

[12] 发明专利申请公开说明书

[21]申请号 93121281.2

[51]Int.Cl⁵

A61K 37/66

[43]公开日 1994年11月9日

[22]申请日 93.12.21

[30]优先权

[32]92.12.22[33]GB[31]9226729.3

[71]申请人 惠尔康基金会集团公司

地址 英国英格兰伦敦

[72]发明人 J·普里艾托瓦图恩纳

O·贝罗奎卢伊兹

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 姜建成

// (A61K 37/66,37:02)

说明书页数:

附图页数:

[54]发明名称 治疗组合物

[57]摘要

本发明涉及一种治疗组合物,更具体地说,涉及一种需要使用人干扰素的组合疗法。该疗法包括用人干扰素与自由基清除剂或其前体或诱导物的组合物治疗对用人干扰素治疗敏感的病症。

权 利 要 求 书

1. 一种增效组合物，该组合物包含一种人干扰素和一种自由基清除剂或其前体或诱导物。

2. 权利要求1 的组合物，其中人干扰素是人干扰素- α 。

3. 权利要求2 的组合物，其中人干扰素- α 是重组的。

4. 权利要求2 的组合物，其中人干扰素- α 是天然的。

5. 权利要求4 的组合物，其中天然人干扰素- α 是淋巴母细胞干扰素。

6. 权利要求1-5 中任一项的组合物，其中自由基清除剂或其前体或诱导物是谷胱甘肽或其前体或诱导物。

7. 权利要求1-5 中任一项的组合物，其中自由基清除剂或其前体或诱导物是N-乙酰半胱氨酸。

8. 权利要求1-7 中任一项的组合物，该组合物用于治疗对干扰素治疗敏感的病症。

9. 权利要求8 的组合物，其中病症是乙型肝炎或丙型肝炎感染。

10. 一种人干扰素在制备药物中的应用，该药物用于治疗患有对用人干扰素治疗敏感的病症的患者，在治疗方法中，在用人干扰素治疗过程中还施用一种自由基清除剂或其前体或诱导物。

11. 一种自由基清除剂或其前体或诱导物在制备药物中的应用，该药物用于治疗患有对用人干扰素治疗敏感的病症的患者，治疗方法包括用人干扰素和自由基清除剂或其前体或诱导物进行治疗。

12. 权利要求10 或11 的应用，其中人干扰素是人干扰素- α 。

13. 权利要求12 的应用，其中人干扰素- α 是重组的。

14. 权利要求12 的应用，其中人干扰素- α 是天然的。

15. 权利要求14的应用，其中天然人干扰素- α 是人淋巴母细胞干扰素。

16. 权利要求10-15中任一项的应用，其中自由基清除剂或其前体或诱导物是谷胱甘肽或其前体或诱导物。

17. 权利要求10-15中任一项的应用，其中自由基清除剂或其前体或诱导物是N-乙酰半胱氨酸。

18. 权利要求10-17中任一项的应用，其中病症是乙型肝炎或丙型肝炎感染。

19. 一种人干扰素在制备药物中的应用，该药物用于治疗患有对用人干扰素治疗敏感的病症但未能对用人干扰素治疗作出反应的患者，治疗方法中，在用人干扰素治疗过程中还施用自由基清除剂或其前体或诱导物。

20. 一种自由基清除剂或其前体或诱导物在制备药物中的应用，该药物用于治疗患有对用人干扰素治疗敏感的病症但未能对用人干扰素治疗作出反应的患者，治疗方法包括用人干扰素和自由基清除剂或其前体或诱导物进行治疗。

21. 权利要求19或20的应用，其中患者以前曾对用人干扰素治疗作出反应。

22. 权利要求19-21中任一项的应用，其中人干扰素是人干扰素- α 。

23. 权利要求22的应用，其中人干扰素- α 是重组的。

24. 权利要求22的应用，其中人干扰素- α 是天然的。

25. 权利要求24的应用，其中天然人干扰素- α 是人淋巴母细胞干扰素。

26. 权利要求19-25中任一项的应用，其中自由基清除剂或其前体或诱导物是谷胱甘肽或其前体或诱导物。

27. 权利要求19-25中任一项的应用, 其中自由基清除剂或其前体或诱导物是N-乙酰半胱氨酸。

28. 权利要求19-27中任一项的应用, 其中病症是乙型肝炎或丙型肝炎感染。

29. 一种药物制剂, 该制剂包含如权利要求1-7中任一项所述的组合物及可药用的载体。

30. 一种配对包装, 该包装包含放在一起的需要施用以产生如权利要求1-7中任一项所述的组合物的组分。

说 明 书

治疗组合物

本发明涉及一种治疗组合物，更具体地说，涉及一种需要使用人干扰素的组合疗法。

动物对病毒感染的第一个也是局部化的反应，是产生淋巴因子干扰素。干扰素原来被认为是一种单一分子，现在则被公认是在进化上古老的、广泛分布于动物界的一大蛋白家族。干扰素一般具有种属特异性，但也会有一些有限的交叉反应。现已鉴定了三种类型的干扰素，这三种类型原来分别称为白细胞干扰素、成纤维细胞干扰素和免疫干扰素，现在则分别定名为干扰素 α 、 β 和 γ 。

人干扰素- α 可以由许多不同类型的细胞产生，HPLC将该类型的干扰素分辨出30多个亚型，每个亚型都由不同的基因编码。通常认为人干扰素- β 是单一物质，是由成纤维细胞产生的。人干扰素- γ 也是单一物质，由辅助细胞诱导亚组的T淋巴细胞在接触抗原时产生，或者由于人白血细胞、T淋巴细胞或T淋巴母细胞样细胞与促有丝分裂剂接触而产生。

大量生产人干扰素- α 的方法是：用仙台病毒刺激Namalwa人淋巴母细胞样细胞系，产生最多由22个亚型的干扰素- α 组成的天然混合物，然后用色谱法纯化至纯度为95%，比活约为 100×10^6 国际单位/mg蛋白。这样一种产物被鉴定为人干扰素 α -N1，可以以商品名WELLFERON (Wellcome Foundation Limited 的注册商标)买到。天然人干扰素- β 是由人二倍体成纤维细胞(通常来自新生组织)得到的，其生产是通过(例如)加入合成双链RNA来诱导的。人干扰素- γ 可

以由血沉棕黄层来制备，用促有丝分裂剂如葡萄球菌肠毒素A 作诱导剂。

人干扰素 α 、 β 和 γ 也可以利用重组DNA 技术产生，但在通过在细菌细胞中表达相关基因而产生时，重组干扰素的三级结构与天然分子可能并不相同。同样，在细菌细胞中生产的干扰素不会是糖基化的，虽然这似乎不影响该分子在体外测定时的生物活性，但会改变构象和抗原性，并可能影响在体内的分布。这样一种重组人干扰素优选与天然人干扰素有90% 以上的氨基酸同源性，更优选的是95%同源性，更优选的是97%同源性，更优选的是98%同源性，更优选的是99%同源性，最优选的是100%同源性。重组人干扰素可以买到，其实例有干扰素 $\alpha - 2a$ (ROFERON-Roche) 干扰素 $\alpha - 2b$ (INTRON-Schering)。这两种分子仅在23位有一个氨基酸残基不同(在ROFERON中为赖氨酸，在INTRON中为精氨酸)。

人干扰素用于治疗肝炎已有若干年。最早在七十年代中期所做的试验使用了人白细胞干扰素，该干扰素是由从捐献的血液生产血浆后留下的血沉棕黄层生产，这不可避免地限制了可得量。在八十年代早期，由于生产技术的进步，在慢性乙型肝炎的治疗中既使用天然的也使用重组人干扰素 α 。这种治疗在许多病例中都可应是为成功的，但一般认为，仅用人 $\alpha -$ 干扰素进行治疗时，由病毒标记的持续丧失评定的反应率低于50%。也曾研究了人干扰素 β 和 δ 在慢性乙型肝炎中的应用，但尚未成为成熟的治疗方法。

在慢性丙型肝炎的治疗中也研究了所有三类人干扰素，但干扰素 β 的可得性低，限制了用这类干扰素进行的工作。曾用前面提到的 $\alpha -$ 干扰素(干扰素 $\alpha - 2a$ 、干扰素 $\alpha - 2b$ 和淋巴母细胞干扰素)进行了很广泛的试验，结果是令人鼓舞的，因为约有40%的患者发生完全反应。然而，治疗6个月后观察到约50%的复发率，这样，可能只

有20—25%的患者长期受益。

关于使用干扰素治疗肝炎的全面综述，可参见Eddleston 和Dixon 所编《干扰素在肝脏慢性病毒感染治疗中的应用》一书(Pennine Press, 1990)。

另外，曾有人提出将干扰素用于治疗多种其他病症，包括：非肝炎病毒性疾病；涉及免疫系统的紊乱，包括自身免疫病症；以及各种癌症，包括肾癌、乳腺癌、结肠癌、卡波济肉瘤、神经胶质瘤和恶性血液病症。

有某种证据(特别是关于HIV)表明，慢性病毒感染可能会引起受感染生物体内的氧化紧张。病毒诱发氧化紧张可能是由多种机理所致，包括免疫复合物激活吞噬细胞、发炎性细胞因子($TNF\alpha$ 、IL-6) 促进自由基形成、以及由于病毒表面糖蛋白和细胞膜之间的直接相互作用而生成活泼氧。

已知有许多物质能在细胞水平或整个生物体的水平上起到自由基清除剂的作用。例如，还原型谷胱甘肽是一种存在于大多数哺乳动物细胞中的分布广泛的非蛋白硫醇，它参与多种代谢功能，包括针对自由基的解毒反应。谷胱甘肽是对抗氧化紧张的主要细胞内防御机制，能增加自由基形成的因素会导致细胞内谷胱甘肽贮存的消耗。谷胱甘肽还在调节淋巴细胞激活和增殖、T 细胞细胞毒性和巨噬细胞—淋巴细胞相互作用方面起到重要的免疫调节作用。

N-乙酰半胱氨酸作为粘液溶解剂、角膜创伤药和扑热息痛中毒解毒剂为人所知已有多年。该化合物具有相对较为温和的还原作用，因此认为它是通过断裂粘蛋白中的二硫键而起到粘液溶解剂的作用。有许多报告报道，在某些慢性病毒病症特别是HIV 感染中，还原型谷胱甘肽水平可能会下降。N-乙酰半胱氨酸是谷胱甘肽的前体，因而也是谷胱甘肽的诱导物，已有人建议将N-乙酰半胱氨酸作为治疗剂用于

HIV 感染病例中。

EP-A-0 269 017(Cetus) 涉及淋巴因子或细胞毒素与自由基清除剂或代谢抑制剂的组合物，该组合物用于治疗哺乳动物宿主由于自由基生成引起的生物损伤。虽然该说明书附带地提到了作为淋巴因子的干扰素，也提到了感染是生物损伤的可能原因，但该说明书基本上涉及的是可能在癌症治疗过程中生成的自由基。说明书中给出的生物学数据完全涉及癌症，而且主要是有关在鼠纤维肉瘤中施用 $TNF\alpha$ 。

本发明涉及自由基清除剂或其前体或诱导物作为用人干扰素进行治疗的辅助剂的应用。

本发明的一个方面提供一种对患有对干扰素治疗敏感病症的患者进行治疗的方法，该方法包括给患者施用有效量的人干扰素，其中在施用人干扰素的全部或部分持续时间内，还施用一种自由基清除剂或其前体或诱导物。

本发明的另一方面提供人干扰素在制备药物中的应用，该药物用于治疗对用干扰素治疗敏感的病症，在该治疗所用的方法中，在施用人干扰素的全部或部分持续时间内，还施用一种自由基清除剂或其前体或诱导物。

本发明的另一方面提供自由基清除剂或其前体或诱导物在制备药物中的应用，该药物用于治疗对用干扰素治疗敏感的病症，该治疗方法包括施用人干扰素，其中在施用人干扰素的全部或部分持续时间内还施用自由基清除剂或其前体或诱导物。

对用干扰素治疗敏感的病症可以是人干扰素已成为其成熟治疗方法或已建议作为其有效治疗方法的任何病症。这类病症包括病毒感染，如病毒性肝炎；由人乳头瘤病毒、细胞肥大病毒和HIV引起的感染；非病毒性感染，如结核；象哮喘这样的病症。

本发明特别适用于人干扰素在肝炎治疗中的应用。如前面已指出

的，虽然这种治疗在许多病例中疗效显著，但反应率相对较低，而且在丙型肝炎的情况下有明显的复发率。因此，迫切需要改进用人干扰素治疗肝炎的方法，以克服这些问题。

用于本发明的人干扰素的例子包括前面提到的干扰素。

本发明的另一方面提供一种通过施用人干扰素治疗病毒性肝炎感染的方法，其中在施用人干扰素的全部或部分持续时间还施用一种自由基清除剂或其前体或诱导物。

本发明的另一方面提供人干扰素在制备药物中的应用，该药物用于治疗病毒性肝炎感染，在所用治疗方法中，在施用人干扰素的全部或部分持续时间还施用自由基清除剂或其前体或诱导物。

本发明的另一方面提供自由基清除剂或其前体或诱导物在制备药物中的应用，该药物用于治疗病毒性肝炎感染，所用治疗方法包括施用人干扰素，其中在施用人干扰素的全部或部分持续时间还施用自由基清除剂或其前体或诱导物。

本发明的另一方面提供人干扰素和自由基清除剂或其前体或诱导物的增效组合物(也称为协同组合物)，该组合物用于治疗对用干扰素治疗敏感的病症。本发明增效组合物的活性成分，可以作为彼此独立的制剂同时或依次施用，也可以作为单一的混合制剂施用。如果是依次施用，则第二种活性成分施用时间的延迟不应使活性成分组合物的增强疗效的优点丧失。

本发明适用于治疗所有形式的病毒性肝炎，目前公认有五种类型的肝炎，分别定名为甲型、乙型、丙型、丁型和戊型肝炎。

甲型肝炎是一种急性病毒感染，潜伏期为40天以下，由排泄物—途口径传染。该病毒是细小核糖核酸病毒科的一个成员，由27nm的球形无被膜颗粒组成。该病毒基因组已经过测序，包含约7480个碱基的单链RNA。

乙型肝炎是一种多发性的严重病毒性疾病，全世界估计有两亿多病毒携带者。该疾病在被称为血清肝炎时，是根据输血、注射人血浆各部或使用未经消毒的注射针头2-3个月后出现症状来诊断的。对乙型肝炎血清标志的认识已证实了皮肤渗透特别是血液在病毒传染中的重要性。该疾病的急性期过后，大多数成年患者在数周内自发康复，但是一定比例的患者在许多月过后仍不清除病毒，成为慢性病毒携带者。乙型肝炎病毒属于肝DNA病毒科，其基因组由一个小的不完全双链环形DNA组成，该DNA在复制时，先将其DNA拷贝成RNA，再用反转录酶将RNA重新拷贝成DNA。

非甲非乙型肝炎逐渐被公认为是日益严重的国际卫生问题。已证明至少有80%的慢性输血后非甲非乙型肝炎病例是由现已鉴定为丙型肝炎的病毒所致，在从血液制品中筛除乙型肝炎的临床条件下，几乎所有的输血后肝炎病例可能都是由这种病毒造成的。大致有半数的急性丙型肝炎感染病例在数月内自动消退，而其余病例则转为慢性，并且在许多(如果不是全部)病例中接着出现慢性活动性肝炎，并有产生肝硬变和肝细胞癌的可能。最近已阐明了丙型肝炎病毒基因组的结构，并已将该病毒鉴定为与黄病毒有些类似的单链RNA病毒。

丁型肝炎病毒最初是在1977年在鉴定出某些乙型肝炎病毒携带者体内的一种新抗原后被识别出来的。该病毒的复制需要乙型肝炎病毒(或密切相关的肝DNA病毒)作为辅助病毒，但这种复制却十分有效，致使它能够在血清中达到比辅助病毒更高的滴度。丁型肝炎病毒其基因组由共价闭合的环状RNA组成，并与在植物中发现的某些环状类病毒或病毒样因子有某种结构相似性。丁型肝炎感染与侵袭性肝病相关，并且在严重疾病(慢性活动性肝炎或肝硬变)患者中比在慢性持续性肝炎患者中更为常见。

戊型肝炎病毒与引起甲型肝炎的病毒有关(Reyes等, Science

247:1335-1339, 1990), 并产生无慢性期的急性肝炎。该病毒是水源性肠道病毒, 通常由排泄物/口途径传染。它在印度次大陆特别流行, 并在孕妇中造成高死亡率。

本发明还适用于治疗人乳头瘤病毒, 该病毒是非生殖器疣、青少年喉乳头瘤和尖锐湿疣的致病因子, 并在宫颈癌中有作用。本发明还适用于治疗其他病毒性感染, 如由人细胞肥大病毒和HIV引起的感染。本发明还适用于治疗非病毒性感染如结核, 以及象哮喘这样的病症。

用于本发明的人干扰素可以是上述三种类型中的任何一种, 即干扰素- α 、干扰素- β 或干扰素- γ 。一般来说, 人干扰素应是干扰素- α 或干扰素- γ 。人干扰素优选人干扰素- α , 更为优选的是由培养的人细胞系得到的人干扰素- α 或重组人干扰素- α 。按照一个优选实施方案, 人干扰素是重组干扰素 $\alpha-2a$ 或干扰素 $\alpha-2b$, 例如以商品名ROFERON和INTRON销售的产品之一。按照另一个特别优选的实施方案, 人干扰素是人淋巴母细胞干扰素(干扰素 $\alpha N1$), 例如由The Wellcome Foundation Ltd.以商品名WELLFERON销售的产品。

术语“人干扰素”包括来自人的已测定了顺序的任何野生型干扰素, 以及它的基本保留了相应野生型顺序的活性并与相应野生型顺序有80%以上顺序同源性的任何等位体、变异体或突变体。

人干扰素可以按与单独用于治疗有关病症(如肝炎)时相同的方式配成制剂, 以便按本发明施用。因此, 干扰素一般是非肠道施用, 例如注射, 优选皮下注射。干扰素优选配成含水制备物, 或配成打算用合适媒液(如注射用水)复原的冰冻干燥产品。制剂还可以含有合适的载体、稀释剂或稳定剂, 例如另一种人蛋白如人血清清蛋白。

人干扰素一般将按照有关产品已建立的治疗方案来施用。例如, 不论淋巴母细胞的还是重组的人干扰素- α , 都可以以每天1-10兆单位干扰素的剂量来施用。可以每周施用该剂量3天或更多天, 优选每周

3 次。优选的剂量范围是每天2—6兆单位干扰素，每周3天或更多天，优选每周3次，特别优选的干扰素剂量是5兆单位，最优选的是每天3兆单位，每周3天或更多天，优选每周3次。在治疗肝炎时，施用干扰素的持续时间通常是若干周，例如12—30周，特别是约24周，但在某些病例中，最多为一年或更长时间的更长的治疗期也可能是适当的。

本文所用的术语“自由基清除剂或其前体或诱导物”是指在施用于宿主后能降低宿主内的自由基水平(也称为氧化紧张)的任何物质。该物质可能是通过直接清除自由基，也可能是通过诱导(不论是否作为直接生物前体)宿主内具有自由基清除作用的物质的生成，从而产生上述的降低自由基水平的作用。另外，该物质也可能是通过对生成自由基的过程施加抑制作用而降低自由基水平。

优选的自由基清除剂或其前体或诱导物包括谷胱甘肽及其前体，例如天然存在的氨基酸半胱氨酸的衍生物。一种特别优选的谷胱甘肽前体是N-乙酰半胱氨酸。如前面所指出的，N-乙酰半胱氨酸已有成熟的作为粘液分解剂的药物应用，并可以买到该化合物的药物制剂。其它自由基清除剂或其前体或诱导物包括维生素A、维生素C(抗坏血酸)、维生素E、尿酸、丁硫氨酸硫脲(buthionine sulphoxime)、马来酸二乙酯2-甲基-5-硝基-1-咪唑基乙醇、超氧化物歧化酶、甲硫氨酸。抑制自由基生成的物质包括黄嘌呤氧化酶抑制剂如别嘌呤醇，并被认为是本文所指的“自由基清除剂或其前体或诱导物”。

自由基清除剂或其前体或诱导物，应以其能在宿主体内减少自由基生成和/或减轻自由基生成作用(氧化紧张)的形式和剂量施用。可以根据物质的本质而以任何方便的途径给药，例如口服或肠胃外给药。可能情况下优选口服给药。

N-乙酰半胱氨酸优选配成片剂或粒剂，或配成液体制剂如糖浆剂，以供口服。N-乙酰半胱氨酸的适当剂量在每剂量200mg至4g范围，每天

最多给药4次，例如400-800mg，每天给药4次，优选600mg，每天给药4次。

虽然本发明提供的治疗方法(例如病毒性肝炎的治疗方法)是组合施用人干扰素和自由基清除剂或其前体或诱导物，但这两种药物一般将作为独立的制剂施用。然而在某些情况下，将这两种组分作为混合制剂施用可能有好处，本发明延伸到这种混合制剂。

因此，本发明的另一方面提供一种药物组合物，该组合物包含一种人干扰素及一种自由基清除剂或其前体或诱导物。

一般来说，任何这类混合制剂都将是准备供肠胃外施用(如注射)的形式。这样一种混合制剂可以呈液态或固态，固态时人干扰素是冰冻干燥的并适于复原成液态。

也可以以适于分别施用的形式将这两种药物放在一起。本发明的另一方面提供一种配对包装，该包装包含为分别施用而合放在一起的一种人干扰素和一种自由基清除剂或其前体或诱导物。

本发明特别适用于乙型肝炎或丙型肝炎的治疗。如前面已指出的，施用人干扰素特别是重组或淋巴母细胞干扰素- α 已经是乙型肝炎的成熟治疗方法。此外，许多试验表明，该治疗方法对丙型肝炎也有显著疗效。按照本发明，用干扰素对肝炎特别是乙型肝炎或丙型肝炎患者进行的治疗，将基本按照成熟方案进行，此外在用人干扰素治疗的全部或部分持续时间用自由基清除剂或其前体或诱导物进行治疗。

血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)水平是肝功能障碍的高度敏感的标志。乙型肝炎和丙型肝炎感染的特点都是ALT水平升高，因此该疾病的进展通常是通过测定血清ALT来监测的。如前面所指出的，只有约50%或更少的乙型肝炎或丙型肝炎患者对人干扰素- α 治疗有反应，这种反应就是由病毒标志的显著清除或ALT水平的显著下降证实的。

本发明的一个实施方案特别适用于治疗乙型肝炎或丙型肝炎，最

适用于治疗丙型肝炎，按照该实施方案，用人干扰素特别是人干扰素- α 进行的治疗以通常方式进行若干周，例如12-30周，特别是约24周。如果患者未能对这个用人干扰素进行的初始疗程作出反应，即血清ALT水平未出现显著降低，则继续用人干扰素进行治疗，并用自由基清除剂或其前体或诱导物，优选谷胱甘肽或其前体或诱导物，最优选的是N-乙酰半胱氨酸，进行进一步的治疗。用人干扰素和自由基清除剂或其前体或诱导物进行的治疗，可以再持续若干周，例如12至30周，特别是约24周。按照本发明的一个优选实施方案，该治疗方案应用于用人淋巴母细胞干扰素(人干扰素 α -NI)治疗丙型肝炎。

如前面也已经指出的，某些乙型肝炎或丙型肝炎患者可能最初对用人干扰素特别是人干扰素- α 治疗有反应，但随后又复发。上述的用人干扰素和自由基清除剂或其前体或诱导物进行的组合疗程对这些患者也会有疗效。

应该理解，人干扰素和自由基清除剂或其前体或诱导物的剂量将随患者和患者所患的具体病症而变化。这种治疗最终将由主治医生来控制并由他来负责。

本发明由下列探索实验来进一步说明，该实验决不应被误认为是限制本发明的范围。

实施例

1. 概述

乙型肝炎病毒(HCV)是大多数输血后和单发性非甲非乙型肝炎病例的病因。该感染转为慢性是很常见的，进而导致慢性肝炎、肝硬化，最终导致恶性变性。若干受控实验表明， α -干扰素(IFN)可用于治疗慢性丙型肝炎(CHC)，但反应率平均为50%，IFN停用后的复发率可达到30-40%。因此，停用IFN后维持正常转氨酶水平的慢性丙型肝炎患者的比例在所治疗的所有病例中只占20-40%左右。

还原型谷胱甘肽是哺乳动物细胞中一种重要的抗氧化剂，参与多种细胞功能。现已表明，GSH 的消耗可能在某些慢性病毒性疾病如艾滋病中起致病作用。在该实验中，对用IFN 治疗至少 4 个月后仍没有反应的慢性丙型肝炎患者，测定了血浆和外周血单核细胞(PBMC)中的GSH 水平。还评定了N-乙酰半胱氨酸(谷胱甘肽的前体)对GSH 水平的影响以及对IFN 治疗的临床和病毒学反应的影响。

2. 患者和方法

2.1 患者

进入该实验的有14名患者(13名男性，1名女性，平均年龄51岁，年龄范围27-71岁)，这些患者经组织学和血清学诊断患有慢性丙型肝炎，其中有两名还伴有肝硬变。所有患者都已经过至少4个月的 α -淋巴母细胞干扰素(Wellferon)治疗(每周 15 ± 1.6 兆单位，范围为每周9-21兆单位)；所有患者在进入实验时都显示异常ALT值(30国际单位/升以上)。大多数对IFN有反应的慢性丙型肝炎患者，在治疗的头三个月内转氨酶水平恢复正常，而在治疗四个月后仍维持高ALT值的患者可认为是无反应者。据此，本实验中的所有患者都被认为是对IFN无反应者。本实验中的患者继续采用与他们前已采用过的基本相同的IFN治疗方案，但加上每天口服N-乙酰半胱氨酸(NAC)，每8小时600mg。增加口服NAC后患者不增加干扰素剂量，但在3个病例中干扰素的量略有减少(增加NAC前 15 ± 1.8 兆单位/周，增加NAC后 11.5 ± 1.3 兆单位/周)。

此外，给10名新近诊断为患慢性丙型肝炎但从未接受抗病毒治疗的患者(8名男性，2名女性，平均年龄32岁，年龄范围24-63岁)口服相同剂量的NAC一个月，但不服用干扰素。

以26名健康人(14名男性，12名女性，平均年龄43岁，年龄范围25-79岁)作对照组。所有患者都以书面通知形式表示同意，而且该

实验得到了地方道德委员会(Local Ethics Committee)的批准。

2.2 PBMC和血浆中GSH的测定

从每个患者体内取血样供同时测定PBMC中的GSH(L-GSH)和贫血小板血浆中的GSH(P-GSH)。在Lymphoprep(Nycomed Pharma AS, Oslo, Norway)上离心分离PBMC,并洗涤5次。将分离出的细胞用20%高氯酸(2%终浓度)杀死,离心($1200g \times 10$ 分钟, 4°C)后,上清液于 -40°C 下贮存备用。将20%高氯酸加到贫血小板血浆中(2%终浓度),离心后将上清液于 -40°C 下贮存以备进行GSH测定。

使贮存的样品融化,按Brigellus等人所述(Biochem. Pharmacol., 32:2529-2534, 1983)、经Ferrer等人修改(Biochem. J., 264:531-534, 1990)的酶法测定GSH。在GSH-S-转移酶存在下使GSH与1-氯-2,4-二硝基苯(CDNB)(SIGMA)结合,并用Perkin-Elmer $\lambda 2$ 型分光光度计测定该复合物在340nm处的光吸收。利用 9.6×10^3 的摩尔消光系数求得GSH的绝对值。

2.3 RNA的提取和反转录聚合酶链反应

基本上如Ruiz等人(Hepatology, 16:637-643, 1992)和Cheng等人(J. Hepatol., 印刷中, 1992)所述,进行血清中丙型肝炎病毒RNA(HCV-RNA)的反转录聚合酶链反应(RT-PCR),以及PBMC中HCV-RNA正链或负链的RT-PCR。严格采用Kwoks和Higuchi(Nature, 339:237-238, 1989)推荐的减少污染危险的方法。所有提取和反应都在阳性和阴性对照中同时进行。还包括一个从最后一次洗涤PBMC得到的试样,在这些样品中PCR总是阴性的。

2.4 统计分析

所有数据都以平均值 \pm 平均值标准误差(SEM)表示。利用Mann Whitney和Wilcoxon检验进行成对数据和不成对数据的比较。

3. 附图

结果参照附图来叙述。附图中:

图 1 显示IFN(-4 至0 个月) 及IFN 加NAC(0 至6 个月) 对进入实验的14 名患者ALT 水平的影响;

图 2 显示在用IFN 和IFN 加NAC 治疗过程中PBMC中HCV-RNA 正链和负链的检测;

图 3 显示在IFN 治疗中增加NAC 之前和之后, 在1:10 的血清稀释度下血清中HCV-RNA 的检测。

图 4 显示上述图 1 中所述患者在接续到开始IFN 加NAC 治疗后11 个月时的ALT 水平。

4. 结果

进入该实验的14 名患者的平均血清ALT 水平示于下表, 该表还显示了L-GSH和P-GSH。

表

月数	平均 ALT (IU/L)	L-GSH (毫微摩尔/ 10^6 个细胞)	P-GSH (μ M)
-4	139 ± 24	-	-
0	124 ± 24	1.45 ± 0.27	0.77 ± 0.21
+1-2	87 ± 9	-	-
+3-4	53 ± 7	3.32 ± 0.18	2.40 ± 0.20
+5-6	37 ± 3	-	-

对照组的L-GSH和P-GSH值如下:

L-GSH 3.43 ± 0.89 毫微摩尔/ 10^6 个细胞

P-GSH 18.1 ± 4.08 μM .

在从未接受抗病毒治疗的慢性丙型肝炎患者($n=10$)中, 血浆中的GSH水平($0.63 \pm 0.07 \mu\text{M}$)和PBMC中的GSH水平(1.02 ± 0.09 毫微摩尔/ 10^6 个细胞)与健康对照组(分别为 $18.1 \pm 4.08 \mu\text{M}$ 和 3.43 ± 0.89 毫微摩尔/ 10^6 个细胞, $P < 0.01$)相比, 似乎受到严重抑制。施用NAC一个月显著提高了PBMC中的GSH水平(2.22 ± 0.38 毫微摩尔/ 10^6 个细胞, $P < 0.05$), 但血浆中的GSH没有明显变化($0.99 \pm 0.22 \mu\text{M}$, 无显著性差异)。此外, 血清ALT水平(128 ± 32 国际单位/升; 用NAC治疗一个月后为 110 ± 29 国际单位/升)也没有明显变化。

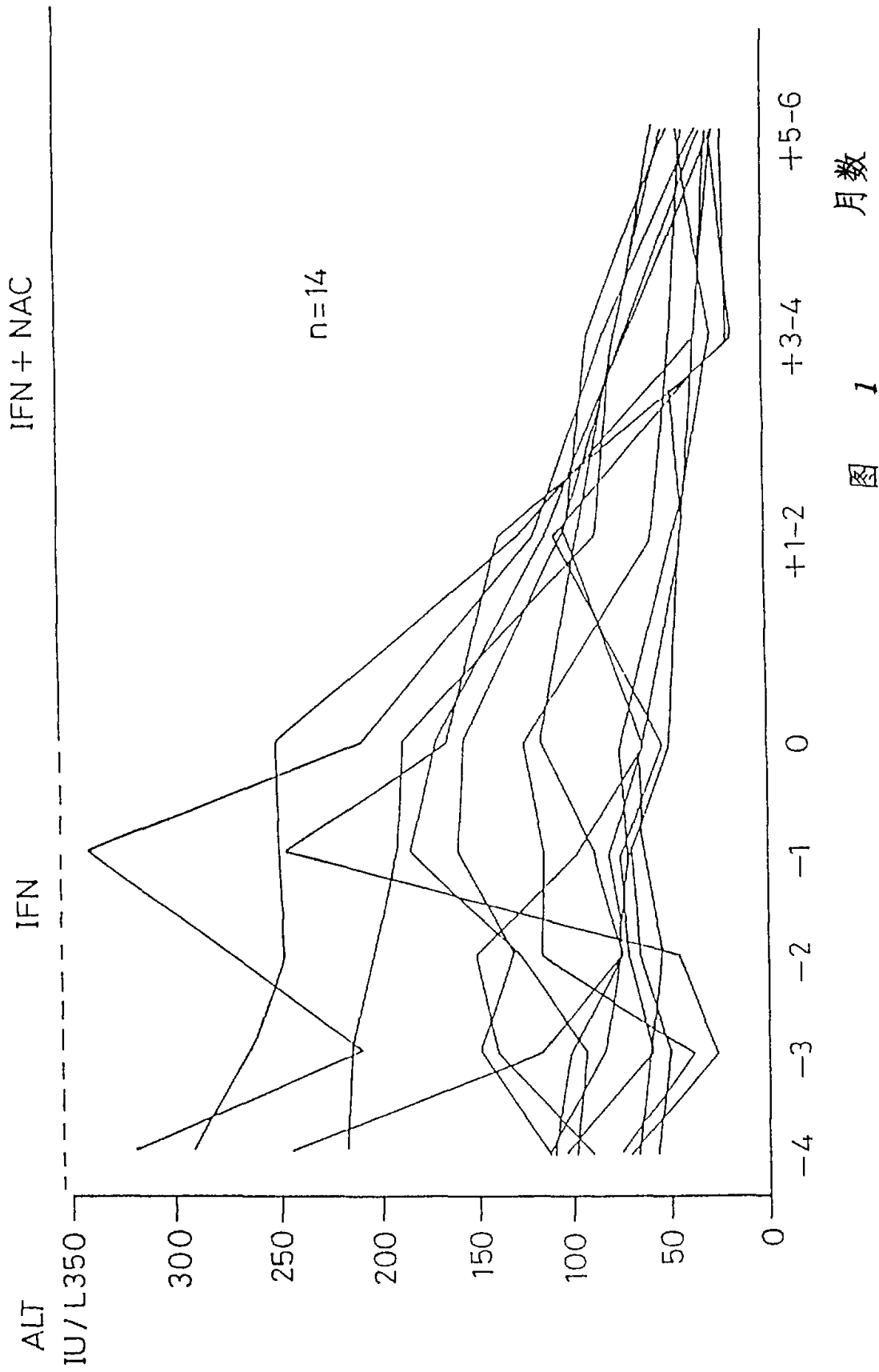
在未对干扰素作出反应的患者中, PBMC中的GSH水平(1.45 ± 0.27 毫微摩尔/ 10^6 个细胞)和血浆中的GSH水平($0.77 \pm 0.21 \mu\text{M}$)与对照值相比似乎也明显受到抑制($p < 0.01$)。在这些患者中, 与干扰素一起施用NAC3-4个月使单核细胞中的GSH(3.32 ± 0.18 毫微摩尔/ 10^6 个细胞, $p < 0.05$)和血浆中的GSH($2.40 \pm 0.20 \mu\text{M}$, $p < 0.05$)明显上升。

图1和上表表明, 在进入该实验的患者(对干扰素无反应者)中, ALT水平在4个月的IFN治疗过程中没有显著变化(139 ± 24 变为 124 ± 17 国际单位/升, 无显著性差异)。然而, 增加口服NAC导致ALT的迅速而明显的下降, 甚至在组合治疗只一个月后, ALT值就已明显下降(87 ± 9 国际单位/升, $p < 0.05$)。另外, 持续施用IFN和NAC5-6个月使所有病例的ALT值都进一步下降(37 ± 4 国际单位/升), 41%的病例达到正常值, 其余的接近正常值(有一个病例最高, 为56国际单位/升)。在以前归入对IFN治疗无反应者的患者中, 在IFN治疗中增加NAC明显改善对IFN的反应。由图4可见, ALT值的这种下降一直持续到最晚的患者分析, 即开始组合治疗11个月后。

IFN和NAC组合所致的ALT水平的下降同时还伴有对病毒复制的影响。在归入对IFN无反应者的9名患者中, 在治疗中增加NAC之前

和之后，检测了PBMC中HCV 基因组链(RNA正链) 和病毒复制中间体(RNA负链) 的存在。如图 2所示，在患者只用IFN 治疗时，在 7个病例中可检测到基因组链(77%)，而在3名患者中检测到复制中间体(33%)。但是，在用IFN 和NAC 组合治疗4-6个月后，只在 2个病例中检测到正链(22%)，在所有病例中都检测不到HCV-RNA负链。

在IFN 治疗中增加NAC 还伴有血清中HCV-RNA水平的下降。如图 3所示，在治疗中增加NAC 后，需要提高血清浓度才能检测到HCV。例如，在增加NAC 之前，用1:10的血清稀释度可以在100%的病例中检测到HCV-RNA，而在治疗中增加NAC 之后，在相同的血清稀释度下只在 70% 的患者中检测到病毒。



月数

图 1

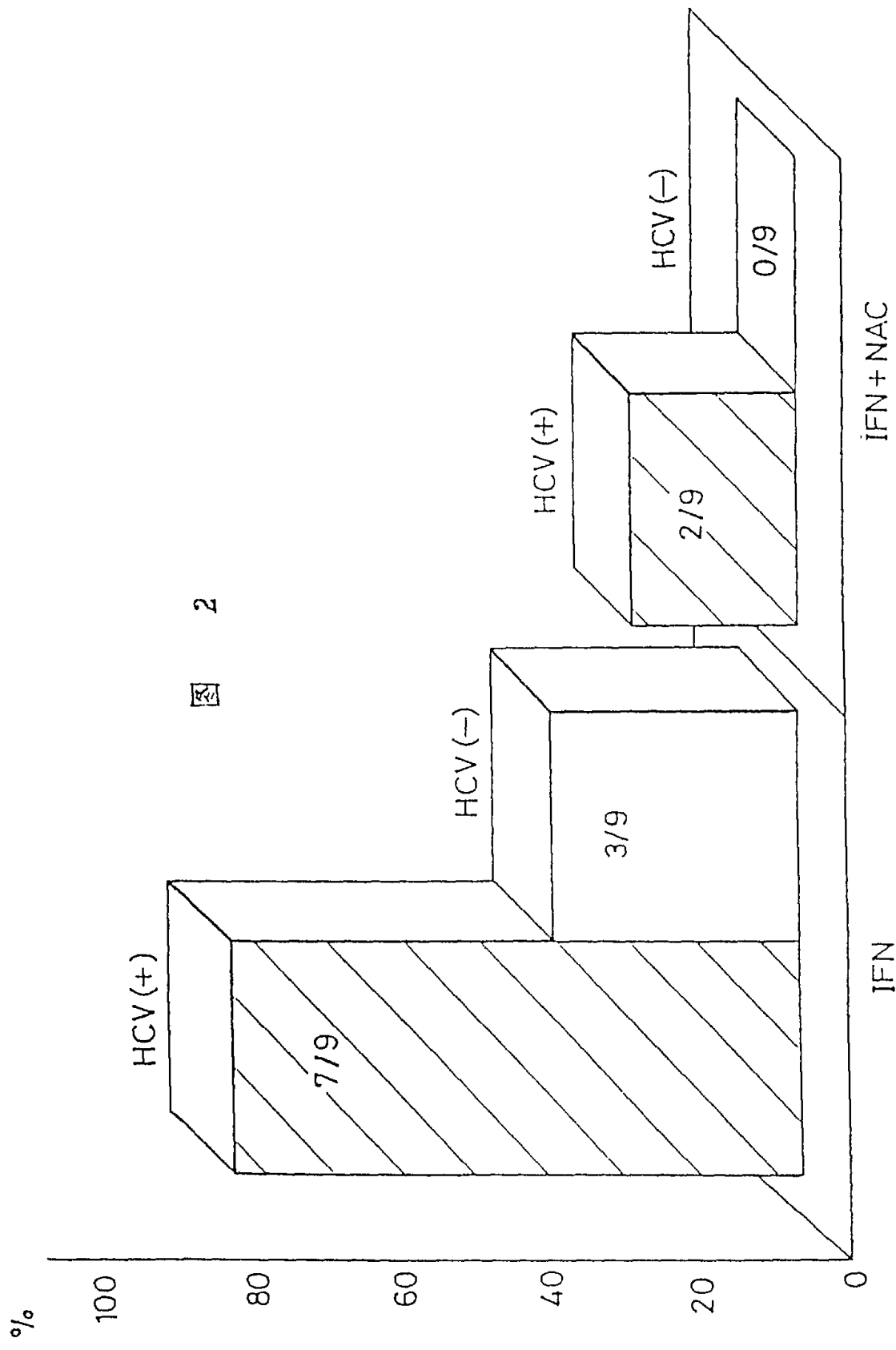
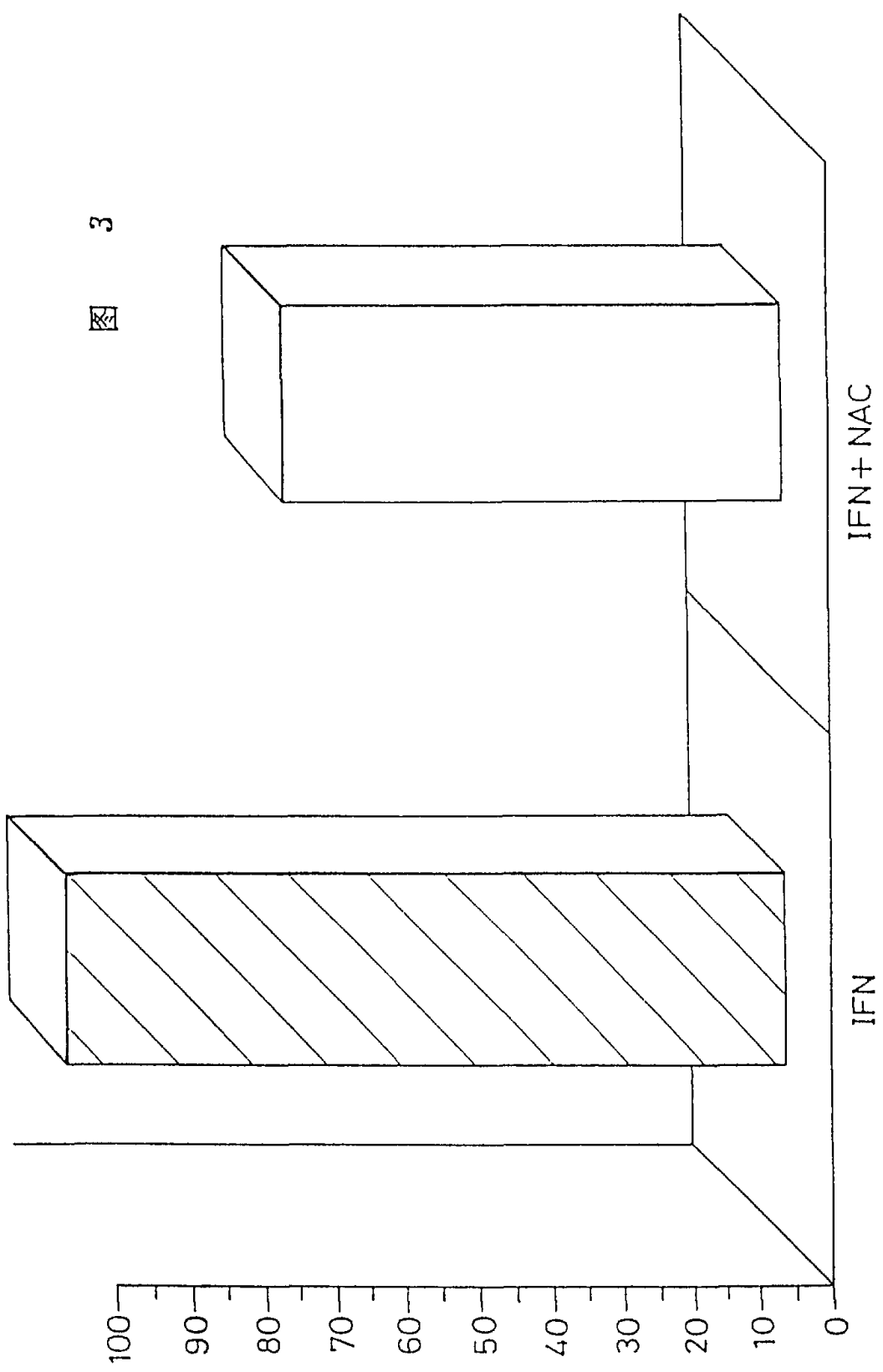


图 2



血清中HCV RNA阳性病例%

探索实验：在慢性丙型肝炎中施用Welliferon+NAC

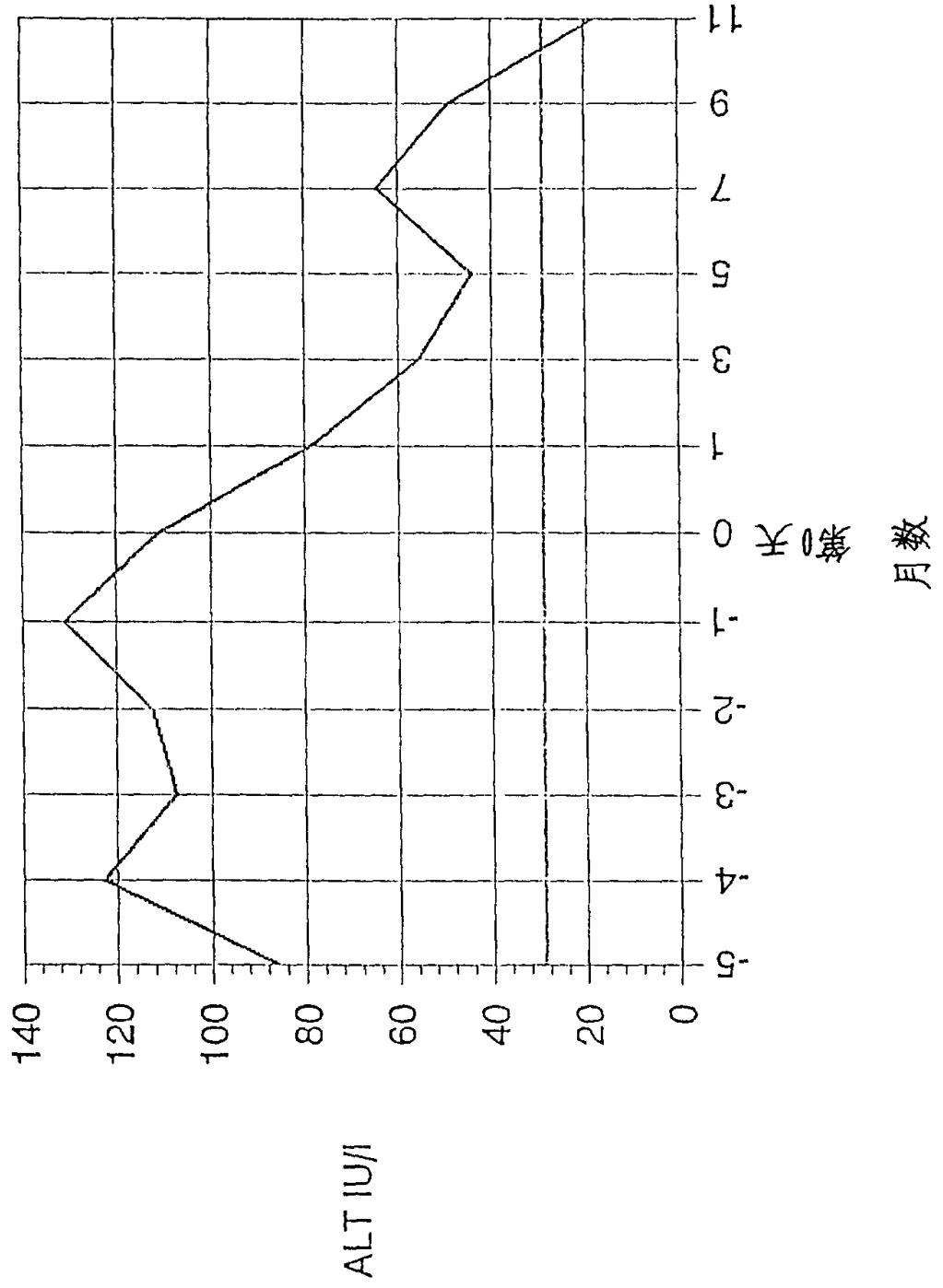


图 4