

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4001379号

(P4001379)

(45) 発行日 平成19年10月31日(2007.10.31)

(24) 登録日 平成19年8月24日(2007.8.24)

(51) Int. Cl.		F I		
A 6 1 K 38/21	(2006.01)	A 6 1 K	37/66	G
A 6 1 P 31/12	(2006.01)	A 6 1 P	31/12	
A 6 1 P 1/16	(2006.01)	A 6 1 P	1/16	

請求項の数 2 (全 5 頁)

<p>(21) 出願番号 特願平7-523298</p> <p>(86) (22) 出願日 平成7年3月7日(1995.3.7)</p> <p>(65) 公表番号 特表平9-509955</p> <p>(43) 公表日 平成9年10月7日(1997.10.7)</p> <p>(86) 国際出願番号 PCT/GB1995/000488</p> <p>(87) 国際公開番号 W01995/024212</p> <p>(87) 国際公開日 平成7年9月14日(1995.9.14)</p> <p>審査請求日 平成14年3月4日(2002.3.4)</p> <p>(31) 優先権主張番号 9404379.1</p> <p>(32) 優先日 平成6年3月7日(1994.3.7)</p> <p>(33) 優先権主張国 英国(GB)</p> <p>(31) 優先権主張番号 9420340.3</p> <p>(32) 優先日 平成6年10月10日(1994.10.10)</p> <p>(33) 優先権主張国 英国(GB)</p>	<p>(73) 特許権者 インペリアル カレッジ オブ サイエンス、テクノロジー アンド メディシン イギリス国、ロンドン エスタブル7 2 エーゼット、インペリアル カレッジ、サーフィールド ビルディング (番地なし)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 八田 幹雄</p> <p>(74) 代理人 弁理士 野上 敦</p> <p style="text-align: right;">最終頁に続く</p>
--	--

(54) 【発明の名称】 ウィルス感染を治療する薬剤の調製におけるインターフェロンのサブタイプの使用

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

インターフェロン - 8 を含有する、肝臓におけるウィルス感染を予防するまたは治療するための薬剤。

## 【請求項2】

前記ウィルス感染は、肝炎ウィルスによって引き起こされるものである、請求の範囲第1項に記載の薬剤。

## 【発明の詳細な説明】

本発明は、インターフェロン ( I F N ) によるウィルス感染の治療または予防に関するものである。

タイプIインターフェロン ( Type I interferon ) ( I F N ) は、多くの I F N - のサブタイプ及び一つの I F N - の亜種 ( subspecies ) を含む密接に関連した糖タンパク質の一科である。少なくとも23個の異なるヒトの I F N - のサブタイプがヒトの c D N A ライブラリーの分析によっておよび刺激されたリンパ芽球細胞 ( lymphoblastoid cell ) によって産生された I F N のタンパク質分析によって同定された。このような異質性に関する理由は不明である。従来の研究により、すべてのタイプI I F N ( Type I IFN ) は同一のレセプターに結合することから同一の効果を有することが示唆された。しかしながら、I F N - へのみ応答し I F N - には応答しない突然変異型の細胞系が同定されたことから、これらの2つの I F N 亜種は異なるレセプターに結合する、即ち異なる効果を有することが示された。最近同定された膜内外のヒト I F N レセプターに関する研究が

ら、このレセプターをマウス細胞中にトランスフェクションさせると、その細胞は幾つかのIFNサブタイプにのみ応答することが示され、これより第二のレセプター成分が細胞をIFNに応答させるために必要であり、さらに、この成分に対応するマウスは異なるIFNのサブタイプを区別することができることが示された。ヒトのタイプI IFNのレセプターの分子の分析によって、このレセプターが異なるIFNのサブタイプを識別できることが示唆されたが、

異なるサブタイプが本当に異なる効果を有しているかは不明である。多くの研究がヒトの細胞系の抗ウイルス活性に関する様々なIFN- $\alpha$ のサブタイプの効果を比較してきた。ズーン(Zoon)ら(ジェーバイオルケム(J.Biol.Chem.) 267:頁15210~15216(1992年))は、天然のIFNをHPLCにより精製することにより得られたIFNを研究したところ、これらの抗ウイルス活性には大きな相違がないことを発見した。しかしながら、スペルバー(Sperber)ら、ジェーインターフェロンレス(J.Int interferon.Res.) 12:頁363~368(1992年)がヒト免疫不全ウイルス(HIV)を感染させた細胞に関する様々な組換えIFN- $\alpha$ のサブタイプの効果を調べたところ、これらの抗ウイルス特性には顕著な相違があることを発見した。

スペルバー(Sperber)らの調査は特定のウイルス(HIV-1)に対するIFN- $\alpha$ の様々なサブタイプの効果に限られるので、IFN- $\alpha$ のサブタイプの抗ウイルス効果はウイルスに感染した細胞型(cell type)により異なることが分かった。さらに、IFN- $\alpha$ のサブタイプによっては抗ウイルス剤として有効な(antivirally effective)IFN- $\alpha$ に対する部分的なアゴニストとして作用すると考えられる。したがって、本発明により、各細胞型の治療を目的としたIFN- $\alpha$ の特定のサブタイプの使用が示される。本発明によると、特定の器官または細胞型(cell type)のウイルス感染を予防するまたは治療することを目的とした薬剤の調製における単一のインターフェロン- $\alpha$ (IFN- $\alpha$ )サブタイプの使用を提供するものである。

細胞型は、通常、スペルバー(Sperber)らによる従前の研究を考慮すると、Tリンパ球ではない。しかしながら、上記で引用されたスペルバー(Sperber)らの文献には、IFN- $\alpha$ が細胞型に特異的な抗ウイルス活性を発揮することは何等示唆されていない。特に好ましいIFN- $\alpha$ のサブタイプはIFN- $\alpha_8$ である。これは、肝臓のウイルス感染を治療するまたは予防するのに特に好ましい。正常な細胞系における強力な抗ウイルス効果に加えて、IFN- $\alpha_8$ はまた、他のIFN- $\alpha$ のサブタイプには応答しない突然変異型の細胞系(11、1(ペレグリニ(Pellegrini)ら、モルセルバイオル(Mol.Ce ll.Biol.)、9:頁4605~4612(1989年))においても活性を有する。臨床で使用される特定のIFN- $\alpha$ のサブタイプは感染した細胞型によって変化する。特定の細胞型に関する好ましいサブタイプは、副作用の可能性を抑制できるように、その特定の細胞型に対しては強力な抗ウイルス活性を有すると同時に他の細胞型に関しては比較的低い活性を有するものである。

例えば、肺の感染症に使用することを目的としてIFN- $\alpha$ のサブタイプを選択する場合には、肺癌細胞系に関するインビトロの研究が注目され、これにより、IFN- $\alpha_2$ 、IFN- $\alpha_5$ 、IFN- $\alpha_8$ 、IFN- $\alpha_{14}$ 及びIFN- $\alpha_{17}$ が最も強力な試験されたサブタイプであり、IFN- $\alpha_{10}$ が高い活性を有することが示された。しかしながら、IFN- $\alpha_2$ 、IFN- $\alpha_5$ 、IFN- $\alpha_8$ 及びIFN- $\alpha_{14}$ は肝臓の細胞系においても非常に強い抗ウイルス活性を示した。このため、肺のウイルス感染を治療するまたは予防するための好ましいサブタイプはIFN- $\alpha_{10}$ 及びIFN- $\alpha_{17}$ である。

肝臓の感染症に使用することを目的としてIFN- $\alpha$ のサブタイプを選択する場合には、肝臓の細胞系に関するインビトロの研究が注目され、これにより、IFN- $\alpha_2$ 、IFN- $\alpha_5$ 及びIFN- $\alpha_8$ が最も強力な試験されたサブタイプであることが示された。IFN- $\alpha_2$ 及びIFN- $\alpha_5$ は、上述したように、肝臓の細胞系において強い抗ウイルス活性を示した。しかしながら、同様のことがIFN- $\alpha_8$ についてもいえるが、インビトロでは、細胞がウイルスの感染に応答してIFN- $\alpha_8$ を産生するらしいことも観察された。したがって、肝臓のウイルス感染を治療するまたは予防するために好ましいサブタイプはI

10

20

30

40

50

IFN- $\gamma$ である。

少数(2、3または4等)の特定のIFN- $\gamma$ の混合物もまた、本発明の概念に含まれる。それぞれは、通常、上記したガイドラインに従って選択される。

IFN- $\gamma$ のサブタイプは、正確な投与形態及び投与量は常に医師または医療従事者の裁量の範囲内であるが、公知の手段によってかつ当該分野における既知の量に匹敵する投与量で投与される。

本発明は、有効に抗ウイルス特性を発揮する量(antiviral amount)の単一のインターフェロン- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )のサブタイプを投与することからなる、特定の器官または細胞型のウイルス感染を予防するまたは治療する方法に適用される。

本発明を下記実施例により詳細に説明する。

実施例は図1を参照するものであり；

図1は、様々な細胞系に対する種々のIFN- $\gamma$ のサブタイプに関する相対的なED50を示すものである。

#### 実施例

##### a) インターフェロン

ウェルフェロン(商標)(WELLFERON<sup>TM</sup>)のリンパ芽球のインターフェロン(lymphoblastoid interferon)を、ザ ウェルカム ファウンデーション リミテッド(The Wellcome Foundation Limited)から得た。ヒトのタイプIインターフェロンを、センダイウィルス(Sendai virus)によりナマルワ細胞(Namalwa cell)を刺激した後、前述した(ズーン(Zoon)ら、ジェー バイオル ケム(J.Biol.Chem.)267:頁15210~15216(1992年))のと同様にして、抗体による沈降(antibody precipitation)及びHPLCによる精製を用いてIFN混合物を精製及び分画することによって調製した。また、IFNを、同様にして、センダイウィルス(Sendai virus)で処置したヒトの末梢血の単核細胞(インターフェロンサイエンセス インコーポレイテッド(Interferon Sciences Inc)製)の上清から調製した。精製したIFNのサブタイプの分画の同一性をカラム溶出物の分画をマイクロシーケンシングすることによって確認し、最終産物の濃度を市販のキット(シグマ(Sigma)製)を用いて測定した。

##### b) 抗ウイルス検定

ヒトの細胞系(HuH7、A549及びSHSY)を10%FCSを添加したDMEM培地で育成させた。抗ウイルス検定を上記(ズーン(Zoon)ら、上記参照)したのと同様にして行った。簡潔にいうと、細胞を96穴のマイクロタイタープレート(microtitre plate)(1.5~2x10<sup>4</sup>細胞/穴)に移し、23時間IFNの存在下で育成させた。このIFN含有培地を除いて、細胞を1時間ウィルス(EMCウィルスまたはHAV)と共にインキュベートした。ウィルスを除去した後、細胞を24時間放置し、生存細胞をメチルバイオレットで染色した。生存細胞の数を各穴の光学濃度を測定することによって決定した。各検定はIFNの6個の5倍希釈液を2連で行い、少なくとも4回検定をそれぞれ繰り返した。各サブタイプの抗ウイルス活性を既知の活性(10<sup>8</sup>IU/ml)のリンパ芽球のIFN(lymphoblastoid INF)(ウェルフェロン(商標)(WELLFERON<sup>TM</sup>))と比較した。

結果

##### a) 抗ウイルス活性

EMCウィルスでチャレンジした(challenge)HuH7(肝臓)、A549(肺)及びSHSY(神経芽腫)細胞における異なるIFNのサブタイプの抗ウイルス効果を、すべての異なるサブタイプについてED50(ウィルスの複製を50%阻害するIFNの投与量)で表わして、図1に示す。

異なるサブタイプの効力は他の肝臓細胞系(HepG2)と同等であり(データは示さず)、HuH7細胞を他のウィルス(A型肝炎ウィルス)でチャレンジした(challenge)際に同様の傾向が見られた。細胞系間で異なるサブタイプの相対的な効力には顕著な相違があった:肝臓細胞系では、IFN- $\gamma$ 、IFN- $\beta$ 及びIFN- $\alpha$ は非常に強力な抗ウイルス活性を示したが、IFN- $\alpha$ <sub>17</sub>は比較的低い抗ウイルス活性を有していた。肺癌細胞系では

10

20

30

40

50

、IFN-<sub>8</sub>、-<sub>17</sub>、-<sub>10</sub>、-<sub>5</sub>及び-<sub>14</sub>が最も強力な試験サブタイプであった、IFN-<sub>1</sub>は非常に低い活性を有していた。

様々なサブタイプの抗ウイルス効果をインターフェロン耐性細胞系 Huh7、SHSY、A549を用いて分析したところ、IFN-<sub>8</sub>のみが細胞変性効果を阻害したことから、このようなタイプのサブタイプは他のIFN-<sub>8</sub>のサブタイプでは分けられない独特の特性を有することが示された。

ディスカッション

1. 細胞系間で、異なるサブタイプ間で抗ウイルス活性には相違がある；したがって、臨床において各細胞型の感染を治療するためには特定のサブタイプを使用することが必要である：肝臓及び肺の感染には異なるIFNのサブタイプが必要である。

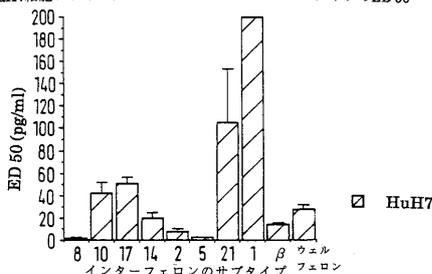
10

2. IFN-<sub>2</sub>、IFN-<sub>8</sub>及びIFN-<sub>5</sub>が肝臓及び肺の細胞系の両方に対して活性を有する；したがって、これらは患者に最も副作用を誘発する - 副作用を抑制するために細胞に特異的なサブタイプを使用すべきである（例えば、肝細胞に対してはIFN-<sub>8</sub>）。

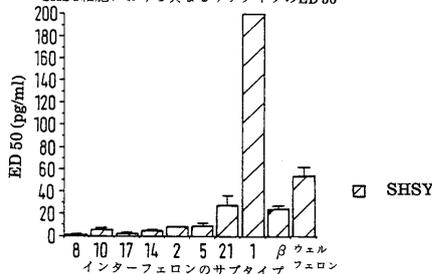
3. しかしながら、ウイルス感染に対する細胞の応答、即ち、IFN-<sub>8</sub>の産生を考慮すると、このサブタイプは通常選択されるサブタイプである。

4. 突然変異型の細胞系におけるIFN-<sub>8</sub>の特異的な活性を考慮すると、このサブタイプはさらに望ましい性質を有しており、他のサブタイプが活性を持たない際に有効である。

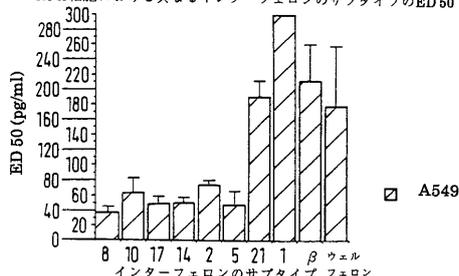
HuH7細胞における異なるインターフェロンのサブタイプのED50



SHSY細胞における異なるサブタイプのED50



A549細胞における異なるインターフェロンのサブタイプのED50



---

フロントページの続き

- (72)発明者 フォスター, グラハム, ラセル  
イギリス国, ロンドン ダブル2 1ピージー, セント メリーズ ホスピタル メディカル ス  
クール, クイーン エリザベス ザ クイーン マザー ウィング, デパートメント オブ メデ  
イシン(番地なし)
- (72)発明者 トーマス, ホワード, クリストファー  
イギリス国, ロンドン ダブル2 1ピージー, セント メリーズ ホスピタル メディカル ス  
クール, クイーン エリザベス ザ クイーン マザー ウィング, デパートメント オブ メデ  
イシン(番地なし)

審査官 榎本 佳予子

- (56)参考文献 国際公開第93/016107(WO, A1)  
特表昭60-500714(JP, A)  
Antiviral Research, 1993年, Vol.22, No.2-3, p.121-129  
Journal of Interferon Research, 1991年, Supecial Issue, p.185-194

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
A61K 38/21  
BIOSIS(STN)  
CA(STN)  
EMBASE(STN)  
MEDLINE(STN)