

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 38/21



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 97194504.7

A61P 31/00 A61P 31/06

A61P 31/12 A61P 31/14

A61P 31/18 A61P 31/22

A61P 35/00 A61P 37/00

[45] 授权公告日 2004 年 6 月 23 日

[11] 授权公告号 CN 1154508C

[22] 申请日 1997.5.5 [21] 申请号 97194504.7

[30] 优先权

[32] 1996.5.9 [33] AU [31] PN9765

[86] 国际申请 PCT/IB1997/000489 1997.5.5

[87] 国际公布 WO1997/041883 英 1997.11.13

[85] 进入国家阶段日期 1998.11.9

[71] 专利权人 太平洋制药控股公司

地址 澳大利亚新南威尔士州

[72] 发明人 迈克尔·格拉德·托文

审查员 张珍丽

[74] 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限责
任公司

代理人 余刚

权利要求书 2 页 说明书 29 页

[54] 发明名称 干扰素在制备刺激宿主防御机制的
药物中的应用

[57] 摘要

一种刺激哺乳动物体内宿主防御机制的方法，
该方法经口腔粘膜接触将有效量的干扰素提供给哺
乳动物。干扰素的给药量小于经胃肠道外给药时
诱发病理学反应的量。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 干扰素在制备经口腔粘膜接触刺激哺乳动物的宿主防御机制抵御病毒、自身免疫、分枝杆菌、神经退化或寄生虫病的药物中的应用，该药物包含治疗有效量的干扰素，其中所述量从1500IU到 20×10^6 IU，条件是所述量经胃肠道外给药时不在哺乳动物体内诱发病理学反应。
2. 根据权利要求1所述的应用，其中所述药物包含单剂量的干扰素。
3. 根据权利要求1所述的应用，其中所述药物包含足以引起相当于单剂量的刺激作用的多份较小剂量的干扰素。
4. 根据权利要求1至3中任何一项所述的应用，其中所述药物在足以引发相当于使用单一剂的刺激作用的时间里提供无毒剂量的连续给药。
5. 根据权利要求1至3中任何一项所述的应用，其中所述药物包含另一种细胞因子或干扰素诱导剂。
6. 根据权利要求5所述的应用，其中所述药物适合从5000IU到 20×10^6 IU的干扰素的给药。
7. 根据权利要求6所述的应用，其中所述药物适合从 1×10^4 IU到 20×10^6 IU的干扰素的给药。
8. 根据权利要求7所述的应用，其中所述药物适合 1×10^4 IU到 1×10^6 IU的干扰素的给药。

9. 根据权利要求8中任何一项所述的应用, 其中所述药物包括另一种适于同时、分别或后续治疗的治疗剂。
10. 根据权利要求9所述的应用, 其中所述治疗剂是另一种抗病毒制剂。
11. 根据权利要求10中任何一项所述的应用, 其中所述干扰素是I型干扰素。
12. 根据权利要求11所述的应用, 其中所述干扰素选自IFN- α 、IFN- β 、IFN- ω 、复合IFN, 以及它们的混合物。
13. 根据权利要求12所述的应用, 其中所述干扰素是IFN- α 。
14. 根据权利要求10中任何一项所述的应用, 其中所述干扰素是II型干扰素。
15. 根据权利要求14所述的应用, 其中所述II型干扰素是IFN- γ 。
16. 根据权利要求11所述的应用, 其中所述干扰素是重组物质。
17. 根据权利要求16所述的应用, 其中所述宿主防御机制抵御关节炎、糖尿病、狼疮、多发性硬化、麻风、结核、脑炎、克雅氏病、疟疾、宫颈癌、生殖器疱疹、乙型和丙型肝炎、HIV、HPV、HSV-1及HSV-2。
18. 根据权利要求14所述的应用, 其中所述干扰素是重组物质。
19. 根据权利要求18所述的应用, 其中所述宿主防御机制抵御关节炎、糖尿病、狼疮、多发性硬化、麻风、结核、脑炎、克雅氏病、疟疾、宫颈癌、生殖器疱疹、乙型和丙型肝炎、HIV、HPV、HSV-1及HSV-2。

干扰素在制备刺激宿主防御机制的药物中的应用

本发明涉及通过口粘膜给药刺激宿主哺乳动物体内的宿主防御机制对抗引起病理学条件反射的方法。具体地说，本发明可应用于治疗自身免疫病、分支杆菌病、神经退化性疾病、寄生虫病和病毒病的方法。

本发明的背景技术

α 干扰素 (IFN- α) 广泛用于治疗各种各样的疾病，包括白血病、淋巴瘤、与爱滋病相关的卡波西氏肉瘤和肝炎 (Gutterman, J.U., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994 91: 1198-1205)。 β 干扰素 (IFN- β) 已被批准临床用于治疗复发-缓解性多发性硬化症及乙肝病毒的慢性感染。 α 干扰素和 β 干扰素都是 I 型干扰素。虽然通常有许多途径可用于 I 型干扰素给药，包括静脉内、皮下、肌肉内、局部和损伤部位内注射，但是口腔途径尚未使用，因为人们认为干扰素是一种因蛋白水解酶失活的蛋白质，并且在胃肠道内不能以其天然形式吸收。确实有许多研究未能在口服给药后在血液中检测到干扰素 (Cantell and Pyhala, J. Gen. Virol., 1973 20: 99-104; Wills 等人, J. IFN Res., 1984 4: 399-409; Gilson 等人, J. IFN Res., 1985 5: 403-408)。

已显示干扰素诱导剂能够保护小鼠抵御波黑疟原虫 (*Plasmodium berghei*) 疟疾的实验性感染，并且这种保护作用对于孢子引起的感染比对寄生虫的血液形式引起的感染有效得多 (Jahiel 等人, Science. 1986, 16: 1802; Nature, 1968, 220: 710; Amer. J. Trop. Med.

Hyg., 1969, 18: 823)。经腹腔内或静脉内途径注射了在感染新城病毒的小鼠的混合血清中的干扰素的小鼠受到保护使之避免孢子诱发的波黑疟原虫疟疾。然而，来自兔血清的干扰素是无效的。在寄生虫发育的原红细胞阶段（即在接种孢子前3小时或接种后不超过40小时 [Jahiel 等人, Nature 1970, 227: 1350-1351] ）注射干扰素可获得保护作用。

迄今已有许多关于在治疗各种病毒性疾病特别是在治疗流感中作为鼻喷雾剂或口服液体配方给药的小剂量干扰素的效力的轶事性报道。但在大多数报道中，所使用的干扰素制剂都是比较粗制的。用较高剂量鼻内干扰素治疗鼻病毒感染的安慰剂对照试验显示治疗是有效的，但副作用的发病率相当高（ Hayden 等人, J. Infect Dis., 1983, 148: 914-921 ）。同样，虽然有许多包括随机双盲临床试验的研究（ Douglas 等人, New Engl. J. Med., 1986, 314: 65-80; Hayden 等人, New Engl. J. Med., 1986, 314: 71-75 ）已经证明通过鼻饲给药投用高剂量重组干扰素 α 2在抗鼻病毒感染中的效力，但这些研究并没有提供有关全身作用的证据。

最近有一系列专利说明书描述了使用低剂量口服给药的异种来源的干扰素治疗家畜的感染性鼻气管炎（“运输热”）和猫白血病，以及在治疗其他病症、增强疫苗的效力、改善食物利用的效率、以及预防牛泰勒氏梨浆虫病中的用途。分别参阅美国专利 No. 4,462,985、澳大利亚专利 No. 608519、澳大利专利 No. 583332 和美国专利 No. 5,215,741。在这些说明书中，所使用的干扰素都是按 Cantell 的方法制备的、加在磷酸盐缓冲盐水中以每磅体重 0.01 至 5IU 的剂量给药的人 α 干扰素。虽然这些说明书中都提出如此低剂量的经口咽粘膜并优选以适合与口粘膜长时间接触的方式给药的干扰素对各种病症可能是有效的，但除了运输热、猫白血病、犬细

小病毒感染和泰勒氏梨浆虫以外的病症的实验证据大都是轶事性的。

已经有人对近年来有关通过口或口咽粘膜给药的非常低剂量干扰素的效果的研究结果进行了综述（ Bocci, Clin. Pharmacokinet., 1991, 21: 411-417; Critic. Reu. Therap. Drug Carrier Systems. 1992, 9: 91-133; Cummins and Georgiades, Archium. Immun. Therap. Exp., 1993, 41: 169-172 ）。已有人提出这种类型的治疗对于治疗 HIV 感染是特别有用的，并且至少可以改善爱滋病患者的生存质量（ Kaiser 等人, AIDS, 1992, 6:563-569; Koech 等人, Mol. Biol. Ther., 1990, 2:91-95 ）。然而，其他一些报告指出这些治疗并没有提供临床益处。也已有报告了使用包含低剂量干扰素的含片治疗乙型肝炎的阶段 I 的研究结果（ Zeilinska 等人, Archiv. Immunol. Therap. Exp., 1993. 41:241-252 ）。

相反， Brigham 和 Women's Hospital 的国际专利申请 WO 95/27499 指出按充分认定的动物模型如果在诱导抗原之前借助胃管法给药的 β 干扰素至少可以部分地抑制如 I 型糖尿病、多发性硬化症及自身免疫性关节炎等自身免疫病的发展。借助这种途经或腹腔内途径与胃内“旁观者”抗原结合给药的 β 干扰素在诱导耐受性方面甚至更有效。这意味着 β 干扰素在提高口服耐受性的诱导作用中是有效的，而不是在诱导体液或细胞对外源性抗原的反应方面有效。

本发明概述

本发明提供一种借助干扰素经口粘膜给药刺激哺乳动物宿主防御机制的方法。一个方面，可以将本发明看作是一种经口粘膜接触将免疫调节量的干扰素提供给哺乳动物刺激哺乳动物体内免疫反应的方法。

本发明提供一种借助口粘膜接触将治疗有效量的干扰素提供给哺乳动物治疗哺乳动物的自身免疫病、分支杆菌病、神经退化性疾病、寄生虫病和病毒性疾病的方法。干扰素的给药量小于经胃肠道外给药时诱发病理学反应的量。本发明提供治疗诸如关节炎、I型糖尿病、狼疮和多发性硬化症之类的自身免疫病、诸如麻风和结核病之类的分支杆菌病、诸如海绵状脑炎和 Crelltzfeldt-Jakob（克雅氏）病之类的神经退化性疾病、疟疾之类的寄生虫病、以及诸如宫颈癌、生殖器疱疹、乙型和丙型肝炎、HIV、HPV、HSV-1 和 HSV-2 之类的毒病的方法。

口粘膜给药可包括以单次量完成有效剂量干扰素的给药，也可以在足以引发相当于单次量的宿主防御刺激作用的时间里以多次较小剂量完成有效剂量的给药。类似地，有效剂量的干扰素还可以在足以引发相当于单次量的宿主防御刺激作用的时间里连续给药。

实践中，每天给药从大约 1500IU、优选从 500IU，到大约 20×10^6 IU 的干扰素，更优选的是从每天大约 1×10^4 IU 到大约 1×10^6 IU 的干扰素，条件是选定的剂量经胃肠道外给药时不诱发病理学反应，即少于经胃肠道外给药时诱发病理学反应的量。这些剂量范围通常是指人体中的同源干扰素- α 。用特定的干扰素为患者治病的医生将能够很容易地依据本发明识别适当的治疗剂量范围。

在另一个实施方案中，本发明提供适于经口粘膜给药的药物组合物，该药物组合物包括至少一种治疗有效量的干扰素。该组合物可以作为溶液、片剂、锭剂、凝胶、糖浆、软膏或作为经口粘膜的控释给药系统来提供。组合物还可以非必选地包含缓冲剂、稳定性、增稠剂、吸收增强剂和增粘剂等。

在一个实施方案中，该药物组合物是以单位剂量形式提供的，其中含有从大约 1500IU、优选从大约 5000IU 到大约 20×10^6 IU 的

干扰素,更优选的是从大约 1×10^4 IU 到大约 20×10^6 IU 的干扰素,最优选的是从大约 1×10^4 IU 到大约 1×10^6 IU 的干扰素。

在实践中,该方法可以作为单独的治疗手段,也可以作为其他治疗的辅助疗法,还可以使用白介素-2、-12 或-15 之类的其它细胞因子,或使用 IFN 诱导剂。

在实践中,该方法使用 I 型或 II 型干扰素,选自 IFN- α 、 β 、 γ 、 ω 和共有 IFN,优选的是采用重组的 IFN- α 。

本发明的详细叙述

现在将仅仅参照下述定义和实施例详细介绍本发明。文中提到的所有专利和出版物均被并入,以供参考。

定义

文中所述“干扰素”是指包括那些通常用 α 、 β 、 γ 和 ω 命名的干扰素在内的 I 型或 II 型干扰素,以及它们的混合物,包括共有序列。干扰素可从各种商业来源得到,并且已被批准用于治疗多种病症。干扰素可以来自天然的来源,但优选的是重组产品。就本发明的目的而言,术语“干扰素”还包括具有干扰素活性的多肽或其片段,以及在诸如美国专利 No. 5,582,824、5,593,667 和 5,594,107 中揭示的,例如为了在不影响其生物学活性性质的条件下提高稳定性而引入了顺序变体的嵌合或突变形式的干扰素。

虽然人们将会清楚地理解本发明可应用于任何刺激宿主防御机制(即免疫刺激作用)将带来益处的病症,但优选的是所述病症是自身免疫病或病毒感染或寄生虫感染。人们还应当理解就本发明的

目的而言干扰素可以单独使用也可以与另一种药剂或治疗方法结合使用。

干扰素可以非必选地与干扰素合成和释放的诱导剂同时给药。诱导剂可以与干扰素一起给药，也可以分别给药。各种各样的干扰素诱导剂是已知的，例如象 poly I:C 之类的多核苷酸；优选的是使用低分子量的、可口服给药的诱导剂。适用的诱导剂在本领域中是已知的，例如双二乙氨基乙基苄酮 Tilorone(美国专利 No. 3,592,819; Albrecht 等人, J.Med, Chem., 1974 17: 1150-1156) 和喹诺酮衍生物 Imiquimod (Savage 等人, Brit. J. Cancer, 1996 74: 1482-1486)。

本发明的方法和组合物可以非必选地与一种或多种其他疗法结合、治疗特定的病症，并且值班医生或兽医将能够很容易地选择适合该条件的其它疗法。

病毒引起的病症可以是急性或暴发性感染，如鼻病毒、流感、水痘疱疹、带状疱疹、登革热，或包括但不只限于麻疹病毒脑炎、Murray Valley 脑炎、日本乙型脑炎、森林脑炎和 Herpes 脑炎在内的病毒性脑炎；如 Ebola 病毒、Marburg 病毒、粒沙热引起的出血热；Hanta 病毒感染，以及由动物传播给人的其他病毒如马麻疹病毒感染。其中有许多感染目前还没有治疗办法和/或可利用的设苗，并且支持性治疗可能是不够的。另外，病毒引起的病症可能是慢性感染的结果，例如乙型肝炎、丙型肝炎、丁型肝炎或其他病毒性肝炎，以及 CMV、HIV、HPV、以及 HSV-I&II 感染。目前乙型肝炎和丙型肝炎都是用干扰素经胃肠道外给药治疗的；对于已发展成爱滋病的 HIV 感染的长期干扰素治疗正在临床试用之中。

在第二个实施方案中，待治疗的疾病是疟疾，并且再次如上所述的那样实施 I 型和 II 型干扰素的给药。疟疾的病原生物体可以是三日疟原虫 (*Plasmodium malariae*)、间日疟原虫 (*Plasmodium*

vivas)、恶性疟原虫(Plasmodium falciparum)、或卵形疟原虫(Plasmodium orale)。特别期待的是,本发明的方法将阻止疟疾恶化成脑型疟疾。

在第三个实施方案中,本发明提供一种治疗诸如 HIV 感染、类风湿性关节炎及多发性硬化症之类的自身免疫功能障碍(无论是恢复-缓解型的还是慢性进行性的)或治疗爱滋病之类免疫缺陷的方法,该方法包括上述的干扰素给药步骤。

另外,本发明的方法和剂量形式可以与其他治疗联合使用。例如,对于疱疹病毒感染可以用阿若洛韦(acyclovir)或更昔洛(ganciclovir)。对于 HIV 感染,可以使用叠氮胸苷(阿西夫定)或一种或多种其他 HIV 反转录酶抑制剂,和/或 HIV 蛋白酶抑制剂。

在制备本发明的药物组合物时可以使用本领域技术人员熟知的各种用于 IFN 的载体和赋形剂。在 Remington: The Science and Practice of Pharmacy(19th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995)及其较早的版本中教导了有代表性的配制技术。IFN 配方可以包括稳定性增强剂(如美国专利 No. 4,496,537 所介绍的甘氨酸或丙氨酸)和/或的一种或多种载体(如载体蛋白质)。例如,为了给人治病,通常使用药品级人血清白蛋白,并且可非必选地使用磷酸盐缓冲盐水作为稀释剂。在 IFN 的赋形剂是人血清白蛋白时,人血清白蛋白可以来源于人血清,也可以是重组源的。在正常情况下所用的血清白蛋白是同源的。

IFN 可以借助任何使 IFN 与受体的口粘膜腔接触的方式给药。因此,人们将清楚地理解,本发明不限于任何具体类型的配方。本说明书介绍深入口粘膜腔的 IFN 给药;这可以通过液体、固体、气溶胶、以及滴鼻剂或喷雾剂来实现。因此,本发明包括但不只限于液体、气雾剂、糖浆、锭剂、含片和喷雾剂配方。本领域技术人员

将能理解制剂的粒度对气溶胶或喷雾剂的配制可能至关重要，并且知道适合用于调整粒度的方法。

一方面，以每日一次的剂量实施干扰素给药。另一方面，干扰素也可以在一段时间内以多次低剂量方式给药，以使总效果相当于单次高剂量的给药。实现这种给药方式的一种途径是借助附着在或植入到口粘膜腔中并为在一段时间内持续地或受控地释放相当于单次高剂量干扰素设计的装置提供的。

有代表性的适合口粘膜给药的干扰素配方包括下列制剂（所有百分比均为重量百分比）：

片剂：右旋糖 BP 45%；白明胶 BP 30%；小麦淀粉 BP 11%；羧甲基纤维素钠 BP 5%；卵白蛋白 BPC 4%；亮氨酸 USP 3%；丙二醇 BP 2%；和 1×10^6 IU 的 IFN- α 2。片剂可以原样使用并让它在口中缓慢地溶解，也可以溶解在水中并且在需要时含在嘴里与口粘膜保持接触。

干扰素软膏可以象在美国专利 No. 4,615,184 中介绍的那样由甘油 45%、羧甲基纤维素钠 2%、柠檬酸盐缓冲液（PH4.5）25%、加至 100% 的蒸馏水，以及 1×10^6 IU 的 IFN- α 2 制备。干扰素软膏可以粘附在口颊粘膜上。

同样，含漱液或糖浆可以借助在市售的嗽口液或止咳糖浆中添加所需量的干扰素来制备。

在上文提到的特定剂量范围内，在任何个别病例中最佳治疗方案取决于所涉及病症的性质、疾病的阶段、前期治疗、正在继续的其他治疗、该哺乳动物的一般健康状况、治疗对象对干扰素的敏感性等因素，因此将任凭医生或兽医考虑所有这些情况自行处理。疗

程长短当然将随被治疗的病情变化，例如，急性病毒感染（如 Ebola 病毒感染）的治疗可能将涉及不同于治疗慢性病症（如肝炎）的疗程。

本文所揭示的有效剂量是经胃肠道外途径给药时在哺乳动物体内不产生病理学反应的剂量。病理学反应可以是急性的、慢性的或累积性的，并可以由血液化学，例如白细胞减少、骨髓抑制或其他组织学参数的变化体现出来。本文所用术语“病理学反应”包括发烧、不适、或类似流感的症状之类的不良的副反应；血管反应（如静脉炎）；以及在注射部位的局部炎症。从个体对干扰素敏感性的差异来看，这些反应在病人群体中有很大的不同。一种鉴别经口粘膜治疗时可接受的低剂量干扰素的简单试验是依据病人的年龄、体重、症状、病程等因素给病人注射公认可接受的剂量，并确定注射是否产生在此定义的病理学反应，在注射部位的局部刺激作用是最容易判断的标准。如果没有不良反应，相同的剂量就可以经口粘膜给药。如果有不良反应，则应以较低剂量重复实验，直至找到无病理学反应的剂量为止。

对于许多病人来说，预期经口粘膜给药的剂量将与按现已批准的胃肠道外给药议定书已知允许使用的有效剂量差不多是一样的。因此，就具体的病例而言，可接受的干扰素低剂量可以从每天大约 1500IU，优选 5000IU 至大约 20×10^6 IU。更优选的剂量是从每天大约 1×10^4 IU 至大约 20×10^6 IU 干扰素，最优选从每天从大约 1×10^4 IU 到大约 1×10^6 IU 干扰素，条件是該剂量在经胃肠道外给药时不诱发病理学反应。在一个实施方案中，总剂量可以在同样时间里以多次低剂量方式给药，甚至可以从附着在或植入到口粘膜的控释装置以连续或脉动方式给药。

干扰素和干扰素配方

小鼠 IFN- α/β

小鼠 IFN α/β (Mu IFN- α/β) 是由新城疫病毒 (NDV) 诱导的 C243-3 细胞的培养基制备的, 并且象以前介绍的那样 (Tovey 等人, Proc. Soc. Exp. Biol. and Med; 1974 146:809-815) 纯化。在这项研究中使用的制剂具有 4×10^6 国际单位 (IU) /ml 的滴度并且具有 5×10^7 IU/mg 蛋白质的比活性, 这是象以前介绍的那样 (Tovey 等人, Proc. Soc. Exp. Biol. and Med; 1974 146:809-815) 在受疱疹性口腔炎病毒 (VSV) 攻击的小鼠 929 细胞上检测的结果。该制剂比照美国国立卫生研究所 (NIH) 的小鼠 IFN α/β 国际基准制剂 (G-002-9004-5411) 进行标准化处理。

人 IFN- α 1-8

重组的人 IFN- α 1-8 (Hu IFN- α 1-8; BDBB 批号 CGP35269, Ciba-Geigy, Basel, Switzerland) 象以前介绍的那样 (Meister 等人; J. Gen. Virol; 1986 67:1633-1643) 制备并纯化的。在研究中使用的制剂象以前介绍的那样 (Tovey 等人; Nature, 1977 267:455-457) 在受 VSV 攻击的同源的人 WISH 细胞上具有 70×10^6 IU/ml 的滴度, 而在异源的鼠 L929 细胞上具有 1×10^6 IU/ml 的滴度。该制剂比照 NIH 人 IFN- α 国际基准制剂 (G-023-901-527) 和小鼠 IFN α/β 标准 (G-002-9004-5411) 进行标准化。该 IFN 制剂的比活性为 2×10^8 IU/mg 蛋白质。

重组小鼠干扰素- α

重组小鼠干扰素- α 购自 Life Technologies 公司。在这项研究中使用的制剂 (批号 HKK404) 在受 VSV 攻击的小鼠 L929 细胞上检

测时具有具有 6×10^6 IU/ml 的滴度和 6×10^8 IU/mg 蛋白质的比活性 (Tovey 等人; Proc. Soc. Exp Biol Med., 1974 146:406-415) 。

重组小鼠干扰素-β

重组小鼠干扰素-β 购自 R&D Systems 公司。在这项研究中使用的制剂 (批号 1976-01S) 在受 VSV 攻击的小鼠 L929 细胞上检测时具有具有 3.2×10^4 IU/ml 的滴度和 8×10^6 IU/mg 蛋白质的比活性 (Tovey 等人; Proc. Soc. Exp Biol Med., 1974 146:406-415) 。

重组小鼠干扰素-γ

重组小鼠干扰素-γ 购自 R&D Systems 公司。本研究所用的制剂 (2580-03SA) 在受 VSV 攻击的 L929 细胞上检测时具有 2×10^5 IU/ml 的滴度和 1×10^7 IU/mg 蛋白质的比活性 (Tovey 等人; Proc.Soc.Exp Biol Med; 1974 146: 406-415) 。

所有的干扰素制剂同时以相同的检定法滴定，并比照美国国立卫生研究所 (NIH) 的小鼠干扰素 α/β 国际基准制剂 (G-002-9004-5411) 进行标准化处理。

小鼠干扰素 α/β 和重组小鼠干扰素两者均在给药前用 Ferimmune™ 赋形剂重新配制。

赋形剂

干扰素制剂用含有牛血清蛋白质 (BSA) 的磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 稀释。将牛血清血蛋白成分 V (RIA 级, 无免疫球蛋白; 药品批号 A7888; Sigma, VSA) 以 100 μg/ml 的最终浓度溶解在 PBS 中 (pH7.4) 并过滤除菌 (0.2μ, Millex-GV, Millipore, USA) 。

在本文中介绍的实验中，使用专有赋形剂稀释干扰素制剂。所用的赋形剂（Ferimmune harma, Pacific）是以片剂形式供应的，其组成如下：

	% w/w	mg/片
右旋糖（葡萄糖）BP**	44.67***	55.84
明胶 BP**	30.06	37.58
小麦淀粉 BP**	11.31	14.14
羧甲基纤维素钠 BP**	4.96	6.20
卵白蛋白 BPC**	4.03	5.04
亮氨酸 USP	3.00	3.75
丙二醇 BP	1.88	2.35
葡聚糖 40** （作为葡聚糖 40 注射 BP）	0.06	0.08
磷酸钠 BP	0.03	0.04
氯化钠 BP	0.01	0.01
酸式磷酸钠 BP	0.01	0.01
总计	100.02	125.04

** 在无水基础上计算的

*** 推导自：

右旋糖(葡萄糖)BP(无水的) 44.64%

葡萄糖 BP(作为葡聚糖 40 注射剂) 0.03%

将一片溶解于 1.5ml 磷酸盐缓冲盐水中，以 16,000g 离心 15 分钟，然后无菌过滤（0.2 μ ，Millex-GV，Millipore，USA），并在使用前在 4℃ 下贮存。每天在使用前制备赋形剂。

干扰素递送系统

初步的实验结果表明用 P20 Eppendorf 微量移液管将 5 μ l 结晶紫施加到正常成年小鼠的每个鼻孔中，这将导致染料几乎立即分布到口咽腔的整个表面上。在施加染料后约 30 分钟，口咽腔的染色仍很明显。采用同样方式施加带 125 I-标记的重组干扰素 α 1-8，获得基本上相似的结果。所以，这种给药方法被用在所有的后续实验中。

就本说明书中介绍的动物实验目的而言，人们将会清楚地理解，有关 IFN 给药途径的表述“口粘膜”或“口咽”或“鼻内/口”或“鼻内加口”或“in/or”都是指深入鼻腔的 IFN 制剂给药，以使它迅速分布到口粘膜腔内，即受体动物的口和咽部内，以便与该腔的粘膜衬接触。

EMCV (脑心肌炎病毒)

分批：批号 095001

截止日期：1997 年 12 月

制备：使用以前描述的方法（Gresser I. Bourali C, Thomas MT, Falcoff E. 重复接种干扰素制剂对感染脑心肌炎病毒的小鼠的影响，Pro Soc Exp. Biol Med., 1968 年 2 月，127：491-6）在小鼠 L929 的细胞上增殖 EMCV 毒株 JH。

特征：这项研究所用的病毒原液在小鼠 L929 细胞上的滴度为 $5 \times 10^{8.62}$ TCID₅₀。

贮存：在 -70 °C 贮存 EMCV 原液。在病毒滴定的第 1 天断电，被迫暂时转移到温度近似相同的备用库。材料始终保持冻结状态。

在病毒滴定的第 8 天，将-70 °C 的冰箱温度升至-60 °C。即将使用前制备稀释的 EMCV，并存放在冰上或动物室冰箱内备用。

动物

在这项研究中所用的小鼠是从无特异病原体的群体（IFFA CREDO, France）获得的。这些小鼠按照 EEC 标准圈养在无特异病原体的动物试验室内（位于 Institut Federatif CNRS, Villejuif）。

干扰素的生物检定

按照常规方法检定干扰素。简单地说，样品（20 μ l）用 80 μ l 包含 2% 热灭活的胎牛血清（FCS）（Gibco, France）的 Eagle 氏极限基本培养基 MEM（Gibco, France）稀释，并且用多道移液管（Finnpipette, Labssystem, 50-300ml）添加到微量滴定板（Falcon，批号 3072）的每个孔中。将 WISH 或 L929 细胞（ 2×10^4 细胞/孔）添加到包含 2% FCS 的 100 μ l MEM 中并在含 5% CO₂ 的空气气氛（Forma 3029 CO₂ 孵箱）中在 37 °C 下孵化过夜。然后用装有 10 倍物镜的 Olympus IM GLDW 倒置显然显微镜检查细胞的毒性征象。然后，从 1:10 稀释开始以包含 2% FCS 的总体积为 200 μ l 的 Eagle 氏 MEM 对未呈现可检出毒性的样品进行连续的加倍稀释，其方法是用多道移液管将 100 μ l 稀释材料归入每孔包含 100 μ l 新鲜的含 2% FCS 的 Eagle 氏 MEM 的微板上。同时还制备 NIH 人 IFN- α 的参考标准（G-023-901-527）或 NIH Mu IFN- α/β 的参考标准（G-002-9004-5411）的适当的连续加倍稀释液。然后，在适当的环境中用 100 μ l 包含 2% FCS 的 Eagle 氏 MEM 将 WISH 或 L929 细胞（ 2×10^4 细胞/孔）添加到每块板上，并在含有 5% CO₂ 的空气环境中在 37 °C 下保温过夜。然后检查细胞单层的毒性征象并且没有任何显著的毒性，将培养物抽吸出来并用 200 μ l 含有 2% FCS 和 100 TCID₅₀ 的 VSV（WISH 细胞为 2×10^4 VSV₂₃，或 L929 细胞为

10^{-5} VSV₂₃) 的 Eagle 氏 MEM 替代。然后, 将这些板在包含 5% CO₂ 的空气气氛中在 37 °C 下保温过夜。然后, 用 Olympus IM VLWD 倒置显微镜检查细胞单层有无特异病毒的细胞病变作用。干扰素的滴度是由给出 50% 抗特异病毒细胞病变效应的稀释度的倒数确定的, 并且以国际参考单位/毫升 (IU/ml) 表示。

实施例 1 : 经口腔粘膜给药的干扰素的抗病毒感染作用

使小鼠腹腔内感染脑心肌炎病毒 (EMCV) 将引起以累及中枢神经系统和脑炎为特征的迅速恶化的致死性疾病 (Rueckart, R. R., Virology, Fields ed., 705-738, 1985, Raven Press, New York)。无论是预防性给药, 还是在靶器官内已发生病毒复制后给药, 干扰素- α 都显示出在阻止小鼠感染致死性 EMCV 病毒时是有效的 (Finter, N. B., Front of 13: 01., 1973, 2: 135-147)。因此, 在这些研究中, 我们确定经口粘膜给药的低剂量天然或重组 IFN 对注射了致死量 EMCV 的小鼠的存活率的影响, 即采用非常严格的抗病毒活性试验。

象以前介绍的那样 (Gresser 等人, Proc. Soc. Exp. Biol. And Med., 1968, 127: 491-496) 在小鼠 L929 细胞上增殖脑心肌炎病毒株 (JH)。在这项研究 (EMC- α) 中使用的病毒原液在小鼠 L929 细胞上有 $5 \times 10^{8.62}$ TCID₅₀ 的滴度。

用 200 或 2000IU 的 Mu IFN- α/β 或 Hu IFN- α 1-8 经 in/or 途径治疗小鼠延长了感染致死量 EMCV (300LD₅₀) 的小鼠的平均存活时间。在所有的 6 次实验中 (表 1 和表 2) , Hu IFN- α/β 1-8 与 Mu IFN- α/β 同样有效。

在本研究所进行的 9 次实验中有 6 次表明经 in/or 途径给药的 IFN 后导致有统计学意义的延长平均存活时间。此外, 在所有实验中, 总趋势是有效的。

在本研究所进行的 8 次经 ip 途径给药的实验中有 7 次表明经 ip 途径给药（每次注射 200 μ l）导致平均存活时间显著增加（表 1 和表 2）。

直接比较表 1 和表 2 中经 ip 和 in/or 给药的数据可以看出，ip 途径似乎更有效（7/16 例），或者没有显著差异（9/16 例）。

我们的初步数据意味着与每天一次 IFN 给药（表 1 和表 2）相比，经任何一种途径每天两次 IFN 给药似乎在预防小鼠感染方面没有显著提高的治疗效果（表 3）。

表 1
干扰素对感染 ECMV 的小鼠存活率的影响

IFN	剂量 (IU/小鼠)	赋形剂	途径	小鼠数	存活天数	存活率 (%)	平均存活天数
无		无		5	5,5,5,6,6,	0	5.4 ± 0.2
Mu-α/β	10000	BSA	ip	5	...	100	-
Mu-α/β	2000	BSA	ip	5	...	100	-
Mu-α/β	200	BSA	ip	5	7,...	80	-
Mu-α/β	2000	BSA	in/or	5	7,7,7,8,10	0	7.8 ± 0.6
Mu-α/β	200	BSA	in/or	5	7,10,...	60	-
Hu I α-8	2000	BSA	ip	5	...	100	-
Hu I α-8	200	BSA	ip	5	7,10,...	60	-
Hu I α-8	2000	BSA	in/or	5	5,7,11,...	40	-
Hu I α-8	200	BSA	in/or	5	5,7,7,...	40	-

相对于受 EMCV 攻击的第 0 天, 在第-2、-1、0、+1、+2 和+3 天每天一次的干扰素或赋形剂给药。

表 2
结合 IFN- α 进行的预防和治疗对注射了 375LD₅₀EMCV 的 Swiss 小鼠存活率的影响

治疗组	剂量	途径	每组中存活的动物数 (注射后的天数)													
			4	5	6	7	8	9	10	12	13	14	26			
未治疗			5/5	5/5	1/5	0/5										
Mu- α/β	200 IU	in/or	5/5	4/5	4/5	4/5	2/5	2/5	2/5	2/5	1/5	1/5	1/5	1/5	1/5	1/5
Mu- α/β	2000 IU	in/or	5/5	5/5	5/5	4/5	3/5	2/5	2/5	2/5	2/5	1/5	1/5	1/5	1/5	1/5
Hu I α -8	200 IU	in/or	4/4	4/4	3/4	3/4	1/4	1/4	1/4	1/4	0/4					
Hu I α -8	2000 IU	in/or	5/5	3/5	1/5	1/5	0/5									
Mu- α/β	200 IU	ip	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
Mu- α/β	2000 IU	ip	5/5	5/5	5/5	5/5	4/5	4/5	4/5	4/5	4/5	4/5	4/5	4/5	4/5	4/5
Mu- α/β	104 IU	ip	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
Hu I α -8	200 IU	ip	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	4/5	4/5	4/5	4/5	4/5	4/5	4/5	4/5
Hu I α -8	2000 IU	ip	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5

相对于受 EMCV 攻击的第 0 天, 在第-2、-1、0、+1 和+2 天每天两次干扰素给药。

表 3
干扰素剂量对感染 ECMV 后存活率的影响

IFN	剂量 (IU/小鼠)	途径	小鼠数	存活天数	存活率 (%)	平均存活天数
无		in/or	6	4,4,5,5,6,6,	0	5.0 ± 0.4
Hu I α-8	2000	ip	5	15,17,...	60	-
Hu I α-8	200	ip	5	9,10,16,17,17	0	13.8 ± 1.8
Hu I α-8	2000	in/or	5	5,6,7,7,21	0	9.2 ± 2.3
Hu I α-8	200	in/or	5	5,6,6,7,9	0	6.6 ± 0.7

相对于受 EMCV 攻击的第 0 天, 在第 0、+1、+2、+3 和+4 天每天两次干扰素给药。

实施例 2：预防和治疗 EMCV 口服感染的相对效率

在 EMCV 感染当天开始 IFN 治疗并于感染后持续 4 天，或在病毒感染前 4 天开始 IFN 治疗并于感染当天停止用药，用 200 或 2000IU Hu IFN- α 1-8 经 ip 或 in/or 途径治疗的小鼠的平均存活时间相差不大（表 3）。

在借助对数秩 X^2 检验（Mantel, 1966）时，我们的结果表明，经口粘膜途径给药的低剂量 IFN 在统计意义上显著延长了感染致死量 EMCV 的小鼠的存活时间。

实施例 3：口粘膜给药的干扰素抗水泡性口炎病毒的效果

以 10 μ l 体积的 100LD₅₀ 水泡性口炎病毒（VSV）鼻内感染来自无特异病原体的繁衍种群的数组 6 周龄小鼠，每组 10 只（Tovey 等人, Proc Soc Exp Biol Med., 1974, 146: 406-415）。在感染病毒七小时后，将留下的小鼠或不作治疗，或用给定剂量的鼠干扰素- α/β 加在 10 μ l 体积的 Ferimmune 赋形剂中经鼻内/口途径治疗给小鼠进行治疗，每天 1 次，治疗 4 天，或只用 10 μ l 赋形剂进行治疗（对照组）。

用鼠 α/β 干扰素治疗成年小鼠致使感染致死量 VSV 的动物存活率显著增加。因此，在所有未经治疗的或只用赋形剂进行治疗的（对照组）感染上病毒的动物均于第 10 天死亡的情况下，有 30% 经 10,000IU IFN- α/β 治疗的动物在感染致死量 VSV 后存活了 21 天。临床观察表明大多数经干扰素治疗在第 21 天活着的动物将继续活下去。

实施例 4：口粘膜给药的干扰素对细胞蛋白质表达式的影响

已知 IFN- α 在蛋白质与其细胞表面受体结合后诱导许多细胞的蛋白质表达式。有人认为这些蛋白质提供有用的 IFN 作用标志。

我们评价了通过 in/or 途径给药的 IFN 对三种受 IFN 诱导的蛋白质（即 I 类 MHC 抗原、LY 6A/E 抗原和 2'-5'-寡腺苷酸合成酶）表达式的影响。

在经腹腔给药仅 20 IU Mu IFN- α 就在外围血液单核细胞和粒细胞上显著增加 H-2-K^d 抗原表达式的条件下，经 in/or 途径用高达 20,000 IU 的 Mu IFN- α 治疗 DBA/2 小鼠（H-2 K^d）并不显著地增加外围血液淋巴细胞、单核细胞或粒细胞上的 H-2- K^d 表达式。单核细胞上的表达式确实略微受到抑制。

同样，通过 in/or 途径用高达 20,000IU 的 Mu IFN- α 治疗小鼠对 Ly6A/E 抗原的表达式没有显著的影响，而该抗原表达式在经胃肠道外途径用 I 型 IFN 治疗后在各种淋巴样细胞的表面上被显著增强（Damout 等人, J.Immunol., 1986, 137:201-210）。通过 in/or 途径用 200 或 20,000 IU 的 Mu IFN- α 或 Hu IFN- α 1-8 获得相似的结果。

用少至 20 IU 的 Mu IFN- α 经腹腔注射治疗 Swiss 鼠或 DBA/2 小鼠导致在外围血液单核细胞和脾细胞两种细胞中 2'-5'-寡腺苷酸合成酶的活性显著增加。相反，在同一实验中通过 in/or 途径用高达 20,000IU 的 Mu IFN- α 进行治疗的小鼠没有显著地增加 2'-5'-寡腺苷酸合成酶活性的表达式。另外，在开始 IFN 治疗后长达 10 天的时间里在任何受检验的时刻，经 in/or 途径用 200 或 20,000IU 的 Mu IFN- α 或 MU IFN- α 1-8 进行的治疗对 2'-5'-寡腺苷酸合成酶的活性都没有显著影响。

实施例 5：口粘膜给药后干扰素的生物利用率

为了检验 IFN 的生物利用率和药物动力学，用 ^{125}I 标出最高比放射性的单次高剂量的重组 IFN- α 来治疗药物-血液体积比对这种研究最有利的小鼠。

将 $70 \times 10^6 \text{IU}$ Hu IFN- α 1-8 的纯制剂重新溶解在 1.4ml 的 PBS 中，并且象 Mogensen 等人介绍的那样(Int. T. Cancer, 1981, 28:575-582)采用 Hunter 和 Greenwood 介绍的改良氯胺 T 法 (Nature, 1962, 194:495-496)进行碘处理。

^{125}I 标记的 Hu IFN- α 1-8 (批号 CGP35269-1) 在受 VSV 攻击的人体 WISH 细胞上检测时呈现 $2 \times 10^7 \text{IU/ml}$ 的生物学活性，而在受 VSV 攻击的小鼠 L929 细胞上检测时呈现 $1 \times 10^6 \text{IU/ml}$ 的生物学活性。

6 至 7 周龄的雌性 Swiss 鼠用相当于 1×10^6 鼠 IU 的 $2 \times 10^7 \text{IU}$ ^{125}I Hu IFN- α 1-8 ($1.0369 \times 10^7 \text{cpm/小鼠}$) 经 iv、ip 注射或经 in/or 途径治疗。在指定的时间点，每组杀死 3 只鼠，收集血液并确定体积。分离并收集动物的肾、肝、肺、脾和胃/食管，打上印迹，并称重，精确到 $\pm 0.1 \mu\text{g}$ 。利用 γ -计数器分别确定每个样品的放射性。然后，借助离心 ($800\text{g} \times 10$ 分钟, 4°C) 分离全血，收获血清，计数并在 -80°C 下冷冻。然后，如上所述利用标准的生物检定法在人体 WISH 细胞和小鼠 L929 细胞上检测血清的 IFN/含量。然后，借助亲和层析法分离存在于血清样品中的放射性物质，并借助 SDS-PAGE 法进行分析。

在每只鼠静脉注射 $1.0369 \times 10^7 \text{cpm}$ 带 ^{125}I 标记的 Hu IFN- α 1-8 之后 5 分钟，在动物的外围血液中检测到非常高水平的放射性 ($> 2 \times 10^6 \text{cpm/ml}$)。在第 15 分钟和 30 分钟，存在于全血中的放射性

逐步降低。腹腔注射 1.0369×10^7 cpm 的 ^{125}I HU IFN- α 1-8 之后 5 分钟，在动物的外围血液中检测到的放射性的水平大约比静脉注射后检测到的低 20 倍。在注射后第 15 和 30 分钟的放射性水平逐步增加。在经 in/or 途径完成 ^{125}I IFN- α 1-8 给药后第 5、10 或 15 分钟在动物血液中检测到的放射性水平显著低于在腹腔注射相同剂量带放射标记的 IFN 之后的给定时刻经定时间检测到的放射性水平。就所有三种给药途径而言，经 in/or 完成带 ^{125}I 标记的 IFN- α 1-8 给药后，在血清中检测到的放射性水平比在全血中检测到的高。与同样体积的血清相比，每毫升全血中检测到的放射性水平较低反映出在去掉全血中细胞成分之后计数的血清实际体积较大。

如上所述，采用标准生物检定法检测来自这项研究中所有小鼠的血清样品以确定存在带生物活性的 IFN，结果表明在所有试验的时间点上，静脉或腹腔注射 ^{125}I Mu IFN- α 1-8 的所有动物的血清中都有易于检测的带生物活性的 IFN。反之，在经 in/or 途径进行 IFN 给药后在任何试验的时间点在所有动物的血清中都没有检测到带生物活性的 IFN，尽管在这些动物的血清中有较高水平的放射性存在。

为了确定在经 ^{125}I Mu IFN- α 1-8 治疗的动物血清中检测到的放射性物质是否确实代表天然 IFN，样品用蛋白质 A-G 琼脂糖进行免疫沉淀，以便将存在于样品中的免疫球蛋白沉淀出来，用亲和纯化的多克隆抗干扰素- α 的抗体处理后再次进行免疫沉淀。然后，对样品进行上述的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）分析。

对静脉或腹腔注射 ^{125}I MU IFN- α 1-8 后血清中放射性物质进行的 SDS-PAGE 分析揭示出一条均匀的迁移带，其中电泳迁移率与未注射 ^{125}I MU IFN- α 1-8 的完全一致。估计该物质的表现分子量约为 20000 道尔顿，它与天然的 Hu IFN- α 1-8 的分子量完全相符。

完全相符。反之，来自经 in/or 用 ^{125}I Mu IFN- α 1-8 治疗的小鼠的血清样品无一包含任何表观分子量与天然 IFN 的分子量相似的物质，既使在每个凝胶上加入完全相同量的放射性物质。

带放射标记物质的组织分布揭示：在静脉注射 ^{125}I Mu IFN- α 1-8 后 5 分钟，动物的肾脏中有非常高水平的放射性，在肝、肺和脾脏中也有高水平的放射性。随后发现存在于这四个器官中的放射性水平在 15 和 30 分钟逐渐降低。相反，在 15 和 30 分钟时，胃中的放射性水平逐渐增高，达到与静脉注射后 30 分钟时动物血清中存在的放射性差不多的水平。

借助腹腔注射完成 ^{125}I Mu IFN- α 1-8 给药导致在 15 分钟内受检的所有组织中放射性均达到峰值水平，接下来在第 30 分钟降低。类似地，经 in/or 途径完成 ^{125}I Hu IFN- α 1-8 给药导致在 15 分钟后被研究的所有组织中的放射性均达到峰值水平，30 分钟时存在的放射性水平有些下降。经 in/or 途径完成 ^{125}I Hu IFN- α 1-8 给药后存在于胃/食管中的放射性水平比在任何其他器官中检测到的水平高一个数量级，而且显著高于借助静脉或腹腔途径完成同样剂量的带放射标记的 Hu IFN- α 1-8 给药后存在于这些组织中的放射性水平。

实验例 6 鼻内/口内给药后干扰素的药物动力学

为了准确地测定 Hu IFN- α 1-8 的药物动力学，以每只小鼠 1.0369×10^7 cpm 的剂量用 ^{125}I HU IFN- α 1-8 经 iv、ip 或 in/or 途径给小鼠治疗，并在 24 小时期间内的一系列时间点测定在全血和血清中存在的放射性水平。

静脉注射后存在于小鼠血液中的 ^{125}I 标记的 Hu IFN- α 1-8 的药物动力学曲线十分接近对数清除曲线。这个结果与以前利用密切相关的分子(即重组人 α A/D (Bg1))进行的小鼠研究 (Bohoslawed

等人; J. IFN Res., 1986, 6: 207-213)的结果相符。根据浓度时间曲线下的面积计算出的生物可利用物质的量也与人 α A/D 的那个量相似。静脉注射 ^{125}I HU IFN- α 1-8 后观察双相对程清除曲线(其为通过肾脏清除的物质的特征), 结果与实施例6的结果一致。腹腔注射后, 带 ^{125}I 标记的 IFN- α 1-8 的药物动力学与以前报导的肌肉注射 IFN 的结果十分相似。

在经静脉或腹腔注射带 ^{125}I 标记的 IFN- α 1-8 后, 在所有动物的血清中都存在易于检测的带生物活性的 IFN。虽然在带 ^{125}I 标记的 IFN- α 1-8 经 in/or 给药后在动物血清中不能检测到抗病毒活性, 但是在这些动物中仍然观察到有统计意义的抗致死量 EMCV 感染的保护作用(表4)。

表 4
用 125I-IFN- α 进行单一治疗对注射了 EMCV 的 Swiss 小鼠存活率的影响

治疗组	剂量	途径	3	4	5	6	7	8	9	10	15	30
			每组中存活的动物数 (注射后的天数)									
未治疗			6/6	4/6	2/6	0/6						
Hu I α -8	1.4 \times 10 ⁵ IU	in/or	6/6	5/6	4/6	3/6	1/6	1/6	1/6	1/6	1/6	1/6
Mu- α / β	6.4 \times 10 ⁴ IU	in/or	6/6	5/6	5/6	4/6	3/6	2/6	2/6	2/6	1/6	1/6

讨 论

我们用明确定义的急性病毒感染的临床前模型所获得的结果提供了明确的证据支持采用低剂量经口粘膜给药的 IFN 治疗人全身性病毒急性感染的“原理验证”，并且表明在这个模型中多种 IFN- α 子型的天然混合物和单一重组的 IFN- α 异型（如 Mu IFN- α ）两者都发挥有统计学意义的抗病毒活性。天然的 Mu IFN- α/β 和 Hu IFN- α 1-8 经口粘膜给药时似乎是同等有效的。重组 Mu IFN- β 和 Mu IFN- γ 也显示有相似的抗病毒活性。

将给定类型和剂量的 IFN 经口粘膜途径给药时所得到的保护程度与全身给药（腹腔注射）后获得的结果相比较，比较结果表明在某些病例中 IFN 经胃肠道外给药在某种程度上比经口粘膜给药更有效，而在其他病例中则不然。

生物标志试验研究的结果非常清楚地表明三种受试的生物标志（I 类 MHC 抗原、Ly6A/E 抗原、和 2'-5'-寡腺苷酸合成酶活性）都没有充分地反映出经口粘膜途径给药的 IFN- α 所呈现的非常显著的抗病毒活性。

继腹腔内(ip)注射少至仅 20 IU 的 IFN- α 之后开始的所有试验中观察到三种 IFN 诱导的全部蛋白质的表达式中都有非常显著的增加，而多达 20,000IU 的 IFN- α 经口粘膜途径给药后却没有任何可测量的效果，两者之间的反差是显著的。

虽然我们不能排除在较早的或中间的时间点上有可能观察到对一种或另一种生物标志的影响，但是，这种情况似乎是不可能的，因为 IFN 影响这些蛋白质的基因代码的转录，因此人们在 IFN 治疗后只有经过很长的时间才可能看到对这些生物标志的影响。

另外，虽然我们不能排除在用 IFN- α 经 in/or 途径治疗后观察到对许多其他受 IFN 诱导的蛋白质之一的系统影响的可能性，但这似乎不可能，因为这将意味着差动调节某些 IFN 诱导的基因的表达式。然而，完全有可能在 IFN- α 经 in/or 途径给药后在局部（例如在鼻淋巴细胞中）观察到对 IFN 生物标志的影响。

与对所研究的生物标志没有可检测的影响相符，即使在用高达 20,000IU 的 IFN- α 治疗的动物中也没有观察到对任何在 IFN 经口粘膜给药治疗期间所监测的血液学或血液化学参数的一致影响。

药物动力学-生物活性研究的结果很清楚地表明：采用比以前所用方法敏感一个数量级的检测方法，在外围血液中没有可检出的 IFN 循环的条件下，单次量的带放射性标记的 Hu IFN- α 1-8 经口粘膜给药后可获得统计学上有意义的抗病毒效果。与这些结果相一致，经口粘膜给药的 IFN 发挥抗病毒活性的程度似乎遵循经典的剂量-反应关系。

在带 ^{125}I 标记的 IFN- α 1-8 经 in/or 给药之后在动物的全血和血清中都发现容易检测到的带放射性标记的物质。这些结果与以前研究的结果（即在口服大量的未带标记的 IFN 后在动物的血清中仍未检测出 IFN）恰好相反。但是，经 in/or 给药后在全血和血清中检测出的放射性物质是无生物活性的。此外，SDS-PAGE 分析的结果表明这种物质是低分子量的，并且很可能反映继 IFN 在胃和小肠中消化之后对降解产物的吸收作用。在 in/or 给药后带放射性标记的物质的组织分布的分析结果表明胃中的放射性水平明显地高于受检验的任何其他器官。我们的结果十分清楚地表明：即使继 in/or 给药后带生物活性的 IFN 不被吸收，这种疗法仍能在体内发挥有统计意义的抗病毒活性。

虽然不希望使观察到的有益作用受任何现有的机理的束缚，但我们的结果意味着经口粘膜给药的 IFN 借助目前尚不明确的新机制发挥其抗病毒作用，这种机制不包括外源给药的 IFN 的直接作用，或内源性 IFN 的诱导作用。缺乏可检水平的循环 IFN 或缺乏可检水平的三种受检生物标志都支持这一观点。似乎这种机制至少可以部分地借助刺激鼻咽腔和口腔周围丰富的淋巴样组织发挥作用。因为我们已证明经口粘膜给药的 IFN 在效力上至少与全身给药的 IFN 相差无几，所以我们的试验结果强有力的支持在治疗病毒急性感染时经口粘膜途径实施 IFN 给药。这对于 IFN 的临床应用可能有重要意义。

本领域技术人员可以明确看出，虽然为了清晰和便于理解已对本发明作了相当详尽的描述，但是不脱离说明书中公开的本发明的精神和范围可以对本文描述的实施方案和方法作出各种修饰和改动。