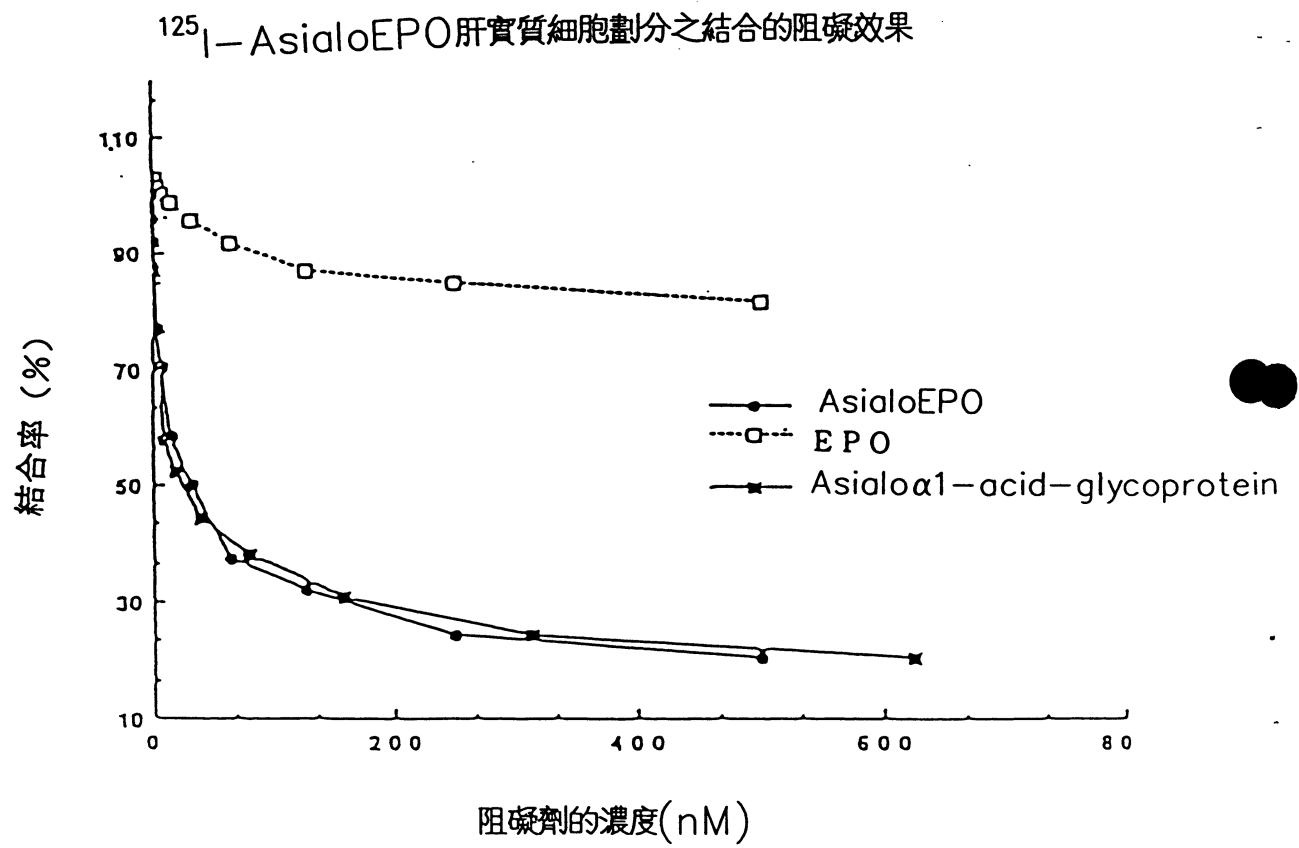
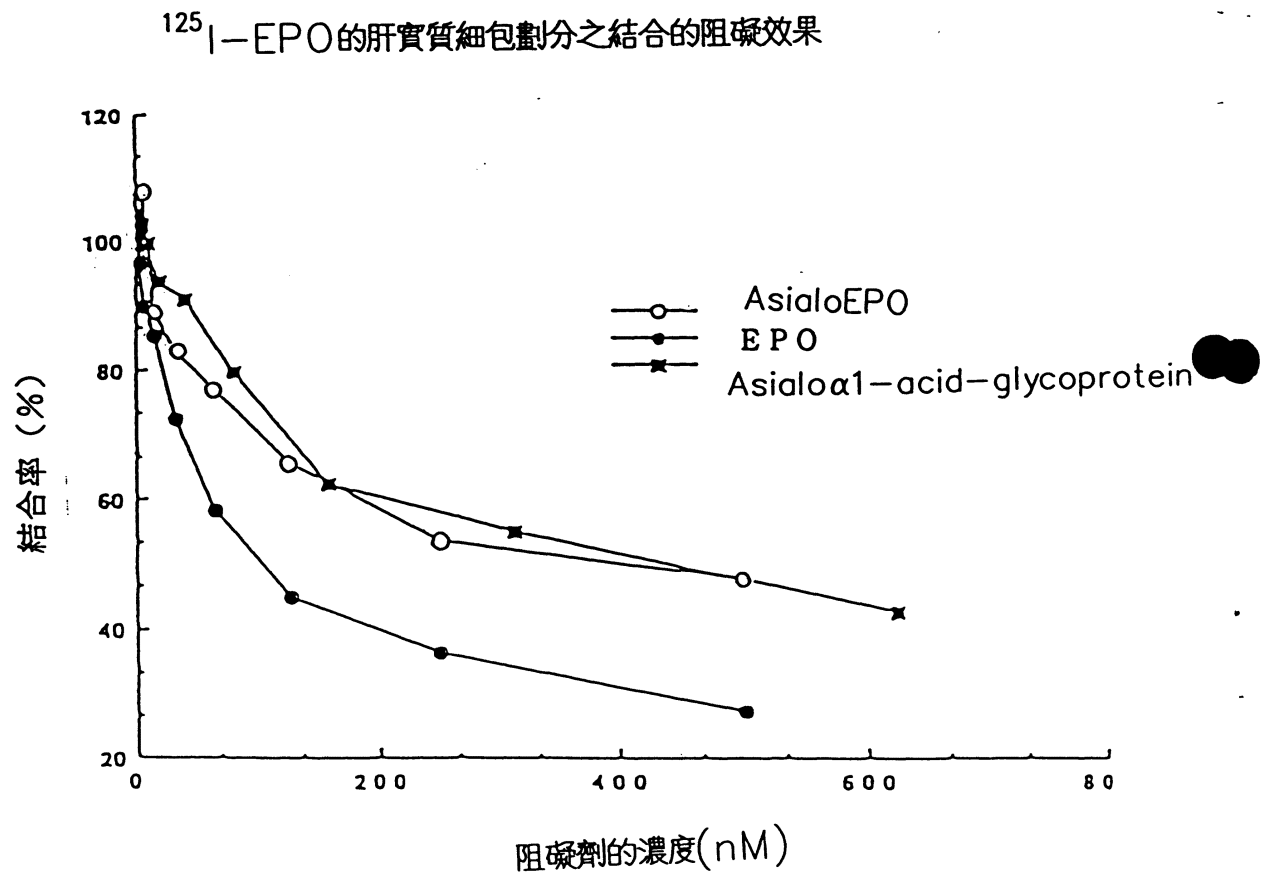
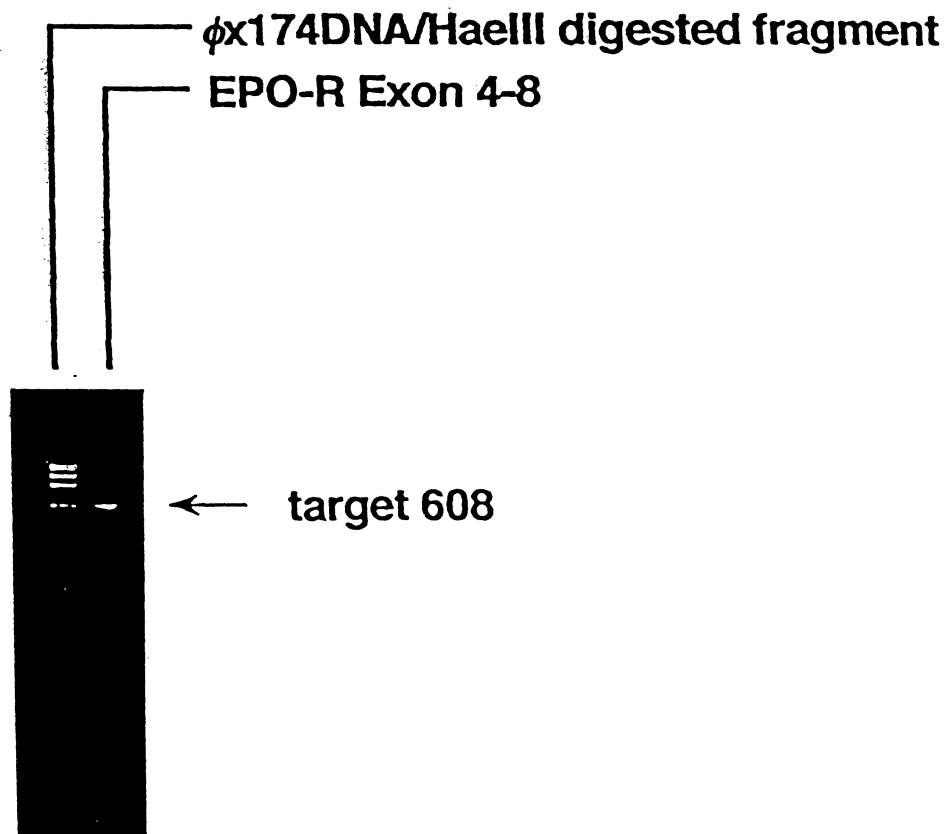




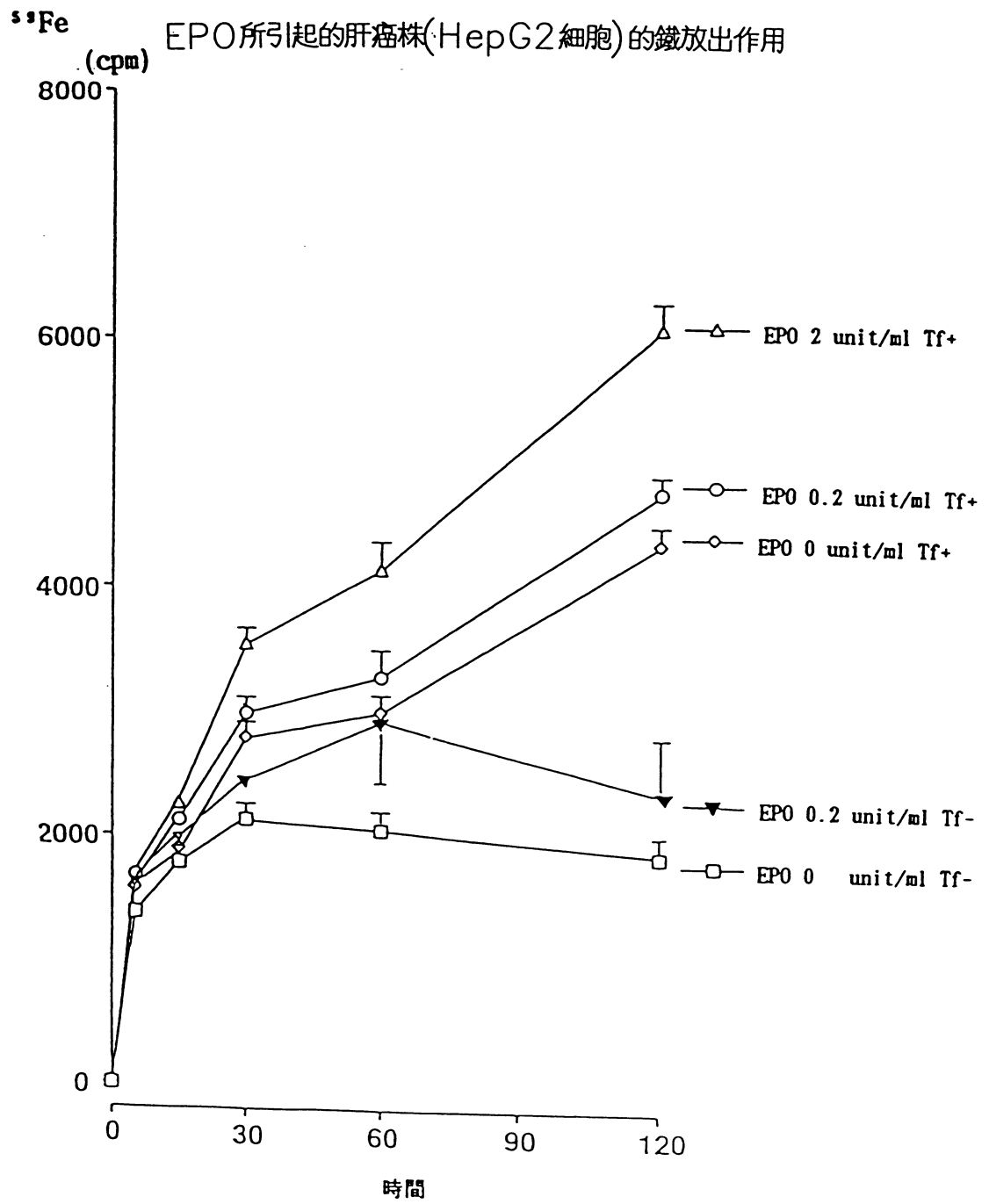
第 1 圖



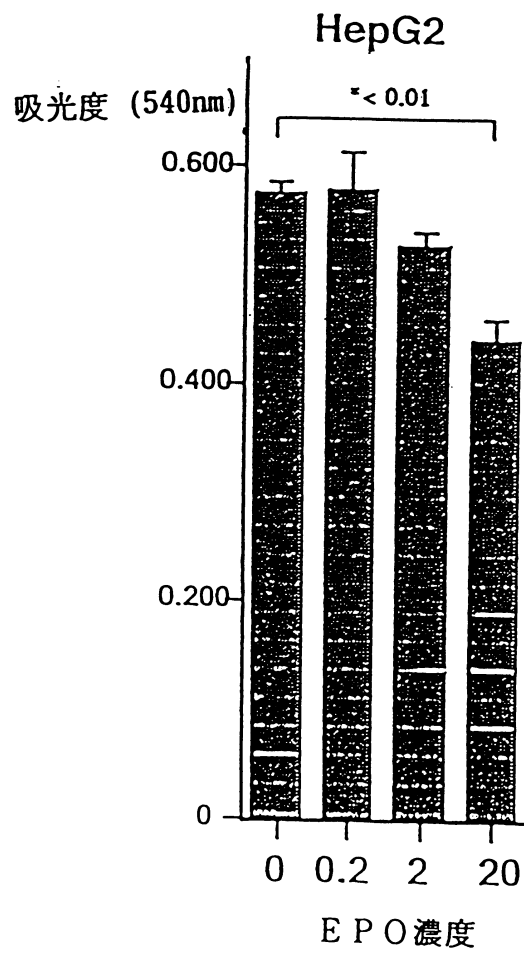
第 2 圖



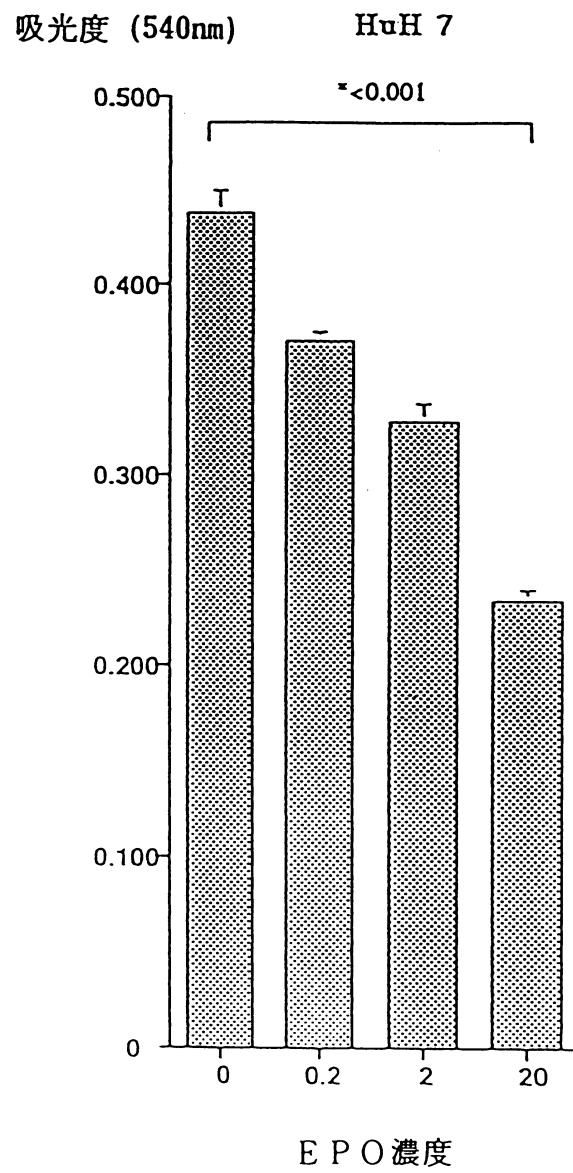
第 3 圖



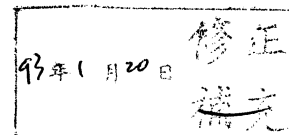
第 4 圖



第 5 圖



第 6 圖



發明專利說明書

586933

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號： 86107017

※ 申請日期： 86.5.24 ※IPC 分類： A61K 38/11

壹、發明名稱：(中文/英文)

治療肝病患者用之藥物組成物

COMPOSITIONS FOR TREATING LIVER-
COMPLAINTS USING EPO

貳、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

中外製藥股份有限公司

CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

代表人：(中文/英文) 永山 治 NAGAYAMA, OSAMU

住居所或營業所地址：(中文/英文)

日本東京都北區浮間 5 丁目 5 番 1 號

國 籍：(中文/英文) 日本 JP

參、發明人：(共 3 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 新津 洋司郎

2. 加藤 淳二

3. 樋口 正人

住居所地址：(中文/英文)

1. 日本北海道札幌市中央區北 3 條西 30 丁目 2-1, 901

2. 日本北海道札幌市中央區南 17 條西 1 丁目 2-10

3. 日本靜岡縣御殿場市駒門 1-135

國 籍：(中文/英文) 1~3. 日本 JP

肆、聲明事項：

☐ 本案係符合專利法第二十條第一項 ☐ 第一款但書或 ☐ 第二款但書規定之期間，其日期為： 年 月 日。

◎本案申請前已向下列國家（地區）申請專利 ☒ 主張國際優先權：

【格式請依：受理國家（地區）；申請日；申請案號數 順序註記】

1.日本；1996/06/20；平成8年特許願第160320號

2.

3.

4.

5.

☐ 主張國內優先權(專利法第二十五條之一)：

【格式請依：申請日；申請案號數 順序註記】

1.

2.

☐ 主張專利法第二十六條微生物：

☐ 國內微生物 【格式請依：寄存機構；日期；號碼 順序註記】

☐ 國外微生物 【格式請依：寄存國名；機構；日期；號碼 順序註記】

☐ 熟習該項技術者易於獲得，不須寄存。

玖、發明說明：

本發明是有關治療肝病患者用之藥物，特別是有關於一種將紅血球生成素做為有效成分的治療肝病患者用之藥物。

慢性肝炎、肝癌以及肝硬化等肝病與肝內鐵離子過剩有密切的關係。而此藥物是有關藉由瀉血療法的合併使用，從肝細胞抽取出過剩的鐵離子，將其離子數減少，改善肝機能的治療肝病患者用之藥物。

慢性肝炎會轉成肝硬化、肝癌之嚴重肝病，大部分是由 C 型肝炎病毒(HCV)感染所引起。目前對於 C 型慢性肝炎是採干擾素(IFN)療法。此種療法不僅有嚴重副作用，投藥期間也需長達 4~6 個月，並且治療效果有限。例如，有人針對干擾素療法的效果與 C 型肝炎病毒的性狀做了一個下述的研究報告。

干擾素療法針對遺傳子型 III 型的病毒(在日本佔 1~2 成)能呈現顯著療效，但對在日本佔 7 成以上的 II 型病毒卻只出現 20~30%的反應。[飯野等、最新醫學、99、2225 (1993)]。因此，針對使用干擾素療法無效的患者，開發新的治療法是被殷切盼望。

本發明是使用發病之初為慢性肝炎之肝癌動物(LEC 老鼠)來研究肝障礙發病症狀構造。在研究過程中發現，如以含有銅、鐵等金屬離子的普通飼料飼養 LEC 老鼠的話，會引起劇烈的肝銅濃度及肝鐵濃度上昇，且突發性肝炎發病的比率很高。相反地，如以欠缺鐵的食物飼養的話，

雖然肝銅濃度是和用普通飼料飼養時一樣劇增，但是肝鐵濃度的上昇很少，所以不被認定是突發性肝炎的發病。

由以上可得知，肝內異常增加的鐵離子是直接引起肝障礙的主要原因[小船等人、第 53 回日本癌症學會總會摘要集、第 91 頁、1994 年]。事實上，也有可利用瀉血去除鐵離子使 C 型慢性肝炎趨向緩和，以及可藉由瀉血使 IFN 不反應性改變成反應性的報告。可是，急遽的瀉血對降低肝鐵濃度雖然有效，但會引起患者貧血，全身症狀惡化，導致持續性的治療難以進行。另外，如為避免患者嚴重貧血，採控制性的進行瀉血的話，要使治療達到充分效果必需花上 1~2 年的長期時間。但是由於慢性肝炎大多會移轉成肝硬化、肝癌，所以發明一種盡可能可以快速地改善肝機能的治療法是大家急切盼望的。

曾有報告指出癌物質的抗原之一是 transferrin receptor [Tr owbridge, I.S. and Omary, M.B., Proc. Natl.Acad.Sci.USA.78 3039-3043,(1981)]，另外本發明的一部分發明者也發表說 transferrin receptor 富含於活潑地分裂增殖的癌細胞上。因此 transferrin receptor 是反映細胞增殖能和癌症的惡化度的標記[J. Jpn. Cancer Ther. 21(3),641~646, Apr. (1986)]。而藉由此發表也顯示出癌細胞的活潑增殖需要大量的鐵離子。

另一方面，為了改善腎機能障礙所引起的慢性貧血，醫學上採用輸血法，但是藉此輸血將引發血色素症。據研究報告，要治療此血色素症，可投給貧血性的血液透析患

者紅血球生成素，並藉由瀉血使貯藏鐵和血清鐵減少(特公平 6-9231)。但是在研究報告中，關於肝病患者，特別是慢性肝炎患者和肝癌患者的肝機能應如何改善，完全沒有記載。

因此本發明之目的，在於將肝鐵代謝與紅血球生成素的關係明白化，同時，提供一種將紅血球生成素做為有效成分的治療肝病患者用的藥物。

為達成本發明之上述和其他目的，本發明提供一種治療肝病用之藥物，將 EPO 做為有效成分，使患肝病之哺乳動物肝內過多的鐵離子減少，以改善該哺乳動物肝機能。此藥物對鐵離子過多所引的慢性肝炎、肝癌和肝硬化等具有療效。另外，將該藥物的投給和瀉血療法併用，除了可避免患者因瀉血引起貧血之外，還可促進排泄肝細胞之過多的鐵離子。又對於 IFN 療法不見效果的 C 型慢性肝炎患者，以本發明之藥物改善其肝機能之後，再進行一般的 IFN 療法的話，可達到治療該肝炎的效果。

為讓本發明之上述和其他目的、特徵、和優點能更明顯易懂，下文特舉較佳實施例，並配合所附圖式，作詳細說明如下：

圖式之簡單說明：

第 1 圖是 AsialoEPO、EPO 及 Asialo α 1-acid-glycoprotein 對 ^{125}I -AsialoEPO 肝實質細胞(AMLC)？劃分之結合的阻礙效果測量圖。

第 2 圖是 AsialoEPO、EPO 及 Asialo α 1-acid-

glycoprotein 對 ^{125}I -EPO 肝實質細胞劃分(AMLC)之結合的阻礙效果測量圖。

第 3 圖是於人體肝癌細胞株(HepG2 細胞)發現的 EPO 受容體 mRNA 之 PCR 產物的 agarose gel 電泳圖。

第 4 圖繪示藉由 EPO 所引起的肝癌細胞株(HepG2 細胞)的鐵放出作用。

第 5 圖繪示 EPO 對抑制肝癌細胞株(HepG2 細胞)增殖的效果。

第 6 圖繪示 EPO 對抑制肝癌細胞株(HUHG7 細胞)增殖的效果。

解決課題所採用之方法

本發明的發明者們，為了解決上述課題幾經研究的結果，第一次得到以下的發現。紅血球生成素透過某種特殊的受容體，直接加速從肝細胞釋放出鐵，使肝內過多的鐵離子減少。藉此，發現了紅血球生成素有改善慢性肝炎和肝癌、肝硬化等肝病患者之肝機能的作用。

另外，本發明的發明者們還得知藉由併用紅血球生成素的投給和瀉血療法，不會引起患者過度的貧血，不僅安全且可於短期間內改善肝機能。除此之外，藉由紅血球生成素可抑制癌化之肝細胞的增殖。

如上所述，本發明是將紅血球生成素做為有效成分，減少患有肝病之哺乳動物肝內的過剩鐵離子，改善該哺乳動物之肝機能的治療肝病患者用的藥物。

以下為本發明的詳細說明。

發明的實施情形

本發明之藥物的有效成分紅血球生成素是分子量(外觀)約 36,000 Dalton 的糖蛋白質，具有使紅芽球系前驅細胞分化成紅血球作用。從人類的尿液等精製出的天然紅血球生成素可使用於眾所周知的各種東西上，例如，經由遺傳工程取得的改換紅血球生成素及其改變體等(特公平 1-44317、特公平 2-17156 等)。

將上述的紅血球生成素做為藥物時，雖然其可單獨溶解於生理食鹽水，但是通常都是將其與人類血清白蛋白、甘露糖醇一起溶於生理食鹽水中。較佳的是和 0.01~0.1%（重量百分比）的人類血清白蛋白以及 1~1.5%（重量百分比）的 D-甘露糖醇一起溶於生理食鹽水。

於上述的生理食鹽水中，可也適當地添加醫藥上容許的安定劑、PH、浸透壓等之調整劑。

本發明之藥物的投藥量依症狀程度、治療對象的年齡、體重而異，但是就有效成分紅血球生成素於治療上的有效量而言，以改換紅血球生成素為例的話，較佳的是 10~10,000 Unit/kg 體重的範圍。另外，如果是和下述的瀉血療法併用的話，其投藥量較佳的為 10~2,000Unit/kg 體重的範圍。

於本發明，因為紅血球生成素的投給會促使紅血球增加，所以和瀉血療法等除血方法併用，去除過多的紅血球是理想的作法。所謂瀉血療法，舉例而言是對肝炎、肝癌、肝硬化等患者，在進行約 200ml/回的瀉血之後，投給本發

明的藥物。藉此方法，不僅可避免患者因瀉血併發貧血，還可促進排泄肝細胞中過多的鐵離子。

本發明之藥物所能治療之疾病是因肝細胞鐵離子過多而引起的肝病，例如，慢性肝炎、肝癌以及肝硬化等。而慢性肝炎，大多是藉由 C 型肝炎病毒感染的疾病。例如，C 型慢性肝炎和 C 型突發性肝炎等。

實施例

以下是利用試驗例、實施例將本發明具體地做一說明，但本發明非僅限於此。

[試驗例 1] 紅血球生成素(EPO)對肝細胞之結合能力的測量

將依照 Indogen 法[Franks, P.J. and Speck, J.C. Jr., Biochem. Biophys. Res. Commun. 80,849-857 (1978)]製造的 ^{125}I -EPO 及 ^{125}I -EPO 放在 0.05N 鹽酸存在下，進行 80°C、60 分鐘的處理。之後用所得之 ^{125}I -AsialoEPO，測量其對於肝實質細胞表面的結合能力。結合能力的測定是依照一般的方法[Higuchi, M. et al., J. Biol. Chem., 267,7703-7709(1992)]進行。

首先，在藉由膠原灌流法得到之老鼠肝實質細胞(AMLC)劃分上添加 0.5nM 的 ^{125}I -Asialo EPO，然後測定 Asialo EPO、EPO 及 Asialo α 1-acid-glycoprotein 對 ^{125}I -AsialoEPO 之肝實質細胞劃分的結合阻礙效果。

其結果如圖 1 所示。從圖 1 可得知 ^{125}I -AsialoEPO 結合於肝實質細胞劃分，並且 AsialoEPO 及 Asialo α 1-acid-

glycoprotein 對於 ^{125}I -AsialoEPO 的結合阻礙度大致相同，但 EPO 的結合阻礙效果卻不明顯。這項結果顯示，對於 ^{125}I -AsialoEPO 肝實質細胞劃分的結合，並非透過 EPO 受容體，而是一種對 Asialo 糖蛋白質受容體的結合。

另外，Asialo EPO、EPO 及 Asialo α 1-acid-glycoprotein 對 ^{125}I -EPO(0.5nM)之肝實質細胞劃分的結合，測定結果是如圖 2 所示。EPO 的阻礙效果最強，而 AsialoEPO 及 Asialo α 1-acid-glycoprotein 只呈現局部性的阻礙效果。

以上結果顯示，EPO 雖然藉由肝實質細胞劃分之 sialidase 活性，部分結合於被 Asialo 化的 Asialo 糖蛋白質受容體，但是和 Asialo 糖蛋白質受容體不同之 EPO 特殊的受容體之存在是被所証實。

[試驗例 2] 於人體肝癌細胞株發現 EPO 受容體

利用 RT-PCR 法，測定人體肝癌細胞株(HepG2 細胞)之 EPO 受容體 mRNA。按照 J.E. Badley et al., Bio Techniques, Vol. 6, No.2, 114-116(1988)所記載之方法從 HepG2 細胞所作出的 mRNA。之後，再利用將 d(T)12-18(Pharmacia Biotech 公司製)做為 Primer 使用的逆轉寫反應，從 mRNA 製造 cDNA。

接著使用下述的 Primer，依 Y. Nakamura et al., Science Vol. 257,21,p.1138-1141(1992)所記載之方法進行 PCR。

Sense : THA GAC ACC CAT GAC GTC TCA

anti-sense : TGT CCA GCA CCA GAT AGG TA

以 1.5% agarose gel 電泳分析所得之 PCR 產物 (EPO-R Exon 4-8) 的結果，如圖 3 所示，EPO 受容體 mRNA 的全長為約 608bp 的 band。而該結果也顯示出於 HepG2 細胞上有正常機能的 EPO 受容體。

[試驗例 3] 藉由 EPO 將肝細胞的鐵放出之作用

以 24well cell culture cluster 培養 HepG2(2×10^5 cell/well、含有 10% FCS、5% CO_2 、 37°C)。接著添加 $^{59}\text{FeCl}_3$ 90,000cpm，以 37°C 培養 24 小時。

培養終了後，用 FCS free MEM 洗淨細胞 3 次，添加定量的 EPO(0、0.2、2 unit/ml) 及/或 Apotransferrin (Tf)(0、100 $\mu\text{g/ml}$)，之後測定肝細胞之 ^{59}Fe 的放出量。其結果如圖 4 所示。從圖 4 可得知，HepG2 細胞的 ^{59}Fe 放出量是隨著 EPO 的濃度增加而升高。

從以上的結果可得知，EPO 是直接對肝細胞產生效應讓細胞內的鐵放出，並且透過在肝細胞所發現之受容體，傳達加速鐵放出的信號。另外，由以上結果也顯示鐵放出的路徑至少和 transferrin(運鐵蛋白)有關係。

[試驗例 4] EPO 對抑制人體肝癌細胞株增殖的效果

使人體肝癌細胞株 HepG2 細胞及 HuH7 細胞各懸濁於含有 2.5% FCS 的 MEM 培養皿和 RPMI 培養皿，並調整其細胞數為 1×10^4 cell/well(96 well/dish)，在 5% CO_2 的條件下，以 37°C 培養 3 天。從培養的第一天開始，於 0~20unit/ml 的範圍內添加 EPO。培養終了後，以 MTT 法測量細胞數，調查 EPO 對人體肝癌細胞株增殖的作用。

其結果如圖 5 及圖 6 所示。從兩圖可看出 EPO 對 HepG2 細胞及 HuH7 細胞有明顯的抑制增殖效果。

[試驗例 5]

對干擾素無效的 C 型慢性肝炎患者，而且是過去 6 個月的血清 GPT 活性超過正常範圍的患者，以一次 200ml 的瀉血量，一週一次持續 12 週的進行瀉血，並且在每回瀉血後於皮下投給 24,000IU 的 EPO。

從第一次瀉血後，每週測量血清 GPT 活性及血紅蛋白濃度，並且隔週測量血清鐵蛋白。其結果與瀉血量是如表 1 所示。

	瀉血量 (ml)	Hb (g/dl)	GPT(U)	鐵蛋白 (ng/ml)
0 週	200	14.8	84	293
1 週	200	14.6	89	-
2 週	200	14.1	69	79
3 週	200	15.1	73	-
4 週	400	14.1	62	
5 週	400	13.4	64	-
6 週	200	12.6	56	
7 週	200	13.0	63	-
8 週	0	12.1	47	
9 週	200	11.4	23	-
10 週	0	11.5	28	
11 週	200	11.2	21	-
12 週	-	10.6	26	14

表一

由表 1 可清楚得知，從瀉血療法開始 2 週後，血清鐵蛋白值是顯著下降，並且在那之後的肝炎指標血清 GPT 活性也降低，且在瀉血療法開始的 9 週後降至正常範圍，

之後是取得維持。另外，於試驗期間血紅蛋白濃度是由於 EPO 的投給，維持在大約 11.Og/dl。

藉由 EPO 的投給，瀉血量可於 12 週間採取 2400ml，且可不致引起貧血症狀地除去過多的鐵。

[實施例 1](注射靜脈之組成物的製造)

在 100ml 的注射用蒸餾水中，於無菌狀態溶解 1mg EPO、50mgD-甘露糖醇以及 50mg 血清白蛋白之後，再將其以 1ml 為單位分注於藥水瓶裏，凍結乾燥後進行密封。使用時再將其溶解於生理食鹽水，製成注射靜脈用的組成物。

[發明效果]

本發明是將 EPO 做為有效成分的藥物。藉由此藥物，能減少患有肝病之哺乳動物肝內過多的鐵離子。因此該藥物對鐵離子過多所引起的慢性肝炎、肝癌和肝硬化等具有療效。另外，將該藥物的投給和瀉血療法併用的話，除了可避免患者因瀉血引發貧血之外，還可促進排泄肝細胞之過多的鐵離子。

又對於 IFN 療法不見效果的 C 型慢性肝炎患者，以本發明之藥物改善其肝機能之後，再進行一般的 IFN 療法的話，可達到治療該肝炎的效果。

雖然本發明已以一較佳實施例揭露如上，然其並非用以限定本發明，任何熟習此技藝者，在不脫離本發明之精神和範圍內，當可作些許之更動與潤飾，因此本發明之保護範圍當視後附之申請專利範圍所界定者為準。

伍、中文發明摘要：

一種治療肝病用之藥物，將紅血球生成素(EPO)做為有效成分，使患肝病之哺乳動物肝內過多的鐵離子減少，以改善該哺乳動物肝機能。此藥物對鐵離子過多所引的慢性肝炎、肝癌和肝硬化等具有療效。另外，將該藥物的投給和瀉血療法併用，除了可避免患者因瀉血引起貧血之外，還可促進排泄肝細胞之過多的鐵離子。又對於 IFN 療法不見效果的 C 型慢性肝炎患者，以本發明之藥物改善其肝機能之後，再進行一般的 IFN 療法的話，可達到治療該肝炎的效果。

陸、英文發明摘要：

The present invention discloses a method for treating patients with liver-complaints, using EPO as the effective ingredient for reducing stored iron in liver in order to improve hepatic functions. The method of the present invention can be used to treat patients with chronic hepatitis induced by iron overload, hepatocirrhosis and hepatoma. Phlebotomy can be combined into the method of the present invention so that anemia induced by phlebotomy can be prevented and the stored iron in the liver can be reduced more effectively for the patient. Furthermore, for chronic hepatitis C patients ineffectual to conventional 1FN

therapy, the method can be used to improve their hepatic functions before IFN therapy is used to treat hepatitis C patients. In this invention, it discloses the first time that EPO can cause the stored iron to be released from liver through binding to specific receptors in liver. Iron is removed from hepatocytes by administering EPO without reducing iron throughout the body~since sideropenia does not occur in the patients. Therefore, EPO can be used to improve hepatic functions for patients with chronic hepatitis, hepatocirrhosis and hepatoma.

柒、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第（ ）圖。

(二)本代表圖之元件代表符號簡單說明：

捌、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

拾、申請專利範圍：

1.一種治療肝病患者用之藥物組成物，其中該藥物組成物以紅血球生成素做為有效成分，使患肝病之哺乳動物的肝內過剩鐵離子減少，進而改善該哺乳動物的肝機能。

2. 一種治療肝病患者用之藥物組成物，其中該藥物組成物以紅血球生成素做為有效成分，使患肝病之哺乳動物的肝內過剩鐵離子減少，進而改善該哺乳動物的肝機能，其中該藥物組成物之施予是與瀉血療法併用。

3.如申請專利範圍第 1 項或第 2 項其中任一項所述之治療肝病患者用之藥物組成物，其中該藥物組成物是用於治療慢性肝炎患者。

4.如申請專利範圍第 1 項所述之治療肝病患者用之藥物組成物，其中該藥物組成物是用於治療經由 C 型肝炎病毒所感染之慢性肝炎。

5.如申請專利範圍第 3 項所述之治療肝病患者用之藥物組成物，其中該藥物組成物是用於治療慢性肝炎中之 C 型慢性肝炎或 C 型突發性肝炎(fulminant hepatitis C)。

6.如申請專利範圍第 1 項或第 2 項其中任一項所述之治療肝病患者用之藥物組成物，其中該藥物組成物是用於治療肝癌患者之藥物。