PCT

世界知的所有権機関
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類5 A61K 31/685, 37/02, 37/22 A61K 35/42	A1	(11) 国際公開番号 WO 94/00131 (43) 国際公開日 1994年1月6日(06.01.1994)

(21) 国際出願番号 PCT/JP93/00851
(22) 国際出願日 1993年6月23日(23. 06. 93)
(30) 優先権データ
特願平4/165875 1992年6月24日(24. 06. 92) JP
(71) 出願人(米国を除くすべての指定国について)
東京田辺製薬株式会社
(TOKYO TANABE COMPANY LIMITED)〔JP/JP〕
〒103 東京都中央区日本橋本町二丁目2番6号 Tokyo, (JP)
(72) 発明者;および
(75) 発明者/出願人(米国についてのみ)
木戸 博(KIDO, Hiroshi)〔JP/JP〕
〒770 徳島県徳島市東吉野町3丁目11番地の10 Tokushima, (JP)
田代眞人(TASHIRO, Masato)〔JP/JP〕
〒323 栃木県小山市花垣町1丁目13番39号 自治医大住宅4棟101号
Tochigi, (JP)
坂井堅太郎(SAKAI, Kentaro)〔JP/JP〕
〒770 徳島県徳島市八万町大坪232番地の1 Tokushima, (JP)
関戸祥三郎(SEKIDO, Shozaburo)〔JP/JP〕
〒279 千葉県浦安市今川4丁目12番38-7号 Chiba, (JP)
(74) 代理人
弁理士 松山直行, 外(MATSUYAMA, Naoyuki et al.)
〒115 東京都北区赤羽北2丁目33番3号
東京田辺製薬株式会社 研究開発本部内 Tokyo, (JP)
(81) 指定国
AT(欧州特許), AU, BE(欧州特許), CA, CH(欧州特許), DE(欧州特許), DK(欧州特許), ES(欧州特許), FR(欧州特許), GB(欧州特許), GR(欧州特許), IE(欧州特許), IT(欧州特許), KR, LU(欧州特許), MC(欧州特許), NL(欧州特許), PT(欧州特許), SE(欧州特許), US.

添付公開書類 国際調査報告書

(54) Title : PROPHYLACTIC AND REMEDY FOR VIRAL DISEASES IN RESPIRATORY TRACT

(54) 発明の名称 気道部ウィルス疾患の予防及び治療剤

(57) Abstract

A prophylactic and a remedy for viral diseases in the respiratory tract, each containing a lung surfactant as the active ingredient and being applicable to the prevention or treatment of diseases caused by a virus which contains an adventitial glycoprotein and which epidemically infects the respiratory tract and proliferates therein, such as influenza virus, parainfluenza virus, RS virus, measles virus or mumps virus.

(57) 要約

肺サーファクタントを有効成分として含有する気道部ウィルス疾患の予防及び治療剤である。肺サーファクタントを有効成分として含有する薬剤は、インフルエンザウィルス、パラインフルエンザウィルス、ＲＳウィルス、麻疹ウィルス又はムンプスウィルス等のような外膜糖蛋白を有するウィルスであって気道部において流行的に感染、増殖するものにより発症するウィルス疾患に対し、予防的又は治療的に適用できる。

情報としての用途のみ
PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AT オーストリア
AU オーストラリア
BB バルバードス
BE ベルギー
BF ブルキナ・ファソ
BG ブルガリア
BJ ベナン
BR ブラジル
BY ベラルーシ
CA カナダ
CF 中央アフリカ共和国
CG コンゴー
CH スイス
CI コート・ジボアール
CM カメルーン
CN 中国
CS チェッコスロヴァキア
CZ チェッコ共和国
DE ドイツ
DK デンマーク
ES スペイン
FI フィンランド
FR フランス
GA ガボン
GB イギリス
GN ギニア
GR ギリシャ
HU ハンガリー
IE アイルランド
IT イタリー
JP 日本
KP 朝鮮民主主義人民共和国
KR 大韓民国
KZ カザフスタン
LI リヒテンシュタイン
LK スリランカ
LU ルクセンブルグ
LV ラトヴィア
MC モナコ
MG マダガスカル
ML マリ
MN モンゴル
MR モーリタニア
MW マラウイ
NE ニジェール
NL オランダ
NO ノルウェー
NZ ニュー・ジーランド
PL ポーランド
PT ポルトガル
RO ルーマニア
RU ロシア連邦
SD スーダン
SE スウェーデン
SI スロヴェニア
SK スロヴァキア共和国
SN セネガル
TD チャード
TG トーゴ
UA ウクライナ
US 米国
UZ ウズベキスタン共和国
VN ヴェトナム

明　細　書

気道部ウィルス疾患の予防及び治療剤

技術分野

本発明は、肺サーファクタント（以下「ＰＳＦ」という）を含有する気道部ウィルス疾患の予防及び治療剤に関し、詳しくは、気管支粘膜上皮分泌細胞が散在する気道部周辺におけるウィルス疾患の予防及び治療を目的とした有効成分としてＰＳＦを含有する薬剤に関する。

背景技術

気管支粘膜上皮分泌細胞は、気道部、特に気管支部に散在する細胞で、気道粘液を分泌する機能を有し、かつ生体内肺表面活性物質の産生に一部関与しているといわれている。一方、ＰＳＦは、主にホスファチジルコリン（別名コリンホスホグリセリドともいう；以下同じ）からなるリン脂質を主要成分とする物質で、後述するように多種類のものが報告されている。それらの報告によれば、ＰＳＦは、一般に、肺胞の気－液界面の表面張力を低下させ、肺胞腔を生理的に維持し、肺の呼吸機能を円滑ならしめる作用を持っていることから、生体内肺表面活性物質の欠乏によって発症する死亡率の高い呼吸窮迫症候群の治療剤として有用であると評価されている。また、国際公開第ＷＯ９１／１７７６６号公報によれば、ＰＳＦは、気管支を安定化し、アレルギー性気管支収縮を抑制する作用を持っていることから、喘息治療剤として有用であることも報告されている。

しかしながら、気管支粘膜上皮分泌細胞の生体内における役割については、知られていない部分が多く、気管支粘膜上皮分泌細胞とウィルス

疾患及びこれらと生体内肺表面活性物質の明確な関わりは未だ解明されていない。従って、ウィルス疾患におけるＰＳＦの有効性も知られていない。

本発明者らは、長年、蛋白分解酵素及びウィルスの研究を行ってきたところ、(1) 本発明者らが発見したことであるが、気管支粘膜上皮分泌細胞からトリプシン様の蛋白分解酵素（以下「トリプターゼクララ」と仮称する）が分泌されていること、(2) そのトリプターゼクララが、ウィルス外膜糖蛋白前駆体を膜融合活性を持つ成熟型ウィルス外膜糖蛋白に限定分解し、その結果、気道部においてウィルス膜と細胞膜との融合を誘導し、気管支粘膜上皮細胞へのウィルスの侵入を決定すること、(3) 生体内表面活性物質が、トリプターゼクララによるウィルス外膜糖蛋白前駆体の分解による成熟を抑制し、気管支粘膜上皮細胞のウィルス感染及びウィルス増殖を防止すること、(4) ウィルスの感染及び増殖が防止されることから、激烈な発熱もしくは炎症等又は細菌重感染を伴うウィルス疾患の予防及び治療が達成されること、及び(5) 外部から投与されたＰＳＦも生体内肺表面活性物質と同様の効果を有すること等の知見を得て本発明に到達した。

発明の開示

本発明によれば、ＰＳＦを有効成分として含有するウィルス疾患の予防及び治療剤が提供される。

本発明のウィルス疾患の予防及び治療剤におけるＰＳＦは、主にホスファチジルコリンからなるリン脂質を全体として４０重量％以上含有する物質であればよく、具体的には以下の公知のもの又は新規なものが挙げられる。

(a) 哺乳動物の肺臓組織に存在するリン脂質、中性脂質、総コレステロー

ル、炭水化物及び蛋白質を含有し、かつ乾燥した最終製品の総重量に対するこれら各成分の重量の百分率が、リン脂質は７５．０～９５．５％、中性脂質は１．８～１４．０％、総コレステロールは３．０％以下、炭水化物は０．１～１．５％及び蛋白質は５．０％以下である表面活性物質（特公昭６１－９９２５号公報）。

(b) 主としてジパルミトイルホスファチジルコリン及び脂肪アルコールからなる肺表面活性薬組成物（特開昭５７－９９５２４号公報）。

(c) 哺乳動物の肺臓組織に存在するリン脂質、中性脂肪、総コレステロール、遊離脂肪酸、炭水化物及び蛋白質を含有する表面活性物質であって、当該物質の乾燥総重量に対する各成分の重量百分率が、リン脂質は６８．６～９０．７％、中性脂肪は０．３～１３．０％、総コレステロールは０．０～８．０％、遊離脂肪酸は１．０～２７．７％、炭水化物は０．１～２．０％及び蛋白質は０．０～３．５％である表面活性物質（以下「ＰＳＦ－１」という；特公昭６１－９９２４号公報）。

(d) リン脂質ホスファチジルコリンと不飽和脂肪酸又はそのエステルを主成分とし、該ホスファチジルコリンが全体の５５～８０重量％を占める合成肺表面活性物質（特開昭５８－１３５８１３号公報）。

(e) 全体の８０重量％以上がリン脂質からなり、実質的に蛋白質を含まない肺表面活性物質（特開昭５８－１６４５１３号公報）。

(f) 哺乳動物の肺臓から抽出されたリン脂質、中性脂質、総コレステロール及び炭水化物を含有し、かつ乾燥後の組成がリン脂質７０～９５重量％、中性脂質１～１０重量％、総コレステロール３．０重量％以下及び炭水化物０．３重量％以下であって、蛋白質を実質的に含まない肺表面活性物質（特開昭５８－１８３６２０号公報）。

(g) リン脂質ホスファチジルコリンとカルジオリピンを主成分とし、該ホスファチジルコリンが全体の５５～８０重量％を占める合成肺表面活

性物質（特公平１－２９１７１号公報）。

(h) ジパルミトイルホスファチジルコリン４０～４５重量％、ジパルミトイルホスファチジルグリセリン５～１０重量％及び糖５０重量％の含量を有する肺用界面活性剤（特公平１－１３６９０号公報）。

(i) リン脂質であるホスファチジルコリンとカルジオリピン及び／又はホスファチジルグリセロールが全体の８０～９５重量％、中性脂質が全体の５～２０重量％、かつ脂肪酸が全体の０～１０重量％を占めるところの合成肺表面活性物質（特開昭５９－９５２１９号公報、日本界面医学会雑誌１４巻１号５９頁１９８３年）。

(j) コリンホスホグリセリド、酸性リン脂質、脂肪酸類及び哺乳動物の肺臓由来のリポ蛋白質を主に含有し、総重量に対するこれらの含量がコリンホスホグリセリドは５０．６～８５．０重量％、酸性リン脂質は４．５～３７．６重量％、脂肪酸類は４．６～２４．６重量％、リポ蛋白質は０．１～１０．０重量％であるサーファクタント（以下「ＰＳＦ－２」という；特公平３－７８３７１号公報）。

(k) 飽和の直鎖脂肪酸残基を２個有するホスファチジルコリンが全体の５５～８０重量％、飽和の直鎖脂肪酸残基を２個有するホスファチジルグリセロールが全体の１０～３５重量％、中性脂質が全体の５～２０重量％含まれるところの合成肺表面活性物質（特開昭５９－１８１２１６号公報）。

(l) リン脂質含量４０～７０％、蛋白質含量１．５％未満、コレステロール含量１０～４０％、中性脂質含量５～３０％である作用物質混合物（特開昭６０－２３７０２３号公報）。

(m) コリンホスホグリセリド、酸性リン脂質及び脂肪酸類を主に含有し、総重量に対するこれらの含量がコリンホスホグリセリドは５３．９～８７．８重量％、酸性リン脂質は４．８～３８．２重量％、脂肪酸類は７．０

～２６．２重量％であるサーファクタント（以下「ＰＳＦ－３」という；特公平２－８７６８号公報）。

(n) ブタの肺胞洗浄液から抽出した脂質に塩化カルシウムを添加してなる肺表面活性物質（日本界面医学会雑誌１２巻１号１頁１９８１年、同１４巻２号２１２頁１９８３年）。

(o) ジパルミトイルホスファチジルコリン、ジステアロイルホスファチジルコリン及び大豆レシチンの三成分系混合物を含有する合成肺表面活性物質（特公平１－９２９２号公報）。

(p) 極性脂質画分と蛋白質画分とからなる動物源の肺動脈界面活性剤において、該極性脂質画分を少なくとも９８．５重量％の割合で存在させると共に、主に少なくとも９５％の割合のリン脂質混合物で構成した肺動脈界面活性剤（特開平１－６３５２６号公報）。

(q) リン脂質と特表昭６２－５０１１２２号公報、特表昭６２－５０１７９２号公報、特表昭６３－５０３２２２号公報、特表平１－５０１２８２号公報、特開平２－４２４号公報、特開平２－６４０５号公報、特開平２－５３７９８号公報、特開平２－２７９６２８号公報、特表平２－５０２９１７号公報、特開平３－４４３３２号公報もしくは特開平３－９００３３号公報に記載の肺表面活性蛋白質又はその他遺伝子組替えにより製造した肺表面活性物質蛋白質を含有する合成肺表面活性物質。

(r) 牛肺から得られ、リン脂質、コレステロール、疎水性表面活性蛋白質、遊離脂肪酸及びトリグリセリド等を含有するアルビオファクト（Alveofact;商品名、以下「ＰＳＦ－４」という）、インファサーフ（Infasurf；商品名）、キューロサーフ（Curosurf；商品名）、人羊水から得られるヒューマンサーフ（Humansurf;商品名）等の天然肺表面活性物質又はその調整品。

(s) エキソサーフ（Exosurf;商品名、以下「ＰＳＦ－５」という）、ジ

パルミトイルホスファチジルコリン７部及びホスファチジルグリセロール３部からなるアレック（Alec；商品名）等の合成肺表面活性物質。

(t) コリンホスホグリセリド、酸性リン脂質、脂肪酸類及び下記特定配列；

Xaa Xbb Xcc Xdd Xee Cys Pro Val Xff Xgg Lys Arg Leu Leu Xhh Val Val Val
1 5 10 15
Val Val Val Leu Xii Val Val Val Ile Val Gly Ala Leu Xjj Xkk Xll Xmm
20 25 30 35

（ここで、Xaa は存在しないか又はPhe もしくはLeu を表し、Xbb は存在しないか又はGly 、Arg もしくはLeu を表し、Xcc は存在しないか又はIle を表し、Xdd は存在しないか又はPro を表し、Xee は存在しないか又はCys を表し、Xff はHis 又はAsn を表し、Xgg はLeu 又はIle を表し、Xhh はVal 又はIle を表し、Xii はIle 、Leu 又はVal を表し、Xjj は存在しないか又はLeu を表し、Xkk は存在しないか又はMet を表し、Xll 存在しないか又はGly を表し、Xmm は存在しないか又はLeu を表す）で示されるペプチドを主に含有し、乾燥総重量に対するこれらの含量がコリンホスホグリセリドは５０．６～８５．０重量%、酸性リン脂質は４．５～３７．６重量%、脂肪酸類は４．６～２４．６重量%、ペプチドは０．１～５．０重量%である肺表面活性物質（以下「ＰＳＦ－６」という）。

ＰＳＦ－６におけるコリンホスホグリセリドとしては、1,2-ジパルミトイルグリセロ-(3)- ホスホコリン(別名ジパルミトイルホスファチジルコリン）、1,2-ジステアロイルグリセロ-(3)- ホスホコリン、1-パルミトイル-2- ステアロイルグリセロ-(3)- ホスホコリン若しくは1-ステアロイル-2- パルミトイルグリセロ-(3)- ホスホコリン等の1,2-ジアシルグリセロ-(3)- ホスホコリン、1-ヘキサデシル-2- パルミトイルグリ

セロ-(3)- ホスホコリン若しくは1-オクタデシル-2- パルミトイルグリセロ-(3)- ホスホコリン等の1-アルキル-2- アシルグリセロ-(3)- ホスホコリン又は1,2-ジヘキサデシルグリセロ-(3)- ホスホコリン等の1,2-ジアルキルグリセロ-(3)- ホスホコリンが適当である。これらの化合物についてはグリセロール残基の２位の炭素に基づく光学異性体が存在するが、本発明サーファクタントにおいてはＤ体、Ｌ体又はＤＬ体のいずれを問わず使用することができる。このほかのコリンホスホグリセリドとしては、上述の単品からなるコリンホスホグリセリド以外に、炭素数が１２～２４個のアシル基、好ましくは、飽和アシル基を２個有する1,2-ジアシルグリセロ-(3)- ホスホコリンの２種以上からなる混合物、更には当該混合物と上述の単品との混合物も使用することができる。

ＰＳＦ－６における酸性リン脂質としては、1,2-ジアシル-sn-グリセロ-(3)- リン酸（別名L-α- ホスファチジン酸）、1,2-ジアシル-sn-グリセロ-(3)- ホスホ-L- セリン（別名ホスファチジルセリン）、1,2-ジアシル-sn-グリセロ-(3)- ホスホ-sn-グリセロール（別名ホスファチジルグリセロール）又は1,2-ジアシル-sn-グリセロ-(3)- ホスホ-(1)-L-myo- イノシトール（別名ホスファチジルイノシトール）が適当である。これらの化合物において、１位及び２位は同一種類又は異なる種類のアシル基でそれぞれ置換されていてもよい。ここで、アシル基の炭素数は１２～２４個が好ましい。

ＰＳＦ－６における脂肪酸類としては、遊離脂肪酸、脂肪酸のアルカリ金属塩、脂肪酸アルキルエステル、脂肪酸グリセリンエステル若しくは脂肪酸アミド又はこれらの２種以上からなる混合物、更には脂肪アルコール又は脂肪族アミンが適当である。

なおＰＳＦ－６においては、薬効活性の安定化を図るため、必要に応じて懸濁時にカルシウムイオンを存在させてもよい。

本明細書において「脂肪酸類」とは、ここでいう脂肪アルコール及び脂肪族アミンも包含する意味である。

遊離脂肪酸としてはミリスチン酸、パルミチン酸又はステアリン酸が適当であるが、パルミチン酸が好ましい。脂肪酸のアルカリ金属塩としてはパルミチン酸ナトリウムが、脂肪酸アルキルエステルとしてはパルミチン酸エチルエステルが、脂肪酸グリセリンエステルとしてはモノパルミチンが、脂肪酸アミドとしてはパルミチン酸アミドがそれぞれ好ましい。脂肪アルコールとしてはヘキサデシルアルコールが、脂肪族アミンとしてはヘキサデシルアミンが好ましい。上述のコリンホスホグリセリド、酸性リン脂質及び脂肪酸類は動植物から分離された製品、半合成品又は化学合成品のいずれでもよく、それらの市販品を使用することができる。

本発明の予防及び治療剤においては、上記のＰＳＦがすべて使用できるが、成分として蛋白質、リポ蛋白質又はペプチドを含有するＰＳＦが望ましい。

本発明の予防及び治療剤におけるウィルス疾患としては、外膜糖蛋白を有するウィルスにより気道部で感染発症するものであればよく、例えば、インフルエンザウィルス、パラインフルエンザウィルス、レスピラトリーシンシシャルウィルス（Respiratory Syncytial Virus；以下「ＲＳウィルス」という）、麻疹ウィルス又はムンプスウィルスを原因とする疾患が挙げられる。

発明を実施するための最良の形態

ＰＳＦのウィルス疾患に対する予防及び治療効果を以下に説明する。以下の各試験に使用したＰＳＦ、ウィルス及びトリプターゼクララは以下のとおりである。

（ＰＳＦ）

各試験においては上記のＰＳＦ－１、ＰＳＦ－２、ＰＳＦ－３、ＰＳＦ－４、ＰＳＦ－５及びＰＳＦ－６を選択し、以下の組成比率からなるものをこれら各ＰＳＦの代表例として使用して行った。組成比率はすべて重量％を意味する。また、ＰＳＦ－４及びＰＳＦ－５については、外部より入手したものを使用した。

ＰＳＦ－１

リン脂質	８５．５％
中性脂肪	２．４％
総コレステロール	０．１％
遊離脂肪酸	８．２％
炭水化物	０．２％
蛋白質	０．７％
水分	２．９％

ＰＳＦ－２

1,2-ジパルミトイルグリセロ-(3)- ホスホコリン	６９．８％
1,2-ジアシル-sn-グリセロ-(3)- ホスホ-sn-グリセロール	１７．５％
パルミチン酸	８．７％
牛肺から抽出したリポ蛋白質	２．２％
水分	１．８％

ＰＳＦ－３

1,2-ジパルミトイルグリセロ-(3)- ホスホコリン	６７．９％
1,2-ジアシル-sn-グリセロ-(3)- ホスホ-sn-グリセロール	２２．６％
パルミチン酸	９．１％
水分	０．４％

ＰＳＦ－６

1,2-ジパルミトイルグリセロ-(3)- ホスホコリン	67.2%
1,2-ジアシル-sn-グリセロ-(3)- ホスホ-sn-グリセロール	22.4%
パルミチン酸	9.0%
水分	0.5%
下記特定配列で示されるペプチド	0.9%

Phe Gly Ile Pro Cys Cys Pro Val His Leu Lys Arg Leu Leu Ile Val Val Val
 1 5 10 15
Val Val Val Leu Ile Val Val Val Ile Val Gly Ala Leu Leu Met Gly Leu
 20 25 30 35

（ウィルス）

ウィルスとしては、センダイウィルス（Ｚ株）及びインフルエンザウィルス（A/Aichi/2/68 H3N2 ）を選択した。センダイウィルス及びインフルエンザウィルスは、発育鶏卵の羊膜腔で生育させたものを２５６HAU/ml（赤血球凝集単位／ml）の割合でカルシウムフリーのリン酸緩衝液（以下「PBS(-)」という）に浮遊させてそれぞれ用いた。

（トリプターゼクララ）

トリプターゼクララは、ラットの肺より、木戸博ら著のザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(THE Journal of Biological Chemistry) ２６７巻１９９２年に記載された方法に従って以下のように調製した。

ラットの肺を生理食塩液で洗浄した後細断し、これをpH５．５の条件でホモゲナイズし、ついで遠心分離して上澄液を得、これを粗抽出液とする。この粗抽出液を以下の４種類のクロマトグラフィー操作により単離精製する。即ち、得られた粗抽出液をＣＭ－５２セルロースカラム（商品名）及びＣＭ－５２セファデックスカラム（商品名）等のイオン交換カラムクロマトグラフィーに順次付し、Boc-Gln-Ala-Arg-MCA 等のトリ

プシン活性測定用発色基剤に対して活性を示す画分を採取する。この採取液をセリン性蛋白分解酵素群特異的吸着体であるアルギニンセファロースカラム（商品名）のクロマトグラフィーに付し、トリプシン様酵素を特異的に吸着採取する。最後に、ここで得られた酵素液をゲル濾過カラムに通し、トリプシン活性測定用発色基剤に対して活性を示す画分を採取することにより単離精製し、トリプターゼクララを調製する。このトリプターゼクララをPBS(-)に１mg／mlの濃度に溶解したものを各試験で用いた。

<u>ウィルスの感染増殖抑制試験</u>

試験は、以下の操作でジャーナル・オブ・ビロロジー(Journal of Virology) ８巻６１９～６２９頁１９７１年に記載されたウィルス感染価（CIU=Cell Infecting Unit)を求めることにより行った。

試験管にトリプターゼクララ２０μl 及び２０μl の各ＰＳＦを採り、０℃で２０分間インキュベートし、これにセンダイウィルス又はインフルエンザウィルス８０μl を添加し、３７℃で２０分間インキュベートした後１０μg の蛋白分解酵素阻害剤アプロチニン（商品名）を加えてトリプターゼクララの酵素活性を停止し、更に氷水中で冷却し、ウィルス反応液を得る。各ＰＳＦは、ＰＳＦ－１、ＰＳＦ－２、ＰＳＦ－３、ＰＳＦ－４及びＰＳＦ－５にあってはPBS(-)に懸濁したものを、ＰＳＦ－６にあっては極めて微量のカルシウムイオンを含むリン酸緩衝液に懸濁したものを用いる。

次に、予め、８穴チャンバースライドにアカゲザル腎細胞を１穴当たり2×10^5個採り、２～３日間インキュベートした後PBS(-)で２回洗浄し、これにウィルス反応液を１穴当たり１０又は５０μl 接種し、CO_2インキューベーター内で３５℃で６０分間インキュベートする。この培養液に０．２％の牛血清アルブミンを含有するミニマム・エッセンシャル・

メディウム培地を１穴当たり３００μl 添加し、３７℃で１５時間インキュベートする。その後、培地を除きPBS(-)で１回洗浄し、０℃のアセトンに２０分間つけて固定し、抗体で免疫蛍光染色する。抗体は、抗センダイウィルス兎血清及びフルオレセイン・イソチオシアネートで標識した抗兎免疫グロブリンヤギ免疫グロブリン又は抗インフルエンザウィルス兎血清及びフルオレセイン・イソチオシアネートで標識した抗兎免疫グロブリンヤギ免疫グロブリンを用いる。ウィルス感染価は、４００倍の顕微鏡下で蛍光を発する細胞を感染陽性細胞として数え、１mlのウィルス液相当量に換算して測定する。センダイウィルスを用いたときの試験結果を表１に、インフルエンザウィルスを用いたときの試験結果を表２にそれぞれ示す。

両表中、コントロール１は、トリプターゼクララで処理することなしに試験管にセンダイウィルス又はインフルエンザウィルス８０μl を採り、３７℃で２０分間インキュベートした後氷水中で冷却したものを、コントロール２は、試験管にトリプターゼクララ２０μl を採り、０℃で２０分間インキュベートし、これにセンダイウィルス又はインフルエンザウィルス８０μl を添加し、３７℃で２０分間インキュベートした後トリプターゼクララの酵素活性を停止し、更に氷水中で冷却したものをそれぞれウィルス反応液とし、以下上記と同様にして測定したときの結果を意味する。また、ＰＳＦ濃度とは、各ＰＳＦのPBS(-)中の濃度を意味するが、ＰＳＦ－６にあっては、混在させた塩化カルシウムを除いたものの濃度を意味する。

[表1]

群	ＰＳＦ濃度 (mg/ml)	センダイウィルス感染価 １穴当たりの感染陽性細胞数 (×１０^{4} CIU/ml)
コントロール１	−	２．０
コントロール２	−	１８０
ＰＳＦ−１投与	０．２３２ １．１６ ５．８０ ２９．０	２５ ２０ １３ ５．０
ＰＳＦ−２投与	０．２３２ １．１６ ５．８０ ２９．０	６．４ ２．１ １．５ ０．２８
ＰＳＦ−３投与	０．２２４ １．１２ ５．６０ ２８．０	３．６ ５．８ ４．９ ０．５４
ＰＳＦ−４投与	２９．０	８．４
ＰＳＦ−５投与	２９．０	１１
ＰＳＦ−６投与	０．０９６ ０．４８ ２．４０ １２．０	１８ １６ ４．７ ２．４

［表２］

群	ＰＳＦ濃度 (mg/ml)	インフルエンザウィルス感染価 １穴当たりの感染陽性細胞数 （×１０⁴ CIU/ml）
コントロール１	－	０．１５
コントロール２	－	７６
ＰＳＦ－１投与	０．２３２ １．１６ ５．８０ ２９．０	２４ １９ ９．１ ２．５
ＰＳＦ－２投与	０．２３２ １．１６ ５．８０ ２９．０	１７ ７．３ １．９ ０．３７
ＰＳＦ－３投与	０．２２４ １．１２ ５．６０ ２８．０	２７ １５ ８．０ ２．２
ＰＳＦ－４投与	２９．０	７．９
ＰＳＦ－５投与	２９．０	１５
ＰＳＦ－６投与	０．０９６ ０．４８ ２．４０ １２．０	１８ １６ １．４ ０．１２

表１及び表２より明白なように、いずれのＰＳＦも濃度依存性にトリ

プターゼクララによって増加する感染細胞の増加を抑制しており、ウィルスの感染と増殖を防止していることが認められる。

<u>ウィルス感染ラットの生存試験</u>

試験は、３週齢のＣＤ（ＳＤ）系雄性ラット（日本チャールス・リバー社製）１群１０匹を用い、ウィルス感染前にＰＳＦを１回投与した場合（以下「感染前１回投与試験」という）とウィルス感染後にＰＳＦを反復投与した場合（以下「感染後反復投与試験」という）に分け、それぞれのラットの生存日数を観察することにより行った。ウィルスとしてはセンダイウィルス（Ｚ株）を、ＰＳＦとしてはＰＳＦ－１、ＰＳＦ－２、ＰＳＦ－３及びＰＳＦ－６を選択し、それぞれ生理食塩液に懸濁したものを使用した。

ウィルス感染は、各ラットにエーテル麻酔下、2×10^{4}プラーク形成単位のセンダイウィルスを経鼻的に投与することにより行った。各ＰＳＦは、感染前１回投与試験ではウィルス感染１０分前に、ＰＳＦ－１、ＰＳＦ－２及びＰＳＦ－３にあっては１０８mg／kgを、ＰＳＦ－６にあっては４４mg／kgをそれぞれ１回気管内投与した。また、感染後反復投与試験では感染直後から８時間毎に４日間、ＰＳＦ－１、ＰＳＦ－２及びＰＳＦ－３にあっては２７mg／kgを、ＰＳＦ－６にあっては１２mg／kgをそれぞれ経鼻的に投与した。コントロール群にはＰＳＦのかわりに同容量の生理食塩液を投与した。感染前１回投与試験の結果を表３に、感染後反復投与試験の結果を表４に示す。

両表中、日目とは、ウィルス感染後の日数を意味し、ラット生存数とは、各日数日において生存しているラットの匹数を意味する。

［表３］

群（1群10匹）	感染前1回投与試験のラット生存数（匹数）									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10（日目）
コントロール	10	10	10	10	8	4	1	0	0	0
ＰＳＦ－１投与	10	10	10	10	10	10	9	8	8	8
ＰＳＦ－２投与	10	10	10	10	10	10	9	7	6	6
ＰＳＦ－３投与	10	10	10	10	10	9	8	7	5	5
ＰＳＦ－６投与	10	10	10	10	10	10	9	8	7	7

［表４］

群（1群10匹）	感染後反復投与試験のラット生存数（匹数）									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10（日目）
コントロール	10	10	10	10	7	4	2	0	0	0
ＰＳＦ－１投与	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
ＰＳＦ－２投与	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
ＰＳＦ－３投与	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
ＰＳＦ－６投与	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

表３から明らかなように、感染前１回投与試験においては、コントロール群では感染５日後から死亡する例が見られ、８日後までには全例が死亡（生存率０％）したのに対し、ＰＳＦ投与群では１０日後でも５～８例が生存（生存率５０～８０％）した。また、表４から明らかなように、感染後反復投与試験においては、コントロール群では感染５日後から死亡する例が見られ、８日後までには全例が死亡（生存率０％）したのに対し、ＰＳＦ投与群では１０日後でも全例が生存（生存率１００％）した。このことは、ＰＳＦがウィルスの感染増殖を極めて効果的に防止していることを示している。これらのことから、いずれのＰＳＦもウィルスの感染増殖を予防及び阻害していることが認められる。

ウィルス感染ラットの肺の剖検試験

試験は、３週齢のＣＤ（ＳＤ）系雄性ラット１群７匹を用い、$２×１０^{4}$プラーク形成単位のセンダイウィルスを経鼻的に投与して感染させ、感染後８時間毎に４日間、ＰＳＦを経鼻的に投与し、感染５日後に全ラットを屠殺して肺を摘出し、肺の障害度を肉眼的に観察することにより行った。ＰＳＦとしてはＰＳＦ－１、ＰＳＦ－２、ＰＳＦ－３及びＰＳＦ－６を選択し、それぞれ生理食塩液に懸濁したものを使用した。各ＰＳＦは、ＰＳＦ－１、ＰＳＦ－２及びＰＳＦ－３にあっては２７mg／kgを、ＰＳＦ－６にあっては１２mg／kgをそれぞれ投与した。コントロール群にはＰＳＦのかわりに同容量の生理食塩液を投与した。結果を表５に示す。

表５中、肺の障害度は、全肺表面積に対する肝変、即ち褐色を呈する面積の割合を０から４までの５段階のスコアーで表示した。肺の障害度スコアーにおいて、０とは、肺全表面積に対する肝変面積の百分率が０％を、１とは同百分率が１～２５％を、２とは２６～５０％を、３とは５１～７５％を、４とは７６～１００％をそれぞれ意味する。

［表５］

群（1群7匹）	肺の障害度スコアー（匹数）					平均値
	0	1	2	3	4	
コントロール				1	6	3．86
PSF－1投与	2	2	2	1		1．29
PSF－2投与	1	3	2	1		1．43
PSF－3投与	2	1	2	2		1．57
PSF－6投与	2	3	2	0		1．00

表５より明白なように、いずれのＰＳＦもウィルス感染による肺の障害範囲の拡大を阻止しており、ウィルスの感染増殖に対して奏効していることが認められる。

急性及び亜急性毒性試験

(a) 急性毒性

５週齢のＩＣＲ系雄性マウス及び５週齢のウィスター系雄性ラットに、ＰＳＦを経口及び腹腔内に投与しＬD_{50}値を求めた。ＰＳＦとしては、ＰＳＦ－１、ＰＳＦ－２、ＰＳＦ－３及びＰＳＦ－６を選択した。いずれのＰＳＦにおいても、ＬD_{50}値は、マウスでは経口で３g/kg以上、腹腔内では２g/kg以上であった。また、ラットでは経口で４g/kg以上、腹腔内では２．５g/kg以上であった。

(b) 亜急性毒性

成熟したウィスター系ラットに、１ケ月間、ＰＳＦ－１、ＰＳＦ－２及びＰＳＦ－３をそれぞれ５００mg／kg腹腔内投与したところ、１ケ月

後のラットの体重増減並びに肺臓及び他の主要臓器における肉眼的観察及び組織学的観察には何ら異常が認められなかった。

用法・用量

本発明の気道部ウィルス疾患の予防及び治療剤は、乳幼児に対しては０．００１～５００mg、好ましくは０．００２～２００mgの、成人に対しては０．００５～８００mg、好ましくは０．０１～４００mgのＰＳＦを一回投与量として含有する。この用量を水もしくは生理食塩液のような電解質溶液又は必要に応じてカルシウムイオンを含有するこれらの液に懸濁し、０．０５～３００mg／ml、好ましくは０．１～２００mg／mlの濃度に調製し、ウィルス感染前又はウィルス疾患発症後に、気道内に注入又は噴霧する。

投与回数は、ウィルス感染前にあっては１～１００回、好ましくは１～５０回、ウィルス疾患発症後にあっては１～２００回、好ましくは１～８０回が適当である。患者の症状もしくは年齢、併用療法又は対象となるウィルス疾患の流行状況に応じて上記の用量、用法及び回数を適宜変更してもよい。

本発明の予防及び治療剤は、必要に応じて安定剤、保存剤、等張剤、緩衝剤もしくは懸濁剤等の医薬品添加物又は気管支拡張剤、鎮咳剤、抗生物質、合成抗菌剤もしくは抗ウィルス剤等の医薬品を含有してもよい。剤型は液剤、用時に懸濁して用いる粉末剤又はエアロゾル剤が適当であり、バイアル瓶、アンプル瓶又はその他の密封容器内に充填し、無菌製剤とする。

産業上の利用可能性

気道部ウィルス疾患は、一般に流行する傾向があり、その流行については報道されることが多い。従って、本発明の気道部ウィルス疾患の予

防及び治療剤は、報道後にあっては、その流行疾患の予防剤として利用でき、発症後にあっては、その疾患の治療剤として利用できる。特に、本発明の予防及び治療剤は、原因ウィルスが、外膜糖蛋白を有するウィルスであって気道部に感染し増殖するもの、例えば、インフルエンザウィルス、パラインフルエンザウィルス、ＲＳウィルス、麻疹ウィルス又はムンプスウィルスによって発症するウィルス疾患に効果的に適用できる。

配　列　表

配列番号：1

配列の長さ：３５

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

```
Phe Gly Ile Pro Cys Cys Pro Val His Leu Lys Arg Leu Leu Ile Val
 1               5                  10                  15
Val Val Val Val Val Leu Ile Val Val Val Ile Val Gly Ala Leu Leu
            20                  25                  30
Met Gly Leu
        35
```

請　求　の　範　囲

1．　肺サーファクタントを含有する気道部ウィルス疾患の予防及び治療剤。

2．　肺サーファクタントが、主にホスファチジルコリン又はコリンホスホグリセリドからなるリン脂質を当該肺サーファクタントの乾燥総重量に対して４０重量％以上含有するものである請求項1記載の予防及び治療剤。

3．　肺サーファクタントが、特定の蛋白質、リポ蛋白質又はペプチドを含有するものである請求項2記載の予防及び治療剤。

4．　肺サーファクタントが、哺乳動物の肺臓組織に存在するリン脂質、中性脂肪、総コレステロール、遊離脂肪酸、炭水化物及び蛋白質を含有する表面活性物質であって、当該物質の乾燥総重量に対する各成分の重量百分率が、リン脂質は６８．６～９０．７％、中性脂肪は０．３～１３．０％、総コレステロールは０．０～８．０％、遊離脂肪酸は１．０～２７．７％、炭水化物は０．１～２．０％及び蛋白質は０．０～３．５％である表面活性物質である請求項3記載の予防及び治療剤。

5．　表面活性物質が、リン脂質８５．５重量％、中性脂肪２．４重量％、総コレステロール０．１重量％、遊離脂肪酸８．２重量％、炭水化物０．２重量％及び蛋白質０．７重量％を含有するものである請求項4記載の予防及び治療剤。

6．　肺サーファクタントが、コリンホスホグリセリド、酸性リン脂質、脂肪酸類及び哺乳動物の肺臓由来のリポ蛋白質を主に含有し、総重量に対するこれらの含量がコリンホスホグリセリドは５０．６～８５．０重量％、酸性リン脂質は４．５～３７．６重量％、脂肪酸類は４．６～２４．６重量％、リポ蛋白質は０．１～１０．０重量％であるサーファクタントである請求項3記載の予防及び治療剤。

７． サーファクタントが、1,2-ジパルミトイルグリセロ-(3)- ホスホコリン６９．８重量％、1,2-ジアシル-sn-グリセロ-(3)- ホスホ-sn-グリセロール１７．５量％、パルミチン酸８．７重量％及び牛肺から抽出したリポ蛋白質２．２重量％を含有するものである請求項６記載の予防及び治療剤。

８． 肺サーファクタントが、コリンホスホグリセリド、酸性リン脂質及び脂肪酸類を主に含有し、総重量に対するこれらの含量がコリンホスホグリセリドは５３．９～８７．８重量％、酸性リン脂質は４．８～３８．２重量％、脂肪酸類は７．０～２６．２重量％であるサーファクタントである請求項２記載の予防及び治療剤。

９． サーファクタントが、1,2-ジパルミトイルグリセロ-(3)- ホスホコリン６９．７重量％、1,2-ジアシル-sn-グリセロ-(3)- ホスホ-sn-グリセロール２２．６重量％及びパルミチン酸９．１重量％を含有するものである請求項８記載の予防及び治療剤。

１０． 肺サーファクタントが、アルビオファクトである請求項３記載の予防及び治療剤。

１１． 肺サーファクタントが、エキソサーフである請求項２記載の予防及び治療剤。

１２． 肺サーファクタントが、コリンホスホグリセリド、酸性リン脂質、脂肪酸類及び下記特定配列；

```
Xaa Xbb Xcc Xdd Xee Cys Pro Val Xff Xgg Lys Arg Leu Leu Xhh Val Val Val
 1               5                   10                  15
Val Val Val Leu Xii Val Val Val Ile Val Gly Ala Leu Xjj Xkk Xll Xmm
        20                  25                  30                  35
```

（ここで、Xaa は存在しないか又はPhe もしくはLeu を表し、Xbb は存在しないか又はGly 、Arg もしくはLeu を表し、Xcc は存在しないか又

はIle を表し、Xdd は存在しないか又はPro を表し、Xee は存在しないか又はCys を表し、Xff はHis 又はAsn を表し、Xgg はLeu 又はIle を表し、Xhh はVal 又はIle を表し、Xii はIle 、Leu 又はVal を表し、Xjj は存在しないか又はLeu を表し、Xkk は存在しないか又はMet を表し、Xll 存在しないか又はGly を表し、Xmm は存在しないか又はLeu を表す）で示されるペプチドを主に含有し、乾燥総重量に対するこれらの含量がコリンホスホグリセリドは５０．６～８５．０重量%、酸性リン脂質は４．５～３７．６重量%、脂肪酸類は４．６～２４．６重量%、ペプチドは０．１～５．０重量%である肺表面活性物質である請求項３記載の予防及び治療剤。

１３．　肺表面活性物質が、1,2-ジパルミトイルグリセロ-(3)- ホスホコリン６７．２重量%、1,2-ジアシル-sn-グリセロ-(3)- ホスホ-sn-グリセロール２２．４重量%、パルミチン酸９．０重量%及び下記特定配列；

Phe Gly Ile Pro Cys Cys Pro Val His Leu Lys Arg Leu Leu Ile Val Val Val
1 5 10 15
Val Val Val Leu Ile Val Val Val Ile Val Gly Ala Leu Leu Met Gly Leu
20 25 30 35

で示されるペプチド０．９重量%を含有するものである請求項１２記載の予防及び治療剤。

１４．　ウィルスが、外膜糖蛋白を有するウィルスであって、気道部に感染し増殖するものである請求項１乃至１３記載の予防及び治療剤。

１５．　気道部が、気管支部である請求項１４記載の予防及び治療剤。

１６．　ウィルスが、インフルエンザウィルス、パラインフルエンザウィルス、レスピラトリーシンシシャルウィルス、麻疹ウィルス又はムンプスウィルスである請求項１５記載の予防及び治療剤。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP93/00851

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl^5 A61K31/685, 37/02, 37/22, 35/42

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl^5 A61K31/685, 37/02, 37/22, 35/42

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP, A, 3-93787 (Beringer Mannheim GmbH.), April 18, 1991 (18. 04. 91), & EP, A, 416401 & DE, A, 3929217	1-16
Y	JP, A, 1-29319 (Toyama Chemical Co., Ltd.), January 31, 1989 (31. 01. 89), (Family: none)	1-16
A	JP, A, 60-34905 (Tokyo Tanabe Co., Ltd.), February 22, 1985 (22. 02. 85), (Family: none)	1-16
A	JP, A, 59-164724 (Tokyo Tanabe Co., Ltd.), September 17, 1984 (17. 09. 84), & EP, A, 119056 & US, A, 4603124	1-16

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [ ] See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
September 9, 1993 (09. 09. 93)	September 28, 1993 (28. 09. 93)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP 93 / 00851

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int. Cl⁵ A61K31/685, 37/02, 37/22, 35/42

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int. Cl⁵ A61K31/685, 37/02, 37/22, 35/42

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

C. 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
Y	JP, A, 3-93787（ベーリンガー・マンハイム・ゲゼルシヤフト・ミット・ベシュレンクテル・ハフツング）18. 4月. 1991（18. 04. 91）&EP, A, 416401&DE, A, 3929217	1-16
Y	JP, A, 1-29319（富山化学工業株式会社）31. 1月. 1989（31. 01. 89）（ファミリーなし）	1-16

☑ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
09. 09. 93	28.09.93

名称及びあて先	特許庁審査官（権限のある職員）
日本国特許庁（ISA/JP） 郵便番号100 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	松浦新司 ㊞ 4C 8314 電話番号 03-3581-1101 内線 3452

様式PCT/ISA/210（第2ページ）（1992年7月）

C（続き）．関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
A	JP，A，60－34905（東京田辺製薬株式会社） 22．2月．1985（22．02．85） （ファミリーなし）	1－16
A	JP．A．59－164724（東京田辺製薬株式会社） 17．9月．1984（17．09．84） &EP．A．119056&US．A．4603124	1－16