

[19] 中华人民共和国专利局

[51] Int.Cl.<sup>4</sup>



# [12] 发明专利申请公开说明书

A61K 45/02

A61K 45/05

A61K 9/72

[11] CN 87 1 00480 A

[43] 公开日 1987年11月11日

(21) 申请号 87 1 00480

(22) 申请日 87.1.24

(30) 优先权

(32) 86.1.24 (33) US (31) 06 / 822,099

(32) 86.7.31 (33) US (31) 06 / 892,531

(71) 申请人 基因技术公司

地址 美国加利福尼亚

(72) 发明人 格瑞思 新一娃王

(74) 专利代理机构 上海专利事务所

代理人 夏晓

(54) 发明名称 预防和治疗病毒感染的方法和配方

(57) 摘要

通过施用肿瘤坏死因子,最好是连续输注肿瘤坏死因子及干扰素以预防或治疗病毒感染。本发明的方法可以特别运用于爱滋病及爱滋相关综合症的治疗。

CN 87 1 00480 A

871A08155 / 04\_330

## 权 利 要 求 书

---

1. 一种配方其特征在于，该配方含有抗病毒的有效治疗剂量的低于大约100,000 国际单位的干扰素及 L T 或 T N F。

2. 根据权利要求1 所述的配方，其特征在于该配方为一种烟雾剂。

3. 根据权利要求1 所述的配方，其特征在于，其中 L T 或 T N F 数量少于大约干扰素重量的10% 。

4. 根据权利要求1 所述的配方，其特征在于，其中所述的干扰素为  $\gamma$  干扰素。

5. 根据权利要求1 所述的配方，其特征在于，所述的配方包括 L T 及 T N F 的混合物。

6. 一种治疗与预防病毒感染的方法，其特征在于所述的方法包括对于已经被病毒感染的或处于受病毒感染的威胁之下的哺乳动物施以抗病毒的有效数量的 (a) 一种干扰素及 (b) 一种 T N F 或一种 L T。

7. 根据权利要求6 所述的方法，其特征在于，其中所述的病毒感染为呼吸道的病毒感染。

8. 根据权利要求6 所述的方法，其特征在于，其中所述的干扰素及 T N F 或 L T 是同时施用的。

9. 根据权利要求7 所述的方法，其特征在于，其中所述的干扰素及 T N F 或 L T 是通过鼻腔施用的。

10. 根据权利要求6 所述的方法，其特征在于，其中所述的 T N F 或 L T 是以抗病毒有效剂量，大约低于5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  的剂量施用的。

11. 一种用以治疗或预防病毒感染的方法，其特征在于，所述的方法包括对受感染的或处于被感染的威胁之下的动物施以在治疗上有效的数量的肿瘤坏死因子或肿瘤坏死因子及干扰素。

12. 根据权利要求11所述的方法，其特征在于，其中的肿瘤坏死

因子为肿瘤坏死因子-  $\alpha$ 。

13. 根据权利要求11所述的方法，其特征在于，其中的干扰素为干扰素  $\alpha$ 、 $\beta$ 或  $\gamma$ 。

14. 根据权利要求11所述的方法，其特征在于，其中干扰素为干扰素  $\gamma$ 。

15. 根据权利要求11所述的方法，其特征在于，其中的所述的动物为受H I V感染的动物。

16. 根据权利要求11所述的方法，其特征在于，其中所述的动物没有任何能检测出来的恶性疾病。

17. 根据权利要求11所述的方法，其特征在于，其中所述的肿瘤坏死因子或肿瘤坏死因子及干扰素在可采用的免疫治疗阶段是通过体外施用的。

18. 根据权利要求11所述的方法，其特征在于，其中所述的干扰素是在施用肿瘤坏死因子之前施用的。

19. 根据权利要求11所述的方法，其特征在于，其中所述的干扰素是加上了  $\alpha$ 干扰素或  $\beta$ 干扰素的  $\gamma$ 干扰素的混合物。

20. 根据权利要求11所述的方法，其特征在于，其中所述的肿瘤坏死因子及干扰素的使用剂量每一样都为约1 至25  $\mu\text{g}/\text{m}^2/24$  小时连续静脉输注。

21. 根据权利要求11所述的方法，其特征在于，该方法还进一步包括对能够中和病毒的感染性的抗体的施用。

22. 根据权利要求15所述的方法，其特征在于，其中对肿瘤坏死因子及干扰素的施用重复大约1 至5 个周期。

23. 根据权利要求15所述的方法，其特征在于，该方法还进一步包括在施用肿瘤坏死因子或肿瘤坏死因子及干扰素之前进行的对动物进行抗H I V的免疫步骤。

24. 根据权利要求11所述的方法，其特征在于，该方法还进一步包括对动物施于生理上可以接受的氧自由基清除剂物质的抗病毒治疗剂量的步骤。

25. 根据权利要求24所述的方法，其特征在于，其中的所述的氧自由基清除剂物质为过氧化氢酶。

26. 根据权利要求25所述的方法，其特征在于，其中所述的氧自由基清除剂物质为红细胞过氧化氢酶。

27. 一种配方，其特征在于，该配方包括一种肿瘤坏死因子、一种干扰素及一种氧自由基清除剂物质。

28. 根据权利要求27所述的配方，其特征在于，其中所述的氧自由基清除剂物质为有过氧化作用活性的酶。

29. 根据权利要求27所述的配方，其特征在于，其中所述的氧自由基清除剂物质为人类的红血球过氧化氢酶。

30. 根据权利要求27所述的配方，其特征在于，该配方还进一步包括一种能够防止(a) 还原病毒的复制的物质或(b) 还原病毒与细胞表面受体结合的物质。

31. 一种配方，其特征为所述的配方包括一种肿瘤坏死因子、一种干扰素及能够防止(a) 还原病毒复制的物质或(b) 还原病毒与细胞表面受体结合的物质。

32. 根据权利要求31所述的配方，其特征在于，其中所述的能够防止还原病毒与细胞表面的受体相结合的物质为一种直接针对于还原病毒的外壳多肽的抗体。

预防和治疗病毒感染的方法和配方

本发明涉及对于受病毒，特别是受还原病毒感染或处于病毒感染威胁下的动物的治疗。进一步说，本发明涉及在哺乳动物细胞内诱发抵抗病毒感染的状态的方法与对受还原病毒感染的人类的治疗。

本发明特别涉及由还原病毒感染导致的免疫缺陷的疗法，进一步说，这些治疗是对于那些被认为与获得的免疫缺乏综合征(AIDS)有关的感染的疗法。

爱滋病是一种可传染的细胞免疫缺乏症，其特征为机会(opportunistic)感染及出现某些恶性的疾病，如，明显的卡氏肺囊虫肺炎及卡波济氏肉瘤，而对于患这些病的患者又没有其它可以分辨得出的致病原因。(1-3)。爱滋病的病症表现似乎是由OKT4<sup>+</sup>T淋巴细孢子集(4)的耗尽而引起的深度淋巴细胞减少、扩散性的皮肤无反应性及对有丝分裂因子、抗原及同种异体细胞的增殖效应的明显减少。而同时体液免疫性却相对地不受影响，日益增多的证据表明存在着超活性B-细胞增殖响应，而其在因果关系上可能与爱滋病人的B-淋巴瘤的高发生率有关(5,6)。除了完全显现综合征外，一种流行性的相关疾病[爱滋相关综合征(ARC)]也显现出来，其特征为全身性的慢性淋巴病变。这种综合征同时具有许多流行病特性及免疫异常，而往往超出爱滋病的临床表现。

最近的证据有力地表明一种亲淋巴细胞的还原病毒是爱滋病及爱滋相关综合症的主要的病原因子。淋巴病变相关病毒(LAV)首先从患淋巴病变及爱滋病的病人的培养的淋巴结T细胞中分离出来也同样从患爱滋病的病人和一对受嗜血性B(haemophilia B)(7-9)感染无

症状的孪生双胞胎的培养淋巴结 T 细胞中分离出来。一种类似的病毒，被称为人类 T 亲淋巴性 III 病毒 (HTLV-III) 通过与受纳 T 细胞系 H9(10,11) 进行共培养而从许多爱滋病及爱滋病相关综合症患者的血样中分离出来。最近从爱滋病患者身上分离出的 LAV 及 HTLV-III 和相关还原病毒 (12,13), 同时分别具有几种重要的特征。病毒复制发生在体内及体外的 OKT4<sup>+</sup> 淋巴细胞群中并且出现损伤细胞增殖以及细胞疾病的后果 (8,10,14) 有关。该病毒具有一个 Mg<sup>2+</sup> 依赖性的逆转录酶, 显现出与 D 型还原病毒相似的密集的圆柱形核的形态 (8,13,15) 并且可通过事实上有所有的爱滋病及爱滋病相关综合症患者血清中均可发现的抗体 (8,13,16-21) 来识别。HTLV-III 及 LAV 目前被确信为是同一病毒的不同株, 这些株被称为人类免疫缺乏症病毒 (HIV)。

患爱滋病或爱滋病相关综合症的患者的免疫功能遭到严重的损伤。然后, 由 HTLV 引起的异常的精确性质正有待继续的研究。特别有兴趣的是, HIV 感染对这些患者的免疫细胞产生淋巴激活素的影响, 及其对外源给与的淋巴激活素的响应。对十六位爱滋病患者的 T 淋巴细胞分泌包括  $\gamma$  干扰素在内的巨噬细胞激活产物的能力进行了测试, 结果十四位患者不能产生有活性的淋巴激活素而有十三至十四位完全不能分泌  $\gamma$  干扰素。另外, 爱滋病患者的巨噬细胞与  $\gamma$  干扰素在体外进行培养时, 显示出能增加抗微生物的性能, 因而提高了这些细胞对外源给予的  $\gamma$  干扰素在体内发生响应的可能性 (22,24)。

爱滋病患者的淋巴细胞据报导缺乏产生内白细胞素-2 (interleukin-2) 的能力, 内白细胞素-2 (interleukin-2) 是一种淋巴激活素在 T 淋巴细胞增殖与分化过程中发挥作用并且刺激  $\gamma$  干扰素的产生 (23)。

$\gamma$  干扰素最终被发现对被泡状口炎病毒 (VSV) 感染的细胞发

挥直接的抗病毒作用，并加强一种细胞活性素对 V S V 感染细胞的作用(25)。该细胞活性素由这些作者们经实验证实为一种多肽在此被作为肿瘤坏死  $\alpha$  因子的多肽。同时参阅 Eifel 等著《Cell. Immun》47:197- 203(1979)。因而，对爱滋病进行的免疫增补疗法显得有机会被采用，并且创立了对病人的临床研究。

尽管对爱滋病人的淋巴激活素疗法是有希望的，但是体内的实验结果是令人失望的。与从体外实验得到的结果相反，长期静脉注射重组体  $\gamma$  干扰素的治疗疗程似乎是对单细胞呼吸突发作用产生抑制作用而非增强(26)，对爱滋病用不同的剂量进行内白细胞素 2(interleukin-2)或  $\gamma$  干扰素的静脉注射而得到的结论是，体内淋巴激活素疗法对于爱滋病的治疗没有重大的价值(27)。事实上，在本发明以前，一种学派认为，免疫激活作用或者免疫重建方法对爱滋病的治疗事实上是“危险的”，因为用淋巴激活素对细胞的激活作用被认为会引起病毒的扩散及 T 细胞的衰竭，因而加剧了疾病的进程(28)。1986年6月 Yamamoto 等人(29)揭示了人类  $\alpha$  及  $\beta$  (而非  $\gamma$ ) 干扰素抑制，H I V 病毒株的体外复制，但当停止暴露于干扰素时，被感染的细胞的病毒产量则增加了。这就进一步说明爱滋病的免疫疗法是抗产生性(counter production)的。

最后，也意味着淋巴毒素是由 H I V 病毒感染的 T 细胞被病毒诱发的 T 细胞的内源淋巴毒素基因的转激活作用而(transactivation)产生的，因而导致了自身有毒性数量的淋巴毒素的分泌(35)。

干扰素用于预防或治疗受诸如牛痘、风疹、单纯性疱疹、水痘-带状疱疹、小鸡痘、细胞巨病毒、腺病毒、未分类的 R N A 病毒、狂犬病病毒及乙型肝炎病毒感染的慢性、急性疾病和/或实验感染。慢性的细胞巨病毒感染经证明难以用干扰素治愈，甚至用预防 C M V 的感染所需剂量高得多的剂量治疗也无用。这样的剂量可能引起预料不

到的副作用如中性白细胞减少症及对体重增加产生抑制。因此这是希望对于被长期存在的病毒或慢性病毒感染的病人提供一种更有效而又不会引发干扰素副反应的干扰素制品。

干扰素同样也被广泛地试验其预防或治疗通常的(主要由鼻病毒感染引起)感冒的能力。大多的研究是采用每天用 $0.8 \times 10^6$ 至 $42.8 \times 10^6$ 单位的剂量进行滴鼻(Finter 等著,1985, Interferon Vol .4 pp. 186-187)。然而需要明白的是,由早期研究报导的专一活性与目前使用的国际标准之间的关系是模糊的。施用的剂量当用国际单位表达时可能更大些或更小些。尽管据报导用浸药的拭子施药更为有效,但一般是用烟雾剂来进行鼻腔施药的。典型的方法是,将每天的剂量分成1至3次施用。采用重组体干扰素的实践表明喷雾施与大约 $1 \times 10^6$ 单位/剂量(每个鼻孔施用0.1ml)对于提供保护作用是有有效的,无论是采用此剂量的十分之一或是百分之一都没有能检测得出的作用(Finter 等.,op cit, P188)。然而,大约 $1 \times 10^6$ 单位的干扰素的测量会伴随产生心烦,对鼻腔有轻微的刺激,更大的剂量则产生显著的刺激(Finter 等 Id .)。

干扰素同样也可以采用滴眼药的形式治疗单纯性疱疹病毒引起的结膜炎或以静脉或腹腔的注射或输药的形式对各种病毒感染进行治疗。典型情况下,每毫升滴眼药中含有超过大约 $1 \times 10^6$ 单位的干扰素(含有60,000单位/ml 干扰素浓度的制剂据报导不产生临床上的作用,Sundmacher 等.,1976, " J. Infect. Dis" 133: A160- A164)。静脉注射施药的剂量一般也超过 $1 \times 10^6$ 单位/患者人次,尽管早期的研究者在当时不能获得粗制干扰素制剂而只能采用较低的剂量。这些研究结果表明,干扰素对于治疗已产生的病毒感染不如用与预防时那么有效。因而,需要有一种对于活性感染表现出增进的活性并显示更高的保护(预防)能力以便能使用较低的剂量的干扰素。

肿瘤坏死因子(参见 Pennica等.,20/27 Dec.1984,“Nature” 312:724)及淋巴毒素(参见 Gray 等.,20/27 Dec.1984,“Nature” 312:721)是由被激活的巨噬细胞及淋巴细胞产生的蛋白质,在此分别称为“TNF”(或“TNF- $\alpha$ ”)及“LT”(或“TNF- $\beta$ ”)。两者在体外与体内都直接地对肿瘤细胞产生细胞毒作用,并在这一点上与干扰素产生协同作用(参见 Lee等.,1984年,“J. Immun.” 133:1083)。然而,TNF或LT本身都没有任何直接的抗病毒的保护活性作用TNF- $\alpha$ 被认为与严重感染的癌症病人可导致消瘦与恶病质(34),而且对TNF- $\alpha$ 的被动免疫作用据报导能保护小白鼠以抵抗内源毒素的致死作用(30)。已经了解到TNF- $\alpha$ 的抗肿瘤作用及被干扰素协同地增强作用,而TNF- $\beta$ 的抗肿瘤作用类似地由干扰素 $\gamma$ 而加强。然而,TNF- $\alpha$ 及TNF- $\beta$ 混合物的抗肿瘤作用仅仅是两者的加和,如 $\alpha$ 及 $\beta$ 干扰素混合后的抗病毒作用一样。

本发明的一个目的是增进干扰素的抗病毒活性而不增加干扰素副作用的发生率。

另一个目的是增加干扰素的抗病毒的专一性。

本发明的一个附加目的是采用干扰素以进行个体病毒感染的预防,包括DNA病毒感染的感染。

本发明的一个目的是将免疫疗法成功地用于被还原病毒,特别是亲淋巴细胞性病毒,如HIV感染的病人的治疗。

在此的另一个目的是对那些处于活性还原病毒感染威胁之下的人,如对怀带有潜伏性还原病毒的人进行治疗。

一个附加的目的是提供免疫疗法预防以抵抗还原病毒的感染。

如果将本发明的说明书作为一个总体来看待,则这些目的以及本发明的其它目的将会更为明显。

本发明的目的是通过对已经受病毒感染或处于受病毒感染威胁之下的哺乳动物施于抗病毒有效量的 T N F 或 L T 或 (a) 干扰素及 (b) T N F 或 L T 而完成的。尽管单独的 T N F 或 L T 是不存在抗病毒保护活性，但是 T N F 或 L T 协同地增强了干扰素的抗病毒活性。非常典型而又十分预料不到的是，当干扰素配方中含有 T N F 或 L T 时干扰素的活性，增加了 2 倍至超过 100 倍据观察对  $\gamma$ - 干扰素作用最大。

对于本发明的情况，认为用于治疗包括抗病毒或抗肿瘤所提供的干扰素配方中含有的干扰素量是不足的，这些干扰素剂量少于大约 500,000 国际单位，一般少于 25,000 单位。这样剂量的干扰素通过在其中渗和一定数量的本身不足以显示毒性而又足于增加干扰素抗病毒活性的 L T 或 T N F 而产生效力。

出乎预料的是，我发现单独施用治疗有效数量的肿瘤坏死因子，或者最好是与干扰素合用时，可以对受还原病毒威胁的人起到保护并杀死已受还原病毒感染的细胞。与此同时， $\gamma$  干扰素单独施用产生很少或不产生对还原病毒感染的保护活性，而且  $\gamma$  干扰素对于受还原病毒感染的细胞也没有足够的细胞毒作用，而且 T N F 单独施用在高浓度下也只有中度的活性，但当这两个药剂联用时则产生显著的作用。尽管受还原病毒感染的病人的免疫系统是处于免疫混乱的状态，在体内还是观察到了这样的现象。这样的结果特别令人鼓舞，因为没有知道在这些病人中缺乏 T N F。

#### 附图的简要说明

图 1 及 2 表示当干扰素  $\gamma$  与 L T 或 T N F 合用时其抗病毒活性的显著增加。

图 3 描绘了通过改变 T N F 和干扰素  $\gamma$  的浓度而使之得到保护而不受病毒感染的细胞培养物。

图 4a 及 4b 显示了 T N F 或 L T 增加干扰素  $\alpha$ 、 $\beta$  或  $\gamma$  的抗病毒活

性的情况。

图5a至5d描述了被TNF或LT加强的干扰素 $\gamma$ 对病毒复制的抑制作用。

图6是一种Northern凝胶显示了与不用TNF- $\alpha$ 及IFN- $\gamma$ 预处理的细胞作比较,当被HIV感染的Hu T78细胞用TNF- $\alpha$ 及IFN- $\gamma$ 作预处理后HIVmRNA显著地减少。

图7说明了过氧化氢酶与TNF- $\alpha$ 和/或IFN- $\gamma$ 合用时的抗病毒的保护作用。

本发明的方法及配方可用于预防或治疗被单股RNA或双股RNA病毒或DNA病毒所引起的显性感染或潜伏感染,而引起感染的病毒不受限制地包括腺病毒、疱疹病毒、乳多空病毒(包括猿病毒40、乳头瘤及多瘤病毒)、痘病毒如小痘及牛痘、虫媒病毒、沙粒病毒、冠状病毒、粘病毒((新城病New Castle)、流行性腮腺炎、麻疹及呼吸道合胞体(syncytial)病毒)、鼻病毒、副粘病毒如甲、乙或丙型流行感冒病毒、微小病毒微小核糖核酸病毒、披膜病毒、还原病毒(包括HTLV-I, II及III)、呼肠孤病毒及轮状病毒。其它的特定的病毒包括风疹、单纯疱疹性、水痘-带状疱疹、小鸡痘、细胞巨病毒、未分类的RNA病毒、狂犬病及乙型肝炎。

还原病毒被定义为含单股或双股RNA的病毒。这类病毒通过利用永久性宿主的细胞代谢以逆转录病毒的RNA遗传物质而进行病毒复制的。如此大量产生的DNA经转译至HIV蛋白及RNA以组装成子代病毒粒。这些病毒的例子包括所谓的“慢”或慢性病毒及T-细胞白血病病毒如HTLV-I及HTLV-II,但最优选的是与爱滋病有关的HIV病毒株(以前称为HTLV-III)。

干扰素是很为人们了解的。从性质上分别包括 $\beta$ 及 $\gamma$ 干扰素,以及大约20种不同的 $\alpha$ 干扰素亚型。它们与本发明目的最为相关的特征

为，可以在体内及体外能保护细胞免受病毒的感染。本发明用于方法或配方中的干扰素典型地为  $\alpha$ - 干扰素、 $\beta$  或  $\gamma$  干扰素，但  $\gamma$  干扰素被优先采用。由干扰素氨基酸顺序或其糖基化的变型（包括非糖基化的形式）所决定，只要它们显示抗病毒的活性，不论是由重组体细胞培养物、或从自然分离物中或由稳定的非转化细胞系产生的干扰素都能在此满意地被使用。因为  $\gamma$  干扰素被认为是种专一性的，因而干扰素  $\gamma$  应该用于对同一种的动物进行治疗。干扰素最好有足够的同源性并且有超过大约  $1 \times 10^6$  国际单位/mg 的专一活性。

TNF及LT包括重组体或未转化细胞培养物的产物，包括氨基酸顺序或者（对于LT的情况）糖甙基化的变型（包括非糖甙基化的LT）。无论是单独的TNF或LN或者它们的混合物都是适用的。因为TNF及LT与干扰素协同作用的能力没有种的专一性，由一种物种得到的TNF或LT可以用于其它种的物种的疗法中。在此最好采用人类成熟的TNF或人类的非糖甙基化的成熟的LT。

TNF- $\alpha$  或 TNF- $\beta$  单独使用或者根据经验测得的能发挥最大临床效应的比例混合使用。TNF没有种子的专一性，因而从其它的动物种如：猪或牛得到的TNF在此也能使用。TNF最好是从重组微生物细胞培养物得到的成熟的人类TNF- $\alpha$ 。TNF通常对于敏感的L-929鼠细胞株具有大于  $1 \times 10^6$  单位/毫克的溶细胞活性，此处的单位是由上述描述的那些专利申请所规定的，这些申请揭示的内容加在此处作为参考。

此处的配方包括可容纳药物的载体，如那些在治疗中用于施于干扰素、TNF或LT的载体，如生理盐水或5%葡萄糖及常用的稳定剂和/或赋形剂如人类血清白蛋白或甘露糖醇。所提供的配方可以是冻干扰素状态的或是灭菌水溶液状态的。

普通的操作人员可以就  $\alpha$ 、 $\beta$ 、或  $\gamma$  干扰素与 TNF- $\alpha$  或

TNF- $\beta$ 的比例，干扰素与TNF的净比例，干扰素及TNF在配方中的浓度以及对每公斤物种基质施用的剂量等方面考虑作一些改变。在治疗上作的改变也包括被治疗的动物种的变化，施用途径的变化，及患者的临床条件的变化（如果存在的话，在治疗的开始包括根据还原病毒和/或偶发性有机体感染的阶段及程度的条件不同而作的变化）干扰素的合适的起始剂量水平在大约从1至50 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 的范围。可以忍受的剂量不超过大约25 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 。

到现在为止，合适的干扰素剂量在大约为被认为是具有最小剂量范围的50%至0.1%，该剂量可与TNF或LT合用以对病毒感染提供抵抗力，及用于杀死已被病毒感染的细胞。剂量可以达到大约500,000国际单位/70kg患者体重，但可以典型地低于大约100,000单位/70kg患者体重。干扰素与TNF或LT的相对重量比一般在大约1000:1至1:1的范围，而大约100:1为最佳。典型的治疗配方为每毫升含有大约从 $1 \times 10^3$ 至 $1 \times 10^6$ 国际单位干扰素及每毫升含大约从 $1 \times 10^{-9}$ 至 $5 \times 10^{-6}$ 的TNF或LT的水溶液。这些配方根据所预防或治疗的病毒感染的情况而通过鼻腔、腹腔注射或静脉注射施药。鼻腔施药剂量一般少于大约25,000国际单位（每0.1ml体积），而静脉施药的剂量少于500,000国际单位，一般少于100,000单位。

TNF或LT与干扰素的合用的协同抗病毒保护作用可以广泛地应用于各种哺乳动物。如表1所示的细胞系在24眼的组织培养板上培养并与TNF或LT及干扰素 $\gamma$ 一起预培养。所有的细胞系（通过细胞致病作用来测定）用感染复数分别为1、1及100的EMC、VSV及HSV- $\alpha$ 进行多次感染，均在某种程度上有抵抗感染的保护作用。

表1

A) 人类细胞系

B) 非人类细胞

- |                     |                   |
|---------------------|-------------------|
| 1. A549(肺癌)         | 1.3 T3(鼠成纤维细胞)    |
| 2. H T- 1080(肺纤维肉瘤) | 2. C127(鼠上皮细胞)    |
| 3. Hela (颈癌)        | 3. Raw~264(鼠巨噬细胞) |
| 4. T24(膀胱肿瘤)        | 4. Rat-1(大鼠成纤维细胞) |
| 5. H T29(结肠肿瘤)      | 5. N R K(正常大鼠肾细胞) |
| 6. 7860(肾肿瘤)        | 6. P K15(猪细胞)     |
| 7. S T486(淋巴细胞)     | 7. M D B K(牛细胞)   |
| 8. R8226(淋巴细胞)      |                   |

因此，本发明的方法可以用于提供哺乳动物抵抗病毒感染，哺乳动物包括人、牛、禽类及马。患者可能已得知或未得知患者肿瘤或恶性肿瘤。

本发明的方法特别适用于发生在高密度农用动物群体的高度传染性病毒传染的预防，首先为发生在幼鸡中的新城病 New Castle 疾病及牛的航运热。尽管病毒群体中引起的变种可能使疫苗失效，但由于本发明的配方和疫苗不同因而对所有的病毒都有效，并在刚出现流行瘟疫突发的预兆时紧急施用得到快速的保护效果因而避免了对群体中的所有动物进行接种。

本方法也可用于预防呼吸道的感染。那些例如家庭中有人患普通感冒等而处于感染危险之下的人，可以施用干扰素及 T N F 或 L T 以保护防止感染。为了防止病毒传播而用于动物或人的施药方法的最为惯用的途径是用对鼻腔喷雾或小拭子而通过呼吸道的途径。该治疗方法除了须使用预先采用的干扰素组分之外，将使用已知的配方和方法，并且，系统的治疗方法包括 T N F 或 L T 的施用。用于鼻腔的制品可选用包括诸如胆汁酸盐或非离子型的聚氧乙烯醚作为渗透增强剂。配方系在 P H 7.4 的磷酸缓冲液中含有指定剂量的干扰素及 T N F 或 L

T, 甘露糖醇或其它的稳定剂或者赋形剂以及1%重量比的增强剂。对其它的合适的鼻内施用的基础配方, 美国专利4,476,116号,

E P127,535 A, E P122,036 A, E P111,841 A, 及 E P128,831 A中作了描述。TNF及干扰素的剂量可以一起施用或分别施用。对于后者的情况, 干扰素需先施用, 然后在24小时内施用TNF。本发明的范围也包括根据病人的临床反应用TNF及干扰素进行多次周期性的施用。本治疗方法有效地用于对处于潜伏期的被感染细胞在进入感染的活性阶段时进行打击, 通过外源地加入T细胞分裂素或者通过导致T细胞活化的偶发性感染均可。

由于用TNF及干扰素进行的治疗将使受病毒感染的细胞溶化, 并引起感染性的病毒的释放, 因而在治疗的过程中加入能够中和更多的病毒感染性的物质是有益的。可以通过几种方式来完成这一目的。其中之一, 可以在治疗的阶段中, 最好在施以TNF的同时, 施用诸如单克隆或多克隆抗还原病毒的抗体。另外, 对于具有免疫活性的病人可以对还原病毒进行接种, 以有效地诱发中和抗体的产生。完成这一目的合适的疫苗包括HIVgp120外壳多肽。据报导, 该疫苗诱发出对HIV进行中和的抗体, 该抗体反过来能用于上述的被动免疫方法中。其它的用于阻止潜在的释放病毒感染力的药剂也可以与TNF合用, 例如与细胞表面的通常所讨论的被还原病毒识别的受体相结合从而竞争性地抑制病毒粘附到靶细胞表面的过程(对于HIV, 细胞表面标记OKT4<sup>+</sup>出现在帮助T细胞中)的gp120env或其片段。

TNF和/或干扰素协同抗病毒及抗肿瘤的活性通过在系统的治疗方法和/或配合中加入能起到治疗效力的足够数量的氧自由基清除剂(包括氧保护酶及过氧化活性物质)而被进一步加强。这些物质包括过氧化氢酶、超氧化(dismutase)、过氧化酶或氯过氧化酶(chloroperoxidase), 大大地增强TNF及干扰素的活性。尽管目前

这些试剂加强 T N F 及干扰素的机制还不了解，这些酶分别催化  $H_2O_2$  分解成水和氧或催化  $H_2O_2 + H O - R - O H \rightarrow 2 H_2O + O = R = O$  的反应这一点是明确的。过氧化氢酶商业上可以大量地获得，并能从人类组织中诸如红细胞中获得。过氧化酶普遍地是从辣根中获得。过氧化活性物质与 T N F 及干扰素的比例，非强调地，可以是大约从 1000:1:0.1 至 100:50:25，但是使用的剂量及比例必须按照病人的临床条件及施药途径以及根据本领域中工作人员熟悉的各种变化情况而作必要的调整。

T N F 及干扰素可以按照同样的途径施用，也可通过不同的途径独立施用，例如通过静脉注射或鼻腔给药或通过肌肉注射施用。两个成份中任一个或一起可以通过持续释放的配方如聚交酯或聚羟基丁酸酯植入物或通过如同 E P 17,2007 A 描述的微脂粒而施用，或者通过连续输送而施用。目前最好采用静脉输注的方式施用如上提及剂量的 T N F 及干扰素。

当采用大剂量时，为了避免复合疗法的副作用，T N F 及干扰素可以通过在此称为可采用的免疫疗法的施用于身体之外的疗法。在这些方法中，将病人的外周血液单核细胞或淋巴细胞在体外的血浆除去循环中分离出来并用内白细胞素-2 (interlenkin-2) 或干扰素进行处理然后再输注到病人体内。通过这样的方法大大地刺激了病人的抵抗恶性病质的免疫效应。除了将外周单细胞和/或淋巴细胞与 T N F 或 T N F 及干扰素一起培养之外，对于还原病毒感染的治疗方法是和通常的一样的。被病毒感染的细胞被 T N F 或复合药剂杀死。体外细胞同样也可与一种杀伤细胞活性剂诸如淋巴细胞裂解素(例如：植物血细胞凝集素)及/或内白细胞素-2 (interlenkin-2) 一起培养。然后洗涤细胞并重新悬浮于输注介质中以便重新输注到原先提供该细胞的病人身上。经过再输注之后接着可以施于在此另外提供的

TNF及干扰素。施用的TNF或TNF及干扰素的最佳数量，及对病人淋巴进行体外治疗的最佳条件是通过测定病人的病毒效价，及对病人临床条件改善的评价而由施药的途径所决定的。

等候用本发明的治疗方法进行治疗的人，是那些处于受还原毒病感染的威胁的人，或那些显示出确实受到病毒感染的征兆的人。那些处于高发病率群体中的人，如同性恋者、静脉毒品使用者及那些接受了未对HIV抗体进行筛选的输血或输入其它的血液制品的人。受还原病毒感染的证据包括产生抵抗HIV抗体的血清转换，对HIV所作的血清阳性测定，与爱滋相关综合征（ARC）相关联的症状或者是明显的爱滋病症状。对爱滋病人可以进行也可以不进行对于卡波济氏肉瘤或其它的恶性病、偶发性的微生物感染如卡氏肺囊虫或真菌性口炎、神经缺陷或恶病质（cachexia）(wasting)的诊断。

通过下列的例子本发明将更完全地被理解。干扰素是重组体细菌细胞培养物的产物并被提纯至专一性活性达到大约 $10^8$ 单位/毫克的程度。TNF及LT也是由重组体获得的，具有大约为 $5 \times 10^7$ 单位/毫克的专一的活性。

### 例 1

LT或TNF增强人类干扰素- $\gamma$ 的抗病毒的活性

在96眼的平底盘（Falcon plastics）上以每眼 $2 \times 10^4$ A549细胞的密度接种于平底盘上，24小时后与连续二倍稀释的样品一起培养。样品为浓度如图1中指定的干扰素 $\gamma$ 的稀释液。该样品还含有0.1微克/毫升的TNF或LT，存在于用5%加热去活的小牛胎血清（FCS）、谷酰胺（2mM）、青霉素（100  $\mu$ /ml）、及链霉素（100  $\mu$ g/ml）补充的用Dulbecco改善的Eagle（DME）培养基中。对照样品含有a)无干扰素及TNF或LT b)只有TNF c)只有LT。在37 $^{\circ}$ C下培养18小时之后，培养物的上清液用含有2%小牛胎血

清（但不含干扰素、TNF或LT）及感染复数为1的EMC病毒的新鲜的DME培养基进行置换。（“MOI”，为感染性病毒/细胞的比例）。细胞致病效果（CPE）用结晶紫（Crystal violet）对生存的细胞进行染色而测定，而滴度用microelisa自动阅读器

（MR580, Dynatech）通过测定数量来测定并进一步通过肉眼观察以确证。CPE抗病毒的效价是以能抑制50%的细胞病的稀释度的倒数表示。同时用人类干扰素- $\gamma$ 的国际对照样品（NOGg23-901-530）作标准化。

如图1所示，在这些干扰素浓度之下，LT及TNF的存在协同地增强了干扰素 $\gamma$ 抗病毒作用在浓度大约为1ng/ml时干扰素 $\gamma$ 的抗病毒效价增加很大。（数据未标明）。然后当干扰素- $\gamma$ 本身的浓度低而效力大大地不足时，LT或TNF对于提供靶细胞以保护是十分有用的。

## 例 2

牛干扰素 $\gamma$ 的抗病毒活性被人类LT或TNF增强

本方法重复例1的方法，只作以下的改动，TNF及LT浓度为1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 而非0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，干扰素为牛的干扰素，靶细胞为牛MDBK而病毒为VSV。CPE测定的结果列于图2。由于TNF或LT的存在再一次大大地增强了保护活性。该数据表明TNF或LT的种的来源对于提供保护作用是无关紧要的，并能用于除人之外的任何其它的哺乳的动物。

## 例 3

保护A549细胞免受VSV感染

本方法除了作以下的变动之外重复例1的方法，试验病毒为VSV，人类重组体干扰素 $\gamma$ 及TNF分别配成一系列的10倍稀释及2倍稀释的溶液，TNF的起始浓度为1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、干扰素 $\gamma$ 的起始浓

度为10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。结果示于图3,为一已经用结晶紫(crystal violet)染色的细胞培养平板。在0,0001至10  $\mu\text{g}$  范围的干扰素  $\gamma$  的浓度对于保护细胞效力是不够的,同样地当 T N F 的浓度从1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 减少至1ng/ml时也不能显示保护细胞的效力。如图所示,被病毒感染的及未感染的对照产生了预料的结果。然而,甚至当 T N F 及干扰素  $\gamma$  的浓度分别在大约1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至1ng/ml以及10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至0.1ng/ml的范围时, T N F 与干扰素  $\gamma$  的复合物即能保护细胞免受 V S V 的感染。

#### 例 4

T N F 或 L T 对干扰素- $\alpha$ 及干扰素  $\beta$  的保护增强作用

用 E M C / A 5 4 9 代替 V S V / A 5 4 9,重复例1 的方法。干扰素的浓度为,干扰素  $\alpha$ 10 ng/ml,干扰素  $\beta$ 10 ng/ml。如图4a所示干扰素  $\alpha$ 及干扰素  $\beta$  (程度较低一些)显示出与人类 T N F 或 L T 的协同抗病毒作用。如图4b所示,用 M D B K / V S V 及牛的干扰素  $\alpha$ 及  $\gamma$  得到同样的效果。

#### 例 5

对病毒复制的协同抑制

将 A 5 4 9 细胞接种于24眼的组织培养平板(costar)24小时后用不同浓度的人类 L T、T N F 或干扰素  $\gamma$  处理18小时,除去培养基之后加入 E M C、V S V、腺病毒-2(Ad-2)及单纯性疱疹病毒-2

(H S V-2)。E M C、V S V、Ad-2 及 H S V-2 的感染复数分别为1、1、100 及100。T N F、L T 及干扰素  $\gamma$  的浓度在0.1ng/ml至10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的范围内。经历2 小时的吸附阶段之后,将上清液吸出以去除未吸附的病毒,并在37 $^{\circ}\text{C}$ 下在含有5% F C S 的培养基中培养24小时之后,培养物(细胞及培养基)进行两次冰冻融化以溶解细胞,在400 Xg 下离心10分钟之后用 Rager- Zisman 等在“Proc. Soc. E X P. Med.” 142:1174-1179(1973) 中描述的空斑测定法

测定病毒产量。胞溶产物的系列稀释液与 A549 细胞相混合并在 37°C 下培养 2 小时。吸出上清液，在上面铺一层含有 5% FCS 及 0.7% 琼脂糖的培养基。24-28 小时之后，空斑用甲醛固定用结晶紫染色。用目测测定了以形成空斑的病毒单位/毫升 (PFU/ml) 表示的病毒产量并将结果列于图 5a 至 5d 中。这些数据表明了对抗病毒活性的协同促进作用，尤其是在低干扰素- $\gamma$  浓度时。

### 例 6

#### 对受病毒感染的细胞的协同杀伤

本方法重复例 1 的方法采用 MOI 为 10 的 VSV 并且不与干扰素、TNF 或 LT 一起预培养。VSV 与细胞在 37°C 下培养 4 小时，然后将病毒从受感染的细胞上洗去。然后，如表 2 所示，对这些受感染的及未受感染的细胞用 0.1  $\mu\text{g/ml}$  的 LT、干扰素  $\gamma$  分别或以表 2 所示的物质共同处理。在 37°C 之下经历了 12 至 18 小时后，用台盼蓝或 propidium 碘化物进行染色以测定细胞存活率。结果列于下面的表 2 中。

表 2

细胞处理	存活数量 (%)			
	未感染		VSV 感染	
	12小时	18小时	12小时	18小时
对照	100		92	70
LT	100		41	29
TNF	100		38	31
干扰素 $\gamma$	100		91	66
LT+ 干扰素 $\gamma$	100		14	0
TNF+ 干扰素 $\gamma$	100		12	0

表 2 显示当干扰素  $\gamma$  及 TNF 或 LT 合用时受病毒感染的细胞被

协同地杀死。将以上一些例子的结果总和起来考虑，可以认为 TNF 或 LT 加上干扰素的复合物抗病毒感染机制有两个：其一为提供未感染的细胞以保护作用，其二为杀死受病毒感染的细胞。

### 例 7

#### HIV 感染的预防

将 OKT4<sup>+</sup> 阳性人类 T 细胞白血病细胞系 H9、Hu T78 及 U937 悬浮于 37°C 下的 RPMI-1640 培养基中进行培养。将培养物离心从培养基中分离出细胞并将细胞以  $1 \times 10^6$ /ml 密度重新悬浮于新鲜的 RPMI-1640 培养基中。将足够量 TNF- $\alpha$  及  $\gamma$  干扰素加入培养物以达到 0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  TNF- $\alpha$  及 0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$   $\gamma$  干扰素的浓度。TNF- $\alpha$  及  $\gamma$  干扰素的复合物对未受感染的 Hu T78 及 H9 细胞没有细胞毒作用。培养物再在 37°C 下培养 24 小时，然后加入  $1 \times 10^6$  CPM 单位·HIV/ml。CPM 单位用逆转录酶活性来测定(31)，每一单位校正到表示每一个病毒粒的逆转录酶活性。在 37°C 下再培养 3 天之后，细胞通过采用鼠单克隆抗体对 P24(core) HIV 蛋白的及带标记的山羊抗鼠免疫球蛋白(32)进行间接的免疫荧光法对病毒的抗原进行筛选。重复实验的结果以含有 HIV 抗蛋白的细胞的百分数形式列于下面。

表 3

试剂	感染细胞的百分数					
	Hu T78		H9		U937	
	1	2	1	2	1	2
对照	54	68	48	36	11	14
TNF- $\alpha$	27	34	32	18	7	8
$\gamma$ 干扰素	63	51	42	41	12	11
TNF- $\alpha$ 及 $\gamma$ 干扰素	1	8	4	3	2	1

这些结果表明了 TNF 与干扰素的复合物对于预防敏感的 T 细胞受 HIV 感染也高度有效。

### 例 8

#### HIV 感染细胞的治疗

将含有  $1 \times 10^5$  H9 及 RPM I-1788 淋巴母细胞

(lymphoblastoid) / 毫升的 RPM I1640 培养基在有  $1 \mu\text{g/ml}$  聚凝胺存在的情况下加入  $1 \times 10^3$  CPm HIV/ml 以提高细胞受 HIV 感染的百分率。这些细胞培养 30 天左右的时间，在此期间每隔 3 至 5 天换一次培养基，大约每隔一周进行一次细胞亚培养 (subculture)。足够的 TNF  $\alpha$  及  $\gamma$  干扰素一起同时加到含有  $1 \times 10^6$  细胞/ml 的培养物中，以建立下面的如表 4 所示的浓度体系。这些浓度的 TNF-  $\alpha$  及  $\gamma$  干扰素复合物对于未受感染的 H9 及 RPM I-1788 细胞没有细胞毒作用。培养物在  $37^\circ\text{C}$  下培养 3 天，然后用台盼蓝染色测定存活细胞的百分数。重复的实验结果列于表 4 (ND = 未进行)。

表 4

药品 (试剂)	浓度	存活细胞百分数			
		H9		1788	
		1	2	1	2
对照	/				
	/	89	76	95	86
TNF- $\alpha$	1.0ng/ml	ND	ND	90	81
	0.1 $\mu\text{g/ml}$	73	70	81	76
$\gamma$ 干扰素	1.0ng/ml	ND	ND	83	84
	0.1 $\mu\text{g/ml}$	85	74	80	82
TNF- $\alpha$ 及	1.0ng/ml	ND	ND	68	72
$\gamma$ 干扰素	0.1 $\mu\text{g/ml}$	50	42	34	53

这些结果表明，TNF与干扰素的复合物对于病毒感染细胞的协同杀伤作用以及单独使用的TNF- $\alpha$ 对于病毒感染细胞的程度较低的杀伤作用是受浓度的影响的。这一特性及TNF或复合物对未感染细胞的保护作用显示了TNF或复合物疗法对于治疗还原病毒感染的价值。

## 例 9

TNF及复合物疗法使HIV复制减少

Hu T78细胞用0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  TNF- $\alpha$ 及 $\gamma$ 干扰素处理，然后按照例7方法用HIV对其进行感染。在37 $^{\circ}\text{C}$ 下培养2天之后，按下述方法将HIV感染细胞中的所有的RNA萃取出来。细胞用PBS洗涤并在0 $^{\circ}\text{C}$ 左右重新悬浮于含0.5% NP-40及17  $\mu\text{l}$  VRC (BRL)的0.35ml TSM缓冲液(10mM Tris PH7.5, 0.15M NaCl, 2mM  $\text{MgCl}_2$ )中。3至5分钟后，离心取出溶解细胞的核。将含有mRNA的上清液加入到含有1% SDS的0.35ml的TSE缓冲液中(10mM Tris PH7.5, 0.15M NaCl, 5mM EDTA)并用0.7ml的苯酚:氯仿:异戊醇(24:24:1)抽提液抽提三次。苯酚用水及0.1%8-羟基喹啉平衡。RNA从含有乙醇及乙酸钠的水层中沉淀出来

Poly(A) RNA通过oligo(dT)纤维素电泳而制备(36)。按照介绍的方法使用1  $\mu\text{g}$  RNA/lane进行Northern杂交(37)。图6的结果表明用TNF- $\alpha$ 预处理可以抑制宿主中HIV RNA的出现，但是当同时使用TNF及干扰素时出现的RNA就远远地减少了。这些结果与列于表3中的感染数据是一致的。据观察用或不用TNF及干扰素进行处理时，肌动蛋白(actin)(一种结构蛋白)都没有变化，表明TNF- $\alpha$ 及干扰素的作用是针对病毒的而不是针对一般的细胞生长。

## 例 10

### 爱滋病或爱滋相关综合征患者治疗记录

记载的案例为，H I V抗体血清阳性的男性，对其血液作体外细胞培养显示出H I V的效价。这些病人一般都呈现出爱滋或爱滋相关综合症的症状，并且由血清转换产生H I V抗体。这个治疗小组根据下列的治疗变异性分成若干个班：

1,同时或连续的用T N F及干扰素治疗。

2,静脉或肌肉注射，对于静脉注射的情况，采用大丸剂(bolus)或者持续的输注(1,2,5及10天)。

3,数小时的剂量系统治疗，按以下浓度开始,1  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  T N F及1  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  干扰素- 及每一药剂浓度都增加至5,10,25,50……  $\mu\text{g}/\text{m}^2$  以至可以耐受的最高浓度。

4, T N F与干扰素的比例为1:100 至100:1

5,重复的治疗周期：重复1 至5 次，每次间隔1、2、5 或10天。

6,干扰素类型的选择及比例： $\alpha$ 及 $\gamma$ ,1:10 至10:1； $\beta$ 及 $\gamma$ ,1:10 至10:1； $\gamma$ ， $\alpha$ 或 $\beta$ 单独使用1:1:1 至10:1:1至1:5:5。

合适的初始疗法包括对于爱滋相关综合征病人施用T N F-  $\alpha$ 、 $\gamma$ 干扰素及 $\alpha$ 干扰素的复合物。复合物通过采用一个校正的输注泵进行连续的静脉输注，输注剂量为T N F-  $\alpha$ :1-10  $\mu\text{g}/\text{m}^2/24$  小时； $\gamma$ - 干扰素:1-10  $\mu\text{g}/\text{m}^2/24$  小时； $\alpha$ - 干扰素1-10  $\mu\text{g}/\text{m}^2/24$  小时。病人施用的剂量可以在能耐受的范围内逐渐上升。输注持续一周。病人休息一周之后进行再次输注。出现的发热、寒战等的副作用可以用惯常的方法治疗或减少剂量。当抗H I V抗体或g P120env作为抗病毒剂与上述的复合物联用时，采用的抗体或env 多肽的剂量按照能够分隔由联合疗法所释放的病毒粒的计算值来确定。这一点将依赖于抗体对病毒粒的亲合性及其中和效价以及病人病毒的效价的确定。确定

合适的剂量是专业人员的工作范围。

病人的临床条件及病毒感染性效价在治疗在及治疗后的记录中作了监测。与体外研究的例7-9一致，本治疗方法的结果得到令人满意的病人的免疫力及病毒效价的比例情况病人获得相当地改善。

### 例 11

过氧化氢酶增强干扰素  $\gamma$  和 / 或 T N F-  $\alpha$  抗病毒活性

将 A549 细胞以每眼  $2 \times 10^4$  只的密度栽种于96眼的平底盘 (falcon plastics), 24 小时之后与试样一起培养。试样如图7所示 (C A t " 为过氧化氢酶)。样品还含有 Dulbecco 改善的 Eagle's (D M E) 培养基并加入5%加热去活的小牛胎血清 (F C S)、谷氨酰胺 (2m M)、青霉素 (100单位/毫升) 及链霉素, (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 补充。在37 $^{\circ}\text{C}$ 下培养18小时, 将培养物上清液换以新鲜的不含干扰素、T N F或过氧化氢酶但含有2%的小牛胎血清及感染复数 ("M O I", 为感染性病毒/细胞的比例) 为1的 D M E培养基。用结晶紫对存活细胞进行染色以测定细胞病的效果 (C P E), 并用microelisa自动阅读器 (M R 580, Dynatech) 作效价的定量测定并进一步通过用目测来确证。

C P E 抗病毒的效价是以能抑制50% 细胞疾病的稀释度的倒数表示, 同时以人体干扰素  $\gamma$  (N O. Gg23-901-530) 的国际对照样品标化。

如图7所示, 过氧化氢酶显著地并且协同地增强干扰素  $\gamma$  及 T N F-  $\alpha$  的抗病毒作用。这种作用并非只限于 E M C 病毒的。已经观察到了许多适用的细胞及病毒。

## 文献目录

1. Gottlieb, M. et al., "New Engl. J. Med." 305:1425-1431(1981).
2. Masur, H. et al., "New Engl. J. Med." 305:1431-1438(1981).
3. Siegal, F. et al., "New Engl. J. Med." 305:1439-1444(1981).
4. Seligman, M. et al., "New Engl. J. Med." 311:1286-1292(1984).
5. Lane, H., Masur, H., Edgar, G., Whalen, G. and Fauci, A. "New Engl. J. Med." 309:453-458(1983).
6. Ziegler, J. et al., "New Engl. J. Med." 311:565-570(1984).
7. Barre-Sinoussi, F. et al. "Science" 220:868(1983).
8. Montagnier, L. et al. "Human T-cell Leukemia Viruses" 363-379 (Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1984).
9. Vilmer, E. et al. "Lancet" I: 753-757(1984).
10. Popovic, M., Sarngadharan, M., Read, E. and Gallo, R., "Science" 224:497-500(1984).
11. Gallo, R. et al. "Science" 224:500-503(1984).
12. Feorino, P. et al. "Science" 225:69-72(1984).

13. Levy, J. et al. "Science" 225:840-842(1984).
14. Klatzmann, D. et al. "Science" 225:59-63(1984).
15. Schupbach, J. et al. "Science" 224:503-505(1984).
16. Sarngadharan, M., Popovic, M., Bruch, L., Schupbach, J. and Gallo, R. "Science" 224:505-508(1984).
17. Safai, B. et al. "Lancet" I:1438-1440(1984).
18. Brun-Vezinet, F. et al. "Lancet" I:1253-1256(1984).
19. Brun-Vezinet, F. et al. "Science" 226:453-456(1984).
20. Goedert, J. et al. "Lancet" II:711-715(1984).
21. Lawrence, J. et al. "New Engl. J. Med." 311:1269-1273(1984).
22. Murray, H. et al., "New Engl. J. Med." 310:883-889(1984).
23. Fauci, A. et al. "Ann. Int. Med." 100:92-106(1984).
24. Nathan, C. et al. "J. Exp. Med." 158:670-689(1983).
25. Aderka, et al. "Cell. Immun." 92:218-225(1985).
26. Pennington, J. et al. "J. Infect. Dis." 153:609-612(March, 1986).
27. Lane, H. et al. "Clinical Research" 32:351A(1984).

28. Klatzmann, D. et al. "Nature" 319:10-11(January, 1986).
29. Yamamoto, J. et al. "J. Interferon Res." 6:143-152(June, 1986).
30. Beutler, B. et al. "Science" 229:869 (30 August 1985).
31. Hoffman, A. et al. "Virology" 147:326-335(1985).
32. Kaminsky, L. et al. "Proc. Nat. Acad. Sci. USA" 82:5535-5539(1985).
33. Meussing, M et al. "Nature" 313:450-458 (1985).
34. Anonymous "Science" 229:811 (30 August 1985).
35. Ruddle, N. et al. "Immunology Today" 1:8-9(1986).
36. Aviv, H. et al. "Proc.Nat.Acad.Sci. USA" 69:1408-1412 (1972).
37. Thomas, P. "Proc.Nat.Acad.Sci. USA" 77:5201-5205(1980).

EMC/A549 细胞

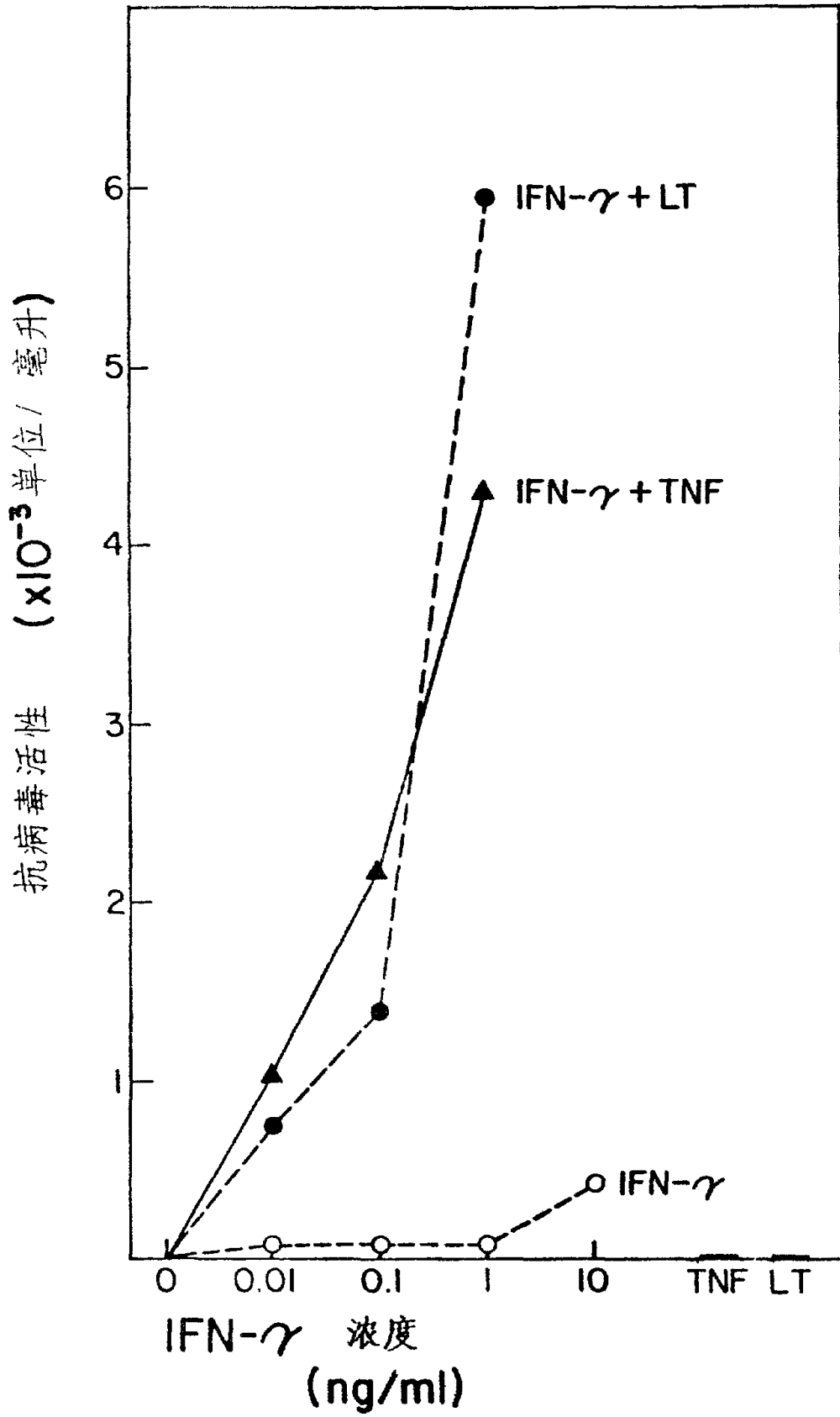


图 1

VSV/MDBK 细胞

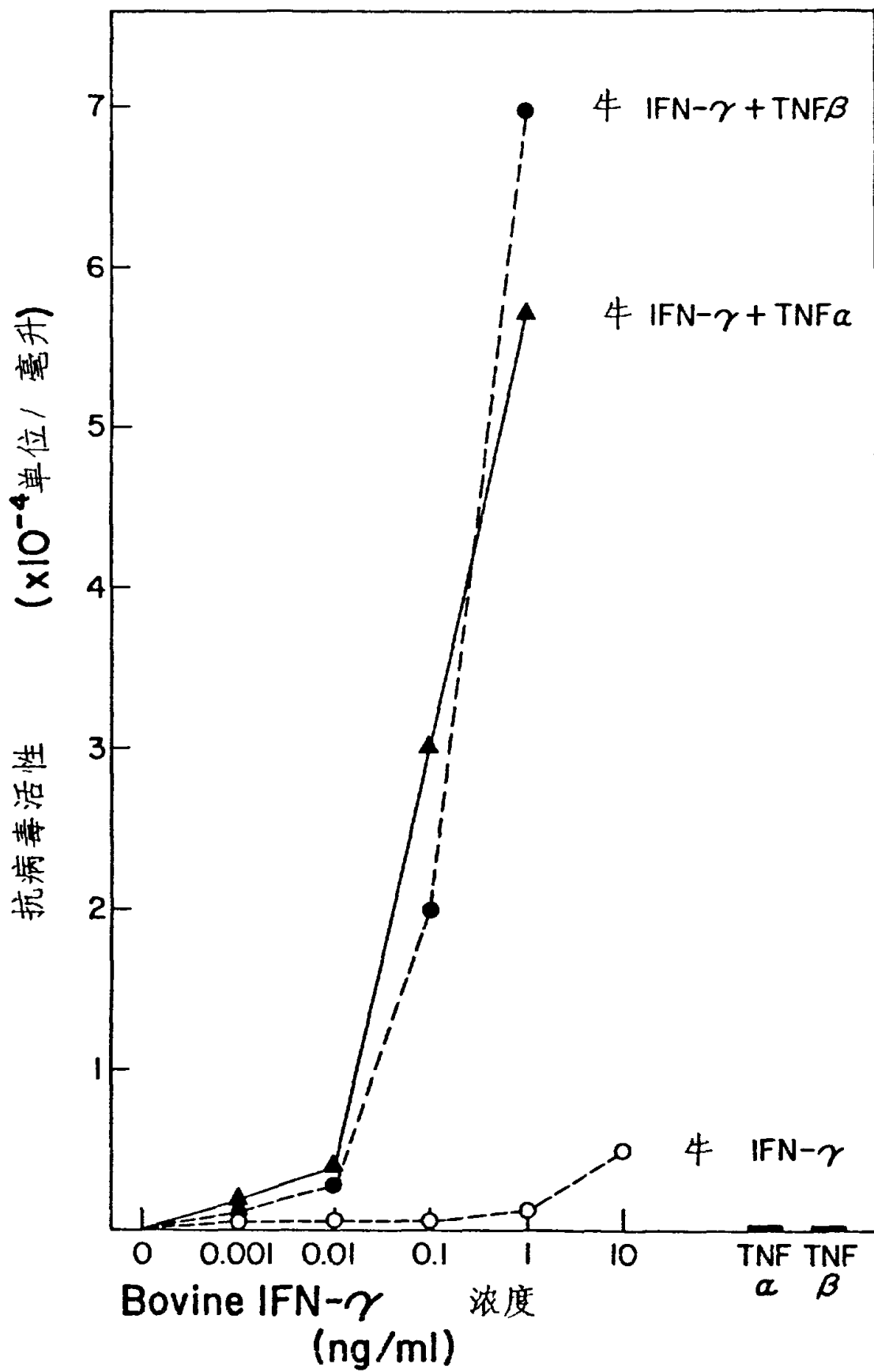


图 2

# IFN- $\gamma$ 在 TNF $\alpha/\beta$ 存在下能保护以抵抗 V S V 感染

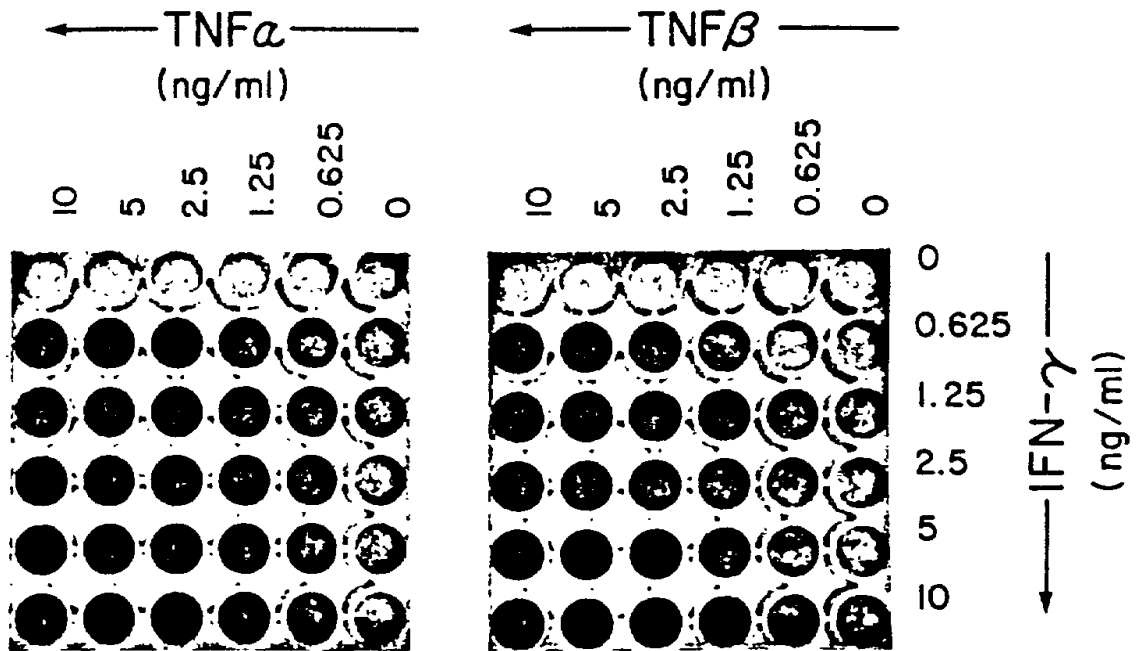


图 3

抗病毒活性  
单位 / 毫升

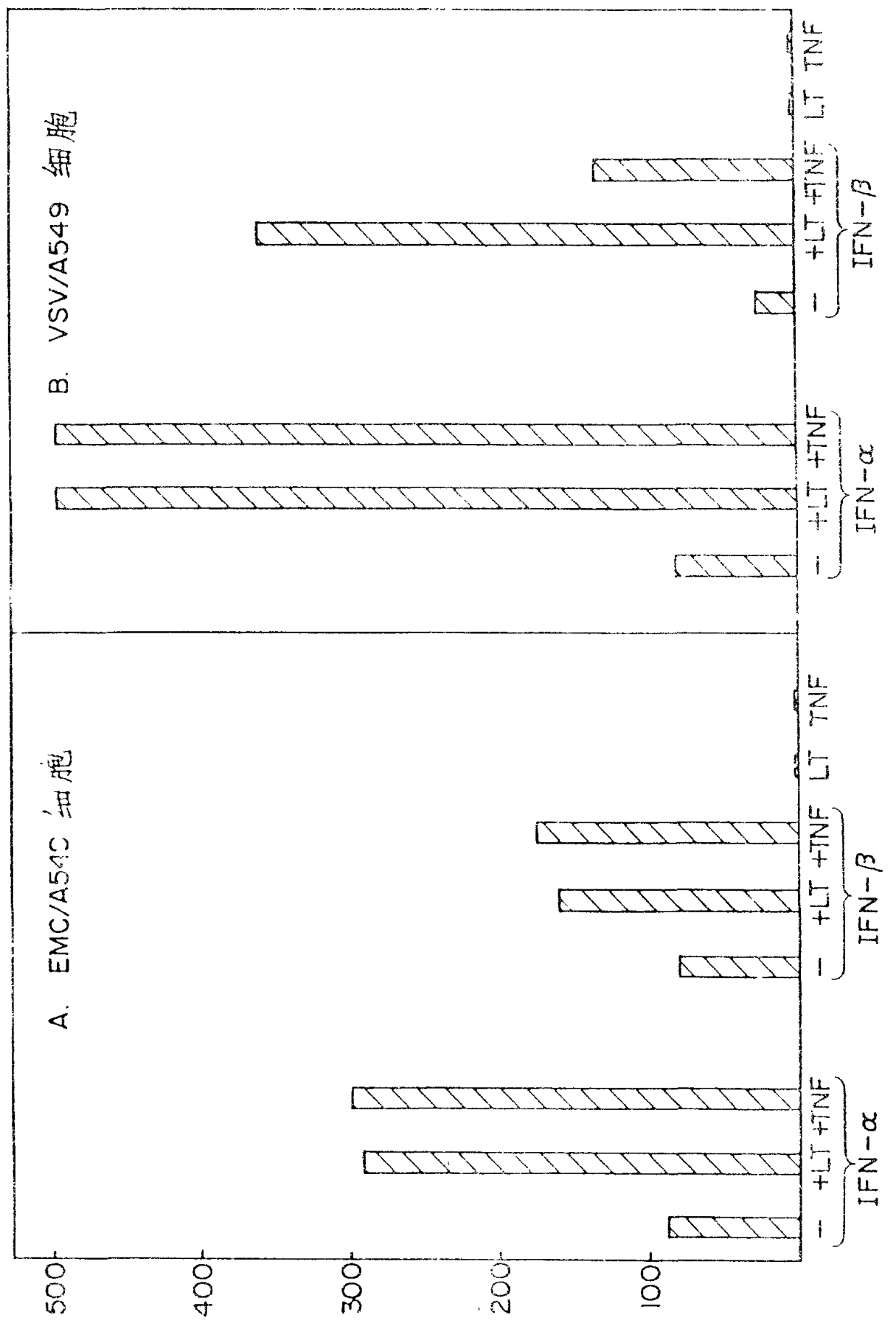


图 4.1

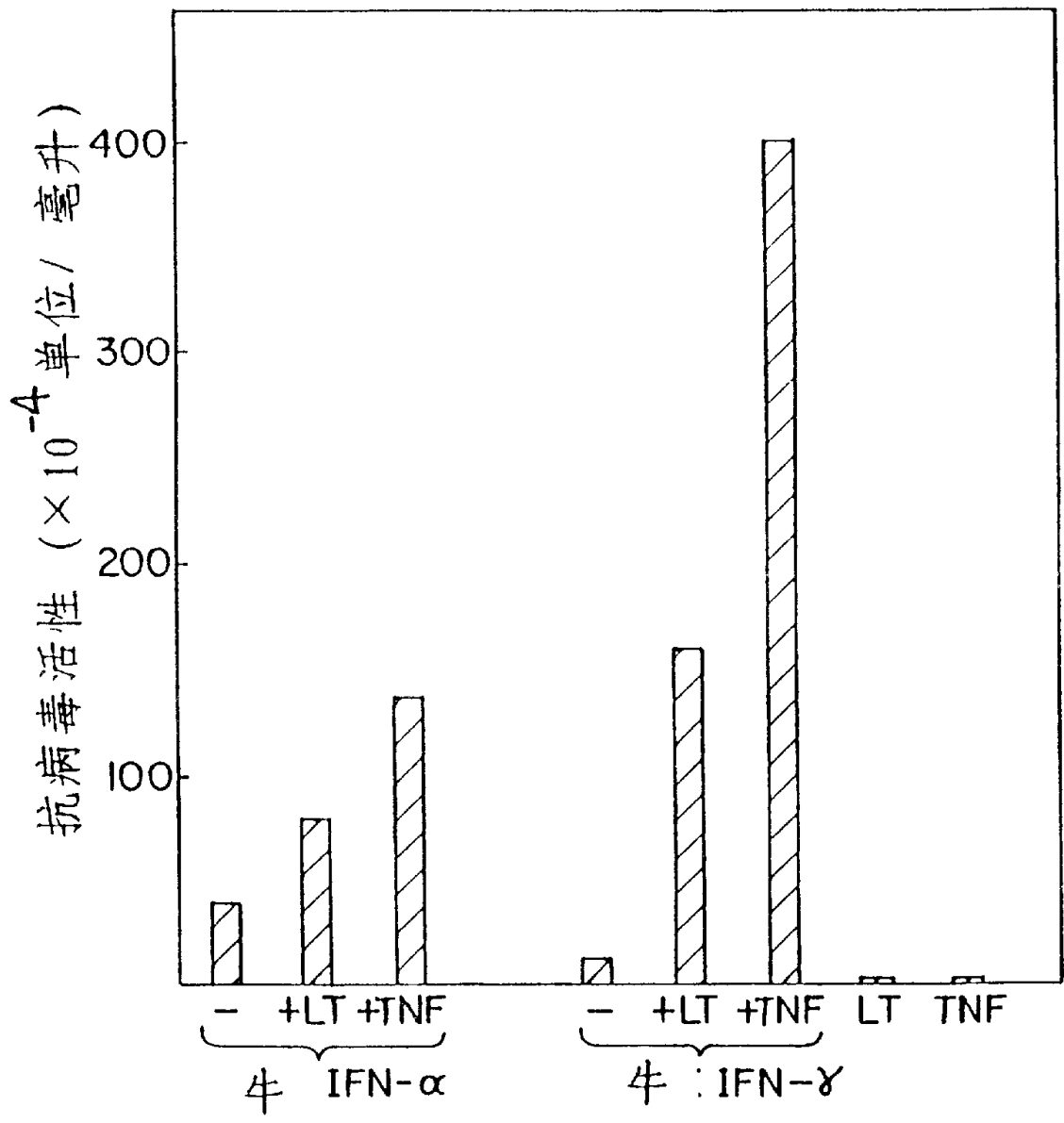


图 4 b

# EMC/A549

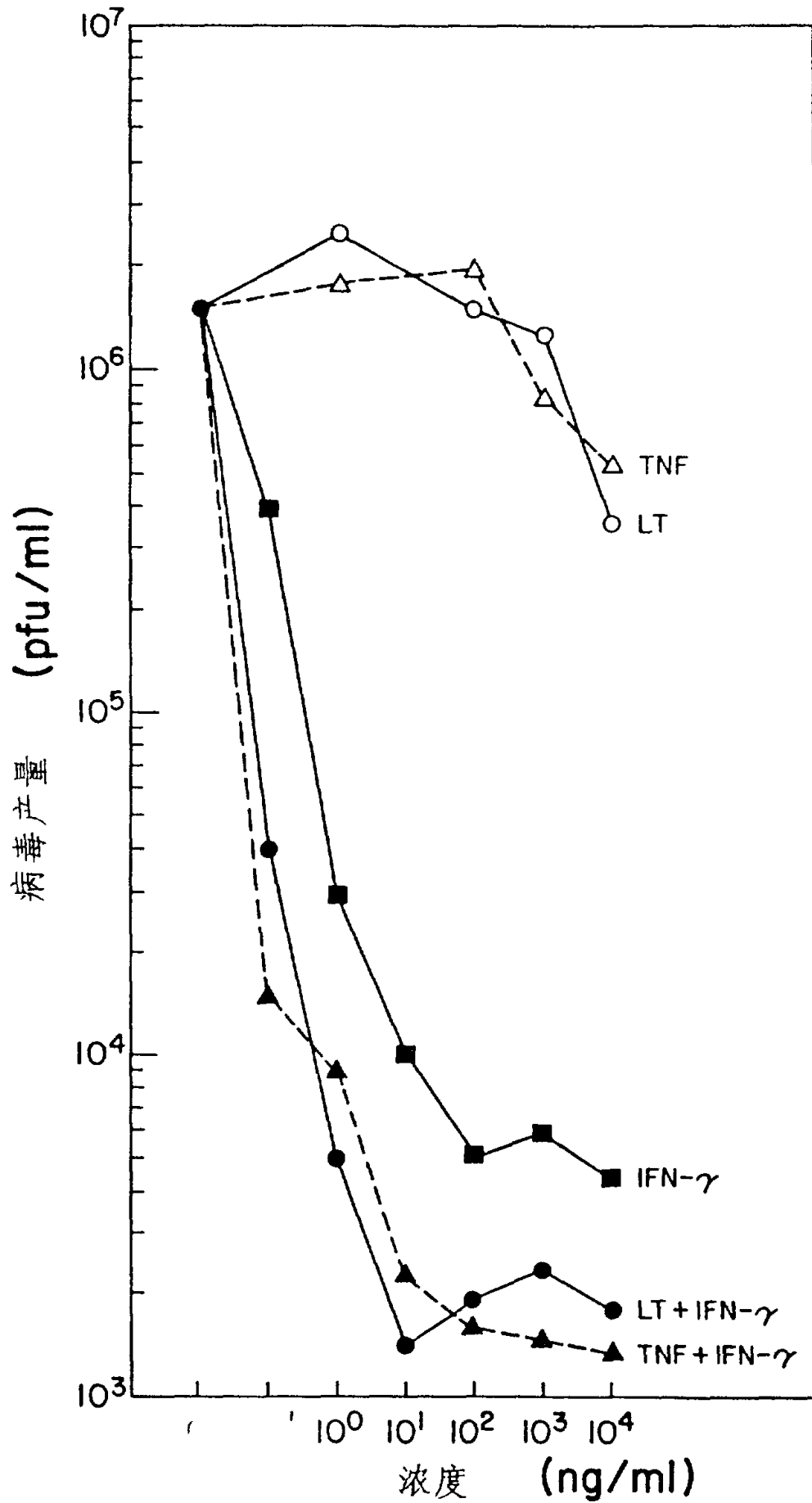


图 5A

# VSV/A549

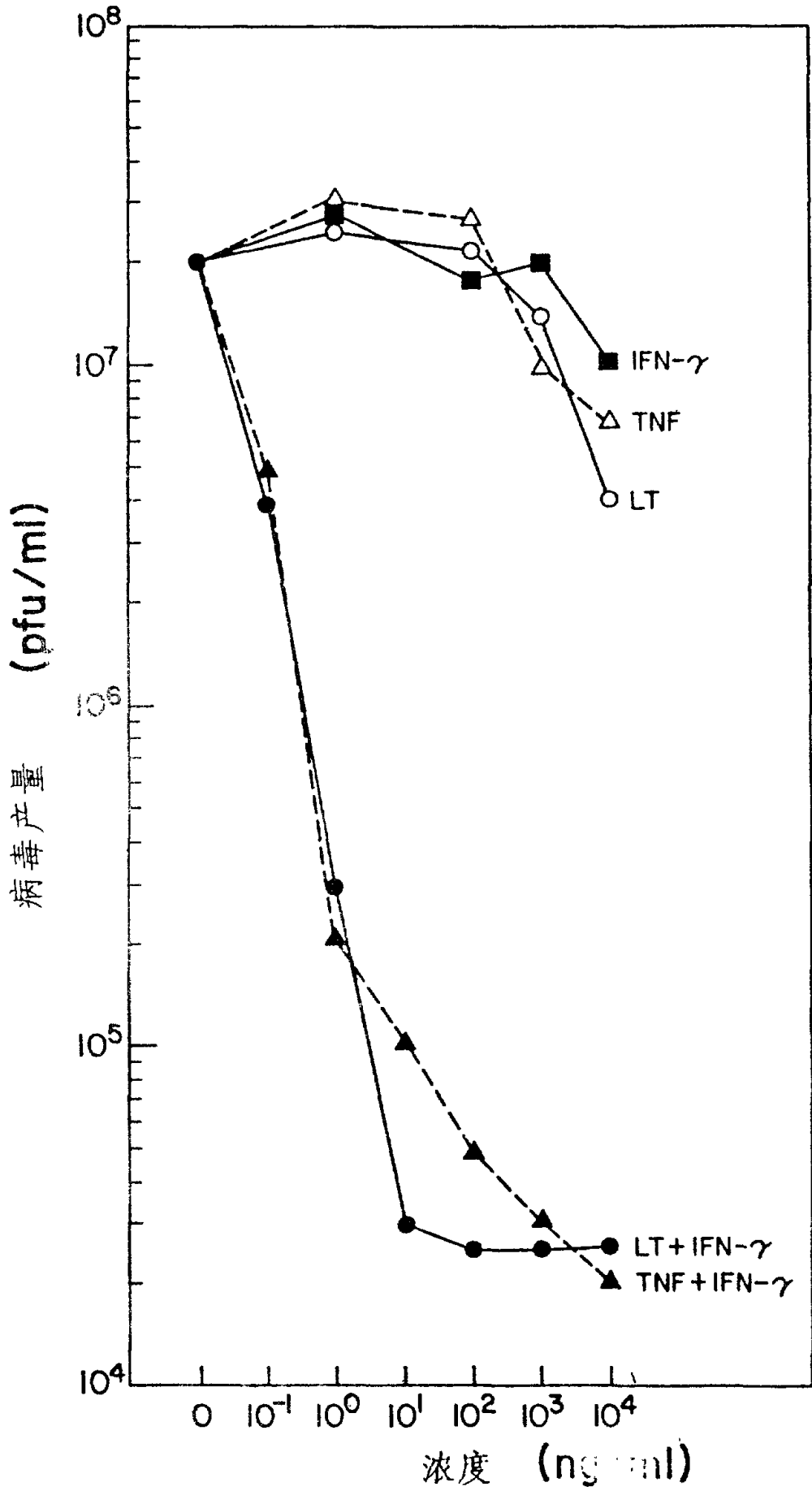


图 5B

# Ad-2/A549

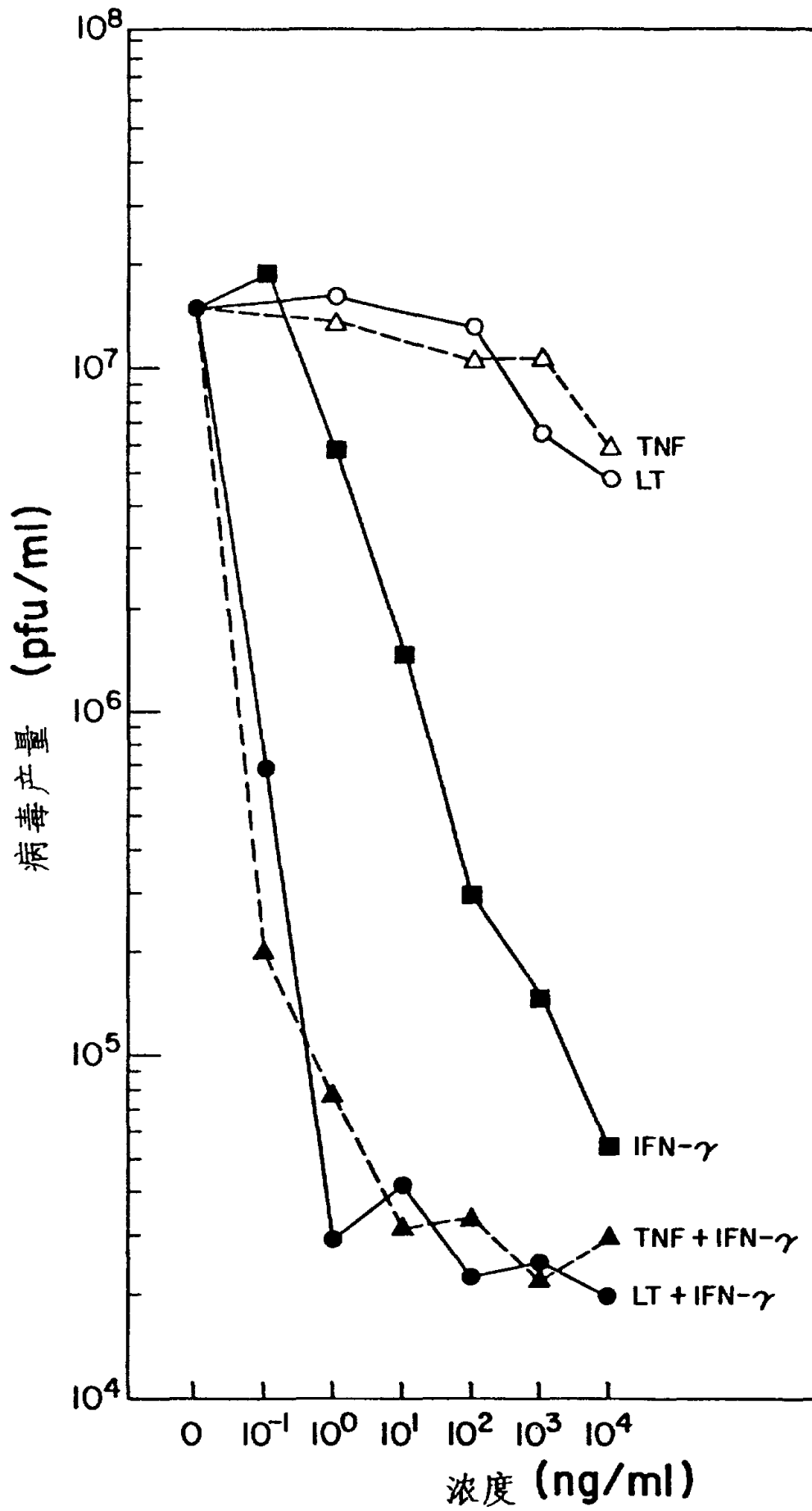


图 5C

# HSV-2/A549

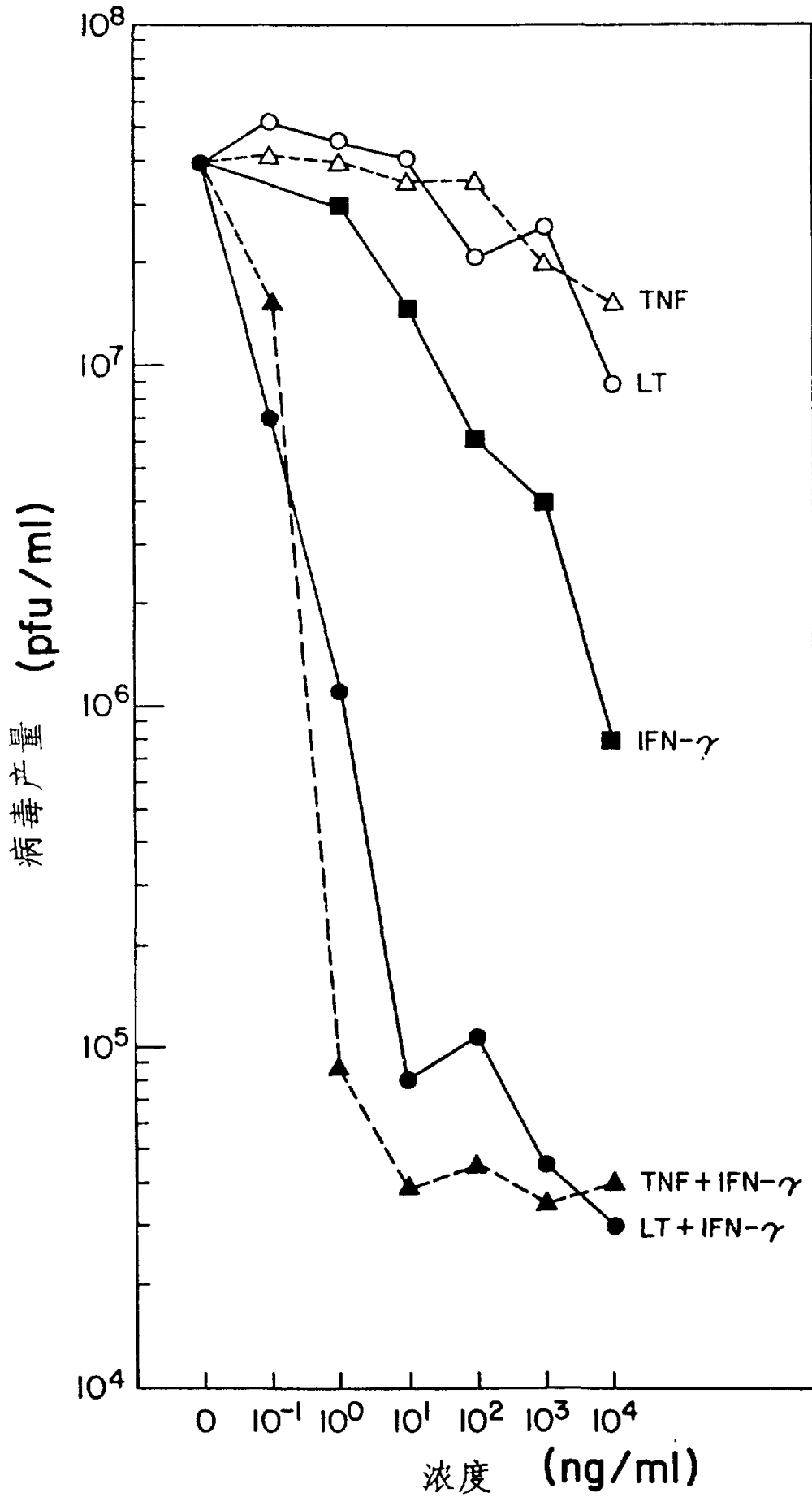
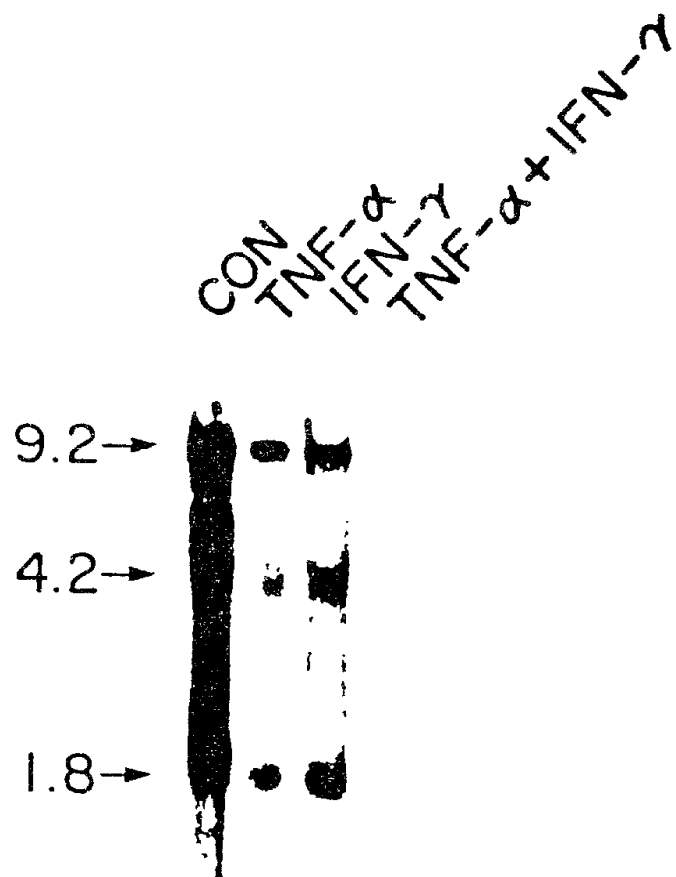


图 5D



HIV

图 6

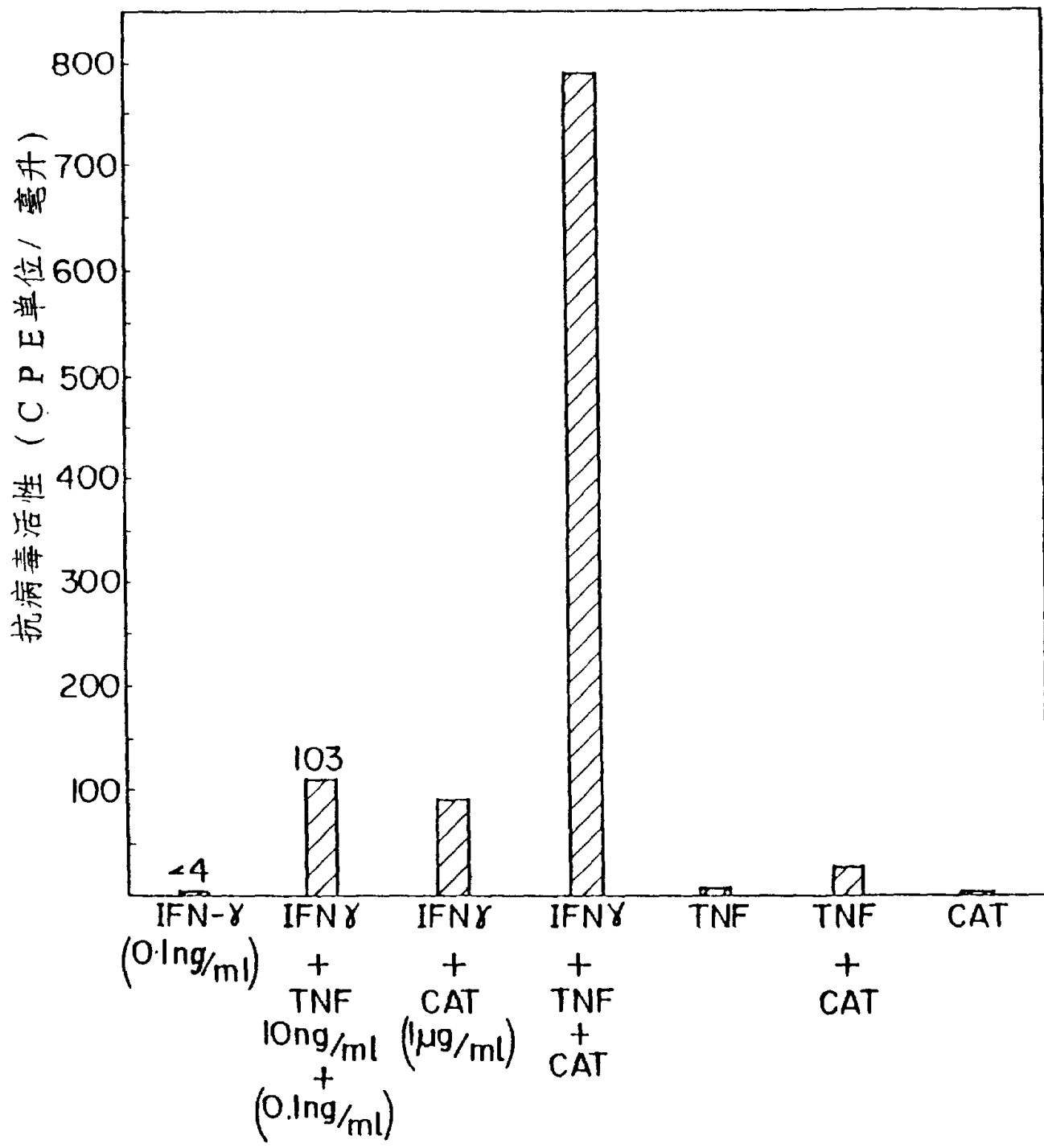


图 7