



申請日期	86.5.7
案 號	86106145
類別 Int. Cl.	A61K 38/21

(以上各欄由本局填註)

A4
C4

528599

發明專利說明書

一、發明 名稱	中 文	刺激宿主防禦機制以對抗病毒挑戰
	英 文	STIMULATION OF HOST DEFENSE MECHANISMS AGAINST VIRAL CHALLENGES
二、發明 創作人	姓 名	麥可.哲拉得.托維
	國 籍	英 國
	住、居所	法國.巴黎75005拉格蘭之路7號
三、申請人	姓 名 (名稱)	太平洋製藥股份有限公司
	國 籍	澳大利亞
	住、居所 (事務所)	澳大利亞.新南威爾斯22116沙布來登,378灣街,灣邊大廈 6002棟
	代 表 人 姓 名	西維.米勒

裝

訂

線

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大類：
I P C 分類：

A6

B6

本案已向：

奧大利亞 國(地區) 申請專利，申請日期 1996.05.09 案號 PN 9765 ，☒有 ☐無主張優先權

有關微生物已寄存於：

，寄存日期：

，寄存號碼：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

線

五、發明說明()

本發明係關於在哺乳類宿主藉由經口腔黏膜施用干擾素來刺激宿主防禦機制對抗病原條件的方法。特別是本發明可應用至自體免疫，分枝桿菌，神經壞死，寄生蟲性和病毒性疾病的處理方法。

發明背景

干擾素- α (IFN- α) 廣泛地被用於許多病症的處理包括白血病，淋巴癌，AIDS-相關的卡波西氏肉瘤，和肝炎。(Gutterman, J. U. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994 91: 1198-1205)。干擾素- β (IFN- β) 被認可臨床使用於復發-緩和多重硬化和B型肝炎病毒的慢性感染的處理。雖然一些施用途徑，包括靜脈注射，皮下注射，肌肉注射，局部注射，和傷口內注射，通常被用來施用第一型的干擾素，口服途徑還未被一般性地使用，因為干擾素是蛋白質，其被認為會被蛋白質分解酵素所不活化，且其在腸胃道內無法以他們原始形式被適當地吸收。(Cantell and Pyhala, J. Gen. Virol., 1973 20:97-104 ; Wills 等人, J. IFN Res., 1984 4: 399-409; Gilson 等人, J. IFN Res., 1985 5 : 403-408)。

曾顯示干擾素的誘導者能夠保護老鼠以對抗的瘧原蟲 (Plasmodium berghei malaria)實驗性感染，且此種保護作用對抗孢子引起的感染比對抗此寄生蟲的血液形式所

五、發明說明(ノ)

引起的感染更加有效 (Jahiel等人, Science, 1986 16: 1802; Nature, 1968 220: 710; Amer. J. Trop. Med. Hyg., 1969 18: 823)。以腹腔注射或靜脈注射含干擾素之紐加塞疾病病毒(Newcastle disease virus)感染的老鼠血清的老鼠會被保護以對抗孢子引起的瘧原蟲瘧疾。但是, 來自兔子血清的干擾素則沒有效果。當干擾素是在此寄生蟲發育的前紅血球時期之間(例如接種孢子前三小時或是接種後約40小時 [Jahiel 等人, Nature 1970 227: 1350-1351])被注射入可獲得到保護作用。

曾經有過一些低劑量干擾素以鼻腔噴灑或當作口服液體配方的施用法用在一些病毒性條件, 特別是流行性感冒的處理之效果的軼事報導。但是, 在大多數這些報告中所使用的干擾素製備均相當粗糙。高劑量鼻腔內干擾素處理鼻病毒(rhinovirus)的感染之安慰劑-控制(placebo-controlled)試驗顯示此種處理是有效的, 但是有相當的副作用發生率 (Hayden 等人, J. Infect. Dis., 1983 148: 914-921)。相同地, 雖然一些研究包括兩種隨機雙重隱瞞(double-blind)臨床試驗 (Douglas 等人, New Engl. J. Med., 1986 314: 65-80; Hayden 等人, New Engl. J. Med., 1986 314: 71-75)已經顯示經鼻施用高劑量重組的 $\alpha 2$ 在保護暴露的物體對抗鼻病毒感染的效果, 這些研究沒有提供一系統性效果的證明。

最近一系列的專利說明書描述低劑量口服施用異源性

五、發明說明(>)

種類的干擾素的使用於牛的感染性鼻氣管炎(infectious rhinotrachetitis)(shipping fever), 和貓科的白血病貧血的處理, 以及其他條件下的處理, 為了增進疫苗的效率; 為了增加食物利用的效率; 以及為了避免牛科的泰勒氏蟲病(theileriosis)。分別見美國專利申請案件編號4, 462, 985, 澳洲專利申請案件編號608519, 澳洲專利申請案件編號583332和美國專利申請案件編號5, 215, 741。在這些專利說明書中, 所使用的干擾素是藉由 Cantell的方法製備出來的人類干擾素 α , 在磷酸緩衝生理食鹽溶液內, 以體重每磅0.01至5 IU的劑量被施用。這些專利說明書建議如此低劑量干擾素施用於口咽黏膜最好是在一適應長期與口腔黏膜接觸的形式, 才足夠對於相當多條件的處理有效果, 對於牛科鼻氣管炎, 貓科白血病貧血, 犬科小病毒和泰勒氏蟲病以外條件之實驗證明大部份只是軼事。

對於非常低劑量藉由口腔或口咽黏膜施用干擾素之效果的更近研究已經被檢閱 (Bocci, Clin. Pharmacokinet., 1991 21: 411-417; Critic. Rev. Therap. Drug Carrier Systems, 1992 9: 91-133; Cummins and Georgiades, Archivum Immun. Therap. Exp., 1993 41: 169-172)。其建議此種形式的處理對於HIV感染的處理特別有效, 且至少可以增進AIDS病人生活的品質 (Kaiser 等人, AIDS, 1992 6: 563-569;

五、發明說明(4)

Koech 等人, Mol. Biol. Ther., 1990, 2: 91-95)。但是, 其他的報導顯示如此的處理沒提供任何臨床上的助益。一使用包含低劑量干擾素的口服錠劑以處理 B 型肝炎的第一期 (Phase I) 研究也有被報導 (Zielinska 等人, Archiv. Immunol. Therap. Exp., 1993 41: 241-252)。

相反地, 由 Brigham and Women's 醫院所提出的國際專利申請案件編號 W O 9 5 / 2 7 4 9 9 顯示藉由胃管插入法 (gastric intubation) 施用的干擾素 β , 如果在誘導抗原之前給予, 至少能部份抑制自體免疫疾病例如第一型糖尿病和自體免疫關節炎在相當已知的動物模式內發生。藉由此途徑或是腹腔內注射途徑, 所給予的連接上胃內 "bystander" 抗原的干擾素 β 在誘發耐受性上是更有效的。此表示干擾素 β 對於口腔耐受性誘發的增進比起誘發對於外來抗原之體液性或細胞性反應是更有效果的。

發明總論

本發明提供一種在哺乳類動物經由一種干擾素之口腔黏膜施用以刺激宿主防禦機制的方法。在一層面上, 此發明可被認為是在一哺乳類動物藉由經口腔黏膜接觸施用人一免疫刺激量的干擾素以刺激免疫反應的方法。

此發明提供一在哺乳動物體內藉由經口腔黏膜施用人此哺乳動物內一有效治療量的干擾素以處理自體免疫, 分枝桿菌, 神經壞死, 寄生蟲性和病毒性疾病的方法。所施用的干擾素的量比起當經非腸胃道施用引起病理反應的量

五、發明說明(5)

要少。本發明提供處理自體免疫例如關節炎，糖尿病，狼瘡和多重硬化，分枝桿菌疾病，例如麻瘋和結核病，神經壞死症，例如腦炎和 Creutzfeldt-Jakob 症，寄生蟲性疾病，例如瘧疾，以及病毒性疾病，例如子宮頸癌，生殖器疱疹，B 型和 C 型肝炎，H I V，H P V 和 H S V - 1 和 2。

口腔黏膜施用包括在一單一劑量施用一有效劑量的干擾素或是此有效劑量乃在一足以引起宿主相同於單一劑量的防禦刺激時間的期間內以多次較少劑量施用。同樣地，此干擾素的有效劑量能持續地施用在一足以引起宿主相同於單一劑量之防禦刺激的一段期間時間內。

此方法可藉由每天施用從約 1500 IU ，最好是 5000 IU 至約 $20 \times 10^6 \text{ IU}$ 的干擾素，更好是每天從約 $1 \times 10^4 \text{ IU}$ 至約 $20 \times 10^6 \text{ IU}$ 的干擾素，最好是從每天約 1×10^4 至約 $1 \times 10^6 \text{ IU}$ 的干擾素來實行，此選出的劑量當非經腸胃道施用時不會引發病理反應。

在另一個具體事實，本發明提供一為了口腔黏膜施用製藥組成物，其包括至少一種治療有效量的干擾素。此組成可以溶液，藥片，錠劑，膠體，糖漿，軟膏，或是控制釋放的口腔黏膜傳送系統來提供。隨意地，此組成可以包含緩衝液，穩定劑，增稠劑，吸收和黏度增加劑以及相似的東西。

五、發明說明 (6)

在一具體事實，此製藥組成物是以單位劑量來提供的從約 1.5×10^3 IU，最好 5×10^3 IU，至約 2×10^6 IU 的干擾素，更好是從約 1×10^4 IU 至約 2×10^6 IU 的干擾素，最好是從約 1×10^4 至約 1×10^6 IU 的干擾素。

此方法可當作單一的治療步驟或是當作其他治療的附加物，或是與其他細胞素，例如白介素 - 2，12，或 15，與 IFN - 誘發物一起施用。

此方法是使用一種第 I 型或第 II 型的干擾素，選自 α ， β ， γ ， ω ，和相同一致的干擾素，最好是用重組 IFN - α 。

發明詳述

本發明現在將以參考文獻方式只使用以下的定義和實例詳細描述。所有在此所指的專利案件和出版品均以參考文獻來併入本案。

定義

如在此所使用的，“干擾素”指的是一種第 I 型或第 II 型的干擾素，包括那些通常被命名為 α ， β ， γ 和 ω ，以及他們的混合物，包括相同一致的序列。干擾素可自許多商業上的來源獲得且被同意可治療許多徵候。此干擾素可來自自然來源，但是最好是一重組產物。為了本發明

五、發明說明 (1)

的目的，此詞“干擾素”也包括有干擾素活性的多肽和他們的片段，以及干擾素之鑲嵌或突變形式其有引入序列的修飾，例如以增加穩定性，而不會影響到他們生物活性的本質，例如揭露於美國專利編號 5,582,824, 5,593,667, 5,594,107。

雖然將可清楚地明白本發明可應用至任何病理條件，其中刺激宿主防禦機制或免疫性刺激是有益處的，但偏好的病理條件是一種自體免疫疾病或是一種病毒性或寄生蟲感染症。亦將瞭解的是，為了本發明的目的此干擾素可單獨使用或是與其他試劑或處理一起使用。

此干擾素可隨意地與干擾素合成或釋放的誘發物一同施用。此誘發物可與干擾素一起施用或是個別施用。已知有許多干擾素的誘發物，例如多核苷酸如 poly I : C；最好使用低分子量，口服可接受的干擾素誘發物。在此技藝中有已知的適當誘發物，例如 Tilorone (美國申請專利案件編號 3592819；Albecht 等人，J. Med. Chem. 1974 17 : 1150-1156) 以及喹諾酮 (quinolone) 的衍生物 Imiquimod (Savage 等人；Brit. J. Cancer, 1996 74: 1482-1486)。

本發明的方法及組成為了特定的條件可隨機地與一種或更多其他處理結合使用，且參與的醫生或獸醫師將容易地能夠選擇此其他的處理其在此情況下是適當的。

病毒性的條件可能為急性或猛爆性的感染，例如鼻病

五、發明說明(8)

毒，流行性感冒病毒，水痘疱疹，帶狀疱疹，登革熱，或是病毒性腦炎包括但不限制於麻疹病毒腦炎，摩瑞谷(Murray Valley)腦炎，日本B型腦炎，由蟲傳染的腦炎以及疱疹腦炎；出血熱例如艾柏拉(Ebola)病毒，馬柏格(Marburg)病毒，拉撒(Lassa)熱；漢他(Hanta)病毒感染症，以及其他被認為經由動物傳染到人類的病毒感染症，例如馬的麻疹病毒。在這些條件中有許多目前沒有處理方式或疫苗可供利用，且支持性的處理可能不適合。另外病毒性條件可能為慢性感染的結果，例如B型肝炎，C型肝炎，D型肝炎或病毒性肝炎的其他形式，以及CMV，HIV，HPV和HSV I及II感染症。B型肝炎和C型肝炎兩者現今均以非經腸胃道的干擾素來處理；在會導致AIDS的HIV感染症長期處理干擾素目前是在臨床試驗階段。

在第二個具體事實，被處理的疾病是瘧疾，且第I型或第II型的干擾素再一次如上所述被施用。瘧疾的病

原體可能為四日熱瘧原蟲(Plasmodium malariae)，三日熱瘧原蟲(Plasmodium vivax)，熱帶熱瘧原蟲(Plasmodium falciparum)或是卵型瘧原蟲(Plasmodium ovale)。本發明的方法特別被預期將避免瘧疾侵襲到大腦模式。

在第三個具體事實，本發明提供一處理自體免疫不全，例如HIV，風濕性關節炎，和多重硬化，的方法，不

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(9)

論復發－緩和或是慢性發展形式均包括施用如上所述的一種干擾素的步驟。

本發明的方法和劑量形式也可以與其他的處理一起使用。例如，對於疱疹病毒感染可以使用無環腺苷(acyclovir)或無環鳥苷(ganciclovir)。對於H I V感染可以使用疊氮胸苷(azidothymidine (zidovudine))或是一種或多種H I V反轉錄酶抑制劑，以及／或H I V蛋白酶抑制劑。

在製備本發明的製藥組成，可以使用I F N的許多載劑(vehicles)和賦形劑(excipients)，且對於已有技藝的技術人員將會更顯而易見。代表性配方技術在 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995,以及他之前的版本內有教導。I F N的配方可能包括穩定性增進劑，例如甘胺酸和丙胺酸，如在美國專利案件編號4, 496, 537中所描述，和／或一或多種載劑，例如一載劑蛋白質。例如，對於處理人類製藥級的人類血清白蛋白，隨機地會以磷酸緩衝液生理食鹽水當作稀釋液，是通常被使用的。對於I F N的輔藥為人類血清白蛋白時，此人類血清白蛋白可衍生自人類血清或是一重組的來源。一般當血清白蛋白被使用時它將是相同的來源。

I F N可藉由可提供此I F N與接受者口腔黏膜腔接觸的任何方法來被施用。因此可清楚地了解本發明並不被

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(10)

限制在任一配方的特殊形式。本專利說明書描述 I F N 深入口腔黏膜腔的施用法；此可用液體，固體，或是液化氣體，以及鼻滴液或是噴劑來達成。因此本發明包括，但不限制在，液體，噴劑，糖漿，甘味藥片(lozenges)，口腔藥片(buccal tablets)，和噴霧劑配方。在此技藝中熟練的人將知道對於液態氣體或是噴霧器配方所製備的顆粒大小是重要的，且將意識到藉由適當的方法可以修飾顆粒的大小。

在一層面而言，干擾素是以單一劑量被施用的。另外，干擾素是以多次低劑量方式被施用的，所以此淨效果相等於單一高劑量的施用。此種傳送模式的一個方法是藉由一持續或受控制的釋放裝置黏接至或是接入口腔黏膜腔一定量供應且設計為在一時段以相等於單一高劑量的量釋放干擾素。

對於口腔黏膜所使用的干擾素代表性配方包括以下（所有%均為 w / w）：

藥片：葡萄糖 B P 45%；動物膠 B P 30%；小麥澱粉 B P 11%；Carmellose sodium B P 5%；蛋白蛋白 B C P 4%；白胺酸 U S P 3%；丙二醇 B P 2%；和 10^6 I U I F N - α 2。此藥片可以使用且使之慢慢地在口中溶解或可在水中溶解在視需要食入口中。

一干擾素糊狀物可如美國專利編號 4,675,18

五、發明說明 (1 /)

4, 所述, 由甘油 45%, 鈉 C M C 2, 檸檬酸緩衝液 (pH 4.5) 25%, 蒸餾水加至 100%, 以及 10⁶ I U I F N - α 2。此干擾素糊狀物可被黏附至口腔黏膜腔。

同樣地, 一漱口劑或是糖漿可以藉由加入想要的干擾素的量來製備成為商業上可得到的漱口或感冒糖漿配方。

在如上的專一劑量範圍內, 對於任何個體適當的處理決定於所關心之條件的本質, 疾病的階段, 之前的治療; 其他持續性的治療, 此哺乳動物的一般健康狀態, 此生物體對於干擾素的敏感性, 等等, 因此將由熟知所有狀況之醫師或獸醫師自行斟酌。處理的時間長短同樣地也依所處理的條件不同而不同, 例如, 一急性感染的處理, 如艾柏拉 (Ebola) 病毒, 將預期包含一不同於慢性疾病, 例如肝炎, 處理法的處理方式。

在此揭露的有效劑量是當以非經腸道施用時在哺乳動物體內不會產生病理的反應。病理的反應可能為急性的, 慢性的或是累積的, 且可能藉由血液化學的改變而顯示出, 例如白血球減少症, 骨髓凹陷, 或其他組織的變數。如在此所使用的, 病理反應包括不利的副作用, 例如發熱, 不適或似流行性感冒的徵狀, 血管的反應, 例如靜脈炎 (phlebitis), 以及在注射部位局部的發炎反應。如此的反應視個體對於對干擾素的敏感性不同在病人群體中將會相當地不同。定義一對於口腔黏膜治療可接受的低劑量干擾

五、發明說明 (/ >)

素之簡單試驗是注射根據考量其年齡，體重，徵候，病程發展等等推定的可接受劑量於病人體內，並探知是否此注射產生如此處所定義的病理反應，於注射部位有局部的刺激為最容易探知的判斷標準。如果沒有不利的副作用顯示，此相同的劑量可以以口腔黏膜方式施用。如果有一不想要的反應，則此過程將以一較低的劑量重複，直到找到沒有病理反應的劑量為止。

對於許多病人，可預期的是口腔黏膜劑量將與那些在已知在現存認可的非經腸道步驟相當耐受且有用的劑量大約相同。因此，為了專一性的目的，一可接受的低劑量干擾素可能從大約 1.5×10^3 IU，最好是 5×10^3 IU，到約 2×10^6 IU 的干擾素。更好的是此劑量從約 1×10^4 IU 至約 2×10^6 IU 的干擾素，最好是從約 1×10^4 IU 到約 1×10^6 IU 的干擾素，所提供的此劑量是當以非經腸道施用時不會引發病理反應的。在一具體事實，總劑量可以多次低劑量於一段時間內施用，或是可以持續的傳送或以一脈動形式由一受控制的釋放裝置連接至或插入口腔黏膜中。

干擾素及干擾素配方

老鼠 IFN - α / β

老鼠 IFN - α / β (Mu IFN - α / β) 由培

五、發明說明(17)

養的 C 2 4 3 - 3 細胞用紐加塞疾病病毒 (Newcastle disease virus) (NDV) 引發來製備且如先前所描述來純化 (Tovey 等人, Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 1974 146: 809-815)。使用於此研究的製備法可達效價 4×10^6 國際單位 (IU) / 毫升以及專一活性 5×10^7 IU / 毫克的蛋白質如之前所描述在老鼠 9 2 9 細胞用泡狀口炎 (Vesicular stomatitis virus (VSV)) 感染的分析法 (Tovey 等人, Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 1974 146: 809-815)。此製備法是針對國家健康機構 (NIH) 的老鼠 IFN - α / β 之國際參考製備法 (G - 0 0 2 - 9 0 0 4 - 5 4 1 1) 所標準化的。

人類 IFN - α 1 - 8

重組的人類 IFN - α 1 - 8 (Hu IFN α 1 - 8; B D B B l o t n o . C G P 3 5 2 6 9 - 1, Ciba-Geigy, Basel, Switzerland) 如之前所述來製備以及純化 (Meister 等人, J. Gen. Virol., 1986 67: 1633-1643)。在本研究所使用的製備在同源的人類 W I S H 細胞如前所述 (Tovey 等人, Nature, 1977 267: 455-457) 以 V S V 感染時有一效價 70×10^6 IU / 毫升, 且在異源的老鼠 L 9 2 9 細胞有效價 1×10^6 IU / 毫升。此製備法是針對 NIH 的人類 IFN - α 國際參

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(14)

考製備法 (G-023-901-527) 和 NIH 老鼠
IFN- α/β (G-002-9004-5411) 所
標準化的。此所製備的 IFN 的專一活性是 2×10^8 I
U / 每毫克蛋白質。

重組的老鼠干擾素 β

重組的老鼠干擾素 β 由 R & D System Inc. 所販售。
使用於此研究 (lot no. 1976-01S) 的製備法可達效價 3
 $\cdot 2 \times 10^4$ 國際單位 (IU) / 毫升以及專一活性 $8 \times$
 10^6 IU / 每毫克蛋白質，如在老鼠 L929 細胞用 V
SV 感染的分析法 (Tovey 等人, Proc. Soc. Exp.
Biol. Med., 1974, 146: 406-415)。

重組的老鼠干擾素 γ

重組的老鼠干擾素 γ 由 R & D System Inc. 所販售。
使用於此研究 (2580-03SA) 的製備法可達效價 2×10^5
IU / 毫升以及專一活性 1×10^7 IU / 每毫克蛋白質
，如在老鼠 L929 細胞用 VSV 感染的分析法 (Tovey
等人, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1974 146: 406-415
)。

所有的干擾素製備法均自動地以相同的分析法來測效
價且針對美國國家健康機構的老鼠干擾素 α/β (G-0
02-9004-5411) 的國際參考製備法來標準化

五、發明說明(15)

老鼠干擾素 α / β 和重組的老鼠干擾素兩者均於施用之前放入 Ferimmune 賦形劑內。

輔藥

干擾素製備物以磷酸緩衝生理食鹽溶液 (PBS) 包含牛血清白蛋白 (BSA) 來稀釋。牛血清白蛋白片段 V (RIA 級; 無免疫球蛋白; Cat No. A7888; Sigma; USA) 以最終濃度 100 微克/每毫升溶於 PBS (pH 7.4) 內且以過濾法滅菌 (0.2 微米, Millex-GV, Millipore, USA)。

在此所描述的實驗干擾素製備物是稀釋於一有專利的輔藥內。所使用的輔藥如下, 以藥片的形式提供 (Ferimmune, Pharma Pacific):

	% w / w	毫克 / 藥片
葡萄糖 BP **	44.67 ***	55.84
動物膠 BP **	30.06	37.58
小麥澱粉 BP **	11.31	14.14

五、發明說明(16)

鈉 B P **	4 . 9 6	6 . 2 0
蛋白蛋白 B C P **	4 . 0 3	5 . 0 4
白胺酸 U S P	3 . 0 0	3 . 7 5
丙二醇 B P	1 . 8 8	2 . 3 5
聚葡萄糖 4 0 **	0 . 0 6	0 . 0 8
磷酸鈉 B P	0 . 0 3	0 . 0 4
氯化鈉 B P	0 . 0 1	0 . 0 1
酸性磷酸鈉 B P	0 . 0 1	0 . 0 1
總量	1 0 0 . 0 2	1 2 5 . 0 4

** 以無水基礎計算

*** 衍生自：

葡萄糖 (Glucose) BP (無水的) 44.64%

五、發明說明(17)

葡萄糖 BP (如聚葡萄糖 40 注射 BP) 0.03%

單一藥片是溶解於 1.5 毫升磷酸緩衝生理食鹽溶液，以 16,000 g 離心 15 分鐘，之後以過濾法滅菌 (0.2 微米，Millex-GV, Millipore, USA)，並於使用之前儲存於 4℃。輔藥則於每天使用之前製備。

干擾素傳送系統

先前的實驗顯示以 P20 Eppendorf 微量吸管將 5 微升的結晶紫加於正常成鼠的每一個鼻孔內結果幾乎馬上會使得染劑分布於整個口咽腔。口咽腔的染色於施用染劑 30 分鐘之後仍然很明顯。使用 ¹²⁵I 標示的重組人類 IFN- α 1-8 應用於相同的方式會得到相似的結果。此施用的方法因此被使用於所有隨後的實驗中。

為了描述於本專利說明書之動物實驗的目的，將清楚地了解“鼻腔內/口腔內”或是“鼻腔內加上口腔內”或是“鼻腔口腔(in/or)”或是“口腔黏膜”或是“口咽腔”的表現參考 IFN 施用的途徑，會被成為 IFN 製備物深入鼻腔的平均施用法如此他會快速地分布入口咽腔內，也就是接受的哺乳動物口和咽喉，如此可與觀於此腔的黏膜接觸。

動物

使用於本研究的老鼠是由專一無病原種 (IFFA

五、發明說明 (18)

C R E D O , F r a n c e) 所得到的。他們根據 E E C 標準居住在 Villejuif 的 Institut Federatif CNRS 之一專門無病原的動物房內。

干擾素生物分析

干擾素是根據一傳統的方法來分析的。簡言之，樣品 (20 微升) 稀釋於包含 2% 經熱不活化之胎牛血清 (F C S) (Gibco, France) 的 80 微升 Eagle's Minimal Essential Medium (MEM) (Gibco, France) 內並以一多管道的微量吸管 (Finnpipette, Labsystem, 50-300 微升) 加至一微量培養皿內的每個孔內 (Falcon, cat no. 3072)。W I S H 或是 L 9 2 9 細胞 (2×10^4 細胞/每孔) 加於包含 2% F C S 的 100 微升 M E M 內並於 37°C ，在含 5% CO_2 的大氣壓下 (Forma 3029 CO_2 培養箱) 培養隔夜。之後細胞便以配置 10X 物鏡之 Olympus IM GLDW 倒立顯微鏡檢視任何毒性的症狀。沒有呈現出可偵測到之毒性的樣品便進一步進行一系列的兩倍稀釋而以起始 1 : 10 稀釋於總量 200 微升含有 2% F C S 的 E a g l e ' s M E M 內，藉由以多管道微量吸管吸取先前的 100 微升稀釋的物質，放入每孔內含有 100 微升新鮮的含 2% F C S 之 E a g l e ' s M E M 的微量培養盤內。N I H 人類 I F N - α 參考標準 (G - 0 2 3 - 9 0 1 - 5 2 7) 或是 N I H M u I F N -

五、發明說明(19)

α / β 參考標準 (G - 002 - 9004 - 5411) 的適當系列兩倍稀釋液也準備好。在 100 微升含 2% FCS 的 Eagle's MEM 內的 WISH 或是 L929 細胞 (2×10^4 細胞 / 每孔) 之後便加入每一盤內適當地於 37°C 含 5% CO_2 大氣壓下培養隔夜。之後便檢視單層細胞是否有任何毒性症狀，若沒有任何明顯的毒性，則此培養便抽出並以 200 微升含 2% FCS 以及 100 TCID₅₀ 的 VSV (對於 WISH 細胞是 2×10^{-4} VSV₂₃，或是對於 L929 細胞是 10^{-5} VSV₂₃) 之 Eagle's MEM 取代。之後此盤在於 37°C 含 5% CO_2 大氣壓之下培養隔夜。之後此單層細胞以 Olympus IM ULWD 倒立顯微鏡檢視專一性的病毒細胞病理變化。干擾素的效價由針對專一性病毒細胞病理變化有 50% 保護作用的稀釋濃度的倒數來決定，且以國際參考單位 / 毫升 (IU / ml) 來表現。

實例 1 口腔黏膜干擾素對抗病毒感染的效果

以腦心肌炎病毒 (Encephalomyocarditis virus, EMCV) 腹腔內注射入老鼠會產生一快速發展的致死疾病其特徵包含中樞神經系統 CNS 以及腦炎 (Rueckart, R., in Virology, Field ed., 705-738, 1985, Raven Press, New York)。為了預防而施用或是在病毒已經在標的器官內複製之後才施用，IFN- α 均曾經顯示對於保

五、發明說明 ()

護老鼠對抗致死的 EMCV 感染是有效的 (Finter, N.B.; Front. of Biol., 1973 2 135-147)。因此，在這些研究我們決定口腔黏膜施用低劑量自然或是重組的 IFNs 對於注射致死劑量之 EMCV 之老鼠的存活率的效果，換言之，在一非常嚴格的抗病毒活性試驗。

腦心肌炎病毒品系 (JH) 如之前所描述 (Gresser 等人; Proc.Soc. Exp. Biol and Med., 1968 127 : 491-496) 在老鼠 L 9 2 9 細胞繼代。使用於此研究的病毒 (EMC - α) 在老鼠 L 9 2 9 細胞內有 5×10^8 . 6^2 TCID₅₀ 的效價。

以 200 或 2000 IU 的 Mu IFN - α / β 或 Hu IFN - $\alpha 1 - 8$ 經由 i n / o r 途徑來處理老鼠會使得注射過致死劑量 EMCV ($300 LD_{50}$) 的老鼠增加平均存活時間。在所有 6 個實驗中 (表 1 和 2) Hu IFN - $\alpha 1 - 8$ 和 Mu IFN - α / β 一樣有效。

藉由鼻腔口腔途徑施用 IFNs 會造成本研究進行的 9 組實驗中有 6 組的平均存活時間在統計上有顯著的增加。再者，在所有進行的實驗中所有的趨勢均傾向有療效的。

藉由腹腔注射途徑 (每次注射 200 微升) 施用會造成本研究使用腹腔施用的 8 組實驗中有 7 組的平均存活時間有顯著的增加 (表 1 和 2)。

五、發明說明()

表 1

干擾素對於注射EMCV老鼠的存活的影响

IFN	劑量	賦形劑	途徑	老鼠	死亡	存活率	平均死亡天數
	IU/老鼠			數量	天數	%	± 標準偏差
無		無		5	5,5,5,6,6	0	5.4±0.2
Mu- α / β	10000	BSA	腹腔	5	-----	100	-
Mu- α / β	2000	BSA	腹腔	5	-----	100	-
Mu- α / β	200	BSA	腹腔	5	7,---	80	-
Mu- α / β	2000	BSA	鼻腔口腔	5	7,7,7,8,10	0	7.8±0.6
Mu- α / β	200	BSA	鼻腔口腔	5	7,10---	60	-
HuI α -8	2000	BSA	腹腔	5	-----	100	-
HuI α -8	200	BSA	腹腔	5	7,10---	60	-
HuI α -8	2000	BSA	鼻腔口腔	5	5,7,11--	40	-
HuI α -8	200	BSA	鼻腔口腔	5	5,7,7--	40	-

干擾素與輔藥在相對於注射EMCV於第0天的第-2, -1, 0, +1, 和+3天每天施用一次。

五、發明說明 (>X)

表2

用 IFN- α 結合預防和治療對於注射 375 LD₅₀ EMCV

的瑞士老鼠存活率的影響

處理組	劑量	途徑	存活動物數目/每組											
			(注射後天數)											
			4	5	6	7	8	9	10	12	13	14	26	
未處理			5/5	5/5	1/5	0/5								
Mu IFN- α/β	200 IU	鼻腔口腔	5/5	4/5	4/5	4/5	2/5	2/5	2/5	1/5	1/5	1/5	1/5	
Mu IFN- α/β	2000 IU	鼻腔口腔	5/5	5/5	5/5	4/5	3/5	2/5	2/5	2/5	1/5	1/5	1/5	
Hu IFN- α -8	200 IU	鼻腔口腔	4/4	4/4	3/4	3/4	1/4	1/4	1/4	0/4				
Hu IFN- α -8	2000 IU	鼻腔口腔	5/5	3/5	1/5	1/5	0/5							
Mu IFN- α/β	200 IU	腹腔	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	
Mu IFN- α/β	2000 IU	腹腔	5/5	5/5	5/5	5/5	4/5	4/5	4/5	4/5	4/5	4/5	4/5	
Mu IFN- α/β	10 ⁴ IU	腹腔	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	
Hu IFN- α -8	200 IU	腹腔	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	4/5	4/5	4/5	4/5	4/5	4/5	
Hu IFN- α -8	2000 IU	腹腔	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	

干擾素與在相對於注射 EMCV 於第 0 天的第 -2, -1, 0, +1, 和 +2 天每天施用兩次。

五、發明說明 (>7)

表3

干擾素劑量對於注射EMCV老鼠的存活的影響

IFN	劑量 IU/老鼠	途徑	老鼠 數量	死亡 天數	存活率 %	平均死亡天數 +標準偏差
無		鼻腔口腔	6	4,4,5,5,6,6	0	5.4+0.2
HuI α -8	2000	腹腔	5	15,17,---	60	-
HuI α -8	200	腹腔	5	9,10,16,17,1	0	13.8+1.8
HuI α -8	2000	鼻腔口腔	5	5,6,7,7,21	0	9.2+2.3
HuI α -8	200	鼻腔口腔	5	5,6,6,7,9	0	6.6+0.7

干擾素與在相對於注射EMCV於第0天的第0, +1, +2, +3和+4天每天施用兩次。

五、發明說明(24)

由表 1 和 2 的數據很清楚直接比較腹腔注射與鼻口腔施用，腹腔內注射途徑勉強較有效（7 / 16 例子）或是沒有顯著的不同（9 / 16 例子）。

我們初步的數據顯示藉由兩種任一種途徑一天兩次施用 IFN，相較於一天施用一次 IFN（表 1 和 2）顯示不出保護老鼠對抗感染的處理效果有顯著地增加（表 3）。

實例 2 對抗口腔感染 EMCV 之預防及治療處理的相對有效性

以 200 或是 2000 IU 的 Hu IFN- α 1-8 鼻口腔或腹腔處理的老鼠之平均存活時間，當 IFN 處理是開始於被 EMCV 感染的那天及感染後持續 4 天，並不會比當 IFN 是在病毒感染 4 天前處理且於感染當天停止處理之平均存活時間明顯較大（表 3）。

我們的結果顯示藉由口腔黏膜途徑低劑量 IFNs 的施用對於感染一致死劑量 EMC 病毒的老鼠的存活率，以對數 χ^2 試驗（Mantel, 1966）來決定，發揮出一統計上顯著的增加。

實例 3 口腔黏液干擾素對抗泡狀口炎病毒的效果

十組來自專一無病原育種種原的 6 周大老鼠以鼻腔內方式感染體積 10 微升 100 LD₅₀ 的泡狀口炎病毒（

五、發明說明 (5)

V S V) (Tovey 等人, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1974, 146: 406-415)。病毒感染七小時之後老鼠一則留著不處理,或是每天以鼻腔內/口腔途徑處理在10微升的Perimmune賦形劑內之一定劑量的老鼠干擾素 α/β 一次,或是只有10微升的賦形劑(控制組),處理4天。

以老鼠干擾素 α/β 處理成鼠造成感染一致死劑量V S V後動物存活率百分比顯著的增加。也就是,處理10,000 IU的干擾素 α/β 的動物有30%在感染致死劑量之V S V 21天之後是存活的,而其他條件相同下,所有未處理或是以賦形劑處理的病毒感染動物在10天內全死亡。臨床觀察顯示大部份在21天活著的干擾素處理過之動物將會存活下來。

實例4 口腔黏膜干擾素對於細胞蛋白質表現的影響

I F N - α 已知在使此蛋白質與其細胞表面的受體結合後會引發一些細胞蛋白質的表現。這些蛋白質被認為提供I F N作用一有用的指標。

我們評估藉由鼻口腔途徑施用I F N - α 對於三種I F N - 誘發的蛋白質, M H C c l a s s I 抗原, L y 6 A / E 抗原和2' - 5' - 寡腺苷酸合成酶,之表現的影響。

藉由鼻腔口腔途徑處理D B A - 2老鼠(H - 2 K)至20,000 IU的M u I F N - α 並不能顯著增

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (56)

加 H - 2 - K 在周邊血液淋巴球，單核球或顆粒球內的表現，而如 20 IU 般少的 Mu IFN - α 以腹腔方式給予則會顯著地增加 H - 2 - K 抗原在周邊血液單核球和顆粒球兩者的表現。事實上，在單核球上的表現是稍微受抑制的。

相同地，藉由鼻腔口腔途徑處理老鼠至 20,000 IU 的 IFN - α 對於 Ly 6 A / E 抗原的表現並沒有顯著的效果，而其表現在以第 I 型 IFN 非經腸道處理後會顯著的增加於許多類淋巴細胞的表面 (Dumont 等人；1986, J. Immunol, 137: 201-210)。相同的結果可由 200 或 20,000 IU 的 Mu IFN - α 或 Hu IFN - α 1 - 8 經由鼻腔或口腔來達到。

處理瑞士或是 DBA / 2 老鼠如 20 IU 般少的 Mu IFN - α 以腹腔注射方式會造成 2' - 5' - 寡腺苷酸合成酶的活性在周邊血液單核球和脾臟細胞顯著的增加。相反的，在相同的實驗處理老鼠至 20,000 IU 的 Mu IFN - α 經由鼻腔口腔途徑不會明顯地增加 2' - 5' - 寡腺苷酸合成酶的活性。再者，藉由鼻腔口腔途徑處理以 200 或 20,000 IU 的 Mu IFN - α 或 Hu IFN - α 1 - 8 對於 2' - 5' - 寡腺苷酸合成酶的活性在 IFN 處理開始後至第十天內的任何時間試驗點都沒有顯著的影響。

藉由腹腔內注射或是鼻腔口腔施用途徑處理動物至 2

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

錄

五、發明說明(>7)

0, 000 IU 的 Mu IFN- α 對於在四組獨立的實驗之周邊血液樣品的偵測之血液學變數(紅血球數, 血容比, 血紅素含量, 平均細胞容積(MCV), 平均細胞血紅素(MCH), 平均細胞血紅素濃度(MCHC), 網狀細胞數, 總白血球數, 淋巴球, 單核球和多核球包括嗜中性球, 嗜酸性球, 和嗜鹼性球的數目)或是在三個獨立的實驗下偵測之血液化學變數(血液尿素氮量(BUN), 肌氨酸酐(creatinin), 乳酸去氫酶(LDH), 血清麩氨酸鹽草乙酸鹽轉移酶(SGOT), 血清磷酸轉移酶(SGPT), 鹼性磷酸酶, 總蛋白質和白蛋白含量)均不會造成相同一致的影響。

但是, 對於一特定的變數所得到的值, 在一特定的時間點個體動物之間以及在相同實驗內部不同時間點之間可觀察到相當的變化。變化也可以在一個實驗至另一個實驗所得到的值內觀察到。因此在這些情況下在未經處理及經過 IFN 處理的動物之間之特定變數的些微不同將不會被偵測出。但是, 對於血液學和血液化學決定因子所得到的值均落於以前曾發表過正常老鼠的值之內。

這些結果顯示所試驗的三種生物標記均沒有絕對反映出由 IFN- α 口腔黏膜施用所發揮的對抗一系統性病毒感染之顯著的抗病毒活性。

實例 5 經由口腔黏膜施用干擾素的生物有效性

五、發明說明(58)

為了試驗 I F N 的生物有效性以及藥物動力學，對於這些研究有最適合的藥物－血液容積比例的老鼠以單一高劑量處理，標示最高專一放射性活性可能為 1.25×10^5 I 之重組 I F N - α 。

一純的 7.0×10^6 I U 之 H u I F N - $\alpha 1 - 8$ 被放入 1.4 毫升的 P B S 內，且藉由 Mogensen 等人 (Int. J. Cancer, 1981 28: 575-582) 所描述的用 Hunter 和 Greenwood 所描述的 chloramin-T 方法修正法 (Nature, 1962 194: 495-496) 進行碘化。

1.25×10^5 I 標示的 H u I F N - $\alpha 1 - 8$ (lot no. CGP35269-1) 當在感染上 V S V 的人類 W I S H 細胞上分析顯示有 2×10^7 I U / 毫升的生物活性，而在感染上 V S V 的老鼠 L 9 2 9 細胞上分析有 1×10^6 I U / 毫升的生物活性。

六至七周大的母瑞士鼠以靜脈，腹腔注射或是鼻腔口腔處理 2×10^7 I U / 毫升相當於 1×10^6 老鼠 I U / 毫升的 1.25×10^5 I 標示的 H u I F N - $\alpha 1 - 8$ (1.0369×10^7 c p m / 老鼠)。在所顯示的時間點，每一組有三隻老鼠被犧牲，血液被收集並測定其容積。收集腎臟，肝臟，肺臟，脾臟和胃 / 食道並吸乾水分，秤重精確至正負 1.0 微克。每一個樣品的放射性強度個別以 γ 計數器來決定。之後全血藉由離心 ($800 \text{ g} \times 10$ 分鐘， 4°C) 來分離，血清收集起來，計數，並冰凍於 -

五、發明說明 (9)

80℃。血清之後以一標準的生物分析法在如前所述人類 W I S H 細胞以及老鼠 L 9 2 9 細胞兩者內分析 I F N 的含量。出現在血清樣品內之有放射性活性的物質之後藉由吸附免疫沈澱法分離並用 S D S - P A G E 分析。

在藉由靜脈注射具 $1 \cdot 0369 \times 10^7$ c p m / 老鼠之 125 I 標示的 H u I F N - $\alpha 1 - 8$ 於 5 分鐘後動物的周邊血液內可偵測出非常高量的放射性活性 ($> 2 \times 10^6$ c p m / 毫升)。出現在全血的放射性活性的量隨後會於 15 和 30 分鐘漸進地下降。在藉由腹腔注射具 $1 \cdot 0369 \times 10^7$ c p m 之 125 I 標示的 H u I F N - $\alpha 1 - 8$ 於 5 分鐘後動物的周邊血液內可偵測出的放射性活性程度大約比用靜脈注射所偵測到的要低二十倍。放射性活性的程度隨後在注射後 15 分鐘和 30 分鐘時漸進地增加。經過鼻腔口腔施用 125 I 標示的 I F N - $\alpha 1 - 8$ 之後 5, 10 或 15 分鐘之動物的血液內偵測到的放射性活性程度明顯地比藉由腹腔注射相同量之放射性標示的 I F N 一定時間下所偵測到的要來的低。對於所有三種施用途徑, 在隨後以鼻腔口腔施用 125 I 標示的 I F N - $\alpha 1 - 8$ 於血清內要比於全血內偵測到較高程度的放射性活性。每毫升全血相較於相同容積的血清所偵測到較低程度的放射性活性反映出在除去全血內細胞組成後所測得的有效較大容積。

來自此研究所有老鼠的血清樣品均使用如上所述的標

五、發明說明 (70)

準生物分析法來分析有生物活性之 I F N 的存在，且顯示在所有以靜脈或是腹腔注射 125 I 的 H u I F N - α 1 - 8 之動物在所有試驗的時間點其血清內均有容易偵測出的具生物活性之 I F N 的量。相反地，以鼻腔口腔施用 I F N 之任一動物在任一試驗的時間點其血清內均沒有具生物活性的 I F N 被偵測出，雖然在這些動物的血清內有相當高程度的放射性活性存在。

為了測定在以 125 I 標示的 H u I F N - α 1 - 8 處理過的動物血清內所偵測到的放射性活性物質是否真正表示本來的 I F N，樣品均用蛋白質 A - G Agarose 做免疫沈澱，為了沈澱出存在於樣品內的免疫球蛋白，再以吸附 - 純化的多株抗 - I F N - α 抗體進一步做免疫沈澱。之後樣品如上所述進行 S D S - 聚丙稀醯胺膠體電泳。

經靜脈或腹腔注射 125 I H u I F N - α 1 - 8 後在血清內放射性活性物質的 S D S - P A G E 分析顯示有與未注射之 125 I H u I F N - α 1 - 8 相同電泳移動性的單一同源移動帶。此物質明顯的分子量估計大約為 20000 道耳吞，其正好與本來的 H u I F N - α 1 - 8 的分子量一致。相反的，來自以鼻腔口腔處理 125 I H u I F N - α 1 - 8 的老鼠血清樣品沒有包含任何物質有相似於本來 I F N 的分子量，即使在每一片膠體均加入相同量的放射性活性物質。

放射性標示之物質的組織分布顯示在以靜脈注射 125

五、發明說明 (21)

125 I I F N - α 1 - 8 於 5 分鐘後動物的腎臟有非常高量，在肝臟，肺臟和脾臟有高量的放射性活性。存在於這四種器官每一種的放射性活性之後發現在 15 和 30 分鐘會漸進地降低。相反的，在胃的放射性活性程度在 15 和 30 分鐘會漸進地增加，到達一相當於經靜脈注射 30 分鐘後存在於動物血清內的程度。

藉由靜脈注射施用 125 I I F N - α 1 - 8 在 15 分鐘內在所有檢視的組織內均造成放射性活性的高峰量，之後在 30 分鐘會降低。相似地，藉由鼻腔口腔施用 125 I H u I F N - α 1 - 8 在 15 分鐘內在所有檢視的組織內均造成放射線活性的高峰量，在 30 分鐘時在放射性活性的量有一些的降低。經過鼻腔口腔施用 125 I 標示的 I F N - α 1 - 8 存在於胃／食道之放射性活性的程度是比任何其他器官在一程度上來的大，且明顯的高於經非經腸道施用，靜脈注射或是腹腔注射途徑，相同量之放射性標示的 125 I H u I F N - α 1 - 8 之些器官內存在的量。

實例 6 鼻腔口腔施用干擾素的藥物動力學

為了精確地測定 H u I F N - α 1 - 8 的藥物動力學，將老鼠以靜脈注射，腹腔注射或鼻腔口腔施用以 1.0369×10^7 c p m / 老鼠之 125 I 標示的 H u I F N - α 1 - 8，且存在於全血及血清兩者內的放射性

五、發明說明 (ㄅ)

活性的量在 24 小時期間內於一系列時間點進行測定。

經過靜脈注射存在於老鼠血液之 ^{125}I 標示過的 $\text{Hu IFN} - \alpha 1 - 8$ 的藥物動力學圖接近一對數清除曲線。此與以前的研究在老鼠使用一相當有關的分子，重組人類 $\alpha A / D$ (Bg1) 之結果相符 (Bohoslawed 等人；J. IFN Res., 1986 6: 207-213)。計算自濃度對時間的曲線之下的面積所得之生物有效物質的量也同於人類 $\alpha A / D$ 。經由靜脈注射 ^{125}I $\text{IFN} - \alpha 1 - 8$ 可得到一雙相的費時清除曲線，其特色是物質自腎臟被清除，此與實例 4 的結果相符。腹腔注射 ^{125}I 標示的 $\text{IFN} - \alpha 1 - 8$ 之藥物動力學相當近似先前以肌肉注射施用 IFN 所報導的結果。

容易偵測到之具生物活性的 IFN 的程度存在於經過靜脈注射或是腹腔注射 ^{125}I 標示之 $\text{IFN} - \alpha 1 - 8$ 的所有動物血清內。雖然在經鼻腔口腔施用 ^{125}I $\text{IFN} - \alpha 1 - 8$ 的動物血清內沒有偵測到抗病毒活性，然而在這些動物內有觀察到保護對抗致死劑量之 EMCV 的一統計上顯著的程度 (表 4)。

五、發明說明 (33)

表4

以¹²⁵I-IFN- α 單一處理對於注射EMCV的瑞士老鼠存活率的影響

處理組	劑量	途徑	存活動物數目／每組									
			(注射後天數)									
			3	4	5	6	7	8	9	10	15	30
未處理			6/6	4/6	2/6	0/6						
Hu IFN- α 1-8	1.4x10 ⁵ IU	鼻口腔	6/6	5/6	4/6	3/6	1/6	1/6	1/6	1/6	1/6	1/6
Mu IFN- α / β	6.4x10 ⁴ IU	鼻口腔	6/6	5/6	5/6	4/6	3/6	2/6	2/6	2/6	1/6	1/6

討 論

我們在一完整建立之急性病毒感染的前臨床模式內所獲得的結果提供了確定的證明來支持對於使用低劑量口腔黏膜IFN在人類上為了急性系統性病毒感染的治療之“理論證據”，並且顯示自然多重IFN- α 亞型的混合和單一重組IFN- α 同型兩者均在此模式下發揮統計上顯著的抗病毒活性。自然的Mu IFN- α / β 和Hu IFN- α 1-8當以口腔黏膜腔施用時顯示有相同的效果。

當一給定形式和劑量的IFN以口腔黏膜途徑施用與

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(74)

以系統性施用（腹腔注射）所得到的結果做比較來比較所獲得的保護作用程度顯示非經腸道的 I F N 施用法在一些例子勉強較口腔黏膜施用法有效，且在另一些例子裡並沒有較有效。

生物標記引導研究的結果（實例 4）相當清楚地顯示所試驗的三種生物標記（M H C c l a s s I 抗原，L y 6 A / E 抗原，和 2' - 5' - 寡腺苷酸合成酶活性）在藉由鼻腔口腔途徑施用 I F N - α 並沒有一種絕對反映出非常顯著的抗病毒活性。

在所有實驗以腹腔注射如 20 I U 般少的 I F N - α 所觀察到的在所有三者 I F N - 引發的蛋白質的表現有非常顯著的增加，與藉由口腔黏膜途徑施用至 20,000 I U 的 I F N - α 沒有任何可偵測到的效果兩者之間對照是顯著的。

雖然我們不能摒除對於一種或其他生物標記的效應曾在一較早或過渡時間點時被觀察到的可能性，但似乎不太可能如 I F N 作用於編碼這些蛋白質基因的轉錄過程且因此不能期望直到 I F N 處理一些小時之後才看到對任何這些生物標記的影響。

再者，雖然我們不能摒除對於一種或其他許多 I F N - 引發的蛋白質一系統性的影響在以鼻腔口腔途徑處理 I F N - α 後會觀察到的可能性，這似乎不可能，此將暗示特定 I F N - 引發的基因的表現之不同的調節作用。但是

五、發明說明 (25)

，經由鼻腔口腔施用 I F N - α 相當有可能對於一種 I F N 生物標記的影響可能局部地被觀察到，例如在鼻腔淋巴球內。

與在生物標記研究沒出現可偵測得到的效果一樣，對於在口腔黏膜 I F N 治療過程中所偵測得任何血液學或血液化學變數均沒有觀察到一致的效應，即使在處理到 20,000 I U 的 I F N - α 之動物體內。

藥物動力學 - 生物活性研究的結果相當清楚地顯示以口腔黏膜施用單一劑量之放射性標示的 H u I F N - α 1 - 8 在使用比以前所使用要多一個強度敏感的偵測方法下沒有循環 I F N 於周邊血液內偵測到的條件下所獲得一統計上顯著的抗病毒效應。與這些結果相符，藉由口腔黏膜施用 I F N 所發揮的抗病毒活性程度確實顯示依循古典的劑量依賴關係。

在經鼻腔口腔施用 1.25×10^5 I 標示之 I F N - α 1 - 8 之動物的全血和血清兩者內均可發現容易偵測到之程度的放射性標示物質。這些結果與之前的研究結果構成對照，其在以口腔施用大量未標示的 I F N 之後在動物的血清內無法偵測到 I F N。但是，經鼻腔口腔施用後在全血以及血清所偵測到的放射性活性物質是不具生物活性的。再者，S D S - P A G E 分析的結果顯示此物質是低分子量的，且大部份可能反映出是 I F N 於未和小腸經消化作用後的分解產物的吸收作用。分析經鼻腔口腔施用後放射性標

五、發明說明(76)

示的物質之組織分布顯示在胃裡有比在任何其他試驗器官較高程度的放射性活性。我們的結果相當清楚地顯示即使具生物活性的 I F N 沒有在鼻腔口腔施用後被吸收，然而此處理劑量在活體上發揮一統計上顯著的抗病毒活性。

對於所觀察到的有益效應並不期望符合任何已被提出的機制，我們的結果顯示口腔黏膜升用的 I F N 發揮其效應對抗病毒乃藉由一目前尚未闡明的新機制，其並不包含外來施用的 I F N 之直接作用，或是內升 I F N 的引發作用。此可由不存在可偵測到程度之循環 I F N 或是三種生物標記試驗來支持之。他顯示此機制至少部份藉由大量的在鼻咽腔及口腔周圍的類淋巴組織之刺激作用來作用。因為我們已經顯示口黏液 I F N 至少在效果上可與系統性施用的 I F N 相比，我們的結果對於在處理急性病毒感染症以口腔黏膜途徑施用 I F N 提供了強有力的支持。此將對於 I F N 的臨床使用有重要的密切關係。

對於在此技藝熟練的人是明顯的本發明為了始知明白和了解的目的曾在一些詳細地描寫，許多修正或改變對於在此所描述的具體事實及方法在不遠離於此專利說明書所揭露之本發明的概念範圍之下均可以進行。

四、中文發明摘要(發明之名稱：

)

刺激宿主防禦機制以對抗病毒挑戰

藉由口腔黏膜接觸施用至哺乳動物體內一治療性有效量的一種干擾素以在哺乳動物體內刺激宿主防禦機制的方
法。所施用的干擾素的量少於當以非經腸道施用會引發病
理反應的量。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

英文發明摘要(發明之名稱：**STIMULATION OF HOST DEFENSE MECHANISMS)
AGAINST VIRAL CHALLENGES**

A method for stimulating host defense mechanisms in a mammal via administering to the mammal a therapeutically effective amount of an interferon via oromucosal contact. The amount of interferon administered is less than an amount which induces a pathological response when administered parenterally.

訂

線

六、申請專利範圍

適於施用從約 1×10^4 至 20×10^6 I U 的干擾素。

。

9. 根據申請專利範圍第 8 項之干擾素，其中該藥劑適於施用從約 1×10^4 I U 至 1×10^6 I U 的干擾素。

。

10. 根據申請專利範圍第 1 或 2 項之干擾素，其中該藥劑包括另外為了同時，分別或連續治療之治療劑。

11. 根據申請專利範圍第 10 項之干擾素，其中治療劑是另一種抗病毒劑。

12. 根據申請專利範圍第 1 或 2 項之干擾素，其中該干擾素是第 I 型干擾素。

13. 根據申請專利範圍第 12 項之干擾素，其中該干擾素是選自 α 干擾素， β 干擾素， ω 干擾素，一致的干擾素，及其混合物所組成之族群中。

14. 根據申請專利範圍第 13 項之干擾素，其中該干擾素是 α 干擾素。

15. 根據申請專利範圍第 1 或 2 項之干擾素，其中該干擾素是第 II 型干擾素。

16. 根據申請專利範圍第 15 項之干擾素，其中該第 II 型干擾素是 γ 干擾素。

17. 根據申請專利範圍第 1 或 2 項之干擾素，其中該干擾素是一種重組物質。

18. 根據申請專利範圍第 1 或 2 項之干擾素，其中

六、申請專利範圍

該宿主防禦機制對抗關節炎，糖尿病，狼瘡，多重硬化，
麻風，結核病，腦炎，Creutzfeldt-Jakob 症，瘧疾，
頸癌，生殖器疱疹，B 型和 C 型肝炎，H I V，H P V 和
H S V - 1 和 2。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

約

六、申請專利範圍

1. 一種用於製備供在一哺乳動物體內以口黏膜接觸來刺激宿主防禦機制之藥劑之干擾素，該藥劑包括治療上有效量的干擾素，該有效量是從約 1500 IU 至約 $20 \times 10^6 \text{ IU}$ ，其條件為當以非經腸道施用時，該量不會在哺乳動物體內引發病理反應且當病況為鼻病毒時，該干擾素並不以多劑量或連續劑量經口施用引發病理反應。

2. 根據申請專利範圍第1項之干擾素，其中該宿主防禦機制對抗一病毒性，自體免疫，分枝桿菌，神經變性或寄生蟲性病況。

3. 根據申請專利範圍第1或2項之干擾素，其中該藥劑包括單一劑量的干擾素。

4. 根據申請專利範圍第1或2項之干擾素，其中該藥劑包含足夠引起相同於單一劑量的刺激作用之多次較低劑量的干擾素。

5. 根據申請專利範圍第1或2項之干擾素，其中該藥劑提供足夠引起相當於單一劑量的刺激作用之一非毒性劑量在一段時間內的持續施用。

6. 根據申請專利範圍第1或2項之干擾素，其中該藥劑包括另一種細胞活素或是一種干擾素誘發物。

7. 根據申請專利範圍第1或2項之干擾素，其中該藥劑適於施用從約 5000 IU 至約 $20 \times 10^6 \text{ IU}$ 的干擾素。

8. 根據申請專利範圍第7項之干擾素，其中該藥劑