



[12] 发明专利申请公开说明书

[21]申请号 94193037.8

[51]Int.Cl⁶

A61K 31/19

[43]公开日 1996年8月14日

[22]申请日 94.7.12

[30]优先权

[32]93.7.12 [33]CZ[31]PV1385-93

[86]国际申请 PCT/CZ94/00015 94.7.12

[87]国际公布 WO95/02398 英 95.1.26

[85]进入国家阶段日期 96.2.9

[71]申请人 阿拉乔斯医药公司

地址 捷克布拉格

[72]发明人 O·库福达基

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商
标事务所

代理人 张元忠

A61K 31/195 A61K 31/51

A61K 31/70

权利要求书 1 页 说明书 13 页 附图页数 3 页

[54]发明名称 用于免疫调节和佐剂治疗的药物组合物

[57]摘要

用于免疫调节和佐剂疗法的药物组合物，它包括代谢增强剂、2-脱氧-D-核糖和其它活性成分，即，核糖、DL-丙氨酸、尼克酸、L-抗坏血酸、维生素、硫胺和谷氨酸酰胺。此药物组合物用于免疫调节和佐剂疗法及预防免疫体系的减弱。

权 利 要 求 书

1. 用于免疫调节和佐剂治疗的药物组合物,其特征在于此组合物含有溶于 1000ml 生理盐水中的:

D—核糖	10 至 35g
2—脱氧—D—核糖 (代谢增强剂)	10 至 35g
DL— α —丙氨酸	2 至 12g
尼克酸	2 至 10g
L—抗坏血酸	7 至 20g
硫胺	0.2 至 2g
谷氨酰胺	0.01 至 15g

2. 根据权利要求 1 的药物组合物,其特征在于,它是静脉应用的合适形式。

3. 根据权利要求 1 的药物组合物,其特征在于,它是腹腔应用的合适形式。

4. 2—脱氧—D—核糖用于制造权利要求 1 至 3 药物组合物以用于免疫调节和佐剂治疗的用途。

说 明 书

用于免疫调节和佐剂治疗的药物组合物

本发明涉及一种用于免疫调节和佐剂治疗及预防免疫体系减弱的药物制品。

目前用于治疗各种免疫缺陷、自身免疫病及恶性病的免疫调节组合物可根据它们的组成和起源分为几组。这些组合物的重要一组例如通胸腺激素形成，此胸腺激素可从动物组织提取产生，并在指定的 Thymus V—fraction (Hoffmann LaRoche)、Thymodulin 和 Leucotropina (Ellem)、Thymunox (Cilag) 或 TFX (Polfa) 范围内分布。另一组特别是在基础医学研究领域颇受注意的免疫调节化合物是细胞因子，细胞因子是在细胞水平控制免疫应答的主要化合物。基因工程技术使重组蛋白质易于制备，它们是免疫调节组合物中活性成份，例如，Roferon (干扰素 α_2)、(Hoffmann LaRoche)、或血小板生成因子 G—CSF (Hoffman LaRoche) 分布在指定的 Neupogen 范围内。在感染的免疫疗法会议上 (Berlin, 1993 年 5 月 4—7 日) 使用 IL—2 的经典疗法已经讨论了，特别讨论了在部分患者失败的观点。白细胞的透析液也是很流行的免疫调节剂。在捷克共和国，它们被称为转移因子 (Sevac)。依赖于选择的抗原的佐剂活性的化合物属于最古老的和仍常用的试剂，此抗原源于细菌细胞膜的成份，例如，Stava (Sevac)、Olimostimulin (Medical Faculty of the Palacky University, Olo-

mouc,)。东方医药,特别是中国医药,以古老的传统为基础,注重于植物起源的免疫刺激化合物,及根据本欧洲研究(感激的免疫疗法, Berlin, 1993年5月4—7日)水平它们的活性机制。

来自希腊专利说明书 72440 (dr. T. H. Alivizatos) 的已知组合物为包含 D—核糖、DL—丙氨酸、尼克酸和维生素 C 的混合物,此混合物也被认为是一种组合物,此组合物有重要的免疫调节活性,能重建代谢平衡,增强机体的免疫力。

根据免疫调节疗法的现代概念,进行机体免疫力的靶向作用,而且必须限定功能区及任何药物制品的功能特性。如此定义在仍最常用的免疫调节化合物存在情况下,是非常复杂和非常困难的。所有这些困难存在的原因一方面是从生物资源(因此,定义所有它们可能的生物活性是困难的)获得一些免疫调节化合物,另一方面,所有这些化合物有许多生物活性,使在调节免疫体系的范围方面其功能的定位不可能。基于单个细胞因子使用的疗法根据现代经验是复杂的,经许多危害,它们是细胞因子受体的自身调节机制的相关结果,而且继而免疫体系的效率降低了。也知道,经外源性细胞因子激活免疫体系不是有充分价值的,而其它天然成份是丢失的。因此有希望制备一种免疫调制品,它能活化在“生理水平上”的体系,意味着在天然调节相关和控制的范围之内。

本发明的目的在于用于免疫调节和佐剂疗法的药物组合物,此组合物包括代谢增强剂。根据关于免疫应答的调节及通过代谢增强剂可能影响此应答的已知信息,本发明拓宽了上述希腊专利说明书的知识范围。代谢增强剂是一种天然非毒性化合物,在此情况下 D—单糖的脱氧衍生物可影响细胞因子的生产,这意味着它是细胞水平免疫

应答的真正调节剂。

本发明的目的是用于免疫调节和佐剂疗法的药物组合物，此组合物包括：

D—核酸	10—35g
2—脱氧—D—核糖（代谢增强剂）	10—35g
DL— α —丙氨酸	2—12g
尼克酸	2—10g
L—抗坏血酸	7—20g
硫胺	0.2—2g
谷氨酰胺	0.01—15g

将这些成份溶于 1000ml 生理盐水中。

D—单糖脱氧衍生物的存在使其能对免疫体系产生靶向作用，而且能用于治疗较宽范围免疫缺陷及免疫系统疾病，特别是自身免疫疾病及和上述希腊专利说明书比较的肿瘤疾病的药物制品的应用。

本发明实施例

实施例 1

根据实施例 A 的药物制品的组合物

10g D—核糖

10g 2—脱氧—D—核糖

2g DL— α —丙氨酸

2g 尼克酸

7g 抗坏血酸

溶于 1000ml 生理盐水中。

实施例 2

生产特异性抗体的实施例 1 的制品的活性。

用 C3H 小鼠血清免疫 7 天后，通过卵蛋白，用 ELISA 测定特异性抗体。根据实施例 A 重复给定了制品，5 次 0.2ml i. p.。结果见下表：

组	抗体 ^x	对照 (%)
对照	672, 8±55, 62	100
试验组	1055, 3±387, 6	156, 8

X (平均数±标准差)

从表 1 给定的值清楚地看出，根据此实施例的药物制品显著地促进了特异性抗体的生产。

实施例 3

通过促细胞分裂剂诱导的脾细胞增殖及混合淋巴细胞反应方面，根据实施例 A (实施例 1) 的制品的活性。

使用悬浮小滴方法进行试验。根据实施例 A，给定制品的量为 3 × 0.2ml。腹腔注射于 C3H 小鼠。在紧接着用药的最后一天，切除脾，并进行试验。使用了促细胞分裂剂 ConcavallinA (CONA)、Phytohaemagglutinine (PHA) 及脂多糖 (LPS)。在试验对混合淋巴细胞 (MLR) 培养时，使用了来自于 DBA/1 小鼠的脾细胞作为同种抗原。

下列表中给出了此实施结果

从结果中看出，根据此实施例，本发明的制品不能刺激由 CONA、PHA 和 LPS 诱导的淋巴细胞的增殖，甚至可以看到抑制此增

殖。

组	dpm \pm SE	对照 (%)
CON A		
对照组	834,8 \pm 175,0	100
试验组	490,7 \pm 70,9	58,8
PHA		
对照组	1065,4 \pm 306,0	100
试验组	593,7 \pm 125,9	55,7
LPS		
对照组	1068,9 \pm 274,4	100
试验组	521,8 \pm 96,7	44,8
MLR		
对照组	494,2 \pm 49,6	100
试验组	477,3 \pm 97,2	96,6

实施例 4

根据本发明实施例 B 药物制品的定量构成：

35g D—核糖

35g 2—脱氧—D—核糖

12g DL— α —丙氨酸

10g 尼克酸

20g 抗坏血酸

溶于 1000ml 生理盐水中。

实施例 5

根据实施例 B，生产特异性抗体的药物制品的活性。

用 C3H 小鼠的血清, 在免疫第 7 天用卵蛋白给 ELISA 测定特异性抗体。根据实施例 B, 重复给定了制品, 5 次 0.2ml, 腹腔注射。结果见下表。

组	抗体 ^x	对照 (%)
对照组	672,8 ± 55,62	100
试验组	592,4 ± 95,4	88

^x 数 ± 标准差

从结果看出, 根据实施例 B 的药物制品不能刺激特异性抗体的产生。

实施例 6

通过促细胞分裂剂诱导的脾细胞的增殖及混合淋巴细胞反应, 根据实施例 B 的制品的活性。

使用悬浮小滴方法进行试验。根据实施例 B, 使用制品的量为 3 × 0.2ml, 腹腔注射于 C3H 小鼠。在接着用药的最后一天除去脾, 进行试验。使用了促细胞分裂剂 ConcavallinA (CONA)、Phytchaemagglutinine (PHA) 和脂多糖 (LPS)。在进行混合淋巴细胞培养 (MLR) 试验时, 来自 DBA/1 小鼠的脾细胞用作同种抗原。

组	dpm ± SE	对照 (%)
---	----------	--------

CON A		
对照组	834,8 ± 175,0	100
试验组	1109,4 ± 225,3	132,9
PHA		
对照组	1065,4 ± 306,0	100
试验组	1475,6 ± 213,4	138,5
LPS		
对照组	1068,9 ± 274,4	100
试验组	1500,6 ± 258,2	140,4
MLR		
对照组	494,2 ± 49,6	100
试验组	411,0 ± 47,7	83,2

从结果中看出，根据实施例 B 的药物制品不能显著地刺激由 CONA、PHA 和 LPS 诱导的脾细胞的增殖。

说明：

在试验中没有使用通用的标准品，因为 WHO 还没有建立合适的而且一般有效的免疫调节制品，这种制品与其它或新制品可进行比较（免疫调节制品特性的定义问题已于有关现有技术情况的段落中讨论了）。

实施例 7

根据实施例 B，培养小鼠黑色素瘤 B16，药物制品的活性。

将小鼠黑色素瘤经右侧皮内接种于 20 个小鼠，C57B16 细胞株。吸入移植液后，使用药物制品，根据 Grossmann V., Jarkovsk^á I., Kvetina J.: Farmacie 9, 1988: 400—404 用于体表人/小鼠量的改变。这意味着，根据实施例 B 每只鼠总是有 0.04ml 制品进入尾静脉。每使用 5 次，间隔两天，二十八天使用二十次制品。对照组鼠获得同等量的生理盐水（10 个鼠移植了 B16 黑色素瘤）。每三天观察肿瘤一

次,使用 Slide calliper 估计肿瘤大小。同时估计生长曲线和鼠的重量。根据实施例 B 在治疗期间通过使用药物制品可证实在肿瘤的实验组和对照组之间肿瘤大小的显著差异。治疗之后,此差异已不显著。显然有必要找出一种合适的药物使用期,论述此制品活性之间及在开始此疗法前肿瘤块之间的相关性。

曲线 1、2、3 分别给定了小鼠的重量改变、相对体积和肿瘤的相对表面指数。

实施例 8

根据实施例 B,大鼠白血病过程中药物制品的活性

在定向试验中,细胞株 SD/IPCIV,大鼠白血病过程之后估计了体重、大鼠的存活及血象值。血象值对个别类型细胞,在使用本制品前,根据实施例 B,如下:

红细胞	8050 000
白细胞	12300
血小板	826 000
分化:	
胚胎因子	4
髓细胞	0
晚幼粒细胞	6
柱细胞	0
片段	25
嗜酸性细胞	0
单核细胞	4
淋巴细胞	56

X—细胞

9

使用制品进入尾静脉，根据人/鼠体表（见实施例7）的比率叙述使用的量。

第5次给药后，血象值改变如下：

红细胞	7350 000
白细胞	10900
血小板	982000
分化：	
胚胎因子	4
髓细胞	0
晚幼粒细胞	3
柱细胞	0
片段	46
嗜酸性细胞	0
单核细胞	3
淋巴细胞	35
X—细胞	9

每周估计类似的值。治疗结束，获得下列值：

红细胞	6310 000
白细胞	9300
血小板	1162000
分化：	
胚胎因子	0
髓细胞	0

晚幼粒细胞	0
柱细胞	2
片段	39
嗜酸性细胞	0
单核细胞	6
淋巴细胞	51

治疗结束，将动物再饲养 4 周，在此期间末获得下列值：

红细胞	8700 000
白细胞	8400
血小板	778000
分化：	
胚胎因子	0
髓细胞	0
晚幼粒细胞	0
柱细胞	1
片段	22
嗜酸性细胞	1
单核细胞	4
淋巴细胞	72
X—细胞	0

在整个试验过程中估计了动物的体重。此值在 8 周的过程中没有明显改变，动物的临床状况也没有明显改变。从此结果看出，根据实施例 B，经此疗法，通过使用药物制品，可能使接受治疗的动物血象“正常化”。

在此实施例中获得的结果，将作为用于靶试验的起始物，此试验与药物制品的活性有关。此药物制品在设定的用于治疗肿瘤疾病的条件下，用于血液肿瘤病，也用于骨质疏松症。

实施例 9

根据实施例 B 在小鼠和大鼠经静脉和腹腔单一注射制品后的急性毒性限制试验。

为了进行试验，使用了正常饲养，鼠龄 6 周的 MMRI 鼠。雄性体重为 31—37g，雌性重量为 27.5—32g，这用于在静脉注射的情况下。在用于腹腔注射的情况下，雄性重量为 32—37g，而雌性重量为 28—33.5g。

根据实施例 B，在两个应用模型中，使用制品的量为 2ml/100g。静脉应用经尾静脉进行，腹腔应用经腹腔左下四分之一处进行。动物饲养于带有空调的室内，控制生活制度（照光时间 12 小时，不照光时间 12 小时，温度为 23—25℃，相当湿度为 50—70%），动物饲养于聚丙烯鼠笼中（Type T3 Velaz），在雌性情况下，每组 5 个动物。由于其对聚丙烯鼠笼（Type T2 Velaz）的侵犯性，雄性动物单独饲养，在鼠笼中洒下消毒的木屑。在整个试验过程中任意给动物 ST1 饲料（Velaz）和饮用水。

使用制品后 21 天期间每天观察动物的临床健康状况及行为，每周估计动物体重一次。在此期末，动物经宏观病理观察。

根据国际上有价值的 OECD 规则，为研究急性毒性，进行试验。

临床研究：静注应用后，观察到规律地深深地吹微风（使用后立即出现直到使用后 30 分钟），然后，直至此期结束，继续观察动物，不可能看到临床毒性症状。生长曲线也未能显出任何明显的改

变，以证实使用的药物制品的有选择的毒性作用。经腹腔注射应用后，又观察到了有规律地深深地吹微风，以及痉挛性行走及“书写”痉挛症状。30分钟后，通过所有接着的时期，动物没有出现任何临床毒性症状。在上述实验期间，不可能观察到任何动物濒临死亡，即不是在静注后，也不是在腹腔注射后。21天的时间结束后，经宏观病理观察，观察动物。静注应用后，证明没有相悖于正常状况的病理改变既没有雄性，也没有雌性，在腹腔器官和胸腔器官中。而且在代替应用中，没有观察到病理改变。在腹腔注射应用情况下，观察结果一致。能观察到脾表面有白色包被，脾部分或全部与胃相接触，肾脏有点轻。

根据上述结果，在国际有价值的 OECD 规则下，关于药物制品的急性毒性研究的急性毒性限制试验，对剂量为 20ml/kg，静注或腹腔使用后，两性别小鼠，不能证实有任何毒性症状，而且也不可能证实小鼠的濒临死亡。

为了进一步试验，使用了，鼠龄为 6 周的 Wistar 大鼠（常规饲养）。雄性体重为 194—209g，雌性体重为 159—170g，这指在静脉使用的情况下。在腹腔使用的情况下，雄性体重为 190 至 215g，雌性为 161—175g。

根据实施例 B，在两种应用类型使用制品的量为 2ml/100g，静注应用经尾静脉进行，腹腔应用经腹腔左上四分之一处进行。动物饲养于带空调的房间，控制生活制度（12 小时照光时间，12 小时非照光时间，温度为 23—25℃，湿度为 50—70%）于聚丙烯鼠笼中（Typ T4 Velaz），每组为同一性别，5 个动物，并洒消毒木屑。在整个试验期动物任意饲用标准颗粒状饲料 ST1（Velaz）和饮用水。

使用制品 21 天期间，每天观察动物的临床健康状况及行为，每周估计动物体重一次。在此期末，动物接受肉眼病理观察。

根据国际上有价值的 OECD 规则，为研究急性毒性，进行试验。

临床研究：腹腔注射后，也是在静注后观察到有规律的深吹微风，及轻微的跛行，直至用后 5 小时都可见到。在全部维持期内，动物没出现任何临床症状，生长曲线也不能显示任何显著改变，以证实使用药物制品的选择性毒性作用。在试验期间，在静注后或制品的腹腔注射后，没有动物死亡。

在 21 天结束，观察动物，使动物接着肉眼病理观察。静注使用后，证明没有相悖于正常状态的病理改变，既不在雄性，也不在雌性，在腹腔和胸腔器官中，而且在取代应用中，仍没有任何病理改变。只有肾脏略轻，腹腔注射后，雄性和雌性观察结果是一致的：观察到在脾的表面有白色包被，脾部分或全部和胃相附，肝小叶连在一起，并有白色包被，肾脏略轻。

组织学研究，在超出要求研究范围，通过 OECD 规则进行了。在肝脏不可能观察到局部慢性增殖性肝炎，肝实质无病理改变。肝脏发现结果在正常范围之内。在肝皮质的一些上皮细胞内发现了透明样沉积物。

根据上述结果，急性毒性的限制试验在 OECD 规则下进行，以测定药物组合物的急性毒性。根据实施例 B，用药量为 20ml/kg 静注或腹腔注射，在两种性别的大鼠不产生任何显著的毒性症状。在试验期内无动物死亡。

说明书附图

在治疗期间小鼠 C57B16 的重量变化

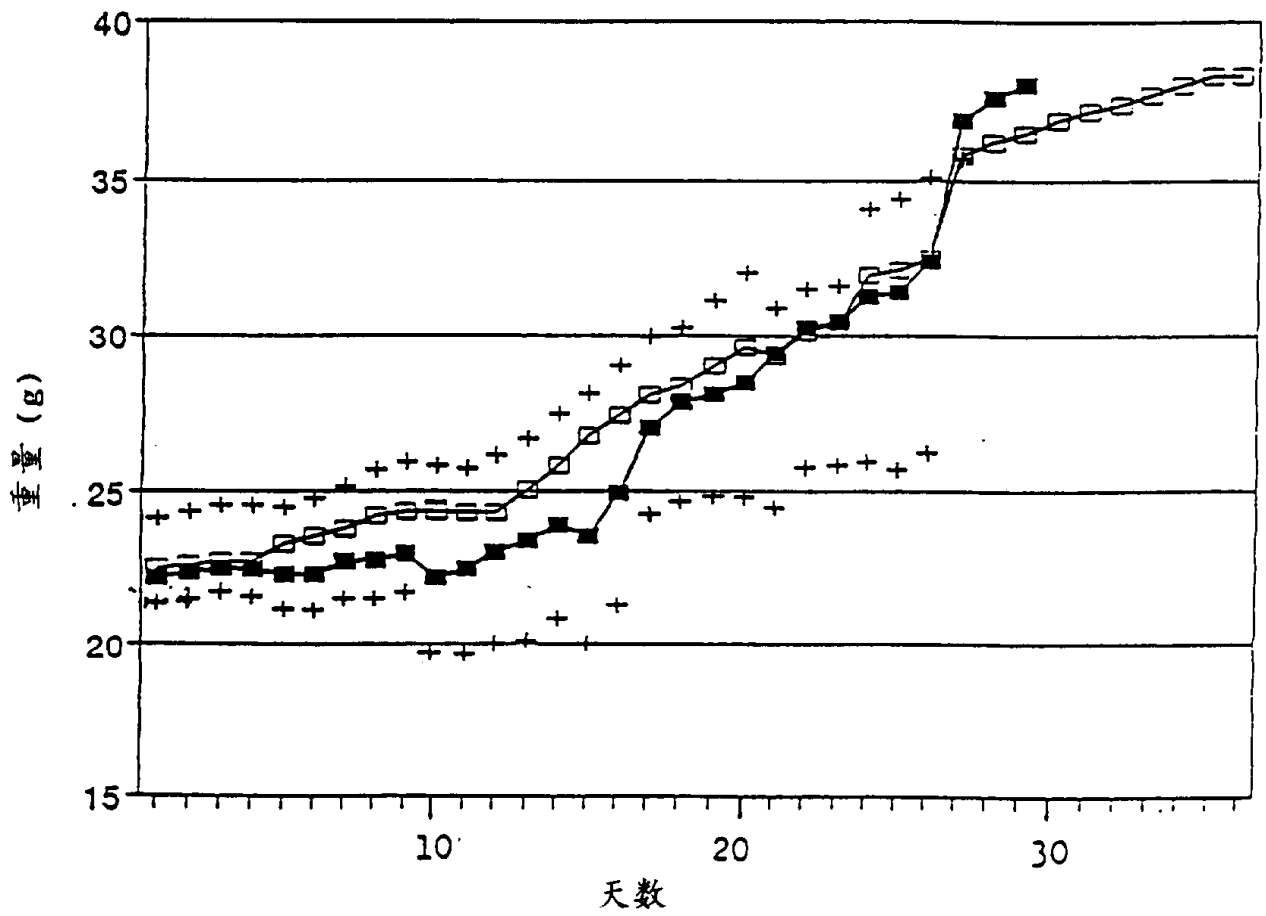


图 1

B16 黑色素瘤+饲养的 C57B16 小鼠疗法

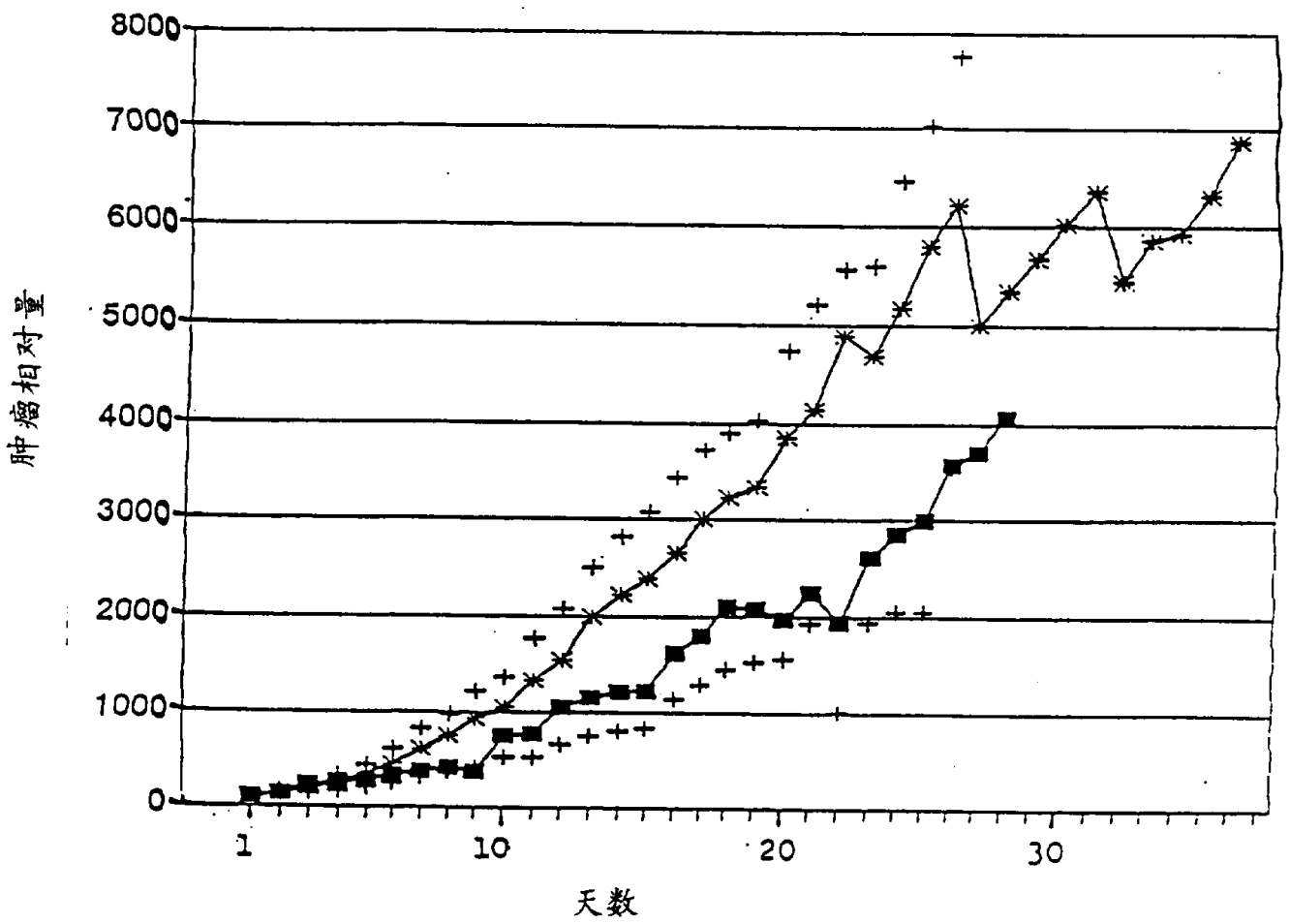
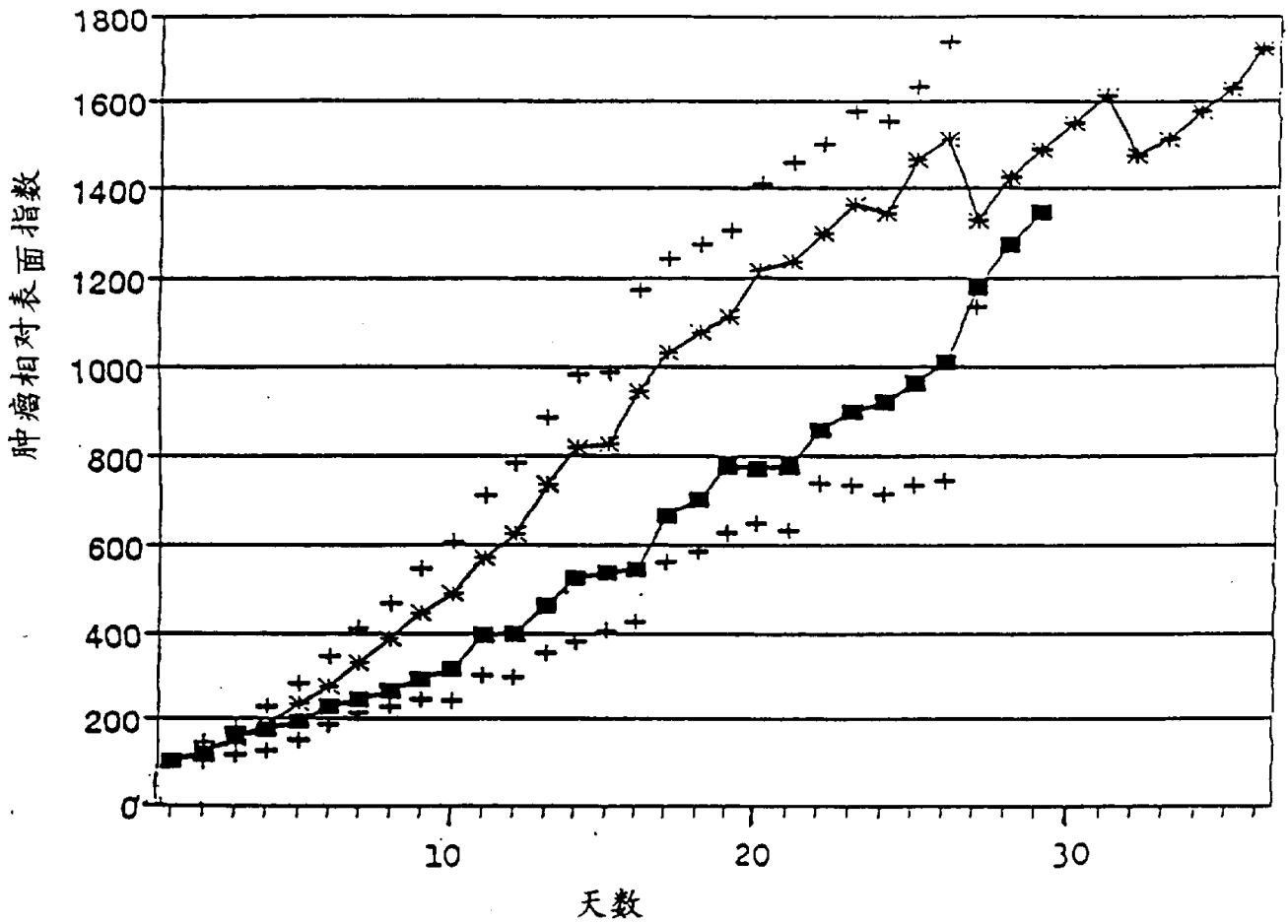


图 2

B16 黑色素瘤+饲养的 C57B16 小鼠疗法



用于曲线中的符号

米, □ 对照

+ 对照组的 SD

■ 试验组

+ 试验组的 SD

图 3