

公告本

發明專利說明書

(本申請書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：92129780

※申請日期：92年10月27日

※IPC分類：A61K 31/05,

A61P 31/16

壹、發明名稱：

(中) 白藜蘆醇 (resveratrol) 於製備藥物以治療流行性感冒病毒感染上之用途(外) Use of resveratrol for preparation of a medicament useful for the treatment of influenza virus infections

貳、申請人：(共 1 人)

1. 姓名：(中) 西格瑪 陶製藥廠(英) SIGMA-TAU INDUSTRIE FARMACEUTICHE RIUNITE S.P.A.代表人：(中) 1. 史提法諾 馬瑞諾(英) 1. MARINO, STEFANO地 址：(中) 義大利羅馬莎士比亞路四十七號(英) 47, Viale Shakespeare, 00144 Rome, Italy國籍：(中英) 義大利 ITALY

參、發明人：(共 2 人)

1. 姓名：(中) 英瑞克·葛瑞西(英) GARACI, ENRICO地 址：(中) 義大利羅馬普瑪利亞潘堤那街 km 三〇四〇〇(英) Via Pontina, km 30,400, 00040 Pomezia RM, Italy2. 姓名：(中) 安那·帕拉瑪拉(英) PALAMARA, ANNA TERESA地 址：(中) 義大利羅馬普瑪利亞潘堤那街 km 三〇四〇〇(英) Via Pontina, km 30,400, 00040 Pomezia RM, Italy

肆、聲明事項：

◎本案申請前已向下列國家(地區)申請專利 ☐ 主張國際優先權：

【格式請依：受理國家(地區)；申請日；申請案號數 順序註記】

1. 義大利 ; 2002/11/06 ; RM2002A000562 ☒ 有主張優先權

公告本

發明專利說明書

(本申請書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：92129780

※申請日期：92年10月27日

※IPC分類：A61K 31/05,

A61P 31/16

壹、發明名稱：

(中) 白藜蘆醇 (resveratrol) 於製備藥物以治療流行性感冒病毒感染上之用途(外) Use of resveratrol for preparation of a medicament useful for the treatment of influenza virus infections

貳、申請人：(共 1 人)

1. 姓名：(中) 西格瑪 陶製藥廠(英) SIGMA-TAU INDUSTRIE FARMACEUTICHE RIUNITE S.P.A.代表人：(中) 1. 史提法諾 馬瑞諾(英) 1. MARINO, STEFANO地 址：(中) 義大利羅馬莎士比亞路四十七號(英) 47, Viale Shakespeare, 00144 Rome, Italy國籍：(中英) 義大利 ITALY

參、發明人：(共 2 人)

1. 姓名：(中) 英瑞克·葛瑞西(英) GARACI, ENRICO地 址：(中) 義大利羅馬普瑪利亞潘堤那街 km 三〇四〇〇(英) Via Pontina, km 30,400, 00040 Pomezia RM, Italy2. 姓名：(中) 安那·帕拉瑪拉(英) PALAMARA, ANNA TERESA地 址：(中) 義大利羅馬普瑪利亞潘堤那街 km 三〇四〇〇(英) Via Pontina, km 30,400, 00040 Pomezia RM, Italy

肆、聲明事項：

◎本案申請前已向下列國家(地區)申請專利 ☐ 主張國際優先權：

【格式請依：受理國家(地區)；申請日；申請案號數 順序註記】

1. 義大利 ; 2002/11/06 ; RM2002A000562 ☒ 有主張優先權

(1)

玖、發明說明

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於使用白藜蘆醇作為活性成份來製備治療流行性感冒病毒（流感病毒）感染的藥物。

【先前技術】

白藜蘆醇，即 3,4,5-三羟基芪，為紅酒的一項基礎成份，而習知地紅酒具有有益於人體健康的特性，所以近來已針對白藜蘆醇作相當深入的研究（Life Sci., 71, 2145-52, 2002）。

白藜蘆醇位在黑葡萄的葡萄皮上且份量為 50 到 100 微克/公克，在紅酒中的濃度為 1.5 到 3 毫克/公升。

多種研究已顯示白藜蘆醇具有抗癌活性，其作用機制區分如下：抑制轉錄因子 NF-kB 的活化，可以調節涉及發炎及致癌過程之多種基因的表現（Lancet, 341, 1103-1104, 1993; Science, 275, 218-220, 1997; Proc. Natl. Acad. Sci., 94, 14138-14143, 1997; Life Science, 61, 2103-2110, 1997; Brit. J. Pharm., 126, 673-680, 1999; J. Imm., 164, 6509-6519, 2000）；抑制多種蛋白質，包括蛋白質激酶 C（Bioch., 38, 13244-13251, 1999），核苷酸還原酶（FEBS Lett., 421, 277-279, 1998）及哺乳動物表皮細胞之環加氧酶-2（COX-2）（Ann. N.Y. Acad. Sci., 889, 214-223, 1999; Carcinog., 21, 959-963, 2000）；活化卡司波酶（caspases）2、3、6 及 9（FASEB J.,

(2)

1613-1615, 2000) 及調控基因 p53, 其為一種已知的腫瘤抑制基因 (Cancer Research, 59, 5892-5895, 1999; Clin. Bioch., 34, 415-420, 2001)。

在白藜蘆醇的有益作用中還該提到其抗氧化劑活性, 其可由前文所提及、其對於引起細胞內氧化壓力之多種物質及/或情況之損害性影響具有抵制的能力 (Free Radic. Res., 33, 105-114, 2000)。

白藜蘆醇可藉由在血管的內皮層產生氧化氮來引發血管鬆弛作用 (Cancer Res., 59, 2596-01, 1999), 抑制血小板內血栓素的合成 (Clin. Chim. Acta, 235, 207-219, 1995; Int. J. Tissue React., 17, 1-3, 1995), 抑制中性球內白三烯的合成且預防低密度脂蛋白 (LDL) 的氧化及凝集 (Lancet, 341, 1103-1104, 1993; Life Sci., 64, 2511-2521, 1999)。

近來基於活體外實驗系統, 顯示出白藜蘆醇對於單純疱疹 DNA 病毒具有抑制活性 (Antiv. Res., 43, 145-155, 1999)。

根據本文作者及其他研究團隊所得數據顯示: 許多抗氧化物質可在活體外抑制副流感仙臺病毒 (SV) 第 1 型、單純疱疹 1 病毒 (HSV-1) 及後天免疫不全病毒 (HIV) 之複製 (AIDS Res. Hum. Retroviruses, 1997: 1537-1541; Biochem. Biophys. Res. Commun., 1992: 188, 1090-1096; Antivir. Res., 1995: 27, 237.235)。抗氧化劑物質的抗病毒效能也展現在鼠科動物 AIDS (MAIDS) 模

(3)

式 中 以 及 在 HSV1 角 膜 炎 (AIDS Res. Hum. Retroviruses, 1996: 12, 1373-1381; Exp. Eye. Res., 200: 70, 215-220)

。

流行性感冒為一種影響全世界的傳染病學問題，其結果有嚴重的大眾健康問題以及主要地在衛生保健方面的經濟影響。造成流行性感冒的病毒分佈廣泛且具有高度傳染性。不幸地，近年來所用的治療法還不全然有效且經常會造成耐藥性病毒株的選汰作用 (Fields, cap47, 1533-79, 2001) ；再者，除了以疫苗來預防此方法本身的缺點以外，由於病毒有極高的抗原可變異能力，所以預防注射仍無法提供令人滿意的保護效用 (Fields, cap47, 1533-79, 2001) 。

在攻擊病毒複製作用的多種不同策略中，近來的研究 (J. of Virol., 74, 1781-1786, 2000) 已指出蛋白質 M1 在將特殊的病毒核糖核蛋白運送到細胞質之運輸作用上的重要性。此似乎為病毒複製循環的一個基礎階段，因而病毒複製作用的抑制可以經由抑制蛋白質 M 的合成使得核蛋白滯留在感染細胞的細胞核中而達成。此現象可歸因於激酶功能對細胞蛋白質的抑制作用。事實上，近期研究已顯示抑制激酶會造成細胞核 NP 的滯留 (Nature Cell. Biol., 3, 301-5, 2001; J. of Virol., 74, 1781-86, 200) ，以及對流感病毒的複製有潛在的抑制作用。

GSH 已知為細胞氧化還原系統內主要的抗氧化劑且與多種病毒的複製有關。事實上，本案發明者以前進行的研

(4)

究已顯示：在病毒感染期間，感染作用本身就可能造成 GSH 量降低的現象（Rotilio et al., "Oxidative stress on cell activation in viral infection", 143-53, 1993; Palamara et al., Antiviral Research, 27, 237-53, 1995）。

對習知細胞凋亡機制的異常調控為多種人類疾病如許多自體免疫、感染性或神經性疾病如 AIDS 及癌症的可能原因。

早期的研究指出白藜蘆醇可透過引發細胞的細胞凋亡作用得以消除掉腫瘤細胞。最近，Tinhofer I. 等人（FASEB J., 18, 1613-15, 2001）所進行的研究顯示：白藜蘆醇引發細胞凋亡之首要現象的特徵為改變粒腺體的膜電位（ $\Delta \psi_m$ ），釋出反應性氧物種（ROS）及活化卡司波酶（caspases）2、3、6 及 9。同樣習知地，流感病毒會根據病毒株種類及感染複數值而誘發不同比率之細胞凋亡作用。

【發明內容】

本發明現在發現到白藜蘆醇對流感病毒的複製顯示出抑制作用。令人徹底感到意外地，我們還發現到白藜蘆醇並不是透過預期的抗氧化劑活性來達到抑制作用，而是透過抑制蛋白質激酶 C（一種在流感病毒複製過程扮演重要角色的細胞酶）的特殊機制來達成。所以利用白藜蘆醇所提供的主要優點係在於其間接攻擊病毒的能力，即干擾病毒之功能性細胞結構的能力，而非直接對病毒顆粒本身

(5)

發生作用。故而，此類型的策略可以抑制病毒複製，而能避免造成病毒對常用抗病毒藥物產生耐藥性的現象。

據此，本發明之一項目標係在利用白藜蘆醇來製備預防及/或治療流感病毒感染之藥物。於本發明一較佳應用中，白藜蘆醇可用來抗人類流感病毒。於本發明一較廣應用中，其目標亦包括使用白藜蘆醇來製備獸醫學領域治療流感病毒感染之藥物。

發明詳述：

爲了顯示本發明之效能，使用流感病毒 A/PR8/34，H1N1 亞型（從此以後簡稱為病毒 PR8）來進行試管內研究。此菌株純然是用以舉例，需了解到本發明可應用到一般通稱的流感病毒上。

材料及方法：

白藜蘆醇爲一種通常可從市場購得或可用文獻報導之習知方法來製得之產物。此物質係溶於 DMSO（80 mg/ml）中使用。實驗所用的濃度係以 RPMI 1640 連續稀釋來製成。所有的對照組樣本是用溶解白藜蘆醇之同等劑量的 DMSO 來處理。此等濃度之 DMSO 對細胞並無有毒影響。

細胞培養物：

採用 MDCK 細胞（狗腎表皮細胞）來進行流感病毒複製的研究。此等細胞係用 T-25 小管或 6-及 24-凹洞之

(6)

林諾 (Libno) 平板培育在 RPMI 培養基中，其內加入 L-麩醯胺酸，青黴素-鏈黴素及 10% 胎小牛血清 (FCS) 且維持在 37℃ 及 5% 二氧化碳氛圍下。諸匯合細胞單層係用 0.25% 胰蛋白酶溶液來分離、離心且重新播種在新鮮培養基中。利用血細胞計數器來進行細胞計數，且以台盼藍活力染色 (0.02%) 的排除作用來測定細胞活性。

病毒的製造：

病毒係藉著將病毒懸浮液接種且適當稀釋到 10-日齡有胚雞蛋之尿囊腔中製得。把雞蛋在 37℃ 下培育 72 小時後，將含有新形成之病毒顆粒的尿囊液於 4℃ 下離心淨化且儲存於 -80℃。

病毒的滴定：

病毒的滴定係利用血細胞凝集素技術來進行，其係基於此病毒獨特的凝聚血細胞的能力。

將尿囊液中未經稀釋的病毒在 96-凹洞平板中用磷酸鹽緩液 (PBS) 作比例稀釋以進行滴定，於此等平板中稍後加入人類 O 型 Rh 陽性血細胞之 0.5% 懸浮液。然後讓此等平板留置在室溫下，時間久得足以讓血細胞凝集反應發生。樣本的病毒效價，以血細胞凝集單位 (HAU) 來表示，係用能產生完全的血細胞凝集作用之最小的稀釋濃度來代表。部份受感染細胞的病毒釋出量係用處理病毒感染 24 及 48 小時之取樣樣本的上清液之相同步驟來評估。

(7)

病毒 感 染：

將 MDCK 細胞之匯合單層用 PBS 清洗且以病毒感染（感染複數值 [m.o.i] 0.2）。詳言之，病毒用無 FCS 之 RPMI 來妥善稀釋且以最低份量體積加到細胞中。於 37°C 下培育 1 小時（病毒吸附期）後將接種物移除，該匯合單層先用 PBS 清洗以去除未吸附病毒，然後將該單層維持在含有 2%FCS 之新鮮培養基中。根據如下處理計劃，加入不同濃度（1、5、10、15、20 及 40 微克/毫升）的白藜蘆醇：a）在感染前 24 小時投藥（感染前投藥組）；b）在病毒吸附到感染細胞後立刻投藥（感染後投藥組）；及 c）在感染前 24 小時及在病毒吸附到感染細胞後立刻投藥（感染前後皆投藥組）。所有的例子都一樣地，投予藥物在整個實驗期間一直維持著與細胞培育在一起。在病毒感染 24 及 18 小時後，被釋放到上清液中的病毒量係以測定血細胞凝集單位的方式來滴定。如第 1 圖所顯示般，於感染後加入白藜蘆醇會以劑量-相關方式抑制病毒的複製。相較於感染組及未經治療之對照組，白藜蘆醇濃度 20 微克/毫升時，病毒效價降低成 87%。且對於偵測的未感染細胞並沒產生任何有毒影響。爲了測定白藜蘆醇對於 MDCK 細胞可能的毒性，將匯合成單層的 MDCK 細胞以不同濃度（5、10、15、20 及 40 微克/毫升）的白藜蘆醇處理。所得的結果顯示：在對於流感病毒有明顯抑制作用的劑量（10-20 微克/毫升）下，觀察到細胞數目稍有減少，

(8)

其可能是由於細胞增殖減慢了（第 2A 圖）。無論如何，在此等劑量下都沒有發現到有細胞形態變異的現象。在 40 微克/毫升的濃度下病毒複製完全被阻斷，不過還發現到細胞死亡率增加了，所以此濃度對細胞呈有毒影響（第 2B 圖）。基於此等結果，在如下實驗中係採用 20 微克/毫升的劑量，其可產生最佳抗病毒活性而無副作用。

抗病毒活性的特徵：

由於實驗目的係在於想確定病毒複製循環中的哪些階段受到白藜蘆醇的控制，所以藥物係相對於病毒生活史的不同階段依不同治療計劃加入。於第一階段，爲了要評估白藜蘆醇是否會干擾病毒進入細胞的作用，所以藥物係以 20 微克/毫升的濃度全部在病毒吸附相期間（於 37℃ 下 1 小時）加入且過後便被去除掉。於 24 小時後測量病毒的複製作用，所得測量值與對照組細胞測得的複製結果差不多，因而顯示出病毒進入細胞的作用並沒有受到此等藥物的抑制（第 3 圖）。更進一步地，爲了評估白藜蘆醇是否能直接使病毒失活化，所以用 40 微克/毫升的藥物在 37℃ 下培育病毒 1 小時。稍後，經如此處理的病毒以 1：500 來稀釋且用以感染細胞。在此等狀況下並沒有觀察到有病毒複製減少的現象。此等結果建議：白藜蘆醇並無法直接讓病毒顆粒失活化。於第二階段，細胞先用病毒感染且再次地以相同濃度（20 微克/毫升）的白藜蘆醇來處理，不過藥物是在感染後不同時間（0、3、6 及 9 小時）加入。

(9)

病毒的複製作用係在感染後 24 小時以 HAU/毫升來評估，其顯示只有在感染後 3 小時內加入白藜蘆醇才能有明顯的抑制作用（第 4B 圖）。相對地，如果在感染後立刻加入白藜蘆醇且在不同時間後（0、3、6、9 及 12 小時）除去白藜蘆醇，則只有在處理至少長達 9 小時時才對病毒複製有抑制作用。此外，第 4 圖的結果亦顯示一旦獲得抗病毒活性，若中斷藥物治療處理時並無法重新獲得抗病毒活性。

病毒複製可藉著免疫螢光法分析感染細胞表面病毒抗原的發生率來評估。以免疫螢光進行病毒蛋白質分析係使用螢光顯微鏡以發射綠光之濾鏡（FITC）（鏡片 100X）來進行。將培育在蓋玻片上 24 小時之 MDCK 細胞用病毒感染，在感染 18 小時後用 1:1 甲醇-丙酮於 4℃ 下處理 15 分鐘來固定。稍後，細胞用 PBS 來清洗兩次，且用 PBS-TRITON 的 0.1% 溶液處理 5 分鐘使其通透化。非特異性部位的封阻係以溶於 PBS 之 1% 牛奶於室溫下處理 30 分鐘來進行。稍後，加入對病毒蛋白質特異的單株抗體（小鼠抗-流感病毒 NP 及小鼠抗-流感病毒 M），以 1:50 稀釋於 PBS 中於室溫下處理 30 分鐘。初級抗體係用與螢光素接合之次級抗體（抗-小鼠 FITC，Sigma）來偵測。

病毒蛋白質合成的分析及與白藜蘆醇抗病毒活性的相關性：

病毒蛋白質係藉著蛋白質印跡法來分析。在病毒感染

(10)

後不同時間，細胞用特殊的溶胞緩衝液來使其溶胞。然後將等量的蛋白質置入聚丙烯醯胺凝膠於 SDS 中。於電泳後，將蛋白質轉印到硝酸纖維素濾膜上且用抗-流感病毒之多株抗體來處理。經培育且適當的清洗後，該等濾膜用與接合氧化酶之第二種抗體來處理且病毒蛋白質可藉化學發光技術（ECL）利用過氧化酶受質（發光醇（luminol））標示出來，該受質在與酶反應時會發出光線且在放射自顯影平板上製造出痕印。細胞係用不同濃度（5、10、15及20微克/毫升）的白藜蘆醇來處理。爲了讓病毒蛋白質能有較佳影像，所以電泳係用10%聚丙烯醯胺凝膠（第7A圖）及梯度凝膠（第7B圖）進行。15及20微克/毫升濃度的白藜蘆醇幾乎完全抑制後期流感病毒血細胞凝集素（H0-H1，H2）及基質蛋白質（M）的合成。相對地，早期核殼蛋白質（核蛋白[NP]及聚合酶蛋白[P]）的表現也受到抑制，不過我們認爲其抑制的程度低於後期蛋白質的抑制程度。

爲了確定病毒蛋白質的抑制機制，如前文所述般以病毒感染且用不同濃度之白藜蘆醇處理之 MDCK 細胞是用 Tobita 等人（J. General Virol., 78, 563-566, 1997）所述之 PCR 技術來分析。受到病毒感染及/或經白藜蘆醇處理之 MDCK 細胞是用 GIBCO BRL TRIZOL 來均質化。在室溫下培育 5 分鐘後，加入氯仿（每份樣本 0.2 毫升）且將樣本置於 15-30℃ 下培育 3 分鐘。然後將其以 10,000 rpm 於 4℃ 離心 15 分鐘，且將含有 RNA 的水相部份回收。加

(11)

入 0.5 毫升異丙醇且將樣本置於 15-30℃ 下培育 10 分鐘，而後離心。去除掉所得上清液且 RNA 沉澱物用 75%乙醇以 8,000 rpm 於 2-8℃ 下處理 5 分鐘。最後，沉澱物用空氣乾燥且以 20 微升的水-DEPC（焦碳酸二乙酯）溶解。

所得 RNA 用逆轉錄酶來轉錄。逆轉錄作用是以各份樣本之 5 微升 RNA 於含有隨機引子，四種去氧核糖核苷酸（dNTP=dATP，dCTP，dGTP，dTTP），二硫蘇糖醇（DTT）及 RT 緩衝液（Life Technologies）之混合物中進行。互補 DNA（cDNA）的合成是將該混合物置於 22℃ 下處理 10 分鐘，而後於 42℃ 下處理 60 分鐘且最後在 75℃ 下處理 10 分鐘使反應停止來完成。如此得到的 cDNA 會被用在 PCR 中。

在 PCR 中使用 Taq 聚合酶。PCR 的變性、退火及延長作用等三階段分別是在 95℃，48℃ 及 72℃ 的個別溫度下進行。此等循環重複 20 回。用於病毒 RNA 擴增作用的寡核苷酸有：用於擴增編碼血細胞凝集素蛋白質（HA）之病毒基因時，所用 5'引子為：

5'-ACCAAAATGAAGGCAAACC-3'，所用 3'引子為：

5'-TTACTGTTAGACGGGTGAT-3'；用於擴增編碼基質蛋白質（M）之病毒基因時，所用 5'引子為：

5'-ATGAGTCTTCTAACCG-3'，所用 3'引子為：

5'-ACTGCTTTGTCCATGT-3'。將 PCR 產物置於 1%瓊脂凝膠中電泳（100 伏特），在緩衝液中加入溴乙錠，使得 DNA 可利用 UV 穿透發光儀（transilluminator）照射來顯

(12)

現。

對分別在病毒感染後 4、8 及 20 小時取得的樣本進行評估。在 4 小時取樣的樣本中，不論是對照組或是經白藜蘆醇處理的實驗樣本中都沒有發現到有病毒蛋白質 HA 及 M 的信使 RNA。實驗結果顯示在感染後 20 小時後 mRNA 的合成並不受到白藜蘆醇處理的影響。對於感染 4 小時的觀測結果顯示白藜蘆醇只會造成此等蛋白質之信使 RNA 的合成延遲（第 8 圖）。根據感染後 8 小時的評估，其結果顯示 20 微克/毫升的白藜蘆醇對於後期病毒蛋白質（HA 及 M）之信使 RNA 的釋出有延遲的效果。

蛋白質 NP 的局部化：

因為考慮到在流感病毒感染的細胞內之蛋白質激酶 C 的抑制現象會使得蛋白質 M 的表現有實質的減少，還會使感染細胞的細胞核有核蛋白滯留情形（J. Virol., 74, 1781-86, 2000），所以用特異性抗-M 及抗-NP 抗體對感染了病毒 PR8 及有或無 20 微克/毫升濃度白藜蘆醇處理之 MDCK 細胞作染色且用螢光顯微鏡來觀察。其結果顯示：在沒有感染的細胞中可同時在細胞核及細胞質中觀察到 NP，且 M1 主要都在細胞質中；而在經白藜蘆醇處理的 NP 細胞中：NP 被保留在細胞核中且被顯著抑制的 M 同樣只在細胞核中才觀察得到。此一現象可能可以歸功於激酶功能對於細胞蛋白質的抑制作用。所以此等數據建議著該抗病毒作用的機制可能與前文所述（FEBS Letters, 45,

(13)

63-67, 1999) 之激酶功能對於蛋白質的抑制作用有關。

還原型及氧化型谷胱甘肽的檢定：

谷胱甘肽檢定是藉著讓自由態硫醇與碘乙酸形成 S-羧甲基-衍生物，接著與 1-氯-2,4-二硝基苯反應來使 NH_2 端基轉化成 2,4-二硝基苯基衍生物而進行 (Anal. Biochem., 106, 55-62, 1980)。

藉由刮除技術來剝離 MDCK 細胞。稍後，細胞用 1,200 rpm 離心 5 分鐘。細胞用 PBS 清洗兩次且離心後得到的沉澱物用 200 微升緩衝液來再懸浮。經由重複地冷凍及解凍循環而製得的溶胞物藉由 5% 偏磷酸的沉澱作用去除蛋白質。用 22,300 g 離心後，上清液內之低分子量硫醇用 10% v/v 碘乙酸來衍生化且用粉末態的碳酸氫鈉來中和。在黑暗中培育 1 小時後，加入 1.5% v/v 的 1-氯-2,4-二硝基苯溶液 (1.5 毫升/98.5 毫升絕對乙醇)。加入桑格試劑後，讓樣本在黑暗中培育 12 小時。且藉由 μ Bondapak 3.9 x 300 mm (Millipore) NH_2 HPLC 管柱來分離不同種類的谷胱甘肽。總 GSH (谷胱甘肽) 量的測量係先用純化的 GSH 製得標準曲線且參照該標準曲線測出總 GSH 量。該 GSH 量是用 GSH 奈莫耳/毫克蛋白質於樣本溶胞液來表示。蛋白質濃度是用勞氏法 (Biol. Chem., 193, 265-75, 1951) 來計算。此方法係利用蛋白質在含有二價銅離子的鹼性溶液中還原福林-喬卡梯奧試劑的能力，此反應是利用具有酚基團之多種胺基酸如色胺酸、酪胺酸、

(14)

半胱胺酸及組胺酸等。色胺酸及酪胺酸係藉由其特殊的反應性酚基團來反應，半胱胺酸則是透過-SH基而組胺酸則是利用咪唑環來反應。還原性的反應產物係藉著其與蛋白質的芳香族胺基酸反應形成染有顏色的化合物來偵測。事實上，溶液會呈現一種特殊的湛藍色，具有 695 nm 之吸收峰值。使用不同濃度的鼓牛白蛋白作為標準物製得直線型校準曲線，基於所測得的吸收比率藉著比對所得校準曲線可以測出蛋白質的濃度。

為了評估抗病毒活性與氧化還原態調節作用間可能的相關性，所以在病毒感染 24 小時後，藉 HPLC 分析來檢測這些有或無病毒感染且用不同白藜蘆醇濃度處理的 MDCK 細胞之細胞 GSH 濃度。令人驚訝地，相較於沒有經過白藜蘆醇處理的 MDCK 未感染細胞，加有白藜蘆醇之 MDCK 未感染細胞具有較低的細胞內 GSH 值（第 6 圖）。將白藜蘆醇添加到感染細胞時，雖然會抑制病毒的複製作用，但是並無法恢復病毒感染導致 GSH 值降低的現象。

細胞凋亡的分析：

對於細胞凋亡的分析，係將 MDCK 細胞用病毒 PR8 來感染。於病毒吸附後，細胞用不同濃度（5、10、15 及 20 微克/毫升）的白藜蘆醇來處理。於病毒感染 24 小時後，細胞用 0.25% 胰蛋白酶溶液來剝離且以 1,200 rpm 離心 5 分鐘。所得沉澱物在用碘化波普錠（propidium）標記後

(15)

藉著 FACS 技術來分析。

爲了評估細胞凋亡所誘發的細胞死亡是否涉及白藜蘆醇的抗病毒效果，所以讓 MDCK 細胞用或不用病毒感染且以不同濃度的該等物質來處理。細胞凋亡型細胞死亡係在經碘化波普錠 (propidium) 標記後藉著 FACS 來評估。如第 5 圖所顯示般，根據白藜蘆醇劑量的不同，白藜蘆醇會使得未感染細胞由於細胞凋亡而造成 8% 到 32% (白藜蘆醇劑量分別爲 5 及 20 微克/毫升) 之細胞死亡率。病毒感染本身會對感染細胞造成 12% 的死亡率。雖然白藜蘆醇劑量的增加會造成死亡率提高，但是在以抗病毒劑量之藥物處理的感染細胞組及未感染細胞組之間的細胞凋亡率並沒有顯著差異 (分別爲 35% 及 37% 細胞凋亡率)。

經由對本發明研究作進一步的確認且藉由實施例來說明如下的活體內研究。

【實施方式】

實施例說明：

採用四週齡大的 Balb/c AnCrIBR 純系雌小鼠。在小鼠感染流感病毒後不同時間經由腹膜內途徑以溶於 PBS 的白藜蘆醇對動物投藥。所選取的白藜蘆醇投藥濃度可讓動物血液內的白藜蘆醇劑量類似於活體外實驗時之有效劑量 (10 到 20 微克/毫升)。小鼠是在用醚輕微麻醉後，以含有流感病毒 A/PR 的懸浮液以感染複數值 2 HAU/小鼠的量來經鼻內 (i.n.) 接種病毒。根據以前的實驗數據，此

(16)

種感染複數值的流感病毒會造成出血性肺炎，其可在感染一週後造成 80% 的動物死亡。爲了要監控感染趨勢，所以除了研究存活率以外同時還監測病毒學及免疫學參數。

對於病毒學參數，係測定其病毒負荷量。在感染後不同時間下，採取感染組及對照組小鼠的肺作爲樣本，稱重且用含有抗生素的 RPMI 均質化。離心後，將上清液適當的稀釋且藉著 CPE-50% 試驗來分析病毒的負荷量。依據此等方法，係將上清液先用加有抗生素及 2% FCS 之 RPMI 來連續稀釋，然後將匯合之 MDCK 細胞用此等稀釋之上清液感染且在 37°C 下於 5% 二氧化碳氛圍中培育 3 天。在每一稀釋比例下，計算平板上顯示出正反應的凹孔數且與根據 Reed 及 Muench 配方、沒有細胞致病效果者作比較。該 CPE-50% 效價是以單位數/毫升來計算。

至於免疫學參數，係使用 ELISA 方法來評估發炎性細胞因子量。使用 96-凹孔平板做實驗。該平板被塗覆上偵對所研究細胞因子之單株抗體且於 4°C 下培育隔夜。稍後，在每一凹孔中加入 200 微升之 1% BSA 於碳酸鹽緩衝液且置於 37°C 下 30 分鐘。然後用 0.25% TBS + Tween 20 來清洗，加入樣本且置於 37°C 下 4 小時。使用比例稀釋之重組細胞因子來製作參考曲線。而後進行清洗，加入不同於先前使用之抗-細胞因子多株抗體且於 4°C 下靜置隔夜。稍後用 0.5% TBS + Tween 20 清洗，加入 $MgCl_2$ 2 nM 且加入與鹼性磷酸酶接合之抗體於 37°C 下處理 4 小時。最後，加入該酶之受質（100 微升/凹孔）且用 ELISA 讀數

(17)

計及 402 nm 濾鏡來讀取數據。分析如下抗體：1) 單株大鼠抗-小鼠 TNF-阿法/重組小鼠 IL-6 之抗體；2) 重組小鼠 TNF-阿法/重組小鼠 IL-6 之抗體；3) 多株兔抗-小鼠 TNF-阿法/多株山羊抗-小鼠 IL-6 之抗體；4) 山羊抗-兔 IgG-鹼性磷酸酶/抗-山羊 IgG 鹼性磷酸酶之抗體。

白藜蘆醇的效能是用小鼠之實驗性流感病毒感染模式來研究。於此模式中，經鼻內接種病毒會造成嚴重的出血性肺炎，其會在感染 7 到 10 天內導致動物死亡。此等實驗設計是基於感染動物的存活率來評估研究物質的治療效果。為了達到此一目的，所以在動物感染病毒後幾個小時內，便開始用不同劑量的白藜蘆醇來對動物每日投藥長達 7 天。所得結果顯示：雖然未經治療的動物之死亡率高達 80%，但是投予白藜蘆醇（1 毫克/公斤）則會明顯地降低死亡率且感染後仍有 60% 的動物存活（第 9 圖）。

【圖式簡單說明】

本發明現在將藉助實施例及圖式作詳細的闡述，其中：

第 1 圖顯示白藜蘆醇對於流感病毒 PR8 在 MDCK 細胞內複製的影響，且明確地說，第 1A 圖為在感染後投藥之例，第 1B 圖為在感染前投藥之例，且第 1C 圖為在感染前後皆投藥之例；

第 2 圖顯示白藜蘆醇對於未感染之 MDCK 細胞之匯合單層的影響，且明確地說為對其存活細胞數目的影響；

(18)

第 3 圖顯示白藜蘆醇之抗病毒活性的特徵，且明確地說，第 3A 圖係在病毒吸附期間作處理，且第 3B 圖為對病毒顆粒的影響；

第 4 圖顯示白藜蘆醇之抗病毒活性的特徵，且明確地說，第 4A 圖為感染後立刻投藥且在不同時間去除的情形，第 4B 圖則是在感染後不同時間下加入的情形；

第 5 圖顯示用白藜蘆醇處理之 MDCK 細胞之細胞凋亡現象（菱形：未感染組；方形：感染組）；

第 6 圖顯示白藜蘆醇之抗病毒效果與細胞內氧化還原態間的相關性；

第 7 圖顯示白藜蘆醇對於流感病毒 PR8 之病毒蛋白質合成的影響；

第 8 圖顯示對後期病毒蛋白質之 mRNA 作 PCR 的結果；

第 9 圖顯示在活體以流感病毒 PR8 感染後使用白藜蘆醇的效果。

伍、中文發明摘要

發明之名稱：白藜蘆醇(resveratrol)於製備藥物以治療
流行性感冒病毒感染上之用途

本發明係說明使用白藜蘆醇以製備治療流行性感冒的
藥物。該藥物係透過抑制病毒複製以展現其治療活性。

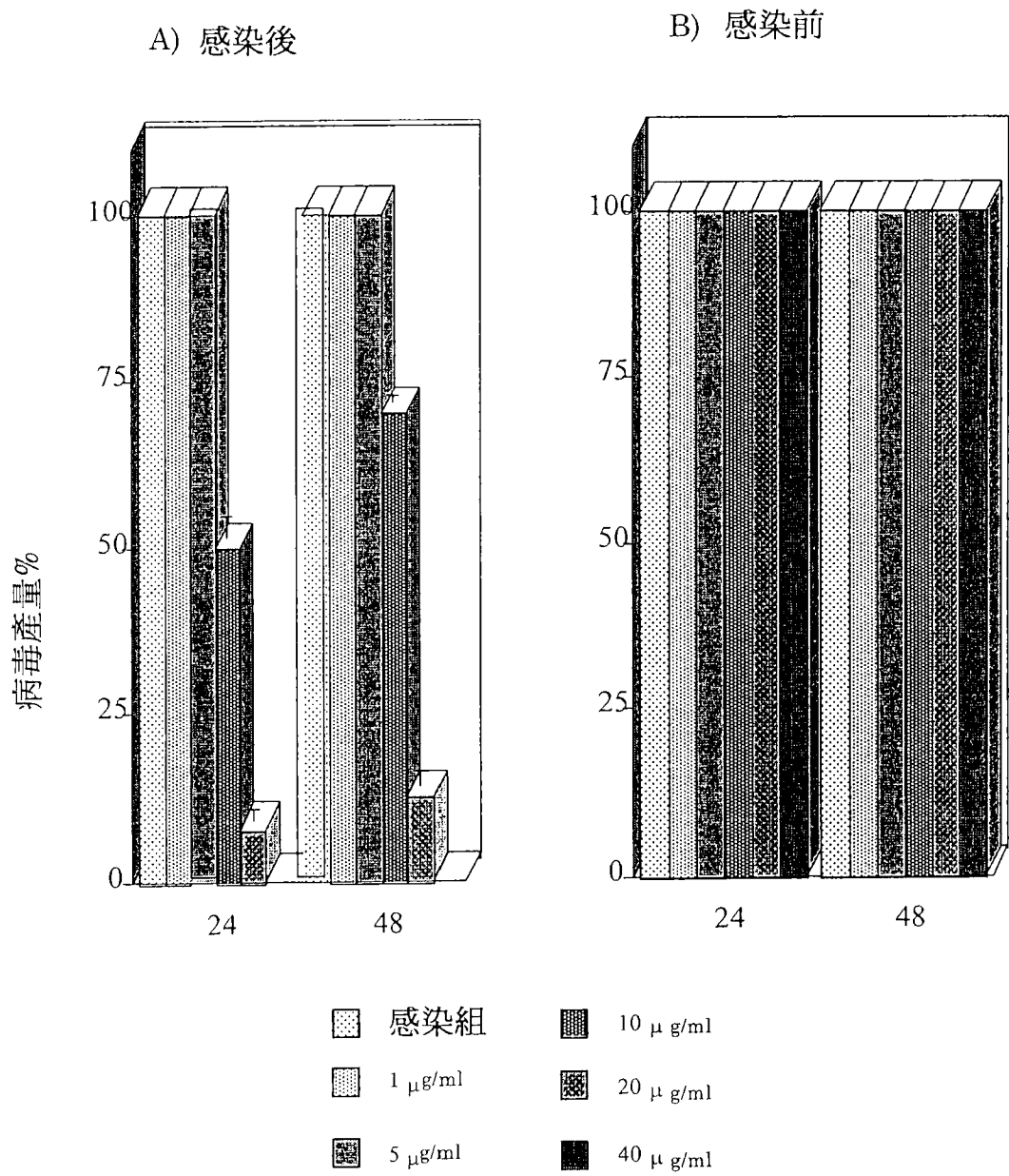
陸、英文發明摘要

發明之名稱：Use of resveratrol for preparation of a medicament
useful for the treatment of influenza virus infections

The use of resveratrol is described for the preparation of a medicament
for the treatment of influenza. Said medicament exerts its therapeutic
activity through inhibition of viral replication.

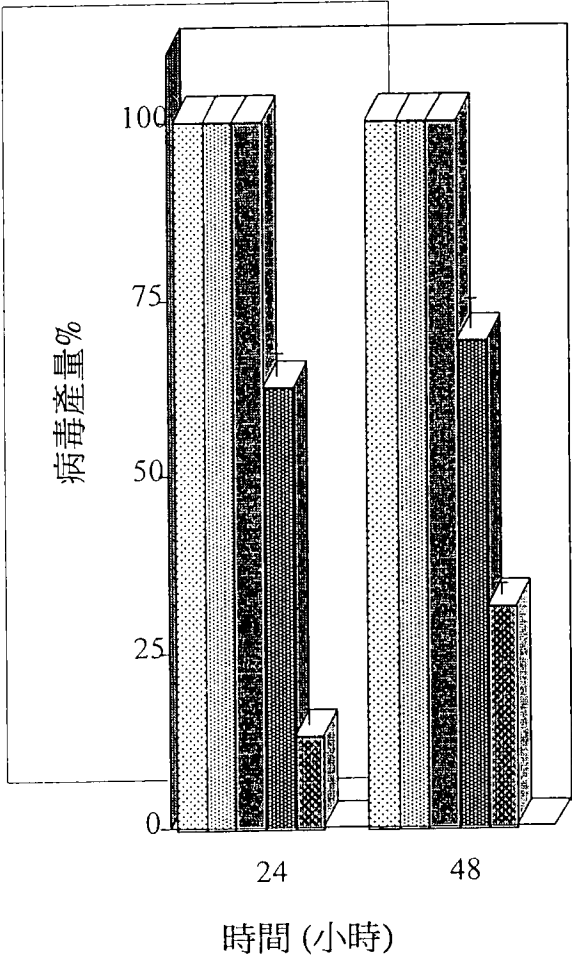
第1圖

白藜蘆醇對於流行性感冒pr8病毒在mdck細胞內複製的影響



第1圖(續)

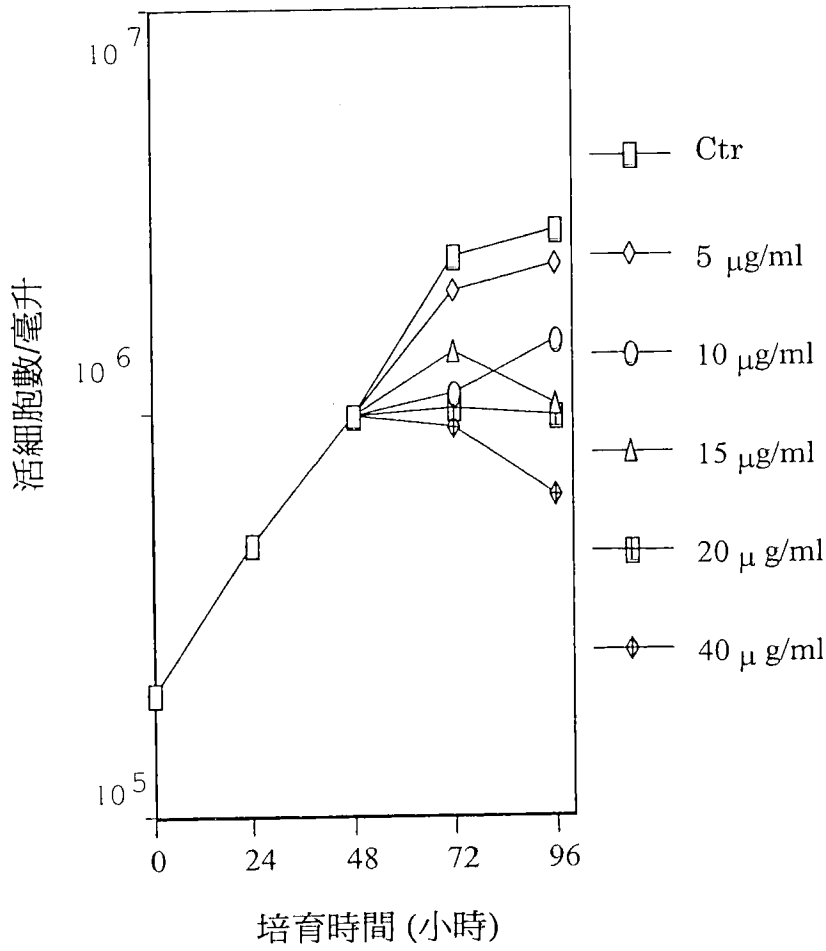
C) 感染前及後



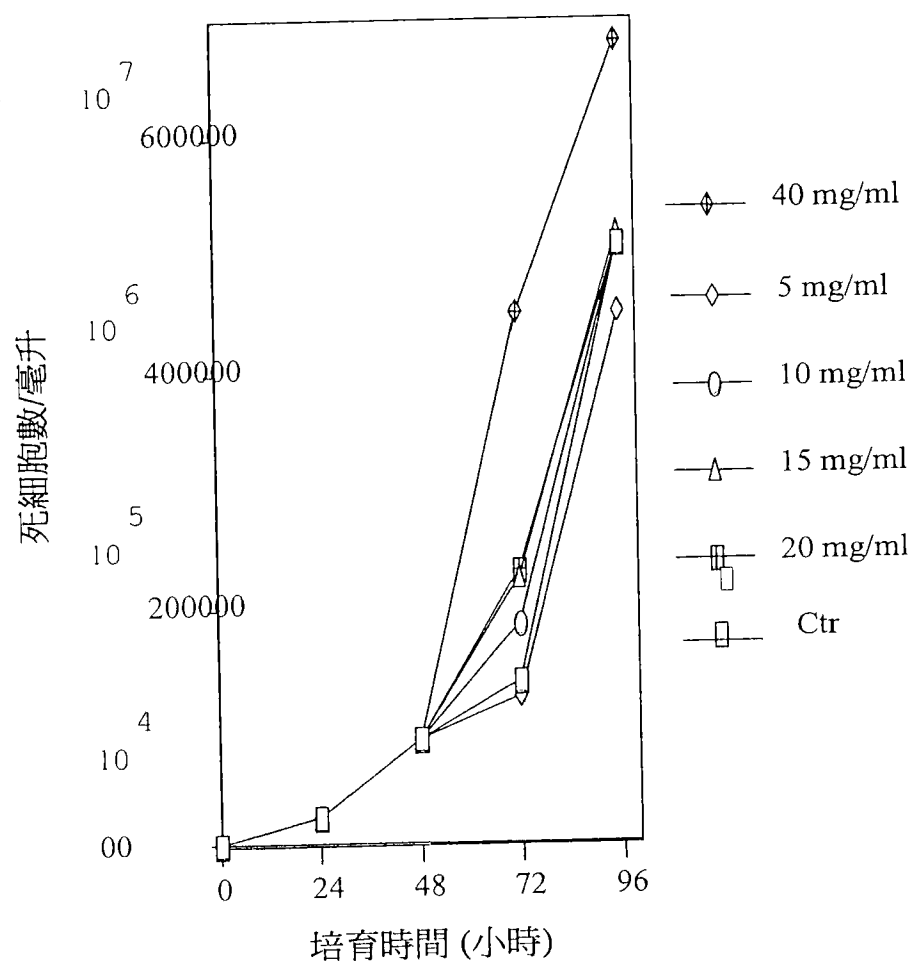
- | | |
|---------|----------|
| 感染組 | 10 μg/ml |
| 1 μg/ml | 20 μg/ml |
| 5 μg/ml | 40 μg/ml |

第2A圖

白藜蘆醇對未感染mdck
細胞之匯合單層的影響



第2B圖(續)

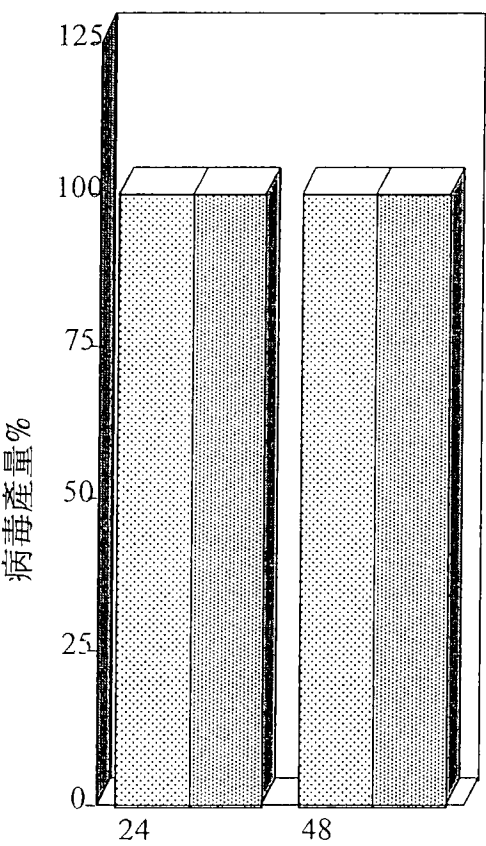


第3圖

白藜蘆醇抗病毒活性之特徵

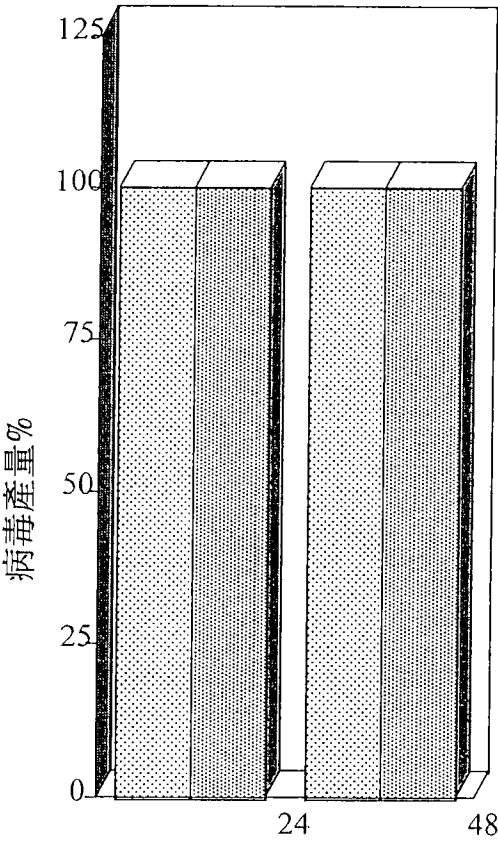
A) 在病毒吸收期間處理

B) 對病毒顆粒的影響



感染組

20 µg/ml

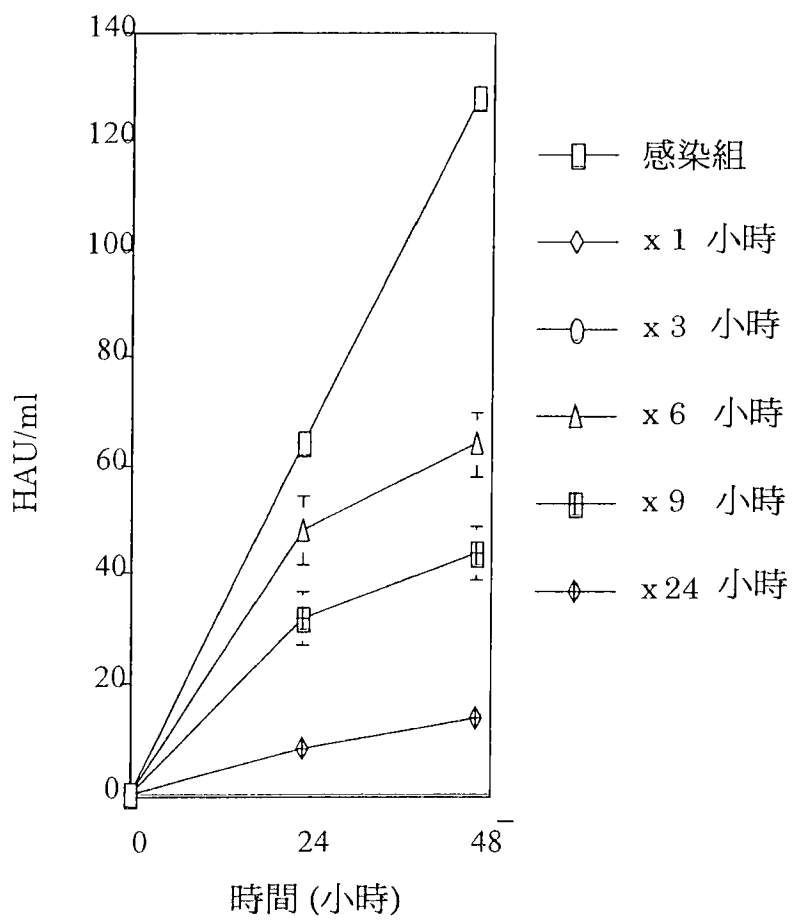


感染組

40 µg/ml

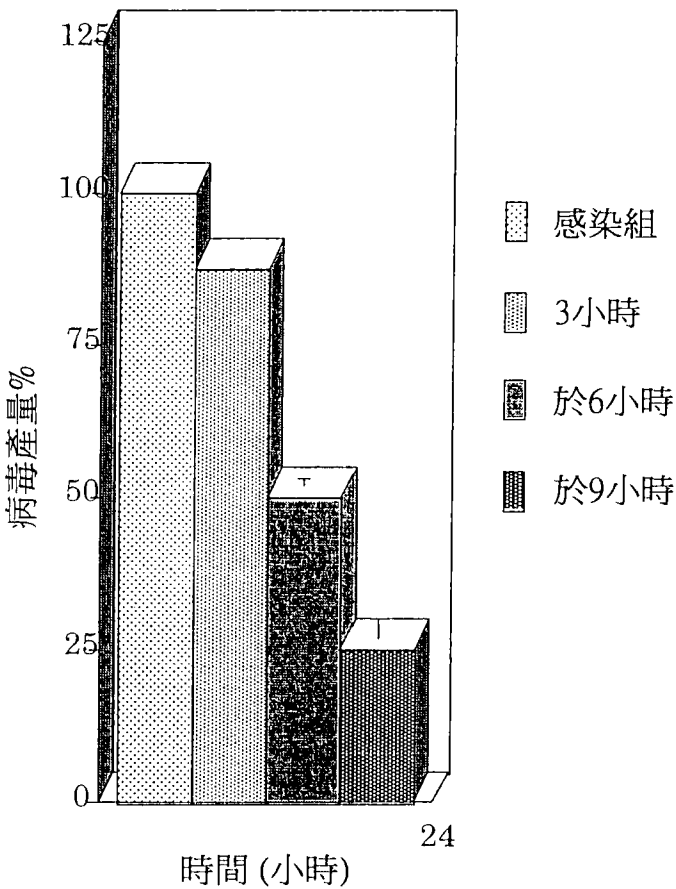
第4A圖

白藜蘆抗病毒活性之特徵



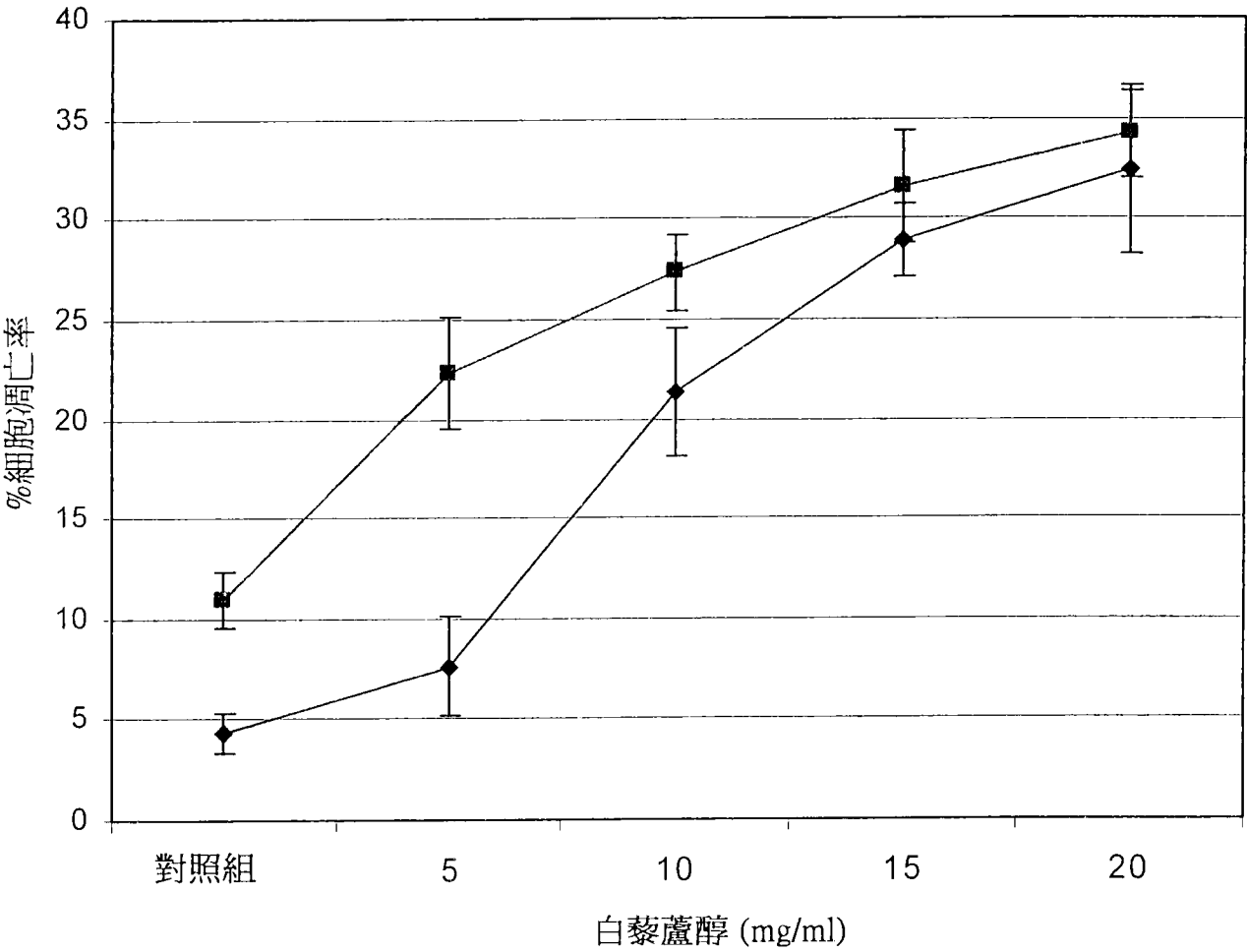
第4B圖

白藜蘆醇抗病毒活性之特徵



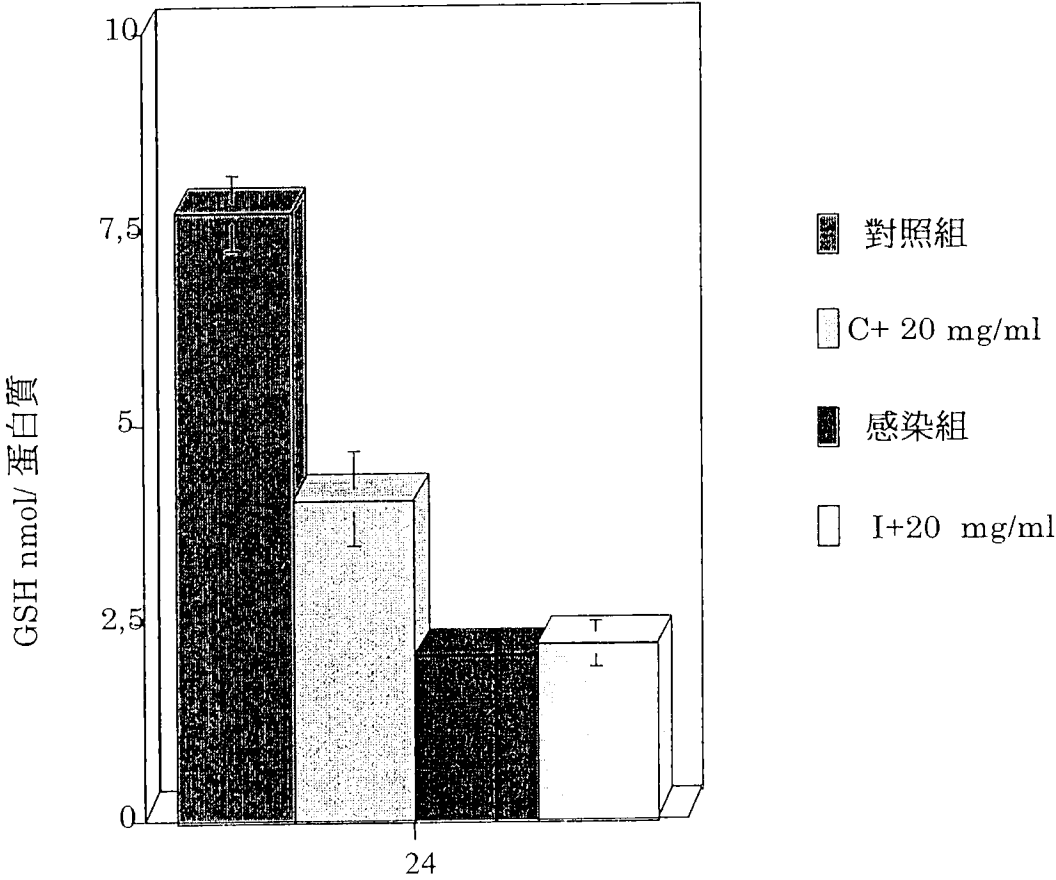
第5圖

白藜蘆醇-處理之MDCK細胞之細胞凋亡現象



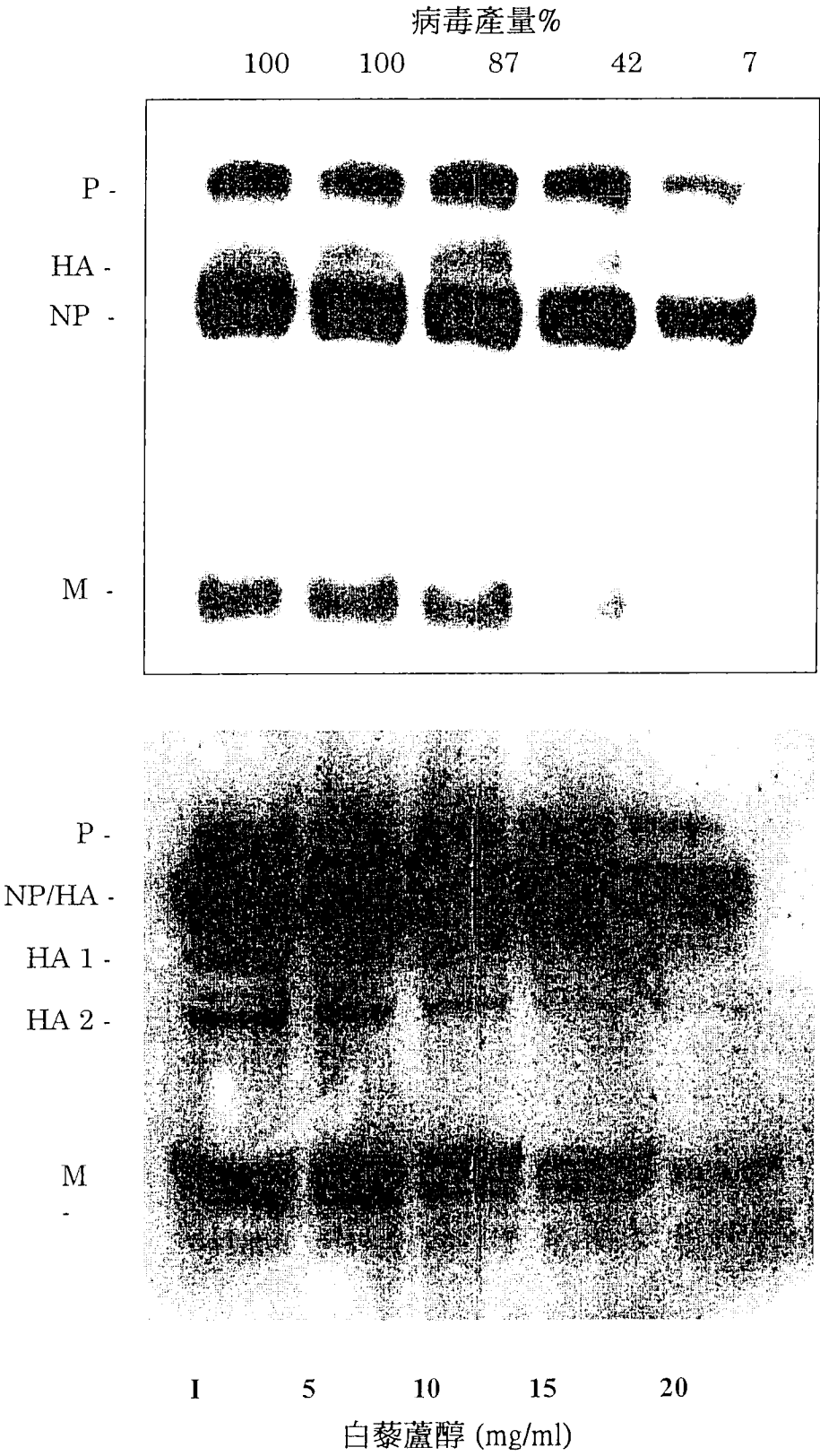
第6圖

白藜蘆醇抗病毒效果與細胞內氧化還原態的相關性



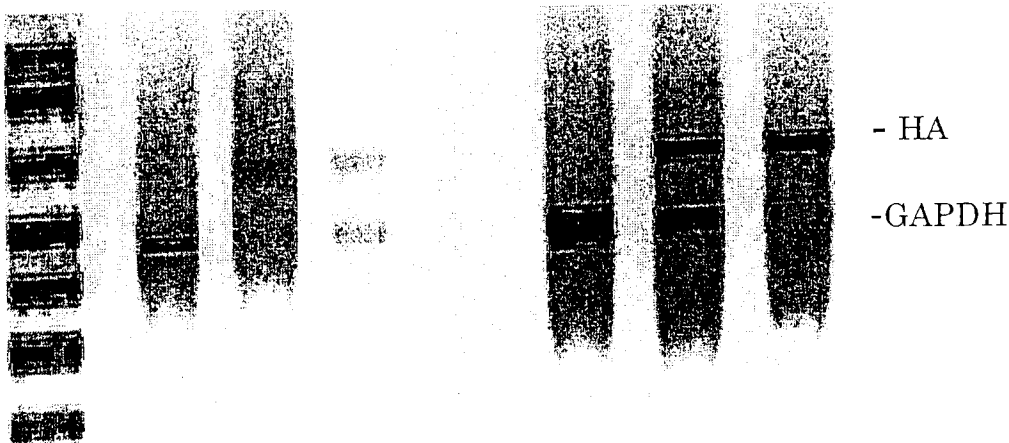
第7圖

白藜蘆醇對流行性感冒pr8
病毒蛋白質之合成的影響



第8圖

後期病毒蛋白質之mRNA之RT-PCR結果

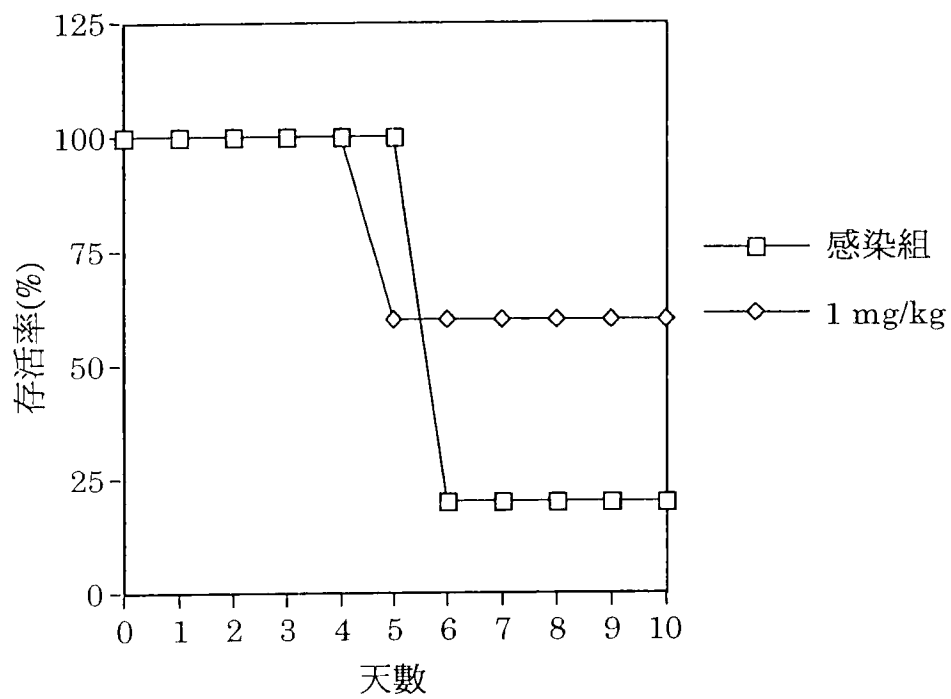


C I I+20 C I I+20

白藜蘆醇 (mg/ml)

第9圖

於流行性感冒pr8病毒感染活
體後投予白藜蘆醇的效果



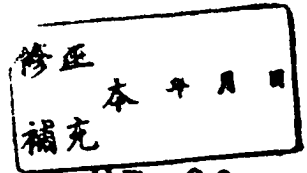
柒、（一）、本案指定代表圖為：第 1 圖

（二）、本代表圖之元件代表符號簡單說明：無

捌、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無

公告本



97.08.11

拾、申請專利範圍

附件 2A：第 92129780 號專利申請案

中文申請專利範圍替換本

民國 97 年 8 月 11 日修正

1. 一種白藜蘆醇作為活性成份於製備對流感病毒複製具有抑制作用的藥物上之用途。
2. 如申請專利範圍第 1 項之用途，其中該病毒為人類流感病毒。
3. 如申請專利範圍第 1 項之用途，其中該藥物係用在獸醫學領域以治療病毒感染。
4. 一種對流感病毒複製具有抑制作用之藥學組成物，其包含有效量之白藜蘆醇及藥學上可接受之載體。
5. 如申請專利範圍第 4 項之藥學組成物，其中該病毒為人類流感病毒。
6. 如申請專利範圍第 4 項之藥學組成物，其係用於獸醫學領域。