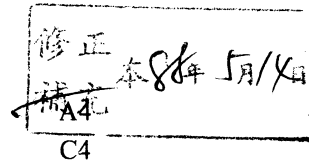


公告本

申請日期	86.5.7
案 號	86106144
類 別	A61K 38/21



482676

(以上各欄由本局填註)

發明專利說明書

一、發明 名稱	中 文	用於口腔黏膜接觸以刺激哺乳動物的宿主 防衛機制或免疫反應之干擾素組成物
	英 文	Interferon Composition for Oromucosal Contact to Stimulate host Defense Mechanisms or an Immune Response in a Mammal
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

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大 類：
I P C 分類：

A6
B6

本案已向：

澳大利亞國(地區) 申請專利，申請日期： 案號： ☒有 ☐無主張優先權

1996.05.09	PN9765
1996.12.03	PO3959
1996.12.24	PO4387

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

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (|)

本發明係關於一在哺乳類動物體內經口腔黏膜施用高劑量之干擾素來刺激宿主防衛系統對抗病原之方法。尤其是，本發明可被應用在自體免疫，腫瘤，神經變性，寄生蟲和病毒性疾病之治療方法上。

本發明之背景

α - 干擾素被廣泛用於許多惡性血液疾病的治療上，這類疾病包括髮細胞白血病，慢性骨髓白血病，低等淋巴瘤，皮膚 T- 細胞淋巴瘤，和固態腫瘤如腎細胞癌，黑色素瘤，輕癌和與愛滋病相關的卡波西式肉瘤 (Gutterman, J.U., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994 91: 1198-1205)。高劑量時有抗癌效果，所用 α - 干擾素劑量通常在百萬分之數十以上，並以非經腸的方式施藥。 β - 干擾素則是被核准用於多發性硬化之再發及舒解和慢性 B- 型及 C- 型肝炎的臨床治療上。

α - 干擾素及 β - 干擾素均屬於第 I 型干擾素。第 I 型干擾素為一大類天然存在之細胞素包括超過 16 種以上之 α - 干擾素的亞型，及 β - 干擾素和 ω - 干擾素。第 I 型干擾素會與單細胞表面之受體結合，並引起一連串複雜的訊息傳遞事件，終至引發抗病毒，抗增生及其它免疫調控之效果，細胞素的生成，和第一類及第二類 HLA 之調控 (Pestka et al., Annu. Rev. Biochem., 1987 56:727)。

I 型干擾素其個別亞型之活性均不太相同。經過篩選許多 α - 干擾素之對偶質亞型已可鍵定出每一位位置上最常見

五、發明說明(2)

之氨基酸順序，且具有保守順序之第 I 型干擾素也已被合成出來 (Alton et al in "The Biology of the Interferon System", E. de Maeyer and H. Schellekens eds. Elsevier (1983)1991-128) 。此保守干擾素在市面上已有販售 (Infergen; Amgen, Inc) ，且近來已被證實較 α 2a-干擾素或 α 2b-干擾素具有更高的活性 (以重量對重量比而言) ；因此有建議認為此類保守干擾素之臨床效果會高出任何一種天然干擾素之亞型 (Blatt et al., J. Interferon and cytokine Research, 1996 16: 489-499) 。

雖然種施用途徑，包括靜脈注射，皮下注射，肌肉注射，局部塗用，以及傷口內注射，都是第 I 型干擾素常見的施用方式，但通常較不採用口服的方式，此乃因干擾素係蛋白質，其活性會被蛋白質裂解酵素抑制且其天然形式在腸道中的吸收效果不佳。的確的研究指出口服後無法在血液中測得干擾素的存在 (Cantell and Pyhala, J. Gen. Virol., 1973 20: 97-104; Wills et al., J. IFN Res., 1984 4: 399-409; Gilson et al., J. IFN Res., 1985 5: 403-408) 。

一般認為欲獲得最大的藥效，應儘可能使用最高劑量之干擾素。雖然以基因重組方式製造的干擾素已經商品化表示使用高劑量是可行的，但實際上使用干擾素的一些副作用卻嚴重的限制了所能用之干擾素的劑量及其治療時間

五、發明說明 (3)

。這些副作用包括嚴重的不適及憂鬱，在某些病例中甚至導致自殺。最近 Hoofnagle 在新英格蘭醫學期刊中就為這些問題作了一個總結報導 (Hoofnagle, J. H., and Lau, D., New Eng. J. Medicine 1996, 334: 1470-1471)。

在 B-型肝炎抗原呈陽性的慢性 B-型肝炎患者身上所作的 α -干擾素療效分析顯示其再發率在 25% 至 40% 之間，在患有典型慢性 B-型肝炎之患者身上乃是以每天五百萬單位或每週一千萬單位治療三次，連續治療 3 至 6 個月。但這些治療均無法達到治癒的效果，大部分的患者對肝炎表面抗原仍然呈陽性反應且以聚合酶鏈反應仍可偵測到病毒的 DNA。再者，患者對這些干擾素的劑量容忍度並不好，由於無法忍受這些副作用導致有 10% 至 40% 的患者須要減輕劑量。但是，在普遍都可容忍的劑量下，亦即每天一百萬單位，再發率則只有 17% (Perrillo et al., New Eng. J. Medicine, 1990, 323: 295-301)。對於慢性 C-型肝炎之患者，在以每週三百萬單位治療三次連續治療 6 個月，只有 10% 至 20% 的患者可發現有長期持續性的改善，主要是 HCV 病毒 RNA 的減少 (Hoofnagle and Lau, op. cit.)。至於癌症患者，只在使用可容忍之最高劑量的 α -干擾素才可看到明顯有反應的比例。因此對患有多發性骨髓瘤之患者，例如，在以每天二千至三千萬單位治療之患者身上其有反應的比例為 50%，而在以每天三百萬單位治療之患者身上其有反應的比例則僅有 15% 至 20%

五、發明說明(4)

。但是，只有非常少數的患者能忍受這樣高的劑量超過一段短時間 (Ahre et al., Eur. J. Hematol., 1988, 41: 123-130)。顯然須要找到一種能使用高劑量又不會引發嚴重副作用的施用方式。

已有一些^先前報導指出於以鼻噴劑或口服液方式來施用低劑量干擾素以治療許多病毒感染，尤其是感冒之效率。但是，在大部分這些報導中所用之干擾素製劑為相當粗燥的。在以相當高劑量鼻內干擾素來治療鼻病毒感染之以安慰劑為控制組的試驗中，顯示此種治療是有效的，但會出現顯著的副作用情況 (Hayen et al., J. Infect. Dis., 1983, 148: 914-921)。同樣的，雖然有許多的研究，包括兩組隨機雙盲臨床試驗 (Douglas et al., New Eng. J. Med., 1986, 314:65-80; Hayden et al., New Eng. J. Med., 1986, 314:71-75)，顯示由鼻內施用高劑量的 $\alpha 2$ - 干擾素來保護受鼻病毒感染的個體之效果，但這些研究均無法為整體性的效果評估提供任何證據。

最近一系專利說明書描述了口服不同來源之干擾素以治療感染鼻病毒之牛隻 (出血性敗血病)，貓白血病，及其它疾病的治療，提高疫苗的效用；改進食品利用的效率；及牛隻泰勒蟲病的預防。參見美國專利案號 4,462,985，澳洲專利案號 608519，澳洲專利案號 583332 和美國專利案號 5,215,741。此外，美國專利案號 5,017,371 也揭露了以此種方式使用干擾素來治療癌症化療及放射線治

五、發明說明(七)

療時所引起的副作用。在這些案例中，所用干擾素是以 Cantell 法製成之人類 α - 干擾素，每磅體重在磷酸塩緩衝液中施用 0.01 至 5 單位劑量。這些案例中建議在口咽黏膜上施用低劑量干擾素，較好是以能長期與口咽黏膜接觸的形式施用，也許在許多疾病的治療上可發揮其功效，包括癌症，除了出血性敗血病、貓白血病、犬之小 DNA 病毒和泰勒蟲病外，大部份為無對照組的實驗證據。但是，在任何人類癌症之動物模型中都缺乏有關此種治療方式其適當控制組實驗的報導。

在近期的研究中總評了由口及口咽黏膜上施用低劑量干擾素的效果 (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)。有報導指出此種治療方式對 HIV 感染的治療特別有效，至少可改善愛滋患者的生活品質 (Kaiser et al., AIDS, 1992, 6:563-569; Koech et al., Mol. Biol. Ther., 1990, 2:91-95)。但是，也有報導指出此種治療方式並沒有任何的臨床效果。已有報導指出以含低劑量干擾素的口服式藥錠來治療 B-型肝炎 (Zielinska et al., Archiv. Immuno. Therp. Exp. 1993 41:241-252)。

相反的，由布來罕婦女醫院所提出之國際專利申請案號 W0 95/27499 中顯示在設計完善的動物模型中，如果在

五、發明說明 (6)

引發抗原之前以插胃管方式施用 β -干擾素至少可部分抑制自體免疫疾病例如第一型糖尿病，多發性硬化及和自體免疫之關節炎。由此種方式或與結合了由胃中給抗原之腹膜注射來施用 β -干擾素在容忍度上更有效。此可看出 β -干擾素在提高口服容忍度上很有效，而不是在引發體液或細胞對外來抗原之反應上有效。

在澳洲臨時專利申請案號 PN 9765中，由口腔黏膜途徑施用低劑量干擾素至口咽腔中能有效保護老鼠對抗具高度轉移性癌細胞之攻擊。由於這些結果之非常例外的特性，及只有非常少數物質能對侵略性的腫瘤表現出抗癌效果的事實，顯示施用干擾素至口咽腔中的確能有效的治療癌症。在口腔黏膜上施用低劑量干擾素對治療由腹膜腔中注射了腦心肌炎病毒 (EMCV) 的老鼠也有同樣的效果，此病毒通常會很快引發涉及中樞神經系統和腦炎的致命性疾病。雖然此系統是一種抗病毒活性的嚴格測試方法，但由口腔黏膜來施用干擾素與由腹膜腔中施用其效果是一樣的。

發明摘述

本發明提供了一種在哺乳類動物體內經口腔黏膜施用一高於非經腸道的干擾素劑量，來刺激宿主防衛系統的方法，此劑量當以非經腸道的方式施用時通常會引發病理反應，在人體通常是施用約高於 20×10^6 單位之同源性第 I 型干擾素。對其它型之干擾素，會引發病理反應之劑量可

五、發明說明(7)

能與會在人體中引發病理反應的同源性第 I 型干擾素之劑量不同。

觀點之一，本發明可當作是一種方法，在哺乳類動物體內經口腔黏膜接觸來施用一足以引起免疫反應之干擾素劑量，來刺激宿主產生免疫反應，此劑量高於當以非經腸道的方式施用時會引發病理反應之劑量。

或者，本發明提供了一種經口腔黏膜來施用干擾素以增加干擾素之治療指標的方法。

經口腔黏膜來施用可能包括在單一劑量時即施用一足夠有效之干擾素劑量或是在一段時間內連續施用相當於單一劑量所引發之免疫反應的小量劑量。同樣的，也可連續施用干擾素一段足夠長的時間，以達到相當於使用單一劑量所引發之免疫反應。

在應用方面，本發明提供一種在哺乳類動物體內經口腔黏膜接觸來施用一有效的干擾素劑量以治療自體免疫，分枝桿菌，和神經變性疾病，腫瘤及病毒感染的方法，此劑量須高於當以非經腸道的方式施用時通常會引發病理反應之劑量。特別是，本發明提供一種治療自體免疫疾病的方法例如關節炎，第一型糖尿病，狼瘡，及多發性硬化，分枝桿菌疾病如麻風和肺結核，神經變性異常如海綿性腦炎和庫非德 - 傑柯氏病 (Creutzfeldt-Jakob disease)，寄生性疾病如瘧疾，和病毒性疾病如子宮頸癌，生殖器疱疹，B-型和C-型肝炎 HIV，HPV，和 HSV-1

五、發明說明(8)

及 HSV-2。

本發明也提供了一種治療多發性骨髓瘤，髮細胞白血病，慢性骨髓白血病，低等淋巴瘤，皮膚 T-細胞淋巴瘤，輕癌，子宮頸癌，卡波西式肉瘤，腎癌，腎細胞癌，肝細胞癌，鼻咽癌，結腸直腸癌，神經膠母細胞瘤，乳頭狀喉瘤，肺癌，直腸癌，惡性黑色素瘤，和惡性腦瘤的方法。在一具體實施例中，本發明通常是被應用在非病毒性腫瘤的治療上。

在另一具體實施例中，本發明提供了一種用於口腔黏膜施用含有效治療量之至少一種干擾素及一藥學上可接受載體的醫藥組成物，此劑量係高於當以非經腸道的方式施用時通常會引發病理反應之劑量。此組成物可以溶液，藥片，錠劑，凝膠，糖漿，糊劑，或可控制釋放之口腔黏膜傳送系統。或者，組成中也可含緩衝溶液，安定劑，濃化劑，吸附劑和黏度增稠劑及其它類似物。

在一實施例中，醫藥組成物乃是以內含約 20×10^6 至 1000×10^6 單位之干擾素的單位劑量存在，較好是內含約 20×10^6 至 500×10^6 單位之干擾素，更好是內含約 50×10^6 至 500×10^6 單位之干擾素。

在應用上，本發明方法可單獨作為治療方法使用，或與放射線治療，化療，或其它類之細胞素，如白介素 -2 (interleukin-2)，12，或 15，或干擾素-誘導劑一併使用。

五、發明說明(9)

進行本發明方法時較好是使用選自 α , β , γ , ω , 和保守干擾素之第 I 型或第 II 型干擾素，最好是以重組 α -干擾素來進行。

發明詳述

以下將以定義及實例為本發明作詳細說明。所有在此引用之專利案及公開案均併於本文作為參考。

定義

如文中所述，“干擾素”係指第 I 型或第 II 型干擾素，包含所有常被稱為 α , β , γ , 和 ω 之干擾素，及其混合物，也包括具有保守序列之干擾素。干擾素來自許多商用來源也被核准用於許多情況的治療上。干擾素可以是天然來源，但較好是以基因重組方式所製備的。對本發明之目的，“干擾素”一詞尚包括多肽或其裂解後仍具干擾素活性之片段，和引入修改過之氨基酸順序的干擾素嵌合體或突變體，例如在不影響其原有生物活性下來增加安定度，例如揭示於美國專利案號 5,582,824, 5,593,667, 和 5,594,107 及其它。

“高劑量”係指高過於以非經腸道途徑給藥時所能忍受之最大劑量，例如靜脈注射或腹膜注射。如文中所述，對一體重 70Kg 的成人而言，高劑量之干擾素係指高於 20×10^6 單位之同源性第 I 型干擾素。較好之劑量是高於 30×10^6 單位。在本發明之特別佳之形式中，總劑量約在 50×10^6 至 1000×10^6 單位之干擾素，更好的是約在 50×10^6

五、發明說明 (10)

。至 500×10^6 單位之干擾素。如文中所述，“高劑量”係指當施用於口腔黏膜時具有有效治療之劑量，此劑量當以非經腸道的方式施用時會引發病理反應之劑量，表現無法接受之副作用或具毒性之指標。高劑小，重量，及患者年齡，治療之性質及嚴重度，所用干擾素及施用時專一賦形劑的不同而有所變化。當醫師以某一特別之干擾素來治療患者時須能很容易的鑑定出適宜欲治療患者之高劑量干擾素的範圍。

干擾素也可和能誘發細胞合成或釋出干擾素之物質一同使用。此物質可與干擾素一同，或分開施用。能誘發干擾素之合成或釋放的物質包括，例如，多核苷酸如聚 I:C (poly I:C)；最好是使用能夠口服的低分子量的干擾素誘導劑。熟悉技藝的人士對安定的誘導劑應不陌生，例如，乙氨芴酮 (Tilorone) (美國專利案號 3592819；Albrecht et al., J. Med. chem. 1974 17: 1150-1156) 和喹諾酮 (quinolone) 之衍生物乙米奎莫 (Imiquimod) (Savage et al., Brit. J. cancer, 1996 74: 1482-1486)。

本發明之方法及組成物對於特殊狀況，可以選擇性地與一種或多種其他治療法共同使用。可以使醫師或獸醫師很容易地選擇適合此種情況的治療法。

在一具體實施例中，本發明提供了一種治療哺乳類動物腫瘤狀況的方法，包括施用如上所述之干擾素的步驟。

五、發明說明 (11)

該腫瘤狀況可以是屬於會轉移的癌症。

雖然本發明之方法可以不和其它藥劑一同使用，但可預期本發明之此實施例在以下情況下會特別有用：

a) 在一般標準之手術，化療，或放射線治療後作為一輔助性的治療方法；

b) 用來治療對干擾素敏感的腫瘤，本發明之方法可單獨或與傳統的化療或放射線治療一同使用；

c) 用來治療能抗干擾素之腫瘤，本發明之方法可單獨使用或在多數情況下較好是配合傳統的化療或放射線治療一同使用。

上述之方法旨在誘發和／或保持疾病在一較緩和的狀況。“與其它方法一同使用”意指在其它化療或放射線治療之前，期間和／或之後施用干擾素。最適合的程序視許多因數而有所變化，以下將詳細討論。

特別是，可預期本發明之方法將較適合與至少一種選自以下族群之其它療法一同使用，此族群包含使用能抑制細胞生長之藥物的化療法，一或多種其它具抗癌活性但與干擾素作用機轉不同之細胞素，抗血管生成藥劑，及能增強干擾素活性之藥劑。較適合之第二種細胞素乃是白介素-1 (IL-1)，白介素-2 (IL-2)，白介素-12 (IL-12)，或白介素-15 (IL-15)；較適宜之血管生成抑制物乃是AGM-1470；能增強干擾素活性之較適宜的治療乃是發熱療法或精氨酸丁酸酯。

五、發明說明 (12)

能與干擾素一同施用之較適宜細胞生長抑制劑包含但不限於環磷醯胺，順氯氨鉑，碳鉑，卡氮芥；(BCNU;N,N-雙(2-氯乙基)-N-亞硝脲)，氨基甲基葉酸，阿黴素， α -二氟甲基鳥氨酸，5-氟尿嘧啶。

適用於本方法之腫瘤包括但不限於那些對以非經腸胃給予高劑量 α -干擾素有反應的癌症，例如血液性惡疾，多發性骨髓瘤，髮細胞白血病，或慢性骨髓白血病，低等淋巴瘤，皮膚T-細胞淋巴瘤，和固態腫瘤如腎細胞癌和黑色素瘤，輕癌，或與愛滋病相關的卡波西式肉瘤，特別是由非病毒所造成的惡性腫瘤。腫瘤情況可以是急性或猛爆式的感染，例如鼻病毒，流行性感冒，疱疹，帶狀疱疹，登革熱，或病毒性腦炎包括但不限於麻疹病毒性腦炎，莫瑞山谷腦炎(Murray Valley encephalitis)，日本B-型腦炎，由壁蝨媒介的腦炎和疱疹性腦炎；出血性熱例如艾波拉病毒，馬伯病毒(Marburg virus)，拉薩熱(Lassa fever)，漢他病毒感染，及其它由動物傳染至人體的病毒性感染，例如馬的麻疹病毒。目前許多此種情況都是無法治療的或是沒有疫苗可供治療的，而一些支援性的治療則仍嫌不足。或者這類病毒性感染也可能是慢性感染所造成的結果，如B-型肝炎，C-型肝炎，D-型肝炎或其它病毒性肝炎，和CMV，HIV，HPV，和HSV1和II所造成的結果。B-型肝炎和C-型肝炎目前都以非經腸胃式的干擾素來治療；目前臨床上正在試驗以干擾

五、發明說明 (13)

素來長期治療因 HIV 病毒感染所造成的愛滋病。

在第二個實施例中，被治療的疾病是瘧疾，同樣的以上述第 I 型及第 II 型干擾素來作治療。引起瘧疾的微生物是四日瘧原蟲 (*Plasmodium malariae*)，間日瘧原蟲 (*Plasmodium vivax*)，鐮狀瘧蟲 (*Plasmodium falciparum*) 或卵圓瘧蟲 (*Plasmodium ovale*)。本發明之方法可有效防止瘧疾侵犯到大腦。

在第三個實施例中，本發明提供了一種治療自體免疫例如 HIV，風濕性關節炎，和多發性硬化的方法，無論是屬於疾病的舒緩一再發或慢性發展或免疫不全如愛滋病，均包含了施用上述干擾素的步驟。

同樣的本發明之劑量可以和其它治療方法一同使用。例如，對於疱疹病毒感染可使用無環鳥苷 (acyclovir) 或甘西克羅維耳 (ganciclovir)。對 HIV 感染可使用疊氮胸苷 (azidothymidine) (zidovudine) 或一或多種其它的 HIV 反轉錄酶的抑制劑，和或 HIV 蛋白酶抑制劑。

在本發明藥學配方的製備上干擾素之載體及賦形劑均可使用，這點對熟習技藝的人士而言將是顯而易見的。在 Remington 所著的：The Science and Practice of Pharmacy, 19th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995 一書及其之前的版本中談及許多代表性的藥劑配方技術。干擾素配方中可含安定性增強劑，例如美國專利案號 4,496,537 中所述的甘氨酸或丙氨酸，和或一或多種

五、發明說明(14)

載體，如攜帶性蛋白質。例如，常見的治療用屬人類藥學級的人類血清白蛋白，或者與作為稀釋劑的磷酸緩衝液一同使用。其中作為干擾素賦形劑的是人類血清白蛋白，人類血清白蛋白可以衍生自人血，或是獲自基因重組方式。一般而言當使用血清白蛋白時通常其均來自同質來源。

干擾素的施用可以任何一種能使患者口腔黏膜接觸到干擾素的方法來施用。因此本發明並不侷限於使用某一種特定配方。本說明描述了在口腔黏膜上使用干擾素，此可藉液體，固體，或空氣噴劑，以及鼻滴劑或噴劑來達成。因此本發明包括，但不限於，液體，噴劑，糖漿，藥錠，口含片，和鼻噴劑配方。熟習技藝的人士將可理解對於氣溶膠或鼻噴劑配方，製品中粒子的大小將很重要，且了解將可以何種適當的方法來改良粒子的體積大小。

觀點之一，以單一劑量來施用干擾素。或者，在一段時間內以數個低劑量來施用干擾素，使其整體效果達到使用一劑高劑量之相同效果。藥品的運送方式之一乃是藉一黏附或植於口腔黏膜腔內的一種持久或可控制的釋放裝置來達成，此釋放裝置乃是設計成可隨時間釋出效果相當於一單一高劑量的干擾素。

可用於口腔黏膜之代表性干擾素配方包括下列（均以重量百分比表示）：

藥錠：右旋糖 BP 45% ；明膠 BP 30% ；小麥澱粉 BP 11% ；卡密羅納 (carmellose sodium) BP 5% ；卵白蛋白

五、發明說明 (15)

BPC 4% ; 白氨酸 USP 3% ; 1,2-丙二醇 BP 2% ; 和 50×10^6 IU 之 α 2-干擾素所組成。藥錠可直接服用並使其緩緩在口中溶解或加水溶解並含於口內使口腔黏膜能與其接觸。

也可製備干擾素的糊劑，如美國專利案號 4,675,184 中所述，由甘油 45%，羧甲基纖維素鈉 2%，檸檬酸緩衝液 (pH4,5) 25%，加蒸餾水至 100%，和 50×10^6 IU 之 α 2-干擾素所組成。可將干擾素糊劑敷貼在口頰黏膜上。同樣的，也可藉添加所須之干擾素量至市售之漱口水或咳嗽糖漿之配方中以製成漱口劑或糖漿。

在上述某特定劑量範圍內，每個個案中最佳的治療劑量將視個案情況，疾病的階段，先前治療方式，其它持續進行之治療方式，該哺乳動物的一般健康情形，該個案主對干擾素的敏感性以及其它而有所不同，因此醫師或獸醫師須考慮所有情況後才作決定。治療時間的長短將視被治療的情況而定，例如，對於生長緩慢之腫瘤的治療，如前列腺癌，將可預期其治療方式會與快速生長之腫瘤，如肝癌的治療方式不同。同樣的，也可預期由使^伊波拉病毒所及引起之急性感染將會與慢性感染，如肝炎有所不同。

在此所揭露之有效劑量，當以非經腸胃的途徑施用時乃是一能在哺乳動物體內引起病理反應之劑量，且當施用於口腔黏膜時其效果良好且不具毒性或是毒性甚小。所引發之病理反應可以是急性，慢性，或累積式，且會表現在

五、發明說明 (16)

血液化學上，如白血球減少，骨髓減少，或其它血液之參數上。如在此所使用的，病理反應包括不良的副作用，例如發燒，不適，或感冒症狀，血管反應，例如靜脈炎，和注射處的局部發炎反應。這類反應會因病患其個別對干擾素的敏感程度情況而有所不同。

對許多患者而言，使用於口腔黏膜之劑量將會比先前以非經腸胃的途徑施用時所能容忍的劑量來得高。在一實施例中，總劑量可藉著黏附或植入於黏膜上的一種控制釋放裝置在一段時間內使用許多低劑量而達成，或以連續或脈動式之施用方式來達成。

干擾素和干擾素之配方

老鼠之 α / β - 干擾素

依前述方法 (Tovey et al., Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 1974 146:809-815) 以新堡病毒 (Newcastle disease virus, NDV) 刺激 C243-3 細胞並由此細胞中製備並純化老鼠之 α / β - 干擾素 (Mu IFN- α / β)。用於本研究之製備其效值為每毫升 4×10^6 國際單位 (IU) 且其比活性為每毫克蛋白質 5×10^7 IU，此乃依前述方法 (Tovey et al., Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 1974 146:809-815) 以水泡性口炎病毒 (vesicular stomatitis virus, VSV) 刺激老鼠 929 細胞後所測得之結果。本製備並以國家衛生院 (NIH) 之國際參考製備之鼠 α / β - 干擾素 (G 9004-5411) 為參考來加以標準化。

五、發明說明(17)

人類之 α -1-8-干擾素

依前述方法(Meister et al., J. Gen. Virol., 1986 67:1633-1643) 製備並純化重組的人類 α -1-8-干擾素 (Hu IFN - α - 1-8 ; BDBB lot No. CGP 35269-1, Ciba-Geigy, Basel, Switzerland) 。用於本研究之製備其效值為每毫升 70×10^6 IU , 此乃依前述方法 (Tovey et al., Nature, 1977 267: 455-457) 以 VSV 刺激人類 WISH 細胞後所測得之結果, 而其在非同源性老鼠 L929細胞上之效值則為每毫升 1×10^6 IU 。本製備並以國家衛生院之國際參考製備之人類 α -干擾素 (G-023-901-527) 及國家衛生院之鼠 α/β -干擾素 (G-002-9004-5411) 為參考來加以標準化。本製備干擾素之比活性為每毫克蛋白質 2×10^8 IU。

重組之鼠 α -干擾素

重組之鼠 α -干擾素乃購自生命科技公司 (Life Technologies Inc.)。用於本研究之製備 (批號 HKK404) 其效值為每毫升 6×10^6 IU, 且其比活性為每毫克蛋白質 6×10^8 IU , 此乃是以 VSV 刺激老鼠 L929 細胞後所得之結果 (Tovey et al., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1974 146: 406-415) 。

重組之鼠 β -干擾素

重組之鼠 β -干擾素乃購自 R&D 系統公司 (R&D System Inc.) 。用於本研究之製備 (批號 1976-018) 其效值為

五、發明說明 (18)

每毫升 3.2×10^4 IU，且其比活性為每毫克蛋白質 8×10^6 IU，此乃是以 VSV 刺激老鼠 L929 細胞後所得之結果 (Tovey et al., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1974 146: 406-415)。

重組之鼠 γ -干擾素

重組之鼠 γ -干擾素乃購自 R&D 系統公司 (R&D System Inc.)。用於本研究之製備 (2580-03SA) 其效值為每毫升 2×10^5 IU，且比活性為每毫克蛋白質 1×10^7 IU，此乃是以 VSV 刺激老鼠 L929 細胞後所得之結果 (Tovey et al., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1974 146: 406-415)。

所有之干擾素的製備均以相同分析方法同時滴定並以美國國家衛生院之國際參考製備之鼠 α / β -干擾素 (G-002-9004-5411) 為參考來加以標準化。

無論是鼠 α / β -干擾素或是重組之鼠干擾素在施用前均先以 Ferimmune™ 賦型劑加以吸收。

賦形劑

以內含牛血清白蛋白 (BSA) 之磷酸塩緩衝液 (PBS) 或以下所述有專利權之賦形劑來稀釋干擾素之製備。將牛血清白蛋白之第五部分 (RIA 級；不含免疫球蛋白；貨號 A788；Sigma；USA) 溶於磷酸塩緩衝液 (pH 7.4) 中使其最終濃度達 100mg/ml 並以過濾方式殺菌 (0.2 μ m, Millex-GV, Millipore, USA)。

五、發明說明 (19)

在以下所述之實驗中干擾素之製備乃是以具專利權之賦型劑來作稀釋。所用賦形劑如下，乃是以藥錠形式存在 (Ferimmune™,Pharma Pacific) :

	重量百分比 %	mg/藥錠
右旋糖 (葡萄糖) BP**	44.67***	55.84
明膠 BP**	30.06	37.58
小麥澱粉 BP**	11.31	14.14
卡密羅納 (carmellose sodium)BP**	4.96	6.20
卵白蛋白 BPC**	4.03	5.04
白氨酸 USP	3.00	3.75
1,2-丙二醇 BP	1.88	2.35
葡聚糖 40*		
(如注射式葡聚糖 40 BP)	0.06	0.08
磷酸鈉 BP	0.03	0.04
氯化鈉 BP	0.01	0.01
酸式磷酸鈉 BP	0.01	0.01
總計	100.02	125.04

** 以無水物來作計算

*** 衍生自：

右旋糖 (葡萄糖) BP (無水物) 44.64%

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明(20)

葡萄糖 BP (如注射式葡聚糖 40 BP) 0.03%

將一藥錠溶於 1.5 ml 之磷酸塩緩衝液中，以 16,000g 離心 15分鐘，之後以過濾方式殺菌 (0.2 μ , Millex-GV, Millipore, USA)，並在使用前先儲存於 4 °C 下。賦型劑乃是每天在使用前才準備。

干擾素之傳送系統

前導實驗顯示以 P20 之微量吸管將 5ml 之結晶紫加在一正常成人的每個鼻孔中，染料幾乎是立刻便均勻的分佈在整個口咽腔中。即使在經過 30 分鐘之後，染料仍清晰可見。基本上以同樣方式來施用標有放射性碘 125 之人類基因重組 α -1-8-干擾素也會得到類似的結果。因此在以下所有的實驗中均採用本施用方法。

在此說明書所述之動物實驗之目的上，將清楚了解關於施用干擾素的途徑之“口腔黏膜”或“口咽腔”或“鼻內／口”或“鼻內和口”或“in/or”之詞係表示將干擾素製劑深入鼻腔來施用，以使其能迅速的分佈在整個口腔黏膜腔中，亦即，接受治療之哺乳動物之口與喉嚨處，以使其能與腔道中的黏膜相接觸。

EMCV (腦心肌炎病毒)

批次：

批號 095001

有效日期截止日：

1997 年 12 月

五、發明說明 (✓\)

製備：以前述方法 (Gresser I. Bourali C, Thomas MT, Falcoff E. Effect of repeated inoculation of interferon preparations on infection of mice with encephalomyocarditis virus. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1968 Feb; 127:491-6) 將腦心肌炎病毒 JH 株在老鼠 L929 細胞中繁殖。

特性：用於本研究之病毒其在老鼠 L929 細胞上的效殖為 $5 \times 10^{8.62}$ TCID₅₀。

儲存方式：腦心肌炎病毒乃儲存於 -70°C 。第一天由於斷電使得須將病毒滴定分析立即轉移至備用的儲存容器中，此備用貯存容器之溫度須與儲存溫度相同。無論任何情況下所有的物質均須維持在冷凍狀態。第八天用以貯存病毒之 -70°C 冷凍櫃的溫度升高至 -60°C 。在使用前才開始配製稀釋的腦心肌炎病毒，並將其置於冰上或動物房之冷凍櫃中直到要使用時才取出。

富藍得紅白血病細胞

一種能抗 α / β - 干擾素之富藍得紅白血病細胞株，3C18，乃是獲自羅馬之阿法比博士處，並詳述於 Affabris et al, 1982 (Virology, 120:441-452)。並不斷的繁殖此細胞。簡言之，以腹膜內注射法在 DBA/2 老鼠身上接種約 100 LD₅₀ 之 3C18 細胞，且在一週後由老鼠的腹膜中收集癌細胞，計數後再繼續在另一隻老鼠身上接種約 100 LD₅₀ 之 3C18 細胞。重覆進行此一步驟約 60

五、發明說明 (22)

至 100 代。已知第 60 至第 100 代的 3C18 細胞在肝臟和胰臟具高度轉移性 (Gresser et al., Int. J. Cancer, 1987 39: 789-792)。藉著在體外存有 α / β - 干擾素的情況下不斷培養這些在體內繁殖之癌細胞已證實此細胞乃是具有能對抗干擾素之表現型細胞 (Belardelli et al., Int. J. Cancer, 1982 30:813-820)。

L1210R6 細胞株及 EL4 可移植式腫瘤

一種能抗 α / β - 干擾素之 L1210 淋巴瘤細胞株，L1210R6，乃是由本實驗室所分離出來的 (Gresser et al., 1974, Interferon and cell division. IX. Interferon-resistant L1210 cells: characteristics and Origin. J. Nat. Cancer Inst., 52: 553-559)。

EL4 可移植式腫瘤乃衍生自接種了致癌物 1-2 二甲基苯札星 (1-2 dimethyl benzanthreine) 之老鼠 (Gorer, P.A., 1950, Br. J. Cancer, 4: 372-381)。

L1210 淋巴瘤細胞株乃是藉著在無病原之 DBA/2 老鼠身上作一系列的體內繁殖來維持。

EL4 可移植式腫瘤乃是藉著在無病原之 C57BL/6 老鼠身上作一系列的體內繁殖來維持。

B16 黑色素瘤

B16 黑色素瘤乃是衍生自 C57BL/6 老鼠之一種自發性可移植式腫瘤 (Fidler, I. J. and Krippl, M. L. 1977,

五、發明說明 (23)

Science 197, 893-897) 。 B16黑色瘤乃是一種生長迅速，具高度造形，可產生黑色素之腫瘤，其主要移轉的部位是肺。一般認為 B16黑色瘤乃是一種能快速生長，具高度侵犯性之人類腫瘤的良好模型系統。

B16黑色瘤細胞乃是藉著在無病原之 C57BL/6 老鼠身上作一系列的體內繁殖來維持。

動物

用於本研究之老鼠乃取自無病原之老鼠族群 (IFFA CREDO, France) 。 這些老鼠乃是飼養在 Villejuif 之 Federatif CNRS 研究院中一符合 EEC 標準之無特定病原之動物房中。

干擾素之生物分析

干擾素乃是依傳統的方法加以分析。簡言之，樣品 (20 μ l) 以 80 μ l 內含 2% 經熱去活化之胎牛血清 (FCS) (Gibco, France) 的伊果最少基本培養基 (Eagle's Minimal Essential Medium, MEM) (Gibco, France) 來加以稀釋，並以多管式微量吸管 (Finnpipette, Labsystem, 50-300 TI) 將其加至微量培養皿的培養孔中。將 WISH 或 L929 細胞 (每個培養孔含 2×10^4 細胞) 加到 100 μ l 內含 2% FCS 之 MEM 培養基中並在 37 $^{\circ}\text{C}$ ，5% CO_2 下培養一夜 (Forma 3029 二氧化碳培養箱)。以配有 10 倍物鏡的 Olympus 倒立式顯微鏡 GLDW 型來檢查細胞是否有任何毒性。對未表現毒性之

五、發明說明 (24)

細胞進行一系列兩倍稀釋，由開始時在總體積為 $200 \mu l$ 內含 2% FCS 之 MEM 培養基中的 1:10 比例開始，以多管道微量吸管取 $100 \mu l$ 之稀釋物，加到微量培養皿之培養孔中，每一個培養孔內均有 $100 \mu l$ 內含 2% FCS 之 MEM 培養基，同樣以美國國家衛生院之人類 α - 干擾素標準參考 (G-023-901-527) 或美國國家衛生院之鼠 α / β - 干擾素標準參考 (G-002-9004-5411) 重覆作一系列的兩倍稀釋。將懸浮於 $100 \mu l$ 內含 2% FCS 之 MEM 培養基中的 WISH 或 L929 細胞 (每個培養孔含 2×10^4 細胞) 加到培養孔中並在 37°C ，5% CO_2 的情況下培養一夜。檢查培養後之單層細胞是否有任何毒性顯示或毒物存在，將培養基吸掉後再加入 200ml 含 2% FCS 之 MEM 培養基，培養基中並含 100 TCID₅₀ 之 VSV (對 WISH 細胞為 2×10^{-4} VSV23，或對 L929 細胞為 10^{-4} VSV23)。之後在 37°C ，5% CO_2 的情況下培養一夜。之後以 Olympus 倒立式顯微鏡 ULWD 型來檢查所培養之單層細胞是否有任何特定之病毒所造成的細胞病變。由稀釋物值來反推出干擾素之效值，此效值乃是可對抗任何特定之病毒所造成的細胞病變 50% 之值，並以每毫升多少國際參考單位表示 (IU/ml)。

實施例 1 高劑量干擾素對以致死性腦心肌炎病毒感染細胞後其存活率的影響

五、發明說明 (25)

在雄鼠及雌鼠身上注射致死劑量的腦心肌炎病毒後，再經由口腔黏膜給予 1,000，10,000，和 100,000 IU 不同劑量之 α -干擾素並觀察其影響。測試不同型式的 α -干擾素，並比較經由腹膜內和經由口腔黏膜途徑給藥的影響。除了監測致死劑量後的存活率外，並以許多臨床化學和血液參數來監測干擾素治療法的毒性。

在病毒感染之後立即以每天一次經由口腔黏膜給予 10⁵ IU 之 α -干擾素來治療老鼠，連續治療四天，結果發現可完全保護所有的動物。經過干擾素治療的老鼠百分之百都存活且在注射致死劑量的腦心肌炎病毒 100 天後仍非常健康，在同樣情形下的控制組老鼠則在感染開始七天後已全部死亡。

依據體重換算，經由口腔黏膜以 10⁵ IU 之 α -干擾素來治療老鼠相當於以二億四千萬個單位在人體上作治療，此遠超過任何已知曾用於人身上的劑量。

經由口腔黏膜以 10⁵ IU 之 α -干擾素來治療老鼠較以 10⁴ IU 之 α -干擾素來治療，能保護更多的老鼠，很可能在更高的劑量時所造成的保護效果（對抗更高量的病毒或腫瘤負荷）會更好。截至目前為止我們在劑量及藥效曲線上並未觀察到有任何驅近平緩之平原期的出現。

我們的結果也顯示經由口腔黏膜給予高和超高劑量之干擾素具有高度抗病毒效果，且以此途徑給予 10⁵ IU 之 α -干擾素對所用之腦心肌炎病毒量有完全治癒的效果。

五、發明說明 (56)

即使依體重換算，此劑量遠超過任何曾用於人體上之劑量，相當於 240×10^6 IU，但從未有任何臨床，生化或血液上的證據顯示使用這樣的劑量會產生任何毒性。相反的，在臨床上以非經腸胃途徑給予干擾素時所能容忍的最高劑量範圍僅為每天 20 至 30×10^6 IU。

實施 2 高劑量 α - 干擾素對感染具高度轉移性腫瘤細胞之老鼠的影響

於第 0 天時在一組 10 隻，六週大的 DBA/2 老鼠之靜脈內注射 10^5 能抗干擾素之富藍得紅白血病細胞株 3C18 或 10^5 之 L1210 淋巴瘤細胞（能抗干擾素之 L1210R 淋巴瘤細胞）。接種後，將老鼠分為不治療，或每天兩次連續 20 天經由鼻內／口以總體積 $10 \mu l$ 內含 10^5 IU 老鼠 α / β - 干擾素之賦型劑，或 $10 \mu l$ 之賦型劑（控制組）來治療老鼠。

經過干擾素治療的老鼠百分之五十都存活且在注射具高度轉移性之富藍得紅白血病細胞 100 天後仍非常健康。經過干擾素治療的老鼠百分之三十都存活且在注射 L1210 淋巴瘤細胞 100 天後仍非常健康。臨床上的觀察發現這些經干擾素治療 100 天後仍存活的老鼠如果不加以犧牲的話可以很健康的過完其正常的生命週期。器官之病理檢驗並未發現任何殘存之腫瘤。相反的，所有未經治療及控制組中的老鼠則分別在富藍得紅白血病細胞感染開始後 13 天，L1210 淋巴瘤細胞感染開始後 14 天已全部死亡。

五、發明說明 (7)

這些結果具高度顯著性，由於所用之兩種腫瘤細胞株均具高度侵犯性，且所用之劑量約相當於百分之五十致死劑量 (LD50) 的 20,000 倍。再者，富藍得紅白血病細胞及 L1210 淋巴瘤細胞為非常不同的腫瘤，此乃因富藍得紅白血病細胞帶有反轉錄病毒，即富藍得紅白血病病毒，而 L1210 淋巴瘤細胞則並未帶有任何已知之病毒。經由口腔黏膜給予 α - 干擾素在接種了 L1210 淋巴瘤細胞之動物上所得之結果約相當於甚或超過在此模型中使用全身系統性之 α - 干擾素治療來得有效 (I. Gresser, 尚未發表之結果)。在我們先前的報導中，澳洲臨時申請案號 PN9765 中，接種了富藍得紅白血病細胞並以 100 或 1,000 單位 α - 干擾素作治療的老鼠無一殘存，而以 10,000 單位 α - 干擾素作治療的老鼠則有約 10-20% 之動物可完全被治癒。實施例 3 高劑量 α - 干擾素對感染具高度轉移性 B16 黑色素瘤細胞或 EL4 腫瘤細胞之老鼠的影響。

在一組 10 隻，六週大的 C57B1/6 老鼠之靜脈內注射 10^5 之 B16 黑色素瘤細胞，或 10^5 之 EL4 腫瘤細胞。接種後，將老鼠分為不治療，或每天兩次連續 20 天經由口腔黏膜以總體積 $10 \mu l$ 內含 10^5 IU 老鼠 α / β - 干擾素之賦型劑，或 $10 \mu l$ 之賦型劑 (控制組) 來治療老鼠。

經過干擾素治療的老鼠百分之三十都存活且在接種了具高度轉移性之 B16 黑色素瘤細胞或 EL4 腫瘤細胞 100 天後仍非常健康。相反的，所有未經治療及控制組中的老鼠

五、發明說明 (28)

則分別在 B16 黑色瘤細胞感染開始後 20 天， EL4 腫瘤細胞感染開始後 22 天已全部死亡。臨床觀察顯示所有經過干擾素治療且在 100 天後仍存活的老鼠，即使干擾素已在第 20 天停用，如果未將其加以犧牲的話，這些老鼠均可很健康的存活下來。在第 100 天時將這些經干擾素治療的老鼠犧牲並進行器官的病理檢驗，均未發現任何殘存的腫瘤。

實施例 4 由口腔黏膜施用干擾素來對抗水泡性口炎病毒 (vesicular stomatitis virus, VSV) 之的效果

在一組 10 隻，於不含病原環境下培養大的六週大的老鼠之鼻孔內接種 $10 \mu\text{l}$ 100 LD50 之水泡性口炎病毒 (VSV) (Tovery et al., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1974, 146:406-415)。接種後 7 小時，將老鼠分為不治療，或每天一次連續 4 天經由鼻或口途徑以內含老鼠 α / β -干擾素在總體積 $10 \mu\text{l}$ 之費立基賦型劑 (Ferimmune excipient)，或單獨 $10 \mu\text{l}$ 之賦型劑 (控制組) 來進行治療。

以 α / β -干擾素來治療成鼠可大大提升感染了致死劑量之水泡性口炎病毒老鼠之存活率。因此，30% 經過 10,000 IU 之 α / β -干擾素治療的老鼠在接種了致死劑量之水泡性口炎病毒後的 21 天仍能存活，同樣情況下所有未受治療，或僅以賦型劑作治療的控制組老鼠則在感染後第 10 天已全部死亡。臨床觀察顯示所有經過干擾素

五、發明說明 (89)

治療且在第21天後仍存活的老鼠均可很健康的存活下來。
實施例5 由口腔黏膜施用干擾素對細胞內蛋白質表現的影響。

已知 α - 干擾素在與其位於細胞表面的受體結合後可誘發許多細胞內蛋白質的表現。一般認為這些蛋白質能作為干擾素在細胞內產生作用時的標記。

我們評估了以鼻內／口途徑施用 α - 干擾素對干擾素所誘發的三種蛋白質之表現的影響，亦即MHC第一型抗原，Ly6A/E抗原和2'-5'-寡腺苷酸合成酶（2'-5'-oligoadenylate synthetase）。

經由口腔黏膜以高達20,000 IU之老鼠 α - 干擾素來治療DBA-2 老鼠（H-2Kd）並未明顯的增加H-2-Kd之週邊血液淋巴細胞，單核細胞或粒細胞之表現，而在同樣情況下僅須20 IU之老鼠 α - 干擾素即可大量增加H-2-Kd抗原在週邊血液單核細胞或粒細胞之表現。的確，在單核細胞上的表現稍微受到抑制。

同樣的，經由鼻內／口以高達20,000 IU之老鼠 α - 干擾素來治療DBA-2 老鼠（H-2Kd）對Ly 6A/E 抗原的表現並未有明顯的效果，在以非經腸胃的方式來施用第一型干擾素後可大量增加此抗原在許多種淋巴細胞表面的表現（Dumont et al., J. Immunol, 1986, 137: 201-210）。經由鼻內／口以200 或 20,000 IU 之老鼠 α - 干擾素或人類 α -1-8- 干擾素來作治療也會得到類似的結果。

五、發明說明(20)

經由非經腸胃的注射僅以 20 IU 之老鼠 α - 干擾素來治療瑞士或 DBA/2 老鼠可大量增加 2'-5'-寡腺苷酸合成酶在週邊血液單核細胞及脾細胞內之表現。相反的，同樣的實驗，經由鼻內／口以高達 200 或 20,000 IU 之老鼠 α - 干擾素或人類 α -1-8-干擾素來治療，在干擾素治療開始後 10 內之任何一個時間下進行測量，發現其對 2'-5'-寡腺苷酸合成酶的活性並未有明顯的效果。實施例 6 經由口腔黏膜來施用干擾素後干擾素之生物可利用性。

為測試干擾素之生物可利用性及其藥學動力學，將適於本研究具有最佳藥物血液體積比之老鼠，以具最高量碘 125 標定之單一高劑量基因重組式 α - 干擾素來進行治療。

將 70×10^6 IU 之純化的人類 α -1-8- 干擾素溶於 1.4 ml 之 PBS 中，並以 Mogensen 等人 (Int. J. Cancer, 1981, 28: 575-582) 所述改良自 Hunter 及 Greenwood 等人 (Nature, 1962 194:495-496) 之氯胺-T (Chloramine-T) 方法來作碘的標定。

以 VSV 刺激人類 WISH 細胞來測試標有 125 I 之人類 α -1-8-干擾素 (批號 CGP 35269-1) 之生物活性，所測得之生物活性為 2×10^7 IU/ml，而以 VSV 刺激老鼠 L929 細胞時其生物活性則為 1×10^6 IU/ml。

六至七週大的瑞士雌鼠分別以靜脈注射，腹膜注射，或經由鼻內／口給予相當於 1×10^6 之老鼠 IU 的 2×10^7 IU

五、發明說明(3)

標有 ^{125}I 之人類 α -1-8-干擾素 (1.0369×10^7 cpm/老鼠)。在所示時間內，將每組三隻老鼠加以犧牲，收集其血液，並測定體積。分別摘取腎臟，肝臟，肺臟，胰臟，及胃／食道，擦乾後稱重至準確度為 $\pm 1.0 \mu\text{g}$ 。以 γ 射線計數器來測每一個樣品的放射線強度。以離心 (800g ，10分鐘； 4°C) 來分離全血，並收集血清，計數後凍 -80°C 。之後在人類 WISH 細胞和老鼠 L929 細胞中以上述之標準的生物分析法測定血清中干擾素的含量。之後以親和性免疫沉澱法來分離血清樣品中的放射性物質並以 SDS-PAGE 加以分析。

每隻老鼠經靜脈注射了 1.0369×10^7 cpm 標有 ^{125}I 之人類 α -1-8-干擾素 5 分鐘後，可在其周邊血液中測得高量的放射線 ($>2 \times 10^6$ cpm/ml)。全血中的放射線強度會在之後的 15 至 30 分鐘內迅速降低。周邊血液中的放射線強度在腹膜注射了 1.0369×10^7 cpm 標有 ^{125}I 之人類 α -1-8-干擾素 5 分鐘後約比剛開始注射時的強度低了 20 倍。在注射後 15 至 30 分鐘內放射線強度會迅速的增加。動物體在經由鼻內／口施用標有 ^{125}I 之人類 α -1-8-干擾素 5，10，或 15 分鐘後其血液中的放射線強度顯著的低於開始注射相同量具有同樣放射性標示物之干擾素時的強度。對三種施用途徑而言，經由鼻內／口施用標有 ^{125}I 之人類 α -1-8-干擾素後在血清中所測得之放射線強度要高於全血中所能測得的強度。與同樣體積的血清相較下，

五、發明說明(32)

在全血中所測得之每毫升的放射線強度顯示在去除了全血中其它細胞內成分後之血清具有較高的體積。

以前述之標準分析方法來分析本研究中所有老鼠血清樣品中具有生物活性的干擾素，結果顯示在所有經靜脈或腹膜注射了標有¹²⁵I之人類 α -1-8-干擾素的老鼠體內，無論是那一個測試時間，均可在其血清中測到有生物活性的干擾素。相反的，在經由口鼻途徑施用干擾素的動物體內，無論是那一個測試時間，均無法在任一動物體之血清中測到具有生物活性的干擾素，即使這些動物的血清中含有非常高的放射線強度。

為證實以標有¹²⁵I之人類 α -1-8-干擾素作治療的動物其血清中的放射性物質的確代表原始的干擾素，因此將樣品以連有A-蛋白質之G-瓊脂膠來進行免疫沉澱，為使存在於樣品中的免疫球蛋白能被沉澱出來，以由親和性法純化出的抗 α -干擾素之多株抗體來作處理，並進一步進行免疫沉澱。之後將樣品以上述方法來進行SDS-聚丙稀醯胺膠質電泳(SDS-PAGE)。

在由靜脈或腹膜注射標有¹²⁵I之人類 α -1-8-干擾素後以SDS-PAGE來分析血清中的放射性物質，只發現一條單獨均勻的蛋白質其移動位置與標有¹²⁵I之人類 α -1-8-干擾素的移動位置相同。此物質之分子量經估計大約為20000 D，約相當於人類 α -1-8-干擾素之原始重量。相反的，經由鼻或口腔黏膜給予標有¹²⁵I之人

五、發明說明 (33)

類 α -1-8-干擾素之老鼠血清樣品中，即使每一片膠片上含有幾乎完全相同量之放射線物質，也未在樣品中發現與原始干擾素重量類似之放射性物質。

放射性物質在組織中的分佈顯示動物體在經由靜脈注射標有 ^{125}I 之人類 α -1-8-干擾素 5 分鐘後，在腎臟出現非常高的放射性，肝臟，肺臟，和胰臟也有高量的放射性。這四種器官內的放射性強度會在 15 至 30 分鐘內開始大幅度的下降。相反的，胃的放射線強度則會在 15 至 30 分鐘內開始大幅度的增加，直到其強度與動物體在靜脈注射 30 分鐘後其血清中的放射性強度相同為止。

若是經由腹膜注射標有 ^{125}I 之人類 α -1-8-干擾素，則放射線強度會在 15 分鐘內於所有的組織中達到高峰，且在接下來的 30 分鐘內逐漸下降。同樣的，經由鼻或口腔黏膜給予標有 ^{125}I 之人類 α -1-8-干擾素，則放射線強度會在 15 分鐘內於所有的組織中達到高峰，且在 30 分鐘後稍稍下降。經由鼻或口腔黏膜給予標有 ^{125}I 之人類 α -1-8-干擾素後，在胃 / 食道中的放射線強度較其它器官中約大一倍，且遠較以非經腸胃的方式，無論是靜脈或腹膜注射，給予這些組織同量的放射性人類 α -1-8-干擾素之量來得高出許多。

實施例 7 經由鼻內 / 口施用干擾素後干擾素之藥學動力學

在由靜脈，腹膜注射或經由鼻 / 口給予每隻老鼠 1.0369×10^7 cpm 標有 ^{125}I 之人類 α -1-8-干擾素後，

五、發明說明(74)

進行4次測試以決定人類 α -1-8-干擾素之藥學動力學特性，在24小時內一系列的時間點中測定全血及血清中放射性物質之強度。

靜脈注射後老鼠全血及血清中標有 ^{125}I 之人類 α -1-8-干擾素之藥學動力學分佈圖呈一對數清除率曲線。此結果與先前在老鼠身上以類似的分子，基因重組之人類 I A/D (Bgl) (Bohoslawed et al; J. IFN Res., 1986, 6:207-213) 所作出的研究報導結果一致。由濃度時間曲線下的面積所算出來的可供生物利用之物質的量，也和人類 α A/D 之結果類似。靜脈注射標有 ^{125}I 之人類 α -1-8-干擾素之動力學分佈圖曲線呈一二時間消耗清除率曲線，此乃是腎臟清除物質時所表現出的特性，此與範例6的結果一致。腹膜注射後標有 ^{125}I 之人類 α -1-8-干擾素之藥學動力學曲線與先前以肌肉注射干擾素在老鼠身上所作的結果一致。

不論是經由靜脈或腹膜注射了標有 ^{125}I 之人類 α -1-8-干擾素後，在所有老鼠之血清中都可以偵測到具有生物活性的干擾素。

1. 抗癌活性之討論

富藍得紅白血病模型系統中包含一嚴謹的屬於臨床應用前的抗癌活性測試，由於富藍得紅白血病細胞屬惡性且經由靜脈注射後會轉移至肝臟和胰臟細胞。的確，以此模型所得之結果為採用非經腸胃道施用 α -干擾素來治療人

五、發明說明 (35)

類腫瘤的基礎。因此，用於本研究中所有實驗中未經處理或以控制組藥物處理過之動物均在 10 至 11 天內死亡。如果沒有治療的話，僅注射了 4 或 5 個富藍得紅白血病細胞即足夠殺死一隻老鼠。相反的，某些動物在接種了 10⁵ 的富藍得紅白血病細胞 100 天後，經由口腔黏膜以老鼠 α -干擾素來治療後仍然可以存活，因此此治療也被認為乃屬有效的。

的確，由前述的結果判斷，經由口腔黏膜來施用 α -干擾素似乎比經非腸胃道施用環磷醯胺，5-氟脲嘧啶，或氨基甲基葉酸來得更有效，且以這些藥物僅能增加注射了富藍得紅白血病細胞之動物幾天的生命而已 (Gresser et al., J. Natl. Cancer Inst., 1988 80:126-131)。其它藥物，例如順氯氨鉑 (cisplatin)，長春新鹼 (vincristine)，阿黴素 (doxorubicin)，博萊黴素 (bleomycin) 或鬼臼乙叉甙 (etoposide) 對此種癌並無作用 (Gresser et al., I. Natl. cancer Inst., 1988 80:126-131)。

同樣的，經由口腔黏膜施用 α -干擾素來對抗富藍得紅白血病似乎比在全身使用其它細胞素例如白介素- β ，白介素-2 和 α -干擾素來得更有效，這些細胞素在此模型系統中所展現的活性非常小。

先前的研究結果顯示以非經腸胃途徑來施用干擾素乃是此模型中最具抗癌效果的藥物，並且即使在癌細胞已開

五、發明說明 (76)

始轉移至肝臟時此干擾素療法仍非常有效 (Gresser et al, Intl. J. Cancer, 1987 39: 789-792)。本研究結果顯示經由口腔黏膜施用干擾素與上述方法同樣，或甚至更有效。

當被診斷出已患有淋巴瘤後，相較於只服用 α -干擾素或只服用環磷醯胺的老鼠，每天注射 α -干擾素並同時服用單一劑量之環磷醯胺，能大幅提高帶有淋巴瘤之 AKR 老鼠的生存機率 (Gresser et al, Eur. J. Cancer, 1978 14: 97-99)。在先前各種臨床前的動物試驗模型系統中也提到了一些成功結合了使用 α/β -干擾素和 BCNU，cis-DDP (順氯氬鉑)，氨基甲基葉酸，阿黴素，和 α -二氟甲基鳥氨酸的療法。有報導指出結合 5-氟脲嘧啶 (5-FU) 和干擾素的療法對治療人類轉移性直腸癌有所助益 (Ernststoff et al, Journal of clinical Oncology, 1987 7:1764-1765)。然而，也有其它報導指出合併使用干擾素和環磷醯胺 (Marquet et al, Int. J. Cancer, 1983 31: 223-226; Lee et al, Biochem. Pharmacol., 1984 33: 3439-3443)，阿黴素 (Blackwill et al, cancer Res., 1984 44: 904-908)，或 5-氟脲嘧啶 (Marquet et al, 1985 109: 156-158) 會降低其抗癌活性，亦即，在某些報導中已顯示同樣的藥物當以非經腸胃途徑與干擾素合併施用時能有所助益。可以在此所述之方法來測試結合使用干擾素和其它化療法藥物的效果。

五、發明說明 (37)

在注射了富藍得紅白血病細胞之老鼠身上合併使用白介素 -1 (IL-1) 和 α / β - 干擾素可更增加其抗癌活性 (Belardelli et al, Int. J. Cancer, 1991 49: 274-278)。同樣的療法對具轉移性質的 Eb 淋巴瘤 (p11-R-Eb) 也有同樣的抗癌效果，任一藥物在單獨使用時均無抗癌活性 (Gabriele et al, Invasion Metastasis, 1993 13: 147-162)。在所有已測試過的細胞素中，當與非經腸道之第 I 型干擾素合併使用時白介素 -1 乃是最有效的。

合併使用血管原抑制物 AGM-1470 [(氯乙醯基)-氨基甲酸 (3R-3 α , 4 α (2R*, 3R*), 5 β , 6 β))-5-甲氧基 -4-(2-甲基 -3-(3-甲氧基 -2-丁烯基)環氧基)-1-氧代螺環(2.5)辛-6-基酯]([(chloroacetyl)-carbamic acid (3R-3 α , 4 α (2R*, 3R*), 5 β , 6 β))-5-methoxy-4-(2-methyl-3-(3-methoxy-2-butenyl)oxiranyl)-1-oxaspiro(2.5)oct-6-yl ester]) 與 α / β - 干擾素較單獨使用任一藥劑更可大幅增加其抗癌活性 (Brem et al, J. Pediatric Surgery, 1993 28: 1253-1257)。

已知高熱可提高 α / β - 干擾素對抗路易士肺癌之抗癌活性 (Yerushalmi et al, Proc. Soc. Exp. biol. Med., 1982 169: 413-415)。已知精氨酸丁酸酯能增強 α - 干擾素之抗癌活性 (Chany and Cerutti, Int. J.

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (28)

Cancer, 1982 30: 489-493) 。經由口腔黏膜途徑給予某一類型及劑量之干擾素其所提供的保護程度與系統系施用(腹膜注射)時之結果相比較,顯示以非經腸胃道的方式施用干擾素在某些病例中能提供稍許好處,在某些病例中則不見得比經由口腔黏膜途徑來得更有效。

2. 抗病毒活性的討論

雖然抗病毒活性無法由經鼻內/口途徑給予標有¹²⁵I之人類 α -1-8-干擾素,老鼠 α/β -干擾素和老鼠 α -干擾素之動物體血清中測得,但在這些注射了致死劑量之腦心肌炎病毒(EMCV)的動物體上卻可觀察到在統計學上有意義的保護效果(表1)。

我們由此一設計良好的臨床前急性病毒感染實驗模型系統中所得的結果能為在口腔黏膜上使用高劑量干擾素以治療人體急性系統性病毒感染提供一些原則性證據的支持,此模型系統同時也顯示了無論是使用各類天然 α -干擾素亞型的混合物或是單一重組 α -干擾素異構物(例如老鼠之 α -干擾素)其抗病毒活性在統計學上顯著。當經由口腔黏膜途徑施用時,天然之老鼠 α/β -干擾素和人類 α -1-8-干擾素乃同樣有效。重組 θ -干擾素和老鼠 κ -干擾素也有類似的抗病毒活性。

3. 一般性的討論

前導性之生物標記實驗結果很清楚的顯示所測試的三種生物標記(MHC第一型抗原, Ly6 A/E抗原, 和

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明(39)

2'-5'-oligoadenylate合成酶)在經由口腔黏膜施用干擾素後均能有效的反應出所標記之生物活性(例如,抗癌和抗病毒活性)。

在所有實驗中經由腹膜注射僅僅 20 IU之干擾素即可造成所有三種干擾素引起之蛋白質的表現,而經由口腔黏膜施用高達 20,000 IU 之干擾素後卻未能測得任何影響,這兩種實驗結果的差異是相當令人驚奇的。

雖然我們無法排除在更早期或中期的時間點內觀察到對一或其它生物標記的影響之可能性,但似乎不太可能,因為干擾素乃作用在編碼這些蛋白質的基因之轉譯上,因此並不會預期看到對於這些生物標記的影響直到干擾素處理數小時。

同樣的,雖然我們無法排除在經由口腔黏膜途徑施用干擾素後對其他多種干擾素誘導之蛋白質之一所造成之系統性影響,但似乎不太可能,因為有可能某些干擾素誘導之基因之表現乃受到不同的調控。但是,許可在局部觀察到對干擾素生物標記的影響,例如,在經由口腔黏膜途徑施用 α 干擾素後在鼻淋巴細胞中局部觀察到。

與未能在生物標記實驗中測到任何影響之結果一致的是,在口腔黏膜治療中即使動物體被注射了高達 20,000 IU之干擾素,也未能在口腔黏膜干擾素治療期間監測的任何血液或血液化學參數觀察到一致的影響。

生物活性藥學動力學實驗的結果很清楚的顯示以敏感

五、發明說明(40)

度較以前方法高一倍的方法也無法在週邊血液測到干擾素的情況下，經由口腔黏膜施用一單一劑量具放射線標示的人類 α -1-8- 干擾素可得到在統計學上具有意義的抗病毒效果。且經由口腔黏膜施用干擾素所得抗病毒活性程度曲線遵循傳統的劑量反應關係曲線。

經由口腔黏膜施用標有 ^{125}I 之人類 α -1-8- 干擾素至動物體內，可輕易的在其全血及血清中偵測到具放射性的物質。這些結果與前述結果不同之處，即在於即使經由口腔黏膜在動物體上施用了高量未有放射線標示的干擾素，也無法在其全血及血漿中偵測到干擾素。但是，經由口腔黏膜施用後在全血及血漿中偵測到的放射性物質乃是具有生物活性的。再者，SDS-PAGE 的分析結果顯示此物質具有低分子量，且很可能是在腸胃消化干擾素之後其降解產物的再吸收所致。經由口腔黏膜施用後分析此放射性物質在組織中的分佈顯示該放射性物在胃的強度要高過任何其它經測試的器官。我們的結果顯示在經由口腔黏膜施用後即使具生物活性的干擾素尚未被吸收，此種治療方法在生物體內仍表現出顯著具統計學意義的抗癌及抗病毒活性。

在不受限於任何有關能解釋這些有利效果之作用機制的前題下，我們的結果顯示經由口腔黏膜施用干擾素乃是經由目前一種仍無法定義的新機轉使其能有對抗癌細胞及病毒的效果，此新機轉並未牽涉到外加干擾素的直接作用

五、發明說明 (41)

，或誘發內在干擾素產生作用。這點可由無法由循環系統中測得任何干擾素或任一生物標計物上得到證實。此機轉有一部分似乎乃是經由刺激環繞口鼻腔週圍許多的淋巴組織來達成。由於我們已經證實經由口腔黏膜施用干擾素所產生的效果與系統性施用干擾素之效果類似，因此我們的結果對以經由口腔黏膜施用干擾素來治療腫瘤或病毒性疾病的方法提供了一強而有力的證據。這點對將干擾素用於臨床上可能非常重要。

在此為能清楚的解釋之故對本發明作了很詳細的描述，但對熟習技藝的人士而言，應該可以了解任何在此所述之方法或實施例之改良或變化均應不悖離在此所揭露之本發明的精神及觀念範疇內。

表 1

施用單一劑量標有 ¹ ² ⁵ I 之人類 α -干擾素對治療接種了腦心肌炎病毒之瑞士鼠之存活率的影響

			每組中存活的動物數目(注射後天數)									
治療組	劑量	途徑	3	4	5	6	7	8	9	10	15	30

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (42)

未治療			6/6	4/6	2/6	0/6							
人類 α -1	1.4 $\times$	口腔											
8-干擾素	10^5 IU	黏膜	6/6	5/6	4/6	3/6	1/6	1/6	1/6	1/6	1/6	1/6	1/6
老鼠 α /	6.4 $\times$	口腔											
β 干擾素	10^4 IU	黏膜	6/6	5/6	5/6	4/6	3/6	2/6	2/6	2/6	1/6	1/6	1/6

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

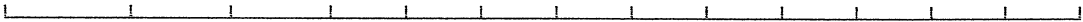
表 2

單一劑量（每天一次連續四天）老鼠 α -干擾素對治療接種了腦心肌炎病毒之瑞士鼠之存活率的影響

			(注射後天數)									
治療組	劑 量	途 徑	3	4	5	6	7	8	9	10	15	30
未治療			10/ 10	9/ 10	1/ 10	0/ 10						
老鼠 α / β 干擾素	2 $\times$ 10 ⁴ IU	口腔 黏膜	10/ 10	10/ 10	10/ 10	10/ 10	10/ 10	10/ 10	10/ 10	9/ 10	7/ 10	7/ 10

A7
B7

五、發明說明(43)



(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

線

四、中文發明摘要 (發明之名稱：)

用於口腔黏膜接觸以刺激哺乳動物的宿主
防衛機制或免疫反應之干擾素組成物

用於口腔黏膜接觸以刺激哺乳動物宿主防衛機制或免疫反應之干擾素組成物，包含一足以產生刺激之干擾素量，此量須高過施用於非經腸道之干擾素劑量，以此組成物來治療之方法及此口腔黏膜組成物製備中所用之干擾素。

英文發明摘要 (發明之名稱：)

Interferon Composition for Oromucosal Contact to Stimulate host Defense Mechanisms or an Immune Response in a Mammal

Interferon composition for oromucosal contact to stimulate host defense mechanisms or an immune response in a mammal with a stimulating amount of the interferon which exceeds parenterally administered amounts of interferon, methods of treatment with such compositions and uses of interferon in the preparation of such oromucosal compositions.

六、申請專利範圍

1. 一種干擾素組成物，用於口腔黏膜接觸以刺激哺乳動物宿主防衛機制或免疫反應，該組成物係包含由 20×10^6 IU 至 1000×10^6 IU 的干擾素之刺激量，該量係超過當非經腸道施用時會引起病理反應之量。

2. 如申請專利範圍第 1 項之干擾素組成物，其用於口腔黏膜接觸以刺激哺乳動物的宿主防衛機制或免疫反應，該哺乳動物係受到腫瘤，自體免疫或慢性病毒攻擊，或受到急性病毒攻擊，其選自流行性感冒病毒，日本 B 型腦炎，由壁蝨媒介的腦炎及疱疹性腦炎，出血性熱包括伊波拉病毒，馬伯病毒 (Morburg virus)，拉薩熱 (Lassa fever)，漢他病毒感染，以及可由動傳染至人類的病毒感染，包括馬的麻疹病毒，該組成物係包含由 20×10^6 IU 至 1000×10^6 IU 的干擾素之刺激量，該量超過當非經腸道施用時會引起病理反應之量。

3. 如申請專利範圍第 1 項之干擾素組成物，其用於口腔黏膜接觸以刺激哺乳動物的宿主防衛機制或免疫反應，該哺乳動物係患有多發性骨髓瘤，髮細胞白血病，慢性骨髓白血病，低等淋巴瘤，細胞淋巴瘤，類癌樣瘤，腎臟瘤，腎細胞癌，肝細胞癌，癌症，結腸直腸癌，神經膠母細胞瘤，結腸癌，及惡性腦瘤，其中該組成物包含一治療上有效量的干擾素，該量高於 20×10^6 IU。

4. 如申請專利範圍第 1 至 3 項中任一項之組成物，其包含單一有效且無毒之干擾素劑量。

六、申請專利範圍

5. 如申請專利範圍第 1 至 3 項中任一項之組成物，其包含多個干擾素的較小劑量，其足以引起相當於使用單一劑量時所引發之宿主防衛或免疫系統之反應。

6. 如申請專利範圍第 1 至 3 項中任一項之組成物，其施用刺激宿主防衛或免疫反應，提供連續無毒的劑量一段時間，且此段時間足以引發相當於使用單一劑量時所引起之宿主防衛機制或刺激免疫反應。

7. 如申請專利範圍第 2 項之組成物，其係用來治療腫瘤狀況。

8. 如申請專利範圍第 2 之組成物，其係用來治療病毒感染或慢性病毒感染。

9. 如申請專利範圍第 2 項之組成物，其係用於治結核病。

10. 如申請專利範圍第 1 至 3 項中任一項之組成物，其包含一干擾素及一干擾素誘發物。

11. 如申請專利範圍第 1 至 3 項中任一項之組成物，其包含另一種治療藥劑以用於同時，分開或連續的治療中。

12. 如申請專利範圍第 1 至 3 項中任一項之組成物，其中該治療藥劑乃選自抑制細胞生長，抗癌，抗血管生成，和抗病毒藥劑中。

13. 如申請專利範圍第 1 至 3 項中任一項之組成物，其中該干擾素係為第 I 型干擾素。

六、申請專利範圍

1 4 . 如申請專利範圍第 1 3 項之組成物，其中該第 I 型干擾素係選自 α - 干擾素， β - 干擾素， ω - 干擾素，保守干擾素，及其混合物所組成之族群中。

1 5 . 如申請專利範圍第 1 4 項之組成物，其中該第 I 型干擾素係為 α - 干擾素。

1 6 . 如申請專利範圍第 1 3 項之組成物，其中該干擾素係為重組物質。

1 7 . 如申請專利範圍第 1 至 3 項中任一項之組成物，其中該干擾素係為第 II 型干擾素。

1 8 . 如申請專利範圍第 1 7 項之組成物，其中該第 II 型干擾素係為 γ - 干擾素。

1 9 . 如申請專利範圍第 1 7 項之組成物，其中該干擾素係為重組物質。

2 0 . 一種用於口腔黏膜施用以單位劑量形式之醫藥組成物，其係包括 20×10^6 IU 至 1000×10^6 IU 之干擾素及一藥學上可接受之載體。

2 1 . 如申請專利範圍第 2 0 項之組成物，其包括 20×10^6 IU 至 500×10^6 IU 之干擾素。

2 2 . 如申請專利範圍第 2 1 項之組成物，其包括 50×10^6 IU 至 500×10^6 IU 之干擾素。