



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201602578 A

(43)公開日：中華民國 105 (2016) 年 01 月 16 日

(21)申請案號：103125602

(22)申請日：中華民國 103 (2014) 年 07 月 25 日

(51)Int. Cl.：

*G01N33/574 (2006.01)**A61K45/06 (2006.01)**A61P35/00 (2006.01)**A61P31/12 (2006.01)*

(30)優先權：2013/07/26

歐洲專利局

13178291.4

(71)申請人：安能傑亞生物科學公司 (荷蘭) ENERGEIA BIOSCIENCES B.V. (NL)

荷蘭

(72)發明人：布里維德 寶琳 BREEDVELD, PAULINE (NL)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：24 項 圖式數：32 共 172 頁

(54)名稱

用於鑑定 A B C 轉運子介導之 A T P 釋放之調節劑的方法及該調節劑用於治療疾病之用途
 METHOD FOR IDENTIFYING MODULATORS OF ABC TRANSPORTER-MEDIATED ATP
 RELEASE AND USE OF SAID MODULATORS FOR TREATING DISEASES

(57)摘要

本發明屬於醫藥工業領域且係關於鑑定測試化合物的活體外方法，該等測試化合物能夠藉由抑制或刺激 ATP 結合匣轉運子(ABC 轉運子)介導之 ATP 轉運來調節細胞釋放三磷酸腺苷(ATP)。本發明進一步關於具有用於治療特定疾病之上述能力的化合物。

The present invention belongs to the field of pharmaceutical industry and relates to an in vitro method for identifying test compounds which are capable of modulating adenosine triphosphate (ATP) release from cells by inhibiting or stimulating an ATP-Binding Cassette Transporter (ABC Transporter)-mediated transport of ATP. The invention further relates to compounds having the above capability for treating specific diseases.

指定代表圖：

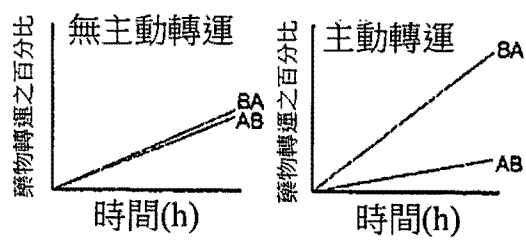
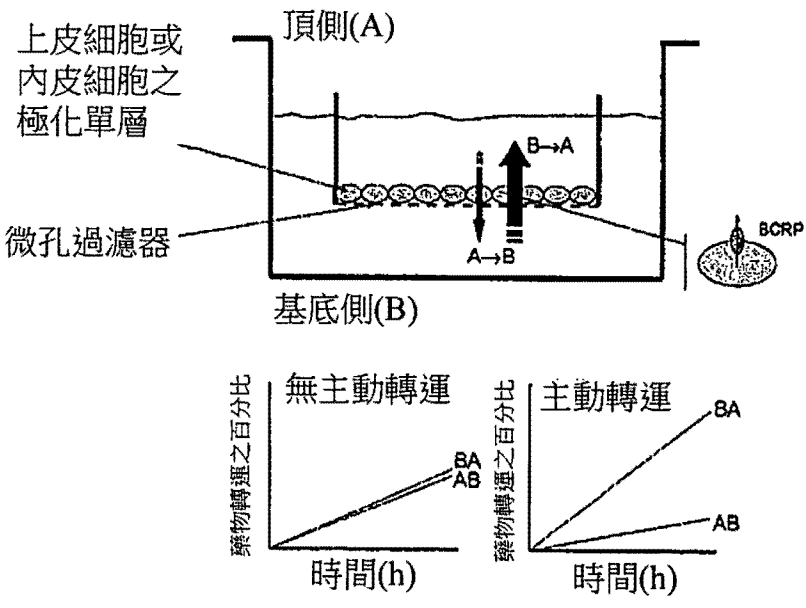


圖6

發明摘要

※ 申請案號：103125602

※ 申請日：103.7.25

G01N 33/574 (2006.01)

※IPC 分類：A61K 45/06 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 31/2 (2006.01)

【發明名稱】

用於鑑定ABC轉運子介導之ATP釋放之調節劑的方法及該調節劑
用於治療疾病之用途

METHOD FOR IDENTIFYING MODULATORS OF ABC

TRANSPORTER-MEDIATED ATP RELEASE AND USE OF SAID
MODULATORS FOR TREATING DISEASES

【中文】

本發明屬於醫藥工業領域且係關於鑑定測試化合物的活體外方法，該等測試化合物能夠藉由抑制或刺激ATP結合匣轉運子(ABC轉運子)介導之ATP轉運來調節細胞釋放三磷酸腺苷(ATP)。本發明進一步關於具有用於治療特定疾病之上述能力的化合物。

【英文】

The present invention belongs to the field of pharmaceutical industry and relates to an in vitro method for identifying test compounds which are capable of modulating adenosine triphosphate (ATP) release from cells by inhibiting or stimulating an ATP-Binding Cassette Transporter (ABC Transporter)-mediated transport of ATP. The invention further relates to compounds having the above capability for treating specific diseases.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（6）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】

用於鑑定ABC轉運子介導之ATP釋放之調節劑的方法及該調節劑
用於治療疾病之用途

METHOD FOR IDENTIFYING MODULATORS OF ABC

TRANSPORTER-MEDIATED ATP RELEASE AND USE OF SAID
MODULATORS FOR TREATING DISEASES

【技術領域】

本發明屬於醫藥工業領域且係關於鑑定測試化合物的活體外方法，該等測試化合物能夠藉由抑制或刺激ATP結合匣轉運子(ABC轉運子)介導之ATP轉運來調節細胞釋放三磷酸腺苷(ATP)。此外，本發明係關於包含用於治療特定疾病之該等化合物的組合物，及包含該等化合物及抗原的醫藥組合物。

【先前技術】

嘌呤核苷酸5'-三磷酸腺苷(ATP)在細胞內的作用已認定多年。ATP為供許多重要反應之能源；當ATP水解為二磷酸腺苷(ADP)或當ATP水解為單磷酸腺苷(AMP)時，大量自由能釋出。細胞具有用於合成ATP及維持或快速恢復細胞內含量的複雜機制，且因此可預期很少會發生ATP釋放至細胞外環境。然而，ATP在嘌呤激導性信號傳導中的作用，亦即ATP直接作用於細胞表面嘌呤激導性P2受體或經由腺苷間接作用於P1受體，已被廣泛接受(1)。此外，在病理生理性條件下，亦即在細胞壓力之情況下，若干細胞類型釋放ATP及其代謝物進入細胞外環境中(2)。

細胞壓力(引起ATP釋放)可由許多因素引起：例如低pH，諸如存

在於腫瘤、內體、溶酶體、粒線體基質，及在酸中毒(酸性壓力)情況下存在於血液中(3)；降低之氧可利用性(缺氧)；因血流中斷所致之去氧(局部缺血)；病原體或毒素侵入細胞(4)；結晶化合物(諸如結晶氧(氫氧)化鋁、膽固醇晶體(5)，及尿酸晶體)；滲透性變化，諸如低張力狀況；活性含氧物過量形成(氧化性壓力)；熱或冷(熱壓力)；機械因素(剪壓力)。

儘管調控細胞ATP通透性之機制受到很大關注，但上皮ATP轉運之分子基礎當前未知。此問題最近亦在關於「在血管壁中ATP釋放及信號傳導之機制」之評論中提出(6)。

ATP釋放機制

細胞外核苷酸及核苷經由細胞表面經由細胞表面嘌呤激導性受體之活化而促進大範圍的生理性反應。在CNS及所有周邊組織中均觀測到針對核苷酸及核苷的反應，表明核苷酸釋放構成許多重要生理學過程的基礎。實際上，所有組織及細胞類型均展現ATP之調控性釋放(1)。

過去已提出及/或研究ATP釋放之若干機制，但迄今尚未得出可靠結論，原因在於已發現相反結果。細胞外ATP之一明顯來源為細胞溶解，此在損傷或發炎期間發生大量細胞死亡時出現。在此情況下，ATP源於發炎位點處之受損細胞、巨噬細胞或淋巴細胞。ATP之非溶胞來源存在於一些分泌細胞類型中，其中分泌性顆粒或微脂粒釋放ATP (6)。然而，即使不發生細胞損傷或微脂粒性胞吐，亦會發生ATP釋放。舉例而言，已提出非溶胞性ATP釋放係經由間隙接點(間隙接點樣)通道(連接蛋白半通道；泛連接蛋白(pannexins))或經由質膜電壓依賴性陰離子通道發生。雖然許多研究因此已提出在生理性及病理生理性條件下發生ATP釋放，但就證明ATP經由所研究之通道釋放而言，一些研究提供的證據與其他研究相左(7、8、9)。此外，有人提出囊腫

性纖維化跨膜傳導調節因子(CFTR; ABCC7)藉由刺激各別ATP釋放通道而促進ATP釋放的作用(10)，但在其他研究中，CFTR不能使ATP傳導(11、12、6)。對於ABC轉運子P-醣蛋白(P-gp; ABCB1)而言，情況亦如此。Abraham等人顯示，P-gp受質與ATP自細胞質遷移至細胞間隙有關，且提出P-gp使ATP與P-gp受質共轉運。如根據藥物阿黴素(doxorubicin)所顯示，ATP與藥物遷移偶聯(13)。然而，ADP及AMP亦均與阿黴素有效偶聯(13)。相反，Grygorczyk及Hanrahan未發現ATP釋放與P-gp (或CFTR)表現有關的證據(11)。此等研究的影響之大，使得ABC轉運子可能涉及細胞釋放ATP的觀點被湮沒。

針對此等爭議發現之一個解釋可能為，ATP因細胞表面處之外部ATP酶而對水解高度敏感。另一解釋可能為，作為量測ATP含量之廣用方法的螢火蟲螢光素酶發光分析為敏感方法，且需要考慮許多變數才能得到可靠結果，例如反應混合物中螢光素濃度須適於細胞中存在之ATP含量。此外，細胞上清液中ATP之定量容易因誘導細胞溶解的刺激而混淆。由於細胞含有毫莫耳濃度量之細胞溶質ATP (約2-10 mM)，因此即使所指定製劑中單個細胞破裂，亦會釋放足量ATP而引發生理性效應(亦即 Ca^{2+} 波傳播)且會使自細胞釋放之ATP之定量及說明顯著偏離。另一解釋可能為對ATP藉由ABC轉運子CFTR及P-gp釋放的研究，例如在中國倉鼠卵巢(CHO)細胞及紅血球(RBC)中，除所關注之轉運子外，此等細胞亦表現多種其他轉運子。然而，此等研究均未顯示ATP藉由轉運子或通道直接轉運，ATP藉由轉運子或通道直接轉運為證明所轉運核苷酸的確為ATP而非ADP或AMP的前提。

最近，指出ABCC7 (CFTR)涉及酸中毒誘導骨骼肌細胞釋放ATP的一項新研究再次強調了ABC轉運子在釋放ATP方面的潛在性。在此研究中，著者提及CFTR在用選擇性CFTR抑制劑CFTR_{inh}172阻斷時及藉由siRNA選擇性阻斷CFTR基因表現時，酸中毒骨骼肌細胞釋放ATP

的量顯著降低(7)。然而，CFTR不太可能為基礎(未刺激) ATP釋放的原因：使用RNA干擾將CFTR基因靜默顯著地降低肌母細胞中的CFTR蛋白表現，但未減少ATP在pH 7.4浸浴介質中的累積。Tu等人的研究證明，CFTR在酸中毒誘導ATP流出中起必需的作用，但其亦未提出CFTR自身是否傳導ATP (7)。

總之，內皮細胞釋放ATP迄今仍為有爭議之題材(6,7) (8)。(非溶胞性) ATP釋放之確切機制至今仍未闡明。

細胞外ATP在發炎及細胞凋亡中的作用

最近，已發現ATP釋放(例如自凋亡、受損及壓力細胞釋放)至細胞外環境為引起NLRP3 (亦稱為NALP3、隱熱蛋白(cryopyrin)、CIAS1或PYPAF1)炎性體活化、卡斯蛋白酶-1活化及IL-1 β 、IL-18及IL-33分泌之事件級聯中的第一個步驟，其為發炎反應之關鍵。卡斯蛋白酶-1之關鍵功能為使發炎細胞激素IL-1 β 及IL-18自其無活性前驅分子(前IL-1 β 及前IL-18)裂解成可自細胞釋放的成熟生物學活性形式(IL-1 β 及IL-18)。IL-1 β 為最強促炎性細胞激素之一，其作用為對感染(14)、損傷及發炎性攻擊產生全身性及局部化反應。此等發炎介體之釋放導致未成熟單核細胞及樹突狀細胞之募集。一經釋放，細胞外ATP便藉由作用於嘌呤激導性受體(亦即P2Y及P2X受體，包括來自樹突狀細胞之P₂X₇受體)而充當向免疫系統報警的危險信號(1、8、15、2)。

ATP不能轉運回至細胞中，而是藉由若干內核苷酸酶快速降解為腺苷後再吸收。此外，腺苷在免疫中具有明確的作用，在免疫中其可藉由以延遲的負反饋方式提供抑制性組織保護信號而對工程改造發炎及免疫反應作出貢獻。

另外，最近已報導，ATP經由嘌呤激導性P2受體活化來調節經活化的調控性CD4⁺ T細胞(其在T細胞介導之發炎中起重要作用)且此調節作用具有劑量依賴性(16)。細胞外ATP之生理性濃度(1-50 nM)不影

響經活化的CD4⁺細胞及Tregs (調控性T細胞)。反之，較高ATP濃度對活化CD4⁺細胞具有雙峰分佈影響。雖然250 nM ATP刺激增殖、細胞激素釋放、黏附分子之表現，但1 mM ATP誘導細胞凋亡且抑制CD4⁺T細胞功能。快速生長腫瘤或超發炎組織中的細胞外ATP濃度大幅度升高(16)。ATP為細胞凋亡之進展所必需的；程式化細胞死亡(細胞凋亡)機制之缺乏在腫瘤發病機制中起重要作用，使得贅生性細胞的存活期超過其正常情況下的預定壽命期，從而在腫瘤塊擴大時防止缺氧及氧化性壓力。因此，細胞外ATP為驅動CD4⁺T細胞活性之關鍵作用者，且調節細胞釋放ATP為治療癌症的細胞凋亡靶向療法且在發炎及腫瘤細胞生長中可具有重要作用。

因此，細胞外ATP及其分解產物腺苷因活化存在於免疫細胞(諸如DC及調控性CD4⁺T細胞)上的NLRP3炎性體及嘌呤激導性受體而牽涉許多發炎/免疫介導性疾病，諸如類風濕性關節炎(17)、動脈粥樣硬化及局部缺血(5)、癌症(15)、哮喘或慢性阻塞性肺病(2)、內毒素血症及敗血症(18)、移植物抗宿主疾病(19)，及神經退化性病變，包括阿茲海默氏病(Alzheimer disease)、抑鬱症(20)，及感染性疾病，諸如瘧疾(21)及流感(22)。

就此而言，WO2005/112947提出ATP用於製造醫藥的用途，該醫藥包含ATP作為活性成分，當投與哺乳動物時，發揮預防或治療性藥理學作用。

雖然脫粒(亦即胞吐)為腎上腺髓質之血小板、神經元及細胞藉以釋放核苷酸的過程，但大多數其他細胞(其細胞質及粒線體而非儲存分子中含有ATP)必須藉由不同機制釋放核苷酸。

總而言之，由上文可知，ATP在諸如發炎及感染性疾病之多種疾病中發揮多重作用，其益處在於作為測試系統能夠鑑定能調節細胞釋放ATP的化合物，從而能夠鑑定潛在免疫調節劑。此等免疫調節性化

合物接著可用於治療與細胞外ATP濃度相關的疾病，例如急性瘧疾感染(71)及癌症。

因此，提供活體外測試系統為本發明之一個目的，該測試系統用於鑑定能夠藉由抑制或刺激ABC轉運子來調節細胞釋放ATP的化合物。

此外，本發明之一個目的為提供具有調節該ATP釋放之潛在能力、用於治療某些ATP相關疾病的化合物組合物。

【發明內容】

本發明提供以下態樣、標的物及較佳實施例，其單獨或組合呈現，從而實現本發明之目的。

1. 一種用於鑑定測試化合物的活體外方法，該等測試化合物能夠藉由抑制或刺激(較佳為抑制)三磷酸腺苷結合匣轉運子(ABC轉運子) ABCG2 (乳癌抗藥性蛋白(BCRP))、ABCC1 (MRP1)、ABCC2 (MRP2)、ABCC3 (MRP3)、ABCC4 (MRP4)、ABCC5 (MRP5)及/或ABCC6 (MRP6)介導之ATP轉運來調節細胞釋放三磷酸腺苷(ATP)，該方法包含以下步驟：

a) 提供包含該ABC轉運子的測試系統，其中此測試系統包括至少兩個隔室且其中該ABC轉運子能夠使ATP在該至少兩個隔室之間轉運，

b) 使步驟a)之測試系統中的至少一個隔室與測試化合物接觸，此接觸的方式及時段應足以使該測試化合物接觸到該ABC轉運子，

其中在測試化合物已接觸到該等隔室中之至少一者之前、期間或之後，將ATP添加至測試系統之至少一個隔室中，ATP可自該隔室轉運至其他隔室，

c) 測定ATP轉運至或自其轉運出之測試系統之至少一個隔室

中的ATP量，

d) 對步驟(c)之ATP測定量與使用同一測試系統所測定的ATP量進行比較

- A) 在測試化合物之不同濃度下；
 - B) 在測試化合物不存在下；及/或
 - C) 在參考化合物而非測試化合物存在下；
- 及

e) 根據(d)中之比較情況推斷出測試化合物是否能夠藉由抑制或刺激(較佳為抑制)該ABC轉運子介導之ATP轉運來調節細胞釋放ATP，

其中欲添加測試化合物之至少該隔室之pH值在添加測試化合物之時間點為約7或低於7。

本發明之活體外方法中使用的ABC轉運子調節劑可為任何ABC轉運子調節劑；例如ABC調節劑轉運子為以下一或多者：

- BCRP、MRP2、MRP3、MRP4、MRP5及/或MRP6；
- BCRP、MRP1、MRP2、MRP3、MRP5及/或MRP6；
- BCRP、MRP1、MRP2、MRP3、MRP4及/或MRP6；
- BCRP、MRP1、MRP2、MRP3及/或MRP6；
- BCRP、MRP1、MRP4、MRP5及/或MRP6；
- BCRP、MRP2、MRP3、MRP5及/或MRP6；
- BCRP、MRP2、MRP3、MRP4及/或MRP6；
- BCRP、MRP2、MRP3及/或MRP6。

在另一實施例中，亦為可能的是測試化合物能夠調節細胞或細胞內結構或胞器(諸如粒線體)釋放ATP。

在一個較佳實施例中，測試系統僅含有指定ABC轉運子，亦即其ATP轉運可藉由測試化合物調節加以影響的ABC轉運子。換言之，在

此較佳實施例中，例如僅存在BCRP，僅存在MRP1，僅存在MRP2，僅存在MRP3，僅存在MRP4，僅存在MRP5，或僅存在MRP6。亦可使用測試系統中包括作為單獨ABC轉運子之上述ABC轉運子之組合的測試系統。

然而，亦可能存在能夠轉運ATP穿越隔室的其他結構/細胞分子，諸如內源性轉運蛋白。在此情況下，熟習此項技術者採取適合的已知措施，以便最終測定之所影響ATP轉運(或至少其大部分)可歸因於所研究之單獨ABC轉運子，及/或能夠轉運ATP的其他結構/細胞分子不再能夠轉運ATP。此例如可在測試期間藉由抑制該等其他結構來達成，例如若存在內源性轉運蛋白P-gp，則添加P-gp抑制劑PSC833(伐司撲達(valspodar))。

在本發明之含義內，術語「測試化合物」表示根據本發明經受測試的任何化合物。較佳測試化合物揭示於下文中。

在本發明之上下文中，術語「約」表示熟習此項技術者所瞭解之仍可確保所述特徵之技術效果的準確度區間。該術語典型地指示相對於指定數值偏離 $\pm 10\%$ ，且較佳偏離 $\pm 5\%$ 。

在本說明書及申請專利範圍中使用術語「包含」的情況下，其不排除其他要素或步驟。為本發明起見，術語「由...組成」視為為術語「包含」之一個較佳實施例。若群在下文中經定義而包含至少某些數目個實施例，則亦瞭解此揭示群視情況僅由此等實施例組成。

在提及單數名詞時使用不定冠詞或定冠詞(例如「一(a/an)」、「該(the)」)的情況下，其包括複數個該名詞，除非另有具體陳述。

術語「隔室」定義測試系統內之一個區段。舉例而言，一個區段可與另一區段藉由空間隔離(例如、細胞層、細胞壁，或用於培養目的之裝置)而隔開。若例如測試系統包含微脂粒，則隔室彼此藉由膜(亦即界定微脂粒內隔室及微脂粒外隔室的微脂粒膜)隔開。若測試

系統包含細胞，則細胞壁界定細胞外隔室及細胞內隔室。此外，若細胞以單層形式存在，則細胞可界定頂端細胞外隔室、底側細胞外隔室及細胞內隔室。

各隔室中可存在不同條件，例如關於所存在介質，或關於pH值的條件。

在本發明之含義中，表述「能夠藉由抑制或刺激ABC轉運子介導之ATP轉運來調節細胞釋放ATP」表示測試化合物中斷ABC轉運子介導之ATP轉運，例如藉由競爭性抑制或別位異構性調節來中斷ABC轉運子介導之ATP轉運，且藉此影響ABC轉運子之功能，以便減少或增強ABC轉運子介導之ATP轉運。

「三磷酸腺苷結合匣轉運子(ABC轉運子)」為蛋白質超家族之成員，該超家族為全部現有門(原核生物至人類)中具有代表性之最大及最多古老家族之一。ABC轉運子為利用三磷酸腺苷(ATP)水解之能量進行某些生物過程(包括各種受質移位穿越膜)的跨膜蛋白。其轉運多種受質(包括代謝產物、脂質及固醇，及藥物)穿越細胞外膜及細胞內膜。蛋白質歸類為ABC轉運子係根據其ATP結合匣(ABC)域之序列及組織。

2. 根據第1項之方法，其中步驟b)中所添加之ATP為經標記之ATP。

3. 根據第2項之方法，其中該經標記之ATP為放射性標記，較佳為 $[^{32}\text{P}] \gamma\text{-ATP}$ 或 $[^3\text{H}] \text{ATP}$ ，較佳為 $[^{32}\text{P}] \gamma\text{-ATP}$ 。

藉由使用經標記之ATP (較佳放射性標記之ATP，諸如 $[^3\text{H}] \text{ATP}$ 或 $[^{32}\text{P}] \gamma\text{-ATP}$ ，更佳使用 $[^{32}\text{P}] \gamma\text{-ATP}$)，可確信所偵測之ATP已經由ABC轉運子、然非經由與其不同的過程或機制(諸如溶胞性ATP釋放)轉運。

4. 根據任一前述項之方法，其中添加測試化合物之至少該隔

室之pH值在步驟b)期間、在添加測試化合物之時間點為約7或低於7。

5. 根據任一前述項之方法，其中在添加測試化合物之時間點，該pH值為約6.8或小於6.8，較佳為約6.5或小於6.5，或處於約7至約4或約6.8至約4之範圍內，或處於約6.5至約4之範圍內，較佳處於約6.5至約5之範圍內。

6. 根據任一前述項之方法，其中測試化合物添加至與ABC轉運子直接接觸的隔室中。

與ABC轉運子直接接觸的隔室可為細胞外、細胞內、微脂粒內及/或微脂粒外隔室。

在一個較佳實施例中，例如若隔室係由微脂粒(諸如微脂粒)構成以便微脂粒內隔室與微脂粒外隔室均存在，則測試化合物僅添加至微脂粒外隔室中。若隔室係由細胞或細胞層(諸如細胞單層)構成，以便細胞外隔室與細胞內隔室均存在，則測試化合物僅添加至細胞外隔室中。

7. 根據任一前述項之方法，其中步驟d)中之參考化合物為已知可抑制或刺激ABC轉運子介導之ATP轉運以便減少或增強ATP轉運的化合物。

已知可抑制ABC轉運子介導之ATP釋放、從而又使得細胞釋放ATP減少的化合物實例為甲胺喋呤(MTX)，或「普拉唑類(prazole class)」之質子泵抑制劑，例如泮托拉唑(pantoprazole)。

8. 根據任一前述項之方法，其中該方法係在缺氧下進行，其中該缺氧特徵較佳為氧氣含量在0至7% O₂範圍內，較佳在0至5% O₂範圍內，或較佳在0.5%至1% O₂範圍內。

9. 根據任一前述項之方法，其中在步驟b)中，測試化合物係以約0.1 nM至約10 mM之濃度、較佳以約0.1 nM至約1 mM之濃度、更佳以約0.1 nM至約500 μM之濃度、甚至更佳以0.1 nM至約100 μM之濃

度與測試系統中之至少一個隔室接觸。

10. 根據任一前述項之方法，其中在步驟(e)中，若滿足以下條件，則推斷出測試化合物能夠藉由抑制或刺激第1項中之ABC轉運子BCRP而調節細胞釋放ATP：

I) 相較於在測試化合物之較低濃度下、測試系統之相應隔室中之ATP測定量，在測試化合物之較高濃度下，ATP所轉運至其中之至少一個隔室中的ATP測定量增加或減少，或ATP自其中轉運出之至少一個隔室中的ATP測定量增加或減少；

II) 相較於在測試化合物不存在下、測試系統之相應隔室中之ATP測定量，在測試化合物存在下，ATP所轉運至其中之至少一個隔室中的ATP測定量增加或減少，或ATP自其中轉運出之至少一個隔室中的ATP測定量增加或減少；及/或

III) 相較於在參考化合物不存在下、測試系統之相應隔室中之ATP測定量，在參考化合物存在下，ATP所轉運至其中之至少一個隔室中的ATP測定量增加或減少，或ATP自其中轉運出之至少一個隔室中的ATP測定量增加或減少。

11. 根據任一前述項之方法，其中若ATP轉運至其中之至少一個隔室中的ATP測定量減少，其中該減少幅度較佳為25%或大於25%，更佳為30%或大於30%，且/或若ATP自其中轉運出之至少一個隔室中的ATP測定量增加，其中該增加幅度較佳為25%或大於25%，較佳為30%或大於30%，則該測試化合物歸類為ATP釋放抑制劑，且

其中若ATP轉運至其中之至少一個隔室中的ATP測定量增加，其中該增加幅度較佳為25%或大於25%，更佳為30%或大於30%，且/或若ATP自其中轉運出之至少一個隔室中的ATP測定量減少，其中該減少幅度較佳為25%或大於25%，更佳為30%或大於30%，則該測試化合物歸類為ATP釋放刺激劑。

當測定刺激百分比時，較佳使用如第1(d)(B)項中所定義之方法。

12. 根據任一前述項之方法，其中步驟a)之該測試系統穩定表現ABC轉運子，較佳為過度表現ABC轉運子，且/或其中步驟b)係藉由添加該測試化合物至該等隔室之至少一者中來進行。

13. 根據任一前述項之方法，其中所添加之ATP濃度處於約0.1 nM至約8 mM範圍內，較佳處於約0.1 nM至約1 μ M範圍內，及約100 μ M至約8 mM範圍內。

舉例而言，若需要測試對低劑量ATP的影響，則所添加ATP在約0.1 nM至約1 μ M範圍內，且若需要測試對高劑量ATP的影響，則所添加ATP在約100 μ M至約8 mM範圍內。

14. 根據任一前述項之方法，其中步驟(b)之時段在熟習此項技術者已知的適合時段範圍內，且適合時段視所使用的系統及細胞類型而定，該時段較佳在0.1分鐘至72小時或甚至長於72小時之範圍內，在0.1分鐘至48小時或24小時範圍內。

若使用例如包含膜微脂粒或細胞單層的測試系統，則步驟b)之時段範圍為0.1分鐘至4小時，較佳為0.1分鐘至2小時。

15. 根據任一前述項之方法，其中在步驟(d)中，測定經標記之ATP量係在添加經標記之ATP之後的一或多個時間點進行，在該等時間點已發生可量測的ATP轉運。

16. 根據任一前述項之方法，其中該測試系統包含：

(i) 較佳具有由內向外的取向、包含該ABC轉運子、較佳穩定表現、更佳穩定地過度表現該ABC轉運子的膜微脂粒，諸如利用昆蟲細胞(諸如Sf9昆蟲細胞)或腎臟細胞(諸如HEK293或MDCKII細胞)製備的膜微脂粒，較佳其中在步驟(c)中，測定經標記之ATP量係藉由分離該等膜微脂粒且測定吸收至且包含於該等所分離膜微脂粒中之經標記

之ATP量來進行；

(ii) 包含該ABC轉運子、較佳穩定表現、更佳穩定地過度表現該ABC轉運子的極化內皮細胞單層，諸如MDCKII細胞或LLC-PK1細胞，或豬或大鼠腦內皮細胞與大鼠初級星形膠質細胞(例如CTX-TNA2細胞株)之共培養物；或

(iii) 較佳表現、更佳過度表現該ABC轉運子的細胞，包含諸如側群(SP)幹細胞、較佳為造血幹細胞(HSC)之SP或人類神經膠母細胞瘤細胞株之側群，諸如U87-MG；或人類或動物(諸如牛、豬或啮齒動物)腦毛細血管內皮細胞(BCEC)，或膠質細胞，諸如星形膠質細胞，或免疫細胞，諸如樹突狀細胞、天然殺手細胞、T細胞、巨噬細胞、血小板或紅血球，

較佳地，其中在步驟(c)中，測定經標記之ATP量係如下進行：獲取經標記之ATP轉運至其中及/或經標記之ATP自其中轉運出之至少一個隔室的等分試樣，且測定該等分試樣中之經標記之ATP量。

藉由使用膜微脂粒系統，可以僅測定需要抑制或刺激之ABC轉運子的方式建構(設計)及製備微脂粒。換言之，可排除可能會影響測試結果的其他結構。

藉由使用包含細胞單層或細胞的系統，可以更實際的方式模擬活體內情形，因為使用細胞(或其單層)比較接近於活體內情形。

在一個較佳實施例中，測試系統包含如上文16. (i)中所定義之膜微脂粒。

17. 根據任一前述項之方法，其中待測試之物質代表源於植物或源於植物之任何適合部分的草本化合物，該草本化合物較佳代表植物或植物之任何適合部分的萃取物，較佳乾燥萃取物。

在另一個實施例中，亦為較佳的是，草本化合物獲自植物或植物之任何適合部分的萃取物，較佳乾燥萃取物。此萃取物可為例如板

藍根(*Radix isatidis*)萃取物。

亦為可能的是，草本化合物並非植物之任何適合部分的萃取物，而是草本化合物以不同方式自植物之任何適合部分獲得，亦即不藉由萃取獲得。

在本發明之含義內，「植物之適合部分」為可經萃取以便獲得草本化合物的任何部分，或可以其他方式用於獲得草本化合物的任何部分。此等部分可為例如根、果、葉、果實及其類似物。

18. 根據任一前述項之方法，其中待測試之化合物係選自傳統草藥製品之群，諸如中藥(Traditional Chinese Medicine)及印度草藥(Ayurvedic Medicine)。

在另一個實施例中，待測試之化合物係選自以下文獻中所列之中藥植物之群："Chinese Herbal Medicine. Materia Medica, 第3版, Bensky, Claver, Stöger, Eastland Press" 第1189至1217頁(Herb and Formula Index), Pinyin-Pharmaceutical cross reference第1219-1242頁, English-Pharmaceutical Cross Reference第1243至1251頁, Japanese-Pharmaceutical Cross Reference第1253至1257頁, Korean Cross Reference第1259至1263頁, Botanical, Zoological, and Mineral Index第1265至1279頁。

19. 根據任一前述項之方法，其中待測試之化合物源於植物或植物之部分，該植物選自由以下組成之群：

- 丹參 (*Salvia miltiorrhiza* Bge.)；較佳為丹參根 (*Salvia miltiorrhiza* Radix) (中國人稱丹參)；

- 青黛(*Indigo naturalis*) (中國人稱青黛) (種：菘藍(*Isatidis tinctoria* Fort.)、木藍(*Indigofera tinctoria* L.)、南板藍根(*Baphicacanthus cusia* (Nees) Bremek) (亦稱為南方板藍根，中國人稱「南板藍根」)，及蓼藍(*Polygonum tinctorium* Ait.)，較佳為菘藍

(*Isatis indigotica* Fort.)，較佳為板藍根或大青葉(*Isatidis Folium*)；中國人將菰藍之乾燥葉稱為「大青葉」且將菰藍之乾燥根稱為「[北]板藍根」；

- 炮彈樹(*Couroupita guianensis Aubl.*) (玉蕊科(*Lecythidaceae*))，較佳為炮彈樹的葉或花；

- 來自苦木科(*Simaroubaceae*)的種，諸如鴉膽子(*Brucea javanica* (L.))；

- 及來自益母草屬(*Leonurus*)的種，諸如益母草(*Leonurus heterophyllus* Sweet)或唇形益母草(*Leonurus japonicas*)或歐益母草(*Leonurus cardiaca*) (英文亦稱*Herba Leonuri*或*Chinese motherwort*；中國人稱益母草)；

- 當歸，較佳為當歸根(中國人稱當歸)；及/或

- 黃耆根(*Astragali Radix*) (中國人稱黃耆)。

20. 根據第17項至第19項中任一項之方法，其中該草本化合物獲自(含水)醇萃取物，較佳70%至100%甲醇或乙醇。

21. 根據第17項至第20項中任一項之方法，其中該草本化合物為親水性酚酸或生物鹼化合物，或親脂性雙萜或三萜化合物。

22. 根據第17項至第21項中任一項之方法，其中該草本化合物係選自由以下組成之群：

丹參酚酸(*salvianolic acids*)，諸如親水性丹參酚酸A、B、C、D、E；較佳為諸如丹參酚酸A或B之丹參酚酸；

迷迭香酸(*rosmarinic acid*)或衍生物；

紫草酸(*lithospermic acids*)，較佳為親水性紫草酸，更佳為紫草酸鎂，諸如紫草酸鎂B；

原兒茶酸(*protocatechuic acids*)，較佳為親水性原兒茶酸，較佳為原兒茶醛；

丹參酮(tanshinones)，較佳為雙萜丹參酮，較佳為親脂性雙萜丹參酮，諸如隱丹參酮、丹參酮I、丹參酮IIA、丹參酮IIB、二氫丹參酮；

生物鹼，較佳為親水性生物鹼，諸如吲哚生物鹼靛紅(indirubin)及靛紅衍生物，或益母草鹼(leonurine)或水蘇鹼(stachydrine)；

三萜，較佳為親脂性三萜，更佳為苦木苦味素(quassinoids)；及三萜皂素(triterpenesaponins)，諸如黃耆皂苷I至VIII (astragaloside I-VIII)；及/或

苯酞，諸如Z-川芎內酯(Z-ligustilide)。

草本化合物較佳選自由丹參酚酸B、紫草酸鎂B、丹參酮IIA及靛紅及靛紅衍生物組成之群；草本化合物更佳選自由丹參酚酸B、紫草酸鎂B及靛紅組成之群

在另一個實施例中，草本化合物係選自如圖10中所定義之化合物之群(A)至(G)中之任一者，或全部)。

23. 根據任一前述項之方法，其中經調節之ATP釋放為非溶胞性ATP釋放。

溶胞性ATP釋放為例如經由胞吐、伴隨細胞膜之破裂所達成的ATP釋放。然而此溶胞性ATP釋放不同於在本發明之含義中提及的ATP釋放；在本文中，ATP釋放係經由ABC轉運子介導。

熟習此項技術者知悉須如何處理用於本發明之測試系統的組分(例如微脂粒，或細胞或細胞層)以避免溶胞性ATP釋放。

24. 選自由以下組成之群之化合物組合：

a) (i)一或多種抗癌藥，較佳選自由以下組成之群：替莫唑胺(temozolomide)、貝伐珠單抗(bevacizumab)、巴維昔單抗(bavituximab)、艾匹木單抗(ipilimumab)、尼妥珠單抗(nimotuzumab)、利妥昔單抗(rituximab)、吉妥珠單抗(gemtuzumab)、

阿來組單抗(alemtuzumab)、曲妥珠單抗(trastuzumab)、舒尼替尼(sunitinib)、索拉非尼(sorafenib)、吉非替尼(gefitinib)及埃羅替尼(erlotinib)、吉西他濱(gemcitabine)、依託泊苷(etoposide)，更佳選自由替莫唑胺、貝伐珠單抗、舒尼替尼及索拉非尼組成之群；

(ii)空泡ATP酶(v-ATP酶)抑制劑，較佳為質子泵抑制劑，較佳選自普拉唑之群，更佳為選自由以下組成之群的普拉唑：泮托拉唑、奧美拉唑(omeprazole)、蘭索拉唑(lansoprazole)、右蘭索拉唑(dexlansoprazole)、雷貝拉唑(rabeprazole)、艾美拉唑(esomeprazole)及泰妥拉唑(tenatoprazole)；較佳選自由奧美拉唑、蘭索拉唑、右蘭索拉唑、雷貝拉唑、艾美拉唑、泰妥拉唑組成之群；甚至更佳地，普拉唑為艾美拉唑；及視情況存在之

(iii)能夠藉由抑制或刺激、較佳抑制三磷酸腺苷結合匣轉運子(ABC轉運子)乳癌抗藥性蛋白(BCRP；ABCG2)、MRP1、MRP2、MRP3、MRP4、MRP5及/或MRP6介導之ATP轉運來調節細胞釋放三磷酸腺苷(ATP)的化合物，較佳為一或多種具有該特性的草本化合物；更佳為選自第18項、第19項、第21項及第22項中任一項、更佳第22項所定義之草本化合物群的一或多種草本化合物，甚至更佳為丹參酚酸B、紫草酸鎂B或靛紅；

b) (i)一或多種抗癌藥，較佳選自如第24 a) (i)項中所定義之群，更佳選自由替莫唑胺、貝伐珠單抗、舒尼替尼及索拉非尼組成之群，及

(ii)能夠藉由抑制或刺激、較佳抑制三磷酸腺苷結合匣轉運子(ABC轉運子)乳癌抗藥性蛋白(BCRP；ABCG2)、MRP1、MRP2、MRP3、MRP4、MRP5及/或MRP6介導之ATP轉運來調節細胞釋放三磷酸腺苷(ATP)的化合物，較佳為一或多種具有該特性的草本化合物；更佳為選自如第18項、第19項、第21項及第22項中任一項、更佳

第22項所定義之草本化合物群之一或多種草本化合物，甚至更佳為丹參酚酸B、紫草酸鎂B或靛紅；

c) (i)一或多種抗癌藥，較佳選自如第24 a) (i)項中所定義之群，更佳選自由替莫唑胺、貝伐珠單抗、舒尼替尼及索拉非尼組成之群；

(ii) ATP；及視情況存在之

(iii)能夠藉由抑制或刺激、較佳抑制三磷酸腺苷結合匣轉運子(ABC轉運子)乳癌抗藥性蛋白(BCRP；ABCG2)、MRP1、MRP2、MRP3、MRP4、MRP5及/或MRP6介導之ATP轉運來調節細胞釋放三磷酸腺苷(ATP)的化合物，較佳為一或多種具有該特性的草本化合物；更佳為選自第18項、第19項、第21項及第22項中任一項、更佳第22項所定義之草本化合物群之一或多種草本化合物，甚至更佳為丹參酚酸B、紫草酸鎂B或靛紅；

d) (i)甲胺喋呤(methotrexate)、伊馬替尼(imatinib)及/或拓撲替康(topotecan)，及

(ii)能夠藉由抑制或刺激、較佳抑制三磷酸腺苷結合匣轉運子(ABC轉運子)乳癌抗藥性蛋白(BCRP；ABCG2)、MRP1、MRP2、MRP3、MRP4、MRP5及/或MRP6介導之ATP轉運來調節細胞釋放三磷酸腺苷(ATP)的化合物，較佳為一或多種具有該特性的草本化合物；更佳為選自如第18項、第19項、第21項及第22項中任一項、更佳第22項所定義之草本化合物群之一或多種草本化合物，甚至更佳為丹參酚酸B、紫草酸鎂B或靛紅；及視情況存在之

(iii)空泡ATP酶(v-ATP酶)抑制劑，較佳為質子泵抑制劑，較佳選自普拉唑之群，普拉唑更佳選自由奧美拉唑、蘭索拉唑、右蘭索拉唑、雷貝拉唑、艾美拉唑及泰妥拉唑組成之群；甚至更佳地，普拉唑為艾美拉唑；

e) (i) ATP，及

(ii)能夠藉由抑制或刺激、較佳抑制三磷酸腺苷結合匣轉運子(ABC轉運子)乳癌抗藥性蛋白(BCRP；ABCG2)、MRP1、MRP2、MRP3、MRP4、MRP5及/或MRP6介導之ATP轉運來調節細胞釋放三磷酸腺苷(ATP)的化合物，較佳為一或多種具有該特性的草本化合物；更佳為選自如第18項、第19項、第21項及第22項中任一項、更佳第22項所定義之草本化合物群的一或多種草本化合物，甚至更佳為丹參酚酸B、紫草酸鎂B或靛紅；或

(ii)空泡ATP酶(v-ATP酶)抑制劑，較佳為質子泵抑制劑，較佳選自普拉唑之群，普拉唑更佳選自由奧美拉唑、蘭索拉唑、右蘭索拉唑、雷貝拉唑、艾美拉唑及泰妥拉唑組成之群；甚至更佳地，普拉唑為艾美拉唑；

f) (i)樹突狀細胞或樹突狀細胞疫苗，及

(ii)能夠藉由抑制或刺激、較佳抑制三磷酸腺苷結合匣轉運子(ABC轉運子)乳癌抗藥性蛋白(BCRP；ABCG2)、MRP1、MRP2、MRP3、MRP4、MRP5及/或MRP6介導之ATP轉運來調節細胞釋放三磷酸腺苷(ATP)的化合物，較佳為一或多種具有該特性的草本化合物；更佳為選自如第18項、第19項、第21項及第22項中任一項、更佳第22項所定義之草本化合物群的一或多種草本化合物，甚至更佳為丹參酚酸B、紫草酸鎂B或靛紅；及

g) (i)樹突狀細胞或樹突狀細胞疫苗，

(ii)空泡ATP酶(v-ATP酶)抑制劑，較佳為質子泵抑制劑，較佳選自普拉唑之群，普拉唑更佳選自由泮托拉唑、奧美拉唑、蘭索拉唑、右蘭索拉唑、雷貝拉唑、艾美拉唑及泰妥拉唑組成之群；或甚至更佳選自由奧美拉唑、蘭索拉唑、右蘭索拉唑、雷貝拉唑、艾美拉唑及泰妥拉唑組成之群；普拉唑甚至最佳為艾美拉唑；

h) (i)樹突狀細胞或樹突狀細胞疫苗，

(ii)空泡ATP酶(v-ATP酶)抑制劑，較佳為質子泵抑制劑，較佳選自普拉唑之群，普拉唑更佳選自由奧美拉唑、蘭索拉唑、右蘭索拉唑、雷貝拉唑、艾美拉唑及泰妥拉唑組成之群；甚至更佳地，普拉唑為艾美拉唑；及

(iii)能夠藉由抑制或刺激、較佳抑制三磷酸腺苷結合匣轉運子(ABC轉運子)乳癌抗藥性蛋白(BCRP；ABCG2)、MRP1、MRP2、MRP3、MRP4、MRP5及/或MRP6介導之ATP轉運來調節細胞釋放三磷酸腺苷(ATP)的化合物，較佳為一或多種具有該特性的草本化合物；更佳為選自第18項、第19項、第21項及第22項中任一項、更佳第22項所定義之草本化合物群的一或多種草本化合物，甚至更佳為丹參酚酸B、紫草酸鎂B或靛紅；

i) (i)能夠藉由抑制或刺激、較佳抑制三磷酸腺苷結合匣轉運子(ABC轉運子)乳癌抗藥性蛋白(BCRP；ABCG2)、MRP1、MRP2、MRP3、MRP4、MRP5及/或MRP6介導之ATP轉運來調節細胞釋放三磷酸腺苷(ATP)的化合物，較佳為一或多種具有該特性的草本化合物；更佳為選自如第18項、第19項、第21項及第22項中任一項、更佳第22項所定義之草本化合物群的一或多種草本化合物，甚至更佳為丹參酚酸B、紫草酸鎂B或靛紅；及視情況存在之

(ii)空泡ATP酶(v-ATP酶)抑制劑，較佳為質子泵抑制劑，較佳選自普拉唑之群，普拉唑更佳選自由奧美拉唑、蘭索拉唑、右蘭索拉唑、雷貝拉唑、艾美拉唑及泰妥拉唑組成之群，甚至更佳地，普拉唑為艾美拉唑；或

(iii) ATP

該組合用於治療發生於組織中之癌症，其中ATP轉運受該(等)化合物抑制或刺激(較佳為抑制)的對應ABC轉運子調節劑相較於對應的

健康、非病理性組織而言被表現，較佳過度表現，

較佳用於治療腦腫瘤及/或腦轉移，

限制條件為上述所有子項中，(i)、(ii)及(iii) (若存在)之化合物分別不同。

表現ABC轉運子的對應組織描述於本文別處。

能夠調節細胞釋放三磷酸腺苷(ATP)的化合物能夠調節ABC轉運子調節劑，其中該ABC調節劑轉運子為以下一或多者：

- BCRP、MRP2、MRP3、MRP4、MRP5及/或MRP6；
- BCRP、MRP1、MRP2、MRP3、MRP5及/或MRP6；
- BCRP、MRP1、MRP2、MRP3、MRP4及/或MRP6；
- BCRP、MRP1、MRP2、MRP3及/或MRP6；
- BCRP、MRP1、MRP4、MRP5及/或MRP6；
- BCRP、MRP2、MRP3、MRP5及/或MRP6；
- BCRP、MRP2、MRP3、MRP4及/或MRP6；
- BCRP、MRP2、MRP3及/或MRP6。

表述「選自由...組成之群之化合物組合」係指第24. a)至i)項中相應之一或多者之選擇。

在另一個實施例中，化合物組合係選自由以下組成之群：

a) (i)一或多種抗癌藥，及

(ii)空泡ATP酶(v-ATP酶)抑制劑，較佳為質子泵抑制劑，較佳選自普拉唑之群，普拉唑更佳選自由奧美拉唑、蘭索拉唑、右蘭索拉唑、雷貝拉唑、艾美拉唑及泰妥拉唑組成之群，甚至更佳地，普拉唑為艾美拉唑；及視情況存在之

(iii)能夠藉由抑制或刺激三磷酸腺苷結合匣轉運子(ABC轉運子)乳癌抗藥性蛋白(BCRP；ABCG2)介導之ATP轉運來調節細胞釋放三磷酸腺苷(ATP)的化合物；

b) (i)一或多種抗癌藥，及

(ii)能夠藉由抑制或刺激三磷酸腺苷結合匣轉運子(ABC轉運子)乳癌抗藥性蛋白(BCRP；ABCG2)介導之ATP轉運來調節細胞釋放三磷酸腺苷(ATP)的化合物；

c) (i)一或多種抗癌藥；

(ii) ATP；及視情況存在之

(iii)能夠藉由抑制或刺激三磷酸腺苷結合匣轉運子(ABC轉運子)乳癌抗藥性蛋白(BCRP；ABCG2)介導之ATP轉運來調節細胞釋放三磷酸腺苷(ATP)的化合物；

d) (i)甲胺喋呤、伊馬替尼及/或拓撲替康，及

(ii)能夠藉由抑制或刺激三磷酸腺苷結合匣轉運子(ABC轉運子)乳癌抗藥性蛋白(BCRP；ABCG2)介導之ATP轉運來調節細胞釋放三磷酸腺苷(ATP)的化合物；及視情況存在之

(iii)空泡ATP酶(v-ATP酶)抑制劑，較佳為質子泵抑制劑，較佳選自普拉唑之群，普拉唑更佳選自由奧美拉唑、蘭索拉唑、右蘭索拉唑、雷貝拉唑、艾美拉唑及泰妥拉唑組成之群；甚至更佳地，普拉唑為艾美拉唑；

e) (i) ATP，及

(ii)能夠藉由抑制或刺激三磷酸腺苷結合匣轉運子(ABC轉運子)乳癌抗藥性蛋白(BCRP；ABCG2)介導之ATP轉運來調節細胞釋放三磷酸腺苷(ATP)的化合物；

f) (i)樹突狀細胞或樹突狀細胞疫苗，及

(ii)能夠藉由抑制或刺激三磷酸腺苷結合匣轉運子(ABC轉運子)乳癌抗藥性蛋白(BCRP；ABCG2)介導之ATP轉運來調節細胞釋放三磷酸腺苷(ATP)的化合物；

g) (i)樹突狀細胞或樹突狀細胞疫苗，及

(ii)空泡ATP酶(v-ATP酶)抑制劑，較佳為質子泵抑制劑，較佳選自普拉唑之群，普拉唑更佳選自由奧美拉唑、蘭索拉唑、右蘭索拉唑、雷貝拉唑、艾美拉唑及泰妥拉唑組成之群；甚至更佳地，普拉唑為艾美拉唑；

h) (i)能夠藉由抑制或刺激、較佳抑制三磷酸腺苷結合匣轉運子(ABC轉運子)乳癌抗藥性蛋白(BCRP；ABCG2)介導之ATP轉運來調節細胞釋放三磷酸腺苷(ATP)的化合物，較佳為一或多種具有該特性的草本化合物；更佳為選自第18項、第19項、第21項及第22項中任一項、更佳第22項所定義之草本化合物群的一或多種草本化合物，甚至更佳為丹參酚酸B、紫草酸鎂B或靛紅；及視情況存在之

(ii)空泡ATP酶(v-ATP酶)抑制劑，較佳為質子泵抑制劑，較佳選自普拉唑之群，更佳為選自由以下組成之群之普拉唑：奧美拉唑、蘭索拉唑、右蘭索拉唑、雷貝拉唑、艾美拉唑及泰妥拉唑；甚至更佳地，普拉唑為艾美拉唑；

該組合係用於治療發生於組織中之癌症，其中ATP轉運受該(等)化合物抑制或刺激的對應ABC轉運子被表現，

限制條件為上述所有子項中，(i)、(ii)及(iii) (若存在)之化合物分別不同。

表述「選自由...組成之群之化合物組合」係指a)至h)中相應一或多者之選擇。

25. 選自由以下組成之群之化合物組合：

aa) (i)替莫唑胺；及

(ii)空泡ATP酶(v-ATP酶)抑制劑，較佳為質子泵抑制劑，較佳選自普拉唑之群，更佳選自由奧美拉唑、蘭索拉唑、右蘭索拉唑、雷貝拉唑、艾美拉唑及泰妥拉唑組成之群；

bb) (i)替莫唑胺；

(ii)空泡ATP酶(v-ATP酶)抑制劑，較佳為質子泵抑制劑，較佳選自普拉唑之群，更佳選自由奧美拉唑、蘭索拉唑、右蘭索拉唑、雷貝拉唑、艾美拉唑及泰妥拉唑組成之群；及

(iii)選自如第18項、第19項、第21項及第22項中任一項、較佳第22項所定義之群的草本化合物，甚至更佳為丹參酚酸B或紫草酸鎂B或靛紅；

cc) (i)替莫唑胺；及

(ii)選自如第18項、第19項、第21項及第22項中任一項、較佳第22項所定義之群的草本化合物，甚至更佳為丹參酚酸B或紫草酸鎂B或靛紅；

dd) (i)替莫唑胺；及

(ii) ATP；

ee) (i)替莫唑胺；

(ii) ATP；及

(iii)選自如第18項、第19項、第21項及第22項中任一項、較佳第22項所定義之群的草本化合物，甚至更佳為丹參酚酸B或紫草酸鎂B或靛紅；

ff) (i)甲胺喋呤；及

(ii)選自如第18項、第19項、第21項及第22項中任一項、較佳第22項所定義之群的草本化合物，甚至更佳為丹參酚酸B或紫草酸鎂B或靛紅；

gg) (i)甲胺喋呤；

(ii)選自如第18項、第19項、第21項及第22項中任一項、較佳第22項所定義之群的草本化合物，甚至更佳為丹參酚酸B或紫草酸鎂B或靛紅；及

(iii)空泡ATP酶(v-ATP酶)抑制劑，較佳為質子泵抑制劑，較佳選

自普拉唑之群，更佳為選自由以下組成之群的普拉唑：奧美拉唑、蘭索拉唑、右蘭索拉唑、雷貝拉唑、艾美拉唑及泰妥拉唑；甚至更佳地，普拉唑為艾美拉唑；

hh) (i) ATP；

(ii)選自如第18項、第19項、第21項及第22項中任一項、較佳第22項所定義之群的草本化合物，甚至更佳為丹參酚酸B或紫草酸鎂B或靛紅；

ii) (i) ATP；及

(ii)空泡ATP酶(v-ATP酶)抑制劑，較佳為質子泵抑制劑，較佳選自普拉唑之群，更佳選自由奧美拉唑、蘭索拉唑、右蘭索拉唑、雷貝拉唑、艾美拉唑及泰妥拉唑組成之群；

jj) (i)樹突狀細胞或樹突狀細胞疫苗；及

(ii)選自如第18項、第19項、第21項及第22項中任一項、較佳第22項所定義之群的草本化合物，更佳為丹參酚酸B或紫草酸鎂B或靛紅；及

kk) (i)樹突狀細胞或樹突狀細胞疫苗，及

(ii)空泡ATP酶(v-ATP酶)抑制劑，較佳為質子泵抑制劑，較佳選自普拉唑之群，更佳選自由奧美拉唑、蘭索拉唑、右蘭索拉唑、雷貝拉唑、艾美拉唑及泰妥拉唑組成之群；

ll) (i)樹突狀細胞或樹突狀細胞疫苗，

(ii)空泡ATP酶(v-ATP酶)抑制劑，較佳為質子泵抑制劑，較佳選自普拉唑之群，更佳為選自由以下組成之群的普拉唑：奧美拉唑、蘭索拉唑、右蘭索拉唑、雷貝拉唑、艾美拉唑及泰妥拉唑；甚至更佳地，普拉唑為艾美拉唑；及

(iii)能夠藉由抑制或刺激、較佳抑制三磷酸腺苷結合匣轉運子(ABC轉運子)乳癌抗藥性蛋白(BCRP；ABCG2)、MRP1、MRP2、

MRP3、MRP4、MRP5及/或MRP6介導之ATP轉運來調節細胞或細胞內結構或胞器(諸如粒線體)釋放三磷酸腺苷(ATP)的化合物，較佳為一或多種具有該特性的草本化合物；更佳為選自第22項中所定義之草本化合物群的一或多種草本化合物，甚至更佳為丹參酚酸B、紫草酸鎂B或靛紅；及

mm) (i)選自如第18項、第19項、第21項及第22項中任一項、較佳第22項所定義之群，或選自如圖10中所定義之群的草本化合物，及

(ii)空泡ATP酶(v-ATP酶)抑制劑，較佳為質子泵抑制劑，較佳選自普拉唑之群，更佳為選自由以下組成之群的普拉唑：奧美拉唑、蘭索拉唑、右蘭索拉唑、雷貝拉唑、艾美拉唑及泰妥拉唑；甚至更佳地，普拉唑為艾美拉唑；

該組合用於治療發生於組織中之癌症，其中ATP轉運受該(等)化合物抑制或刺激(較佳為抑制)的對應ABC轉運子調節劑相較於對應的健康、非病理性組織而言被表現，較佳過度表現，

較佳用於治療腦腫瘤及/或腦轉移，

限制條件為上述所有子項中，(i)、(ii)及(iii) (若存在)之化合物分別不同。

表現ABC轉運子的對應組織描述於本文別處。

表述「選自由...組成之群之化合物組合」係指第25. aa)至mm)項中相應一或多者之選擇。

26. 根據第24項及第25項之組合，係用於治療神經膠質瘤、較佳高度惡性多形性膠質母細胞瘤，及/或腦轉移。

在另一個實施例中，用於治療神經膠質瘤、較佳高度惡性多形性膠質母細胞瘤，及/或腦轉移的該組合僅含有一或多種、較佳一種草本化合物作為藥物，該草本化合物較佳選自如第22項及/或圖10中所定義之群。

在本發明之含義內，術語「藥物」係指有意包括於組合或組合物中的活性成分，其分別有效治療經分別指示之病理狀態或疾病。

27. 根據第24 a)、b)、c)、e)、f)、g)或i)項中任一項，或第24 a)、e)、f)或g)項中任一項；及/或根據第25 hh)、ii)、jj)、kk)、ll)或mm)項中任一項之組合，係用於治療晚期胰管腺癌或高度惡性肝細胞癌。

28. 根據第24 a)至c)項中任一項，或根據第25 aa)至ee)項中任一項之組合，係用於治療高度惡性肝細胞癌，其中(i)對應地為索拉非尼。

在第24項至第28項中任一項之一個實施例中，抗癌藥不為甲胺喋呤。

在第24項至第28項中任一項之另一個實施例中，能夠藉由抑制或刺激、較佳抑制三磷酸腺苷結合匣轉運子(ABC轉運子)乳癌抗藥性蛋白(BCRP；ABCG2)、MRP1、MRP2、MRP3、MRP4、MRP5及/或MRP6介導之ATP轉運來調節細胞或細胞內結構或胞器(諸如粒線體)釋放三磷酸腺苷(ATP)的化合物不為甲胺喋呤。

29. 選自由以下組成之群之化合物組合：

A) (i)抗瘧疾藥劑，其視情況能夠藉由抑制三磷酸腺苷結合匣轉運子(ABC轉運子)乳癌抗藥性蛋白(BCRP；ABCG2)、MRP1、MRP2、MRP3、MRP4、MRP5及/或MRP6介導之ATP轉運來調節細胞釋放三磷酸腺苷(ATP)，

較佳為青蒿素(artemisinin)或其衍生物，及

(ii)空泡ATP酶(v-ATP酶)抑制劑，較佳為質子泵抑制劑，較佳選自普拉唑之群，更佳選自由奧美拉唑、蘭索拉唑、右蘭索拉唑、雷貝拉唑、艾美拉唑及泰妥拉唑組成之群，甚至更佳地，普拉唑為艾美拉唑；

或更佳選自由泮托拉唑、奧美拉唑、蘭索拉唑、右蘭索拉唑、雷貝拉唑、艾美拉唑及泰妥拉唑組成之群；甚至更佳地，普拉唑為艾美拉唑；

或更佳選自由泮托拉唑、蘭索拉唑、右蘭索拉唑、雷貝拉唑、艾美拉唑及泰妥拉唑組成之群；甚至更佳地，普拉唑為艾美拉唑；

或更佳選自由蘭索拉唑、右蘭索拉唑、雷貝拉唑、艾美拉唑及泰妥拉唑組成之群，甚至更佳地，普拉唑為艾美拉唑；及視情況存在之

(iii) ATP；

B) (i)抗瘧疾藥劑，較佳為青蒿素或其衍生物，其視情況能夠藉由抑制三磷酸腺苷結合匣轉運子(ABC轉運子)乳癌抗藥性蛋白(BCRP；ABCG2)、MRP1、MRP2、MRP3、MRP4、MRP5及/或MRP6介導之ATP轉運來調節細胞釋放三磷酸腺苷(ATP)，及

(ii)能夠藉由抑制或刺激、較佳抑制三磷酸腺苷結合匣轉運子(ABC轉運子)乳癌抗藥性蛋白(BCRP；ABCG2)、MRP1、MRP2、MRP3、MRP4、MRP5及/或MRP6介導之ATP轉運來調節細胞釋放三磷酸腺苷(ATP)的化合物，較佳為一或多種具有該特性的草本化合物；更佳為選自如第18項、第19項、第21項及第22項中任一項所定義之草本化合物群的一或多種草本化合物，甚至更佳為獲自丹參根萃取物的化合物，更佳選自由丹參酚酸B、紫草酸鎂B組成之群，或選自丹參酮之群的化合物；及視情況存在之

(iii)空泡ATP酶(v-ATP酶)抑制劑，較佳為質子泵抑制劑，較佳選自普拉唑之群，更佳選自由奧美拉唑、蘭索拉唑、右蘭索拉唑、雷貝拉唑、艾美拉唑及泰妥拉唑組成之群；及視情況存在之



(iv) ATP；

C) (i)抗瘧疾藥劑，較佳為青蒿素或其衍生物，其視情況能夠藉由抑制三磷酸腺苷結合匣轉運子(ABC轉運子)乳癌抗藥性蛋白(BCRP；ABCG2)、MRP1、MRP2、MRP3、MRP4、MRP5及/或MRP6介導之ATP轉運來調節細胞釋放三磷酸腺苷(ATP)，及

(ii)板藍根萃取物或源於其之化合物，較佳為吡咯生物鹼，更佳為靛紅或其衍生物，例如靛紅-3-肟；及視情況存在之

(iii)空泡ATP酶(v-ATP酶)抑制劑，較佳為質子泵抑制劑，較佳選自普拉唑之群，更佳選自由奧美拉唑、蘭索拉唑、右蘭索拉唑、雷貝拉唑、艾美拉唑及泰妥拉唑組成之群；或選自由泮托拉唑、奧美拉唑、蘭索拉唑、右蘭索拉唑、雷貝拉唑、艾美拉唑及泰妥拉唑組成之群；或選自由泮托拉唑、蘭索拉唑、右蘭索拉唑、雷貝拉唑、艾美拉唑及泰妥拉唑組成之群；或選自由蘭索拉唑、右蘭索拉唑、雷貝拉唑、艾美拉唑及泰妥拉唑組成之群；及視情況存在之

(iii) ATP；

D) (i)抗瘧疾藥劑，較佳為青蒿素或其衍生物，其視情況能夠藉由抑制三磷酸腺苷結合匣轉運子(ABC轉運子)乳癌抗藥性蛋白(BCRP；ABCG2)、MRP1、MRP2、MRP3、MRP4、MRP5及/或MRP6介導之ATP轉運來調節細胞釋放三磷酸腺苷(ATP)，及

(ii) ATP；

E) (i)樹突狀細胞或樹突狀細胞疫苗；及

(ii)能夠藉由抑制或刺激三磷酸腺苷結合匣轉運子(ABC轉運子)乳癌抗藥性蛋白(BCRP；ABCG2)、MRP1、MRP2、MRP3、MRP4、MRP5及/或MRP6介導之ATP轉運來調節細胞釋放三磷酸腺苷(ATP)的化合物，較佳為一或多種具有該特性的草本化合物；更佳為選自如第18項、第19項、第21項及第22項中任一項、更佳第22項所定義之草本

化合物群的一或多種草本化合物；甚至更佳地，該化合物係選自由丹參萃取物或源於其之化合物組成之群，較佳為丹參酚酸B、紫草酸鎂B，或選自丹參酮之群，或板藍根萃取物或源於其之化合物，較佳為靛紅及靛紅衍生物；或益母草鹼。

F) (i)樹突狀細胞或樹突狀細胞疫苗，及

(ii)空泡ATP酶(v-ATP酶)抑制劑，較佳為質子泵抑制劑，較佳選自普拉唑之群，普拉唑更佳選自由奧美拉唑、蘭索拉唑、右蘭索拉唑、雷貝拉唑、艾美拉唑及泰妥拉唑組成之群，甚至更佳地，普拉唑為艾美拉唑；

或更佳選自由泮托拉唑、奧美拉唑、蘭索拉唑、右蘭索拉唑、雷貝拉唑、艾美拉唑及泰妥拉唑組成之群，甚至更佳地，普拉唑為艾美拉唑；

或更佳選自由泮托拉唑、蘭索拉唑、右蘭索拉唑、雷貝拉唑、艾美拉唑及泰妥拉唑組成之群，甚至更佳地，普拉唑為艾美拉唑；

或更佳選自由蘭索拉唑、右蘭索拉唑、雷貝拉唑、艾美拉唑及泰妥拉唑組成之群，甚至更佳地，普拉唑為艾美拉唑；及

G) (i)樹突狀細胞或樹突狀細胞疫苗，

(ii)空泡ATP酶(v-ATP酶)抑制劑，較佳為質子泵抑制劑，較佳選自普拉唑之群，普拉唑更佳選自由奧美拉唑、蘭索拉唑、右蘭索拉唑、雷貝拉唑、艾美拉唑及泰妥拉唑組成之群，甚至更佳地，普拉唑為艾美拉唑；

或更佳選自由泮托拉唑、奧美拉唑、蘭索拉唑、右蘭索拉唑、雷貝拉唑、艾美拉唑及泰妥拉唑組成之群，甚至更佳地，普拉唑為艾美拉唑；

或更佳選自由泮托拉唑、蘭索拉唑、右蘭索拉唑、雷貝拉唑、艾美拉唑及泰妥拉唑組成之群，甚至更佳地，普拉唑為艾美拉唑；

或更佳選自由蘭索拉唑、右蘭索拉唑、雷貝拉唑、艾美拉唑及泰妥拉唑組成之群，甚至更佳地，普拉唑為艾美拉唑；及

(iii)能夠藉由抑制或刺激、較佳抑制三磷酸腺苷結合匣轉運子(ABC轉運子)乳癌抗藥性蛋白(BCRP；ABCG2)、MRP1、MRP2、MRP3、MRP4、MRP5及/或MRP6介導之ATP轉運來調節細胞釋放三磷酸腺苷(ATP)的化合物，較佳為一或多種具有該特性的草本化合物；更佳為選自如第18項、第19項、第21項及第22項中任一項、更佳第22項所定義之草本化合物群的一或多種草本化合物；甚至更佳地，該化合物係選自由丹參萃取物或源於其之化合物組成之群，較佳為丹參酚酸B、紫草酸鎂B，或選自由丹參酮之群，或板藍根萃取物或源於其之化合物，較佳為靛紅及靛紅衍生物，或益母草鹼，

該組合用於治療瘧疾或腦型瘧疾，

限制條件為上述所有子項中，(i)、(ii)及(iii) (若存在)之化合物分別不同。

表述「選自由...組成之群之化合物組合」係指A)至G)中相應一者之選擇。

在本發明之含義內，術語「丹參酮」係指所有已知的丹參酮，較佳指所有已知丹參酮之群，然而不包括隱丹參酮，更佳指包含丹參酮I、IIA、IIA磺酸酯及B及二氫丹參酮之群。

30. 一種選自由以下組成之群之化合物組合

AA) (i)青蒿素或氯喹，較佳為青蒿素，及

(ii)空泡ATP酶(v-ATP酶)抑制劑，較佳為質子泵抑制劑，較佳選自由普拉唑之群，更佳選自由奧美拉唑、蘭索拉唑、右蘭索拉唑、雷貝拉唑、艾美拉唑及泰妥拉唑組成之群；或選自由泮托拉唑、奧美拉唑、蘭索拉唑、右蘭索拉唑、雷貝拉唑、艾美拉唑及泰妥拉唑組成之群；或選自由泮托拉唑、蘭索拉唑、右蘭索拉唑、雷貝拉唑、艾美拉

唑及泰妥拉唑組成之群；或選自由蘭索拉唑、右蘭索拉唑、雷貝拉唑、艾美拉唑及泰妥拉唑組成之群；

BB) (i)青蒿素或氯喹，較佳為青蒿素，及

(ii)選自由丹參酚酸B、紫草酸鎂B組成之群，選自由丹參酮之群的化合物；

CC) (i)青蒿素及選自由丹參酚酸B、紫草酸鎂B組成之群及選自由丹參酮之群的一或多種化合物，及

(ii)空泡ATP酶(v-ATP酶)抑制劑，較佳為質子泵抑制劑，較佳選自普拉唑之群，更佳選自由奧美拉唑、蘭索拉唑、右蘭索拉唑、雷貝拉唑、艾美拉唑及泰妥拉唑組成之群，甚至更佳地，普拉唑為艾美拉唑；

或更佳選自由泮托拉唑、奧美拉唑、蘭索拉唑、右蘭索拉唑、雷貝拉唑、艾美拉唑及泰妥拉唑組成之群，甚至更佳地，普拉唑為艾美拉唑；

或更佳選自由泮托拉唑、蘭索拉唑、右蘭索拉唑、雷貝拉唑、艾美拉唑及泰妥拉唑組成之群，甚至更佳地，普拉唑為艾美拉唑；

或更佳選自由蘭索拉唑、右蘭索拉唑、雷貝拉唑、艾美拉唑及泰妥拉唑組成之群，甚至更佳地，普拉唑為艾美拉唑；

DD) (i)青蒿素，及

(ii)板藍根萃取物或源於其之化合物，較佳為靛紅或其衍生物；

EE) (i)青蒿素，

(ii)板藍根萃取物或源於其之化合物，較佳為靛紅或其衍生物；

及

(iii)空泡ATP酶(v-ATP酶)抑制劑，較佳為質子泵抑制劑，較佳選自普拉唑之群，更佳選自由奧美拉唑、蘭索拉唑、右蘭索拉唑、雷貝拉唑、艾美拉唑及泰妥拉唑組成之群；或選自由泮托拉唑、奧美拉

唑、蘭索拉唑、右蘭索拉唑、雷貝拉唑、艾美拉唑及泰妥拉唑組成之群；或選自由泮托拉唑、蘭索拉唑、右蘭索拉唑、雷貝拉唑、艾美拉唑及泰妥拉唑組成之群；或選自由蘭索拉唑、右蘭索拉唑、雷貝拉唑、艾美拉唑及泰妥拉唑組成之群；

FF) (i)青蒿素；及

(ii) ATP；

GG) (i)樹突狀細胞或樹突狀細胞疫苗，及

(ii)選自如第18項、第19項、第21項或第22項中任一項、較佳第22項所定義之群的草本化合物，甚至更佳為丹參酚酸B或紫草酸鎂B、丹參酮IIA、靛紅或靛紅衍生物，或益母草鹼；

HH) (i)樹突狀細胞或樹突狀細胞疫苗；及

(ii)空泡ATP酶(v-ATP酶)抑制劑，較佳為質子泵抑制劑，較佳選自普拉唑之群，更佳選自由奧美拉唑、蘭索拉唑、右蘭索拉唑、雷貝拉唑、艾美拉唑及泰妥拉唑組成之群；或選自由泮托拉唑、奧美拉唑、蘭索拉唑、右蘭索拉唑、雷貝拉唑、艾美拉唑及泰妥拉唑組成之群；或選自由泮托拉唑、蘭索拉唑、右蘭索拉唑、雷貝拉唑、艾美拉唑及泰妥拉唑組成之群；或選自由蘭索拉唑、右蘭索拉唑、雷貝拉唑、艾美拉唑及泰妥拉唑組成之群；

II) (i)樹突狀細胞或樹突狀細胞疫苗，

(ii)空泡ATP酶(v-ATP酶)抑制劑，較佳為質子泵抑制劑，較佳選自普拉唑之群，更佳選自由奧美拉唑、蘭索拉唑、右蘭索拉唑、雷貝拉唑、艾美拉唑及泰妥拉唑組成之群，甚至更佳地，普拉唑為艾美拉唑；

或更佳選自由泮托拉唑、奧美拉唑、蘭索拉唑、右蘭索拉唑、雷貝拉唑、艾美拉唑及泰妥拉唑組成之群，甚至更佳地，普拉唑為艾美拉唑；

或更佳選自由泮托拉唑、蘭索拉唑、右蘭索拉唑、雷貝拉唑、艾美拉唑及泰妥拉唑組成之群，甚至更佳地，普拉唑為艾美拉唑；

或更佳選自由蘭索拉唑、右蘭索拉唑、雷貝拉唑、艾美拉唑及泰妥拉唑組成之群，甚至更佳地，普拉唑為艾美拉唑；及

(iii)能夠藉由抑制或刺激、較佳抑制三磷酸腺苷結合匣轉運子(ABC轉運子)乳癌抗藥性蛋白(BCRP；ABCG2)、MRP1、MRP2、MRP3、MRP4、MRP5及/或MRP6介導之ATP轉運來調節細胞釋放三磷酸腺苷(ATP)的化合物，較佳為一或多種具有該特性的草本化合物；更佳為選自如第18項、第19項、第21項及第22項中任一項、更佳第22項所定義之草本化合物群的一或多種草本化合物，甚至更佳地，該化合物係選自由丹參酚酸B、紫草酸鎂B、丹參酮IIA、益母草鹼、靛紅或靛紅衍生物組成之群；

該組合用於治療瘧疾或腦型瘧疾，

限制條件為上述所有子項中，(i)、(ii)及若存在之(iii)之該等化合物分別不同。

靛紅衍生物之一實例為靛紅-3-肟。

表述「選自由...組成之群之化合物組合」係指第30 AA)至II)項中相應一者之選擇。

在另一個實施例中，用於治療瘧疾或腦型瘧疾之該組合僅含有一或多種、較佳一種草本化合物作為藥物，該草本化合物較佳選自如第18項、第19項、第21項及第22項中任一項及/或圖10中所定義之群。

31. 根據第30項之用於治療瘧疾或腦型瘧疾之化合物組合，其中在AA)、BB)、CC)、DD)、EE)及HH)中另外存在ATP。

在另一個較佳實施例中，各項中提及的草本化合物為獲自丹參(*Salvia miltiorrhiza*)之化合物，獲自丹參之化合物較佳為如圖10A至

10E中所繪之化合物，及板藍根萃取物。

32. 根據第29項至第31項中任一項之用於治療瘧疾或腦型瘧疾的化合物組合，其中青蒿素衍生物為蒿甲醚(artemether)、青蒿琥酯(artesunat)、阿替夫林(arteflene)、阿替莫特(artemotil)、二氫青蒿素(dihydroartemisinin)及蒿乙醚(arteether)。

在第29項至第32項中任一項之一個實施例中，抗瘧疾藥劑能夠藉由抑制三磷酸腺苷結合匣轉運子(ABC轉運子)乳癌抗藥性蛋白(BCRP；ABCG2)介導之ATP轉運來調節細胞釋放三磷酸腺苷(ATP)。

33. 如第29項至第32項中任一項所定義之化合物組合，係用於治療癌症，較佳為腦腫瘤及腦轉移、晚期胰管腺癌、高度惡性肝細胞癌、食道鱗狀癌症、胃癌、白血病，更佳為高度惡性神經膠母細胞瘤及腦轉移。

34. 如第29項至第32項中任一項所定義之化合物組合，係用於抗病毒或抗微生物治療感染性疾病。

在本發明之含義內，術語「抗病毒治療」表示旨在殺死病毒或抑制病毒複製能力的治療。方如此，抗病毒治療可例如抑制病毒繁殖及再生能力。此種治療亦稱為「治療性」治療。病毒引起的疾病(或病狀)已為熟習此項技術者所知，且能夠指示個體是否被病毒感染的適合測試亦為熟習此項技術者所知。此等測試包括(但不限於)免疫學及分子生物學測試，諸如抗體測試。

另外，術語「抗病毒治療」亦指預防性治療。

可加以抗病毒治療的可能疾病或病狀原則上為病毒感染所引起的所有疾病/病狀，較佳為其中病毒進入(部分地)經由低pH內體/溶酶體途徑實現的病毒感染，諸如流感病毒、登革熱病毒(dengue virus)、西尼羅河病毒(West Nile Virus)、SARS冠狀病毒、C型肝炎病毒、B型肝炎、痘苗病毒、人類免疫缺乏性病毒(HIV-1)、呼吸道合胞體病毒

(RSV)、人類巨細胞病毒、黃熱病毒、塞姆利基森林病毒(Semliki forest virus)、風疹病毒所引起的病毒感染。

可能疾病為該等病毒所引起的相應疾病，諸如流感、登革熱(斷骨熱)、西尼羅河疾病、SARS、C型肝炎、B型肝炎、天花、AIDS、感冒、CMV感染、黃熱病、塞姆利基森林病毒感染、風疹或德國麻疹。

35. 如第29項至第32項中任一項所定義之化合物組合，係用於治療與幽門螺桿菌(*Helicobacter pylori*)感染相關的胃腸道疾病，諸如胃炎、消化性潰瘍、胃癌。

36. 如第1項至第23項中任一項所定義之能夠活化ATP釋放、較佳能夠刺激ATP釋放的化合物，其用於刺激免疫系統。

在另一個實施例中，本發明係關於藉由使用如第1項至第23項中任一項所定義之方法鑑定為低劑量或高劑量ATP釋放之活化劑的化合物，其用於刺激免疫系統。

37. 如第1項至第23項中任一項所定義之能夠調節、較佳能夠調節低劑量或高劑量ATP釋放、較佳能夠調節(較佳抑制) ATP釋放的化合物，其用於抑制超發炎。

38. 如第1項至第23項中任一項所定義之能夠調節、較佳能夠調節低劑量或高劑量ATP釋放、較佳能夠調節ATP釋放的化合物，其用於治療性及/或預防性疫苗接種。

39. 如第1項至第23項中任一項所定義之能夠抑制、較佳能夠抑制低劑量或高劑量ATP釋放、較佳能夠抑制ATP釋放的化合物，

或如第24項至第32項中任一項所定義之化合物組合，

係用於治療發炎疾病，諸如類風濕性關節炎、哮喘或慢性阻塞性肺病、動脈粥樣硬化及局部缺血、內毒素血症及敗血症、移植物抗宿主疾病、神經退化性病變，包括阿茲海默氏病、抑鬱症、胃病(諸

如胃炎)，較佳為類風濕性關節炎或移植物抗宿主疾病。

在另一個實施例中，第39項之化合物組合為甲胺喋呤與草本化合物，較佳為選自如第18項、第19項、第21項及第22項中任一項、更佳第22項所定義之草本化合物群的一或多種草本化合物，甚至更佳為丹參酚酸B、紫草酸鎂B或靛紅，該組合用於治療類風濕性關節炎或移植物抗宿主疾病。

另一個實例為丹參化合物與/或益母草鹼之組合，用於治療動脈粥樣硬化或局部缺血，較佳為缺血再灌注損傷。

另一個實例為青蒿素與泮托拉唑之組合，用於治療胃病。

40. 一種藉由使用如第1項至第23項中任一項所定義方法鑑定為調節劑、較佳為低劑量或高劑量ATP釋放之調節劑的化合物，用於DC成熟。

在一個實施例中，用於DC成熟的調節劑不為甲胺喋呤。

根據本發明，化合物以及化合物組合代表醫藥組合物或可包含於醫藥組合物中且可調配為醫藥劑型。熟習此項技術者已知哪些賦形劑(諸如稀釋劑、填充劑、黏合劑、滑動劑、緩衝劑與/或包衣劑及其類似物)為適合的且可用於製備相應調配物。適合劑型可為例如錠劑、散劑、顆粒、藥丸、口含錠、藥囊、膠囊、溶液(例如注射或輸注溶液)，及其類似劑型。

醫藥組合物可用於治療本文所列疾病之方法中。

41. 一種醫藥組合物，包含

(a)抗原，

(b)視情況能夠藉由刺激三磷酸腺苷結合匣轉運子(ABC轉運子)乳癌抗藥性蛋白(BCRP；ABCG2)、MRP1、MRP2、MRP3、MRP4、MRP5及/或MRP6介導之ATP轉運來調節細胞釋放三磷酸腺苷(ATP)的化合物，較佳為一或多種視情況具有該特性的草本化合物，

其中該組合物適於引發針對抗原(a)的免疫反應，較佳用於疫苗接種。

能夠藉由刺激三磷酸腺苷結合匣轉運子(ABC轉運子)來調節細胞釋放三磷酸腺苷(ATP)的化合物可例如能夠刺激可選自以下的ABC轉運子：

- BCRP、MRP2、MRP3、MRP4、MRP5及/或MRP6；
- BCRP、MRP1、MRP2、MRP3、MRP5及/或MRP6；
- BCRP、MRP1、MRP2、MRP3、MRP4及/或MRP6；
- BCRP、MRP1、MRP2、MRP3及/或MRP6；
- BCRP、MRP1、MRP4、MRP5及/或MRP6；
- BCRP、MRP2、MRP3、MRP5及/或MRP6；
- BCRP、MRP2、MRP3、MRP4及/或MRP6；
- BCRP、MRP2、MRP3及/或MRP6。

抗原可為熟習此項技術者已知且需要藉以疫苗接種的任何適合抗原。剛好說明性地提及一實例，適用於流感疫苗接種的抗原可為流感病毒特異性血球凝集素及/或神經胺糖酸苷酶。亦可存在超過一種抗原。如熟習此項技術者所知，醫藥組合物可進一步包含通常存在於藥理學組合物(諸如疫苗接種調配物)中的化合物，且可例如包含佐劑，諸如氫氧化鋁(AlOH)、包含角鯊烯及聚山梨醇酯80之佐劑(例如MF59®或AS03®)、CpG寡核苷酸，或包含膽固醇及磷脂之佐劑(諸如ISCOMATRIX®)。

在一個較佳實施例中，第41 (b)項之化合物能夠藉由刺激三磷酸腺苷結合匣轉運子(ABC轉運子)乳癌抗藥性蛋白(BCRP；ABCG2)、MRP1、MRP2、MRP3、MRP4、MRP5及/或MRP6介導之ATP轉運來調節細胞釋放三磷酸腺苷(ATP)。

42. 根據第41項之醫藥組合物，其中化合物(b)已藉由使用根據

第1項至第23項中任一項之方法加以鑑定，已經受根據第1項至第23項中任一項之方法的化合物(b)較佳為草本化合物，諸如如本文中別處所定義之草本化合物，例如如第18項、第19項、第21項及第22項中任一項所定義之草本化合物。

43. 根據第24項至第42項中任一項之組合，其中能夠藉由抑制或刺激三磷酸腺苷結合匣轉運子(ABC轉運子)來調節細胞釋放三磷酸腺苷(ATP)的化合物已藉由使用根據第1項至第23項中任一項之方法加以鑑定。

44. 一種醫藥組合物，包含

(i)抗病毒藥物，其視情況能夠藉由抑制三磷酸腺苷結合匣轉運子(ABC轉運子)乳癌抗藥性蛋白(BCRP；ABCG2)介導之ATP轉運來調節細胞釋放三磷酸腺苷(ATP)，該抗病毒藥物係選自由治療病毒感染(較佳為利用低pH內體/溶酶體路徑的病毒感染，諸如多種高病原性RNA病毒感染)的抗病毒藥物組成之群，包括針對流感的M2通道抑制劑金剛烷胺(amantadine)及金剛烷乙胺(rimantadine)，及神經胺糖酸苷酶抑制劑奧司他韋(oseltamivir)及紮那米韋(zanamivir)，及針對C型肝炎及RSV感染的病毒唑(ribavirin)；及

(ii)能夠藉由調節、較佳抑制三磷酸腺苷結合匣轉運子(ABC轉運子)乳癌抗藥性蛋白(BCRP；ABCG2)、MRP1、MRP2、MRP3、MRP4、MRP5及/或MRP6介導之ATP轉運來調節細胞釋放三磷酸腺苷(ATP)的化合物，較佳為具有該特性的草本化合物，其中該化合物適於抑制病毒複製，此係藉由ABC轉運子來抑制ATP自胞質液釋放至細胞外環境中，從而限制ATP用於內體吸收及複製病毒。

能夠藉由調節、較佳抑制三磷酸腺苷結合匣轉運子(ABC轉運子)來調節細胞釋放三磷酸腺苷(ATP)的化合物可例如能夠抑制可選自以下的ABC轉運子：

- BCRP、MRP2、MRP3、MRP4、MRP5及/或MRP6；
- BCRP、MRP1、MRP2、MRP3、MRP5及/或MRP6；
- BCRP、MRP1、MRP2、MRP3、MRP4及/或MRP6；
- BCRP、MRP1、MRP2、MRP3及/或MRP6；
- BCRP、MRP1、MRP4、MRP5及/或MRP6；
- BCRP、MRP2、MRP3、MRP5及/或MRP6；
- BCRP、MRP2、MRP3、MRP4及/或MRP6；
- BCRP、MRP2、MRP3及/或MRP6。

在一個實施例中，第44項之化合物(ii)已藉由使用根據第1項至第23項中任一項之方法加以鑑定，已經受根據第1項至第23項中任一項之方法的化合物(ii)較佳為草本化合物，諸如如本文中別處所定義之草本化合物，例如如第18項、第19項、第21項及第22項中任一項所定義之草本化合物。

45. 一種醫藥組合物，包含

(i)抗病毒藥物，其視情況能夠藉由抑制三磷酸腺苷結合匣轉運子(ABC轉運子)乳癌抗藥性蛋白(BCRP；ABCG2)介導之ATP轉運來調節細胞釋放三磷酸腺苷(ATP)，該抗病毒藥物係選自由治療病毒感染(較佳為利用低pH內體/溶酶體路徑的病毒感染，諸如多種高病原性RNA病毒感染)的抗病毒藥物組成之群，包括例如針對流感的M2通道抑制劑金剛烷胺及金剛烷乙胺，及神經胺糖酸苷酶抑制劑奧司他韋及紮那米韋，及針對C型肝炎及RSV感染的病毒唑；及

(ii)空泡ATP酶(v-ATP酶)抑制劑，較佳為質子泵抑制劑，較佳選自普拉唑之群，及視情況存在之

(iii)視情況能夠藉由調節、較佳抑制三磷酸腺苷結合匣轉運子(ABC轉運子)乳癌抗藥性蛋白(BCRP；ABCG2)、MRP1、MRP2、MRP3、MRP4、MRP5及/或MRP6介導之ATP轉運來調節細胞釋放三

磷酸腺苷(ATP)的化合物，較佳為視情況具有該特性的草本化合物，其中該化合物適於抑制病毒複製，此係藉由ABC轉運子來抑制ATP自胞質液釋放至細胞外環境中，從而限制ATP用於內體吸收及複製病毒。

在一個實施例中，第45項之化合物(iii)已藉由使用根據第1項至第23項中任一項之方法加以鑑定，已經受根據第1項至第23項中任一項之方法的化合物(iii)較佳為草本化合物，諸如如本文中別處所定義之草本化合物，例如如第18項、第19項、第21項及第22項中任一項所定義之草本化合物。

此外，在第44項或第45項之一個實施例中，抗病毒藥物能夠藉由抑制三磷酸腺苷結合匣轉運子(ABC轉運子)乳癌抗藥性蛋白(BCRP；ABCG2)介導之ATP轉運來調節細胞釋放三磷酸腺苷(ATP)。

能夠藉由調節、較佳抑制三磷酸腺苷結合匣轉運子(ABC轉運子)來調節細胞釋放三磷酸腺苷(ATP)的化合物可例如能夠抑制可選自以下的ABC轉運子：

- BCRP、MRP2、MRP3、MRP4、MRP5及/或MRP6；
- BCRP、MRP1、MRP2、MRP3、MRP5及/或MRP6；
- BCRP、MRP1、MRP2、MRP3、MRP4及/或MRP6；
- BCRP、MRP1、MRP2、MRP3及/或MRP6；
- BCRP、MRP1、MRP4、MRP5及/或MRP6；
- BCRP、MRP2、MRP3、MRP5及/或MRP6；
- BCRP、MRP2、MRP3、MRP4及/或MRP6；
- BCRP、MRP2、MRP3及/或MRP6。

46. 如第18項、第19項、第21項及第22項中任一項所定義之草本化合物，較佳為選自由以下組成之群的草本化合物：靛紅及靛紅衍生物，諸如靛紅-3-肟；丹參酮，諸如丹參酮I、IIA、IIA磺酸酯，或

丹參酮IIB；丹參酚酸B、紫草酸鎂B，及益母草鹼，該草本化合物用於治療瘧疾。

47. 一種能夠藉由抑制三磷酸腺苷結合匣轉運子(ABC轉運子)乳癌抗藥性蛋白(BCRP，ABCG2)介導之ATP轉運來調節細胞釋放三磷酸腺苷(ATP)的草本化合物，用於治療瘧疾。

48. 如第29項或第30項中所定義之草本化合物，或如第18項、第19項、第20項或第21項中所定義之草本化合物，係用於治療瘧疾。

49. 用於治療瘧疾的靛紅-3-脲。

在本發明之含義內，(i)、(ii)及適用時之(iii)中所列之能夠藉由刺激三磷酸腺苷結合匣轉運子(ABC轉運子)乳癌抗藥性蛋白(BCRP；ABCG2)、MRP1、MRP2、MRP3、MRP4、MRP5及/或MRP6介導之ATP轉運來調節細胞或細胞內結構或胞器(諸如粒線體)釋放三磷酸腺苷(ATP)的化合物，係組合用於治療分別指示之疾病(病理狀態)。組合使用在本文中意謂特定化合物一起使用，例如其可在一個治療步驟中實質上同時使用(投與)，或依時序分開使用。若一起投與，則其可調配成共同投藥形式，或調配成分開、但同時應用的投藥形式。若化合物依時序分開使用，則投藥之間隔時間較佳經選擇以使得組合中之各組分仍藉由抑制或刺激ABC轉運子來發揮其調節細胞或細胞內結構或胞器(諸如粒線體)釋放ATP的作用。

此外，普拉唑之清單中較佳的普拉唑為泮托拉唑；然而，若組合物或組合僅包含甲胺喋呤及普拉唑、或伊馬替尼及普拉唑作為活性成分，則不使用泮托拉唑。

此外，在本發明之含義內，術語「治療」意謂預防性及/或治療性治療。

此外，在本發明之含義內，術語「衍生物」係指具有衍生其之化合物之特性的化合物。舉例而言，抗瘧疾藥劑之衍生物具有抗瘧疾

特性，且某種草本化合物之衍生物(諸如丹參酮IIA或靛紅)具有能夠藉由抑制ABC轉運子介導之ATP轉運來調節細胞釋放ATP的特性。後一特性較佳藉由如第1項至第16項中任一項所定義之方法測試。

本發明亦關於以下態樣：

(1) 一種用於鑑定測試化合物的活體外方法，該等測試化合物能夠藉由抑制或刺激三磷酸腺苷結合匣轉運子(ABC轉運子)乳癌抗藥性蛋白(BCRP；ABCG2)介導之ATP轉運來調節細胞釋放三磷酸腺苷(ATP)，該方法包含以下步驟

a) 提供包含該ABC轉運子的測試系統，其中此測試系統包括至少兩個隔室且其中該ABC轉運子能夠使ATP在該至少兩個隔室之間轉運，

b) 使步驟a)之該測試系統中的至少一個隔室與測試化合物接觸，此接觸的方式及時段應足以使該測試化合物接觸到該ABC轉運子，

其中在該測試化合物已接觸到該等隔室中之至少一者之前、期間或之後，將ATP添加至該測試系統之至少一個隔室中，ATP可自該隔室轉運至其他隔室，

c) 測定ATP轉運至或自其轉運出之該測試系統之至少一個隔室中的ATP量，

d) 對步驟(c)之該(等) ATP測定量與使用該同一測試系統所測定的ATP量進行比較

A) 在該測試化合物之不同濃度下；

B) 在該測試化合物不存在下；及/或

C) 在參考化合物而非該測試化合物存在下；

及

e) 根據(d)中之該比較情況推斷出該測試化合物是否能夠藉由

抑制或刺激該ABC轉運子介導之ATP轉運來調節細胞釋放ATP，

其中欲添加測試化合物之至少該隔室之pH值在添加測試化合物之時間點為約7或低於7。

(2) 根據第(1)項之方法，其中步驟b)中所添加之ATP為經標記之ATP，較佳為放射性標記之ATP，更佳為 $[^{32}\text{P}] \gamma\text{-ATP}$ 。

(3) 根據任一前述項之方法，其中pH值為約6.8或小於6.8，較佳為約6.5或小於6.5，或處於約7至約4或約6.8至約4之範圍內，或處於約6.5至約4之範圍內，較佳處於約6.5至約5之範圍內。

(4) 根據任一前述項之方法，其中該方法係在缺氧下進行，其中該缺氧特徵較佳為氧氣含量在0至7% O_2 範圍內，較佳在0至5% O_2 範圍內，或較佳在0.5%至5% O_2 範圍內。

(5) 根據任一前述項之方法，其中若ATP轉運至其中之至少一個隔室中的ATP測定量減少，其中該減少幅度較佳為25%或大於25%，且/或若ATP自其中轉運出之至少一個隔室中的ATP測定量增加，其中該增加幅度較佳為25%或大於25%，則該測試化合物歸類為ATP釋放抑制劑，且

其中若ATP轉運至其中之該至少一個隔室中的ATP測定量增加，其中該增加幅度較佳為25%或大於25%，且/或若ATP自其中轉運出之該至少一個隔室中的ATP測定量減少，其中該減少幅度較佳為25%或大於25%，則該測試化合物歸類為ATP釋放刺激劑。

(6) 根據任一前述項之方法，其中步驟a)之該測試系統穩定表現ABC轉運子，較佳為過度表現ABC轉運子，且/或其中步驟b)係藉由添加該測試化合物至該等隔室之至少一者中來進行。

(7) 根據任一前述項之方法，其中待測試之物質代表源於植物或源於植物之任何適合部分的草本化合物，該草本化合物較佳代表植物或植物之任何適合部分的萃取物，較佳乾燥萃取物。

(8) 根據第(7)項之方法，其中該草本化合物獲自(含水)醇萃取物，較佳70%至100%甲醇或乙醇。

(9) 根據第(7)項或第(8)項之方法，其中該草本化合物係選自由以下組成之群：

丹參酚酸，諸如親水性丹參酚酸A、B、C、D、E；較佳為諸如丹參酚酸A或B之丹參酚酸；

紫草酸，較佳為親水性紫草酸，更佳為紫草酸鎂，諸如紫草酸鎂B；

原兒茶酸，較佳為親水性原兒茶酸，諸如迷迭香酸，亦較佳為原兒茶醛；

丹參酮，較佳為雙萜丹參酮，較佳為親脂性雙萜丹參酮，諸如隱丹參酮、丹參酮I、丹參酮IIB、二氫丹參酮；

生物鹼，較佳為親水性生物鹼，諸如吲哚生物鹼靛紅及靛紅衍生物，或益母草鹼或水蘇鹼；及

三萜，較佳為親脂性三萜，較佳為苦木苦味素；

草本化合物較佳係選自由丹參酚酸B、紫草酸鎂B及靛紅組成之群。

(10) 一種選自由以下組成之群之化合物組合

a) (i)一或多種抗癌藥物，及

(ii)普拉唑，選自由奧美拉唑、蘭索拉唑、右蘭索拉唑、雷貝拉唑、艾美拉唑、泰妥拉唑組成之群，及視情況存在之

(iii)能夠藉由抑制或刺激該三磷酸腺苷結合匣轉運子(ABC轉運子)乳癌抗藥性蛋白(BCRP；ABCG2)介導之ATP轉運來調節細胞釋放三磷酸腺苷(ATP)的化合物；

b) (i)一或多種抗癌藥物，及

(ii)能夠藉由抑制或刺激該三磷酸腺苷結合匣轉運子(ABC轉運

子)乳癌抗藥性蛋白(BCRP；ABCG2)介導之ATP轉運來調節細胞釋放三磷酸腺苷(ATP)的化合物；

c) (i)一或多種抗癌藥物；

(ii) ATP；及視情況存在之

(iii)能夠藉由抑制或刺激該三磷酸腺苷結合匣轉運子(ABC轉運

子)乳癌抗藥性蛋白(BCRP；ABCG2)介導之ATP轉運來調節細胞釋放三磷酸腺苷(ATP)的化合物；

d) (i)甲胺喋呤及/或伊馬替尼，及

(ii)能夠藉由抑制或刺激該三磷酸腺苷結合匣轉運子(ABC轉運子)乳癌抗藥性蛋白(BCRP；ABCG2)介導之ATP轉運來調節細胞釋放三磷酸腺苷(ATP)的化合物；及視情況存在之

(iii)普拉唑，選自由奧美拉唑、蘭索拉唑、右蘭索拉唑、雷貝拉唑、艾美拉唑及泰妥拉唑組成之群；

e) (i) ATP，及

(ii)能夠藉由抑制或刺激該三磷酸腺苷結合匣轉運子(ABC轉運子)乳癌抗藥性蛋白(BCRP；ABCG2)介導之ATP轉運來調節細胞釋放三磷酸腺苷(ATP)的化合物；或

(ii)普拉唑，選自由奧美拉唑、蘭索拉唑、右蘭索拉唑、雷貝拉唑、艾美拉唑及泰妥拉唑組成之群；

f) (i)樹突狀細胞疫苗，及

(ii)能夠藉由抑制或刺激該三磷酸腺苷結合匣轉運子(ABC轉運子)乳癌抗藥性蛋白(BCRP；ABCG2)介導之ATP轉運來調節細胞釋放三磷酸腺苷(ATP)的化合物；及

g) (i)樹突狀細胞疫苗，及

(ii)質子泵抑制劑

該組合係用於治療發生於組織中之癌症，其中ATP轉運受該(等)

化合物抑制或刺激的對應ABC轉運子調節劑被表現，

限制條件為上述所有子項中，(i)、(ii)及若存在之(iii)之該等化合物分別不同。

(11) 根據第(10)項之組合，用於治療腦腫瘤及/或腦轉移，較佳為神經膠質瘤，更佳為高度惡性多形性膠質母細胞瘤。

(12) 根據第(10) e)、f)及/或g)項之組合，用於治療晚期胰管腺癌或高度惡性肝細胞癌。

(13) 一種選自由以下組成之群之化合物組合

A) (i)抗瘧疾藥劑，其能夠藉由抑制該三磷酸腺苷結合匣轉運子(ABC轉運子)乳癌抗藥性蛋白(BCRP；ABCG2)介導之ATP轉運來調節細胞釋放三磷酸腺苷(ATP)；及

(ii)質子泵抑制劑，及視情況存在之

(iii) ATP；

B) (i)抗瘧疾藥劑，其能夠藉由抑制該三磷酸腺苷結合匣轉運子(ABC轉運子)乳癌抗藥性蛋白(BCRP；ABCG2)介導之ATP轉運來調節細胞釋放三磷酸腺苷(ATP)；及

(ii)能夠藉由抑制該三磷酸腺苷結合匣轉運子(ABC轉運子)乳癌抗藥性蛋白(BCRP；ABCG2)介導之ATP轉運來調節細胞釋放三磷酸腺苷(ATP)的化合物，及選自丹參酮之群的化合物；及視情況存在之

(iii)質子泵抑制劑，及視情況存在之

(iv) ATP；

C) (i)抗瘧疾藥劑，其能夠藉由抑制該三磷酸腺苷結合匣轉運子(ABC轉運子)乳癌抗藥性蛋白(BCRP；ABCG2)介導之ATP轉運來調節細胞釋放三磷酸腺苷(ATP)；及

(ii)靛紅或其衍生物，及視情況存在之

(iii)質子泵抑制劑，及視情況存在之

(iii) ATP；

D) (i)抗瘧疾藥劑，其能夠藉由抑制該三磷酸腺苷結合匣轉運子(ABC轉運子)乳癌抗藥性蛋白(BCRP；ABCG2)介導之ATP轉運來調節細胞釋放三磷酸腺苷(ATP)；及

(ii) ATP；

E) (i)樹突狀細胞疫苗，及

(ii)能夠藉由抑制該三磷酸腺苷結合匣轉運子(ABC轉運子)乳癌抗藥性蛋白(BCRP；ABCG2)介導之ATP轉運來調節細胞釋放三磷酸腺苷(ATP)的化合物；及

F) (i)樹突狀細胞疫苗，及

(ii)質子泵抑制劑；

該組合係用於治療瘧疾，

限制條件為上述所有子項中，(i)、(ii)及若存在之(iii)之該等化合物分別不同。

(14) 一種醫藥組合物，包含

(a)抗原，

(b)能夠藉由刺激三磷酸腺苷結合匣轉運子(ABC轉運子)乳癌抗藥性蛋白(BCRP；ABCG2)、MRP1、MRP2、MRP3、MRP4、MRP5及/或MRP6介導之ATP轉運來調節細胞釋放三磷酸腺苷(ATP)的化合物，

其中該組合物適於引發針對該抗原(a)的免疫反應。

(15) 如第(1)項至第(9)項中任一項所定義之能夠抑制ATP釋放的化合物，用於DC成熟。

【圖式簡單說明】

圖1：藉由BCRP (ABCG2)轉運ATP。

A)在pH 7.4及pH 6下攝取100 μ M [3 H]ATP至含有BCRP之膜囊泡中與野生型(wild-type；WT)對照囊泡(n=4)相比之時間過程；

B)在pH 7.4及pH 6下隨時間淨攝取100 μM [^3H]ATP至BCRP膜囊泡中(對野生型囊泡中的轉運之校正)。

圖2：在pH 6 (A)及pH 7.4 (B)下藉由BCRP (ABCG2)進行的ATP轉運之濃度相依性。

藉由[^3H]ATP之濃度且在指定的pH下在37°C下培育Sf9-BCRP膜囊泡5 min。以pmol/mg蛋白/min標繪ATP之攝取。所示值意謂一式三份地 $\pm$ 各實驗之SE。

圖3：藉由BCRP (ABCG2)轉運ATP。

在pH 7.4及pH 6下淨攝取100 μM [^{32}P] γ -ATP至BCRP膜囊泡中之時間過程(對野生型囊泡中的轉運之校正)。

圖4：泮托拉唑(4A)及甲胺喋呤(methotrexate) (4B)對藉由BCRP (ABCG2)轉運ATP之影響。

A)在10 μM 及1 mM泮托拉唑(n=3)不存在及存在下在pH 6下淨攝取89 μM [^3H]ATP至含有BCRP之膜囊泡中(對野生型(WT)對照囊泡中的轉運之校正)；B)在100 μM 及1 mM甲胺喋呤(n=3)不存在及存在下在pH 6下淨攝取89 μM [^3H]ATP至含有BCRP之膜囊泡中(對野生型(WT)對照囊泡中的轉運之校正)。

圖5：ABC藥物轉運子介導之ATP釋放膜囊泡分析之示意性圖示。

在較低pH (與生理pH相比)之條件下藉由選自由BCRP (ABCG2)或MRP1-6 (ABCC1-6)組成之群之ABC藥物轉運子攝取[^3H]放射性標記ATP或[^{32}P]放射性標記ATP至膜囊泡(穩定過度表現一種類型之ABC轉運子)中可藉由放射性化學分析來研究。隨後，可在不同pH值下研究測試化合物對ABC藥物轉運子介導之ATP釋放的影響(圖中未示)。

圖6：ABC藥物轉運子介導之ATP釋放遷移能力分析之示意性圖示。

在較低細胞外pH (與生理pH相比)條件及/或低氧條件(0-1% O₂ 、5% CO₂、94-95% N₂) (與常氧條件(20% O₂、5% CO₂、75% N₂)相比)下藉由選自由BCRP (ABCG2)或MRP1-6 (ABCC1-6)組成之群之ABC藥物轉運子轉運[3H]放射性標記ATP或[32P]放射性標記ATP至MDCKII細胞(穩定過度表現一種類型之ABC轉運子)中可藉由放射性化學分析或HPLC來研究。隨後，可在不同pH值下研究測試化合物對ABC藥物轉運子介導之ATP釋放的影響(圖中未示)。

圖7：在正常組織中的ABCG2表現之示意性圖示。

箭頭指示基質轉運方向。在大腦及睪丸中，ABCG2主要表現於血管內皮中，分別形成血腦屏障及血液-睪丸屏障之一部分。(來自：Robey等人Curr Pharm Biotechnol 2011)。

圖8：表1：

細胞定位及離子交換泵之功能。

圖9：表2：

在人類及小鼠與大鼠中之不同腦隔室中的MRP/Mrp同功異型物之蛋白及/或基因表現。表改編自Dallas等人(45)。

圖10：丹參(Danshen)化合物之化學結構

圖10 A：來自丹參(Danshen/*Salvia miltiorrhiza*)之化合物之化學結構

圖10 B：來自丹參之主要親脂性化合物之化學結構

圖10 C：來自丹參之主要親水性化合物之化學結構

圖10 D：丹參酸B鎂之化學結構

圖10 E：丹酚酸B之化學結構

圖10 F：靛玉紅之化學結構

圖10 G：靛玉紅-3-肟之化學結構。

圖11：

藉由HRP2藥物靈敏度分析之對抗惡性瘧原蟲3D7之青蒿素之活體外抗瘧疾活性。

圖12：

藉由HRP2藥物靈敏度分析之對抗惡性瘧原蟲3D7之青蒿素及質子泵抑制劑泮托拉唑(pantoprazole；PP)之活體外抗瘧疾活性。

圖13：

藉由HRP2藥物靈敏度分析之對抗惡性瘧原蟲3D7之青蒿素及質子泵抑制劑泮托拉唑(PP)與ATP之活體外抗瘧疾活性。

圖14：

在具有或不具有ATP之情況下個別抗瘧疾藥物青蒿素及與質子泵抑制劑泮托拉唑(PP)之組合之 IC_{50} 值。

圖15：

藉由HRP2藥物靈敏度分析之對抗惡性瘧原蟲3D7之氯喹之活體外抗瘧疾活性。

圖16：

藉由HRP2藥物靈敏度分析之對抗惡性瘧原蟲3D7之氯喹及質子泵抑制劑泮托拉唑(PP)之活體外抗瘧疾活性。

圖17：

藉由HRP2藥物靈敏度分析之對抗惡性瘧原蟲3D7之氯喹及質子泵抑制劑泮托拉唑(PP)與ATP之活體外抗瘧疾活性。

圖18：

在具有或不具有ATP之情況下個別抗瘧疾藥物青蒿素及與質子泵抑制劑泮托拉唑(PP)之組合之 IC_{50} 值。

圖19：

藉由HRP2藥物靈敏度分析之對抗惡性瘧原蟲3D7之雙氫青蒿素之活體外抗瘧疾活性。

圖20：

藉由HRP2藥物靈敏度分析之對抗惡性瘧原蟲3D7之雙氫青蒿素及質子泵抑制劑泮托拉唑(PP)之活體外抗瘧疾活性。

圖21

藉由HRP2藥物靈敏度分析之對抗惡性瘧原蟲3D7之雙氫青蒿素及ATP之活體外抗瘧疾活性。

圖22：

個別抗瘧疾藥物雙氫青蒿素及與質子泵抑制劑泮托拉唑(PP)或ATP之組合之IC₅₀值。

圖23：

圖23 A 藉由HRP2藥物靈敏度分析之對抗惡性瘧原蟲3D7之與丹參酮IIA 組合(比率1:1)的青蒿素之活體外抗瘧疾活性

圖23 B：IC₅₀丹參酮IIA (nM)、IC₅₀青蒿素(nM)及比率TSIIA:青蒿素

圖23 C：自歸一化部分抑菌濃度 (fractional-inhibitory concentration；FIC)分析在圖22 B之各實驗中進行等效線圖分析。所示資料為青蒿素(nM)及丹參酮IIA (TSIIA) (nM)之FIC及理論比率丹參酮IIA:青蒿素之FIC總和。青蒿素與丹參酮IIA之組合為加成的，具有朝向協同的趨勢。

圖24：

圖24 A

藉由HRP2藥物靈敏度分析之對抗惡性瘧原蟲3D7之與靛玉紅-3-肟(I-3-O)組合(比率1:1)的青蒿素之活體外抗瘧疾活性

圖24 B：IC₅₀靛玉紅-3-肟(I-3-O) (nM)、IC₅₀青蒿素(nM)及比率青蒿素:I-3-O

圖24 C：自歸一化部分抑菌濃度(FIC)分析在圖24 B之各實驗中

進行等效線圖分析：所示資料為青蒿素(nM)及靛玉紅-3-脲(nM)之FIC及理論比率青蒿素:靛玉紅-3-脲(I-3-O)之FIC總和。青蒿素與靛玉紅-3-脲之組合為加成的，具有朝向協同的趨勢。

圖25：

圖25 A：藉由HRP2藥物靈敏度分析之對抗惡性瘧原蟲3D7之與靛玉紅-3-脲(I-3-O)組合(比率1:1)的氯喹之活體外抗瘧疾活性

圖25 B：IC₅₀靛玉紅-3-脲(I-3-O) (nM)、IC₅₀氯喹(nM)及比率靛玉紅-3-脲:氯喹

圖25 C：自歸一化部分抑菌濃度(FIC)分析在圖25 B之各實驗中進行等效線圖分析：所示資料為氯喹(nM)及靛玉紅-3-脲(nM)之FIC及理論比率氯喹:靛玉紅-3-脲(I-3-O)之FIC總和。氯喹與靛玉紅-3-脲之組合為加成的。

圖26：

圖26 A：IC₅₀靛玉紅-3-脲(I-3-O) (nM)、IC₅₀青蒿素(nM)及比率青蒿素:I-3-O；其中補充藥物為50 μ M泮托拉唑(PP)。

圖26 B：自歸一化部分抑菌濃度(FIC)分析在圖26 A之各實驗中進行等效線圖分析：所示資料為在添加50 μ M PP時靛玉紅-3-脲(nM)及青蒿素(nM)之FIC及理論比率青蒿素:靛玉紅-3-脲(I-3-O)之FIC總和。在添加50 μ m PP時，青蒿素與靛玉紅-3-脲之組合為加成的。

圖27：

圖27 A：

藉由HRP2藥物靈敏度分析之對抗惡性瘧原蟲3D7之丹參酸B鎂之活體外抗瘧疾活性(IC₅₀大約為10 μ M)

圖27 B：

藉由HRP2藥物靈敏度分析之對抗惡性瘧原蟲3D7之丹參酸B鎂及50 μ M質子泵抑制劑泮托拉唑之活體外抗瘧疾活性(IC₅₀大約為10 μ M)

圖27 C：

藉由HRP2藥物靈敏度分析之對抗惡性瘧原蟲3D7之丹參酸B鎂及50 μM 質子泵抑制劑泮托拉唑與100 μM ATP之活體外抗瘧疾活性(IC_{50} 大約為5-10 μM)。

圖28：

藉由HRP2藥物靈敏度分析之對抗惡性瘧原蟲3D7之板藍根(Radix isatidis)萃取物之活體外抗瘧疾活性。

圖29：

圖29 A：藉由HRP2藥物靈敏度分析之對抗惡性瘧原蟲3D7之益母草鹼之活體外抗瘧疾活性($\text{IC}_{50} = 14.4 \mu\text{M}$)

圖29 B：藉由HRP2藥物靈敏度分析之對抗惡性瘧原蟲3D7之益母草鹼及50 μM 泮托拉唑之活體外抗瘧疾活性($\text{IC}_{50} = 12.4 \mu\text{M}$)。

圖30：

藉由HRP2藥物靈敏度分析之對抗惡性瘧原蟲3D7之丹參酮IIA及10 μM 泮托拉唑之活體外抗瘧疾活性($\text{IC}_{50} = 2.2 \mu\text{M}$)。

圖31：靛玉紅-3-肟對藉由BCRP (ABCG2)之轉運之影響。

與對照組(DMSO)相比在5 μM 及1 μM 靛玉紅-3-肟或1 μM 之BCRP抑制劑Ko143 (n=3)存在下在pH 7.4下淨攝取雌酮-3-硫酸鹽至含有BCRP之膜囊泡中(對野生型對照囊泡中的轉運之校正)。5 μM 靛玉紅-3-肟(I-3-O)之濃度抑制模型基質藥物雌酮-3-硫酸鹽(E3S)之93%的轉運，而1 μM I-3-O抑制E3S之81%的轉運。藉由1 μM 之BCRP抑制劑Ko143對BCRP介導的E3S轉運之抑制為93%。

圖32：靛玉紅-3-肟對藉由MRP4 (ABCC4)之轉運之影響。

與對照組(DMSO)相比在5 μM 及1 μM 靛玉紅-3-肟或150 μM 之MRP4抑制劑MK-571 (n=3)存在下在pH 7.4下淨攝取脫氫表雄酮-3-硫酸鹽(DHEAS)至含有BCRP之膜囊泡中(對野生型對照囊泡中的轉運之

校正)。5 μ M 靛玉紅-3-肟之濃度抑制脫氫表雄酮-3-硫酸鹽(DHEAS)之MRP4介導之34%的轉運。150 μ M之MRP4抑制劑MK-571之濃度抑制DHEAS之94%的轉運。

【實施方式】

如通篇本說明書中所解釋，細胞釋放ATP在病理生理性過程中起重要作用。

在本發明之含義內，現已驚人地發現，藉由使用已知為ABC轉運子之抑制劑或刺激劑的化合物(其中該等化合物較佳已藉由本發明方法鑑定)抑制或刺激、較佳抑制本文所定義(特定而言，如各項中所定義)之ABC轉運子、尤其ABC轉運子介導之ATP釋放，使得細胞釋放ATP減少或增加，從而分別引起細胞外ATP量減少或增加。如本文中別處所述，藉由使用能夠抑制或刺激細胞釋放ATP的化合物抑制或刺激本文所定義之ABC轉運子來調節ATP釋放，可治療與細胞外ATP含量有關的某些疾病。此情況分別在細胞或組織中尤其如此，其中ABC轉運子相較於正常、健康、非病理性組織而言被表現，較佳過度表現。ABC轉運子調節劑之實例為抑制BCRP的泮托拉唑。

與細胞外ATP含量(其為「危險信號」且參與加強各種反應，諸如免疫反應)有關的疾病為例如免疫相關疾病，諸如癌症(15)或瘡疾(21)。其他疾病為例如類風濕性關節炎(17)、動脈粥樣硬化及局部缺血(5)、哮喘或慢性阻塞性肺病(2)、內毒素血症及敗血症(18)、移植物抗宿主疾病(19)，及神經退化性病變，包括阿茲海默氏病、抑鬱症(20)及感染性疾病，諸如流感(22)。與ATP有關之疾病之另一個實例為彈性假黃瘤(Pseudoxanthoma elasticum, PXE) (79)。

因此，在第一態樣中，本發明係關於選自由ABCG2 (BCRP；乳癌抗藥性蛋白)及ABCC1-6 (多藥抗藥性相關蛋白1-6)組成之群之ATP結合匣轉運子(ABC轉運子)在細胞壓力條件下調節ATP釋放、較佳非

溶胞性ATP釋放。更特定而言，在低pH及/或缺氧條件下，例如存在於腫瘤之微環境中。因此，本發明係關於ABC藥物轉運子(ABCG2或ABCC1-6)與較佳腫瘤微環境(低pH及/或缺氧)之伴隨調節。關於所調節之ABC轉運子，此等轉運子可為以下任一或多者：

- BCRP、MRP2、MRP3、MRP4、MRP5及/或MRP6；
- BCRP、MRP1、MRP2、MRP3、MRP5及/或MRP6；
- BCRP、MRP1、MRP2、MRP3、MRP4及/或MRP6；
- BCRP、MRP1、MRP2、MRP3及/或MRP6；
- BCRP、MRP1、MRP4、MRP5及/或MRP6；
- BCRP、MRP2、MRP3、MRP5及/或MRP6；
- BCRP、MRP2、MRP3、MRP4及/或MRP6；
- BCRP、MRP2、MRP3及/或MRP6。

每當提及「ABC轉運子」或「BCRP」時，熟習此項技術者將瞭解，亦提及上述ABC轉運子(之群)。

特定而言，尤其根據本發明之上文所解釋概念，本發明係關於用於以下之活體外方法(「ABC藥物轉運子介導之ATP釋放分析」)：

1.篩選免疫調節劑(分別為「測試化合物」或「化合物」)用於治療與細胞外ATP含量增加(相較於健康、非病理性組織)相關的疾病，諸如免疫/發炎疾病，腦用於治療癌症，更尤其用於新穎的神經膠質瘤療法，更尤其用於高度惡性多形性膠質母細胞瘤及腦轉移。此外，用於消化道之腺癌(包括食道、胃、肝臟、膽管、膽囊、胰臟、小腸(=十二指腸癌症)、結腸、直腸(=結腸直腸癌)及肛門、子宮內膜及肺)，及用於黑色素瘤。特定而言，用於胰管腺癌。此外，用於肝細胞癌(HCC)，特定而言，病理學分化不良G3/G4級HCC組織。此外，用於治療白血病。

2.篩選用於治療感染性疾病(諸如瘧疾及流感)的免疫調節劑，例

如能夠藉由抑制或刺激三磷酸腺苷結合匣轉運子(ABC轉運子)乳癌抗藥性蛋白(BCRP; ABCG2)、MRP1、MRP2、MRP3、MRP4、MRP5及/或MRP6介導之ATP轉運來調節細胞釋放三磷酸腺苷(ATP)的化合物。

3.篩選添加劑用於改良基於細胞之疫苗之生產，特定而言，離體產生用於生產疫苗的樹突狀細胞或天然殺手細胞，該等疫苗尤其用於治療神經膠質瘤及瘧疾。

最近顯示，位於頂端的ABC藥物轉運子BCRP (ABCG2)及MRP4 (ABCC4)轉運內源性化合物，諸如cAMP、cGMP、葉酸及尿酸鹽，以及癌症化學療法及抗逆轉錄病毒療法中所用的核鹼基及核苷類似物(23-25)。對於BCRP (ABCG2)而言，顯示受質藥物可更有效地在低pH下轉運，且此與藥物之解離狀態無關(24)。簡言之，已顯示BCRP對1 μ M甲胺喋呤(MTX)的ATP依賴性轉運在pH 5.1下為在生理性pH下的7倍，且隨著[H⁺]濃度增加而逐漸增加。此外，發現主要(毒性)代謝物7-OH-MTX在低pH下轉運更有效。發現MTX二氫胺酸鹽可在低pH下被BCRP轉運，而在生理性pH下則不能被BCRP轉運。白藜蘆醇(其在pH $\leq$ 7.4下為中性化合物)在pH 6.0下被BCRP有效地轉運，且在pH 7.4下未觀測到轉運。此外，BCRP受質米托蒽醌(mitoxantrone)及拓撲替康在低pH下的轉運亦更有效(24)。

根據本發明，現已尤其發現核苷酸ATP為例如ABC藥物轉運子ABCG2 (BCRP)之受質。臨床上的重要性在於，已發現BCRP在生理性pH下轉運ATP，但在pH 6下轉運ATP更有效(依據pH梯度)。研究放射性標記之ATP (亦即[³H]放射性標記之ATP (圖1及2)，以及[³²P]放射性標記之 γ -ATP)在pH 7.4及pH 6.0下於Sf9-BCRP膜微脂粒及作為對照之野生型微脂粒中的吸收(圖3)來證明此。此具有重要作用，原因在於可表明所觀測之轉運並非ATP、而是其分解產物(二磷酸腺苷(ADP)或單磷酸腺苷(AMP))轉運至微脂粒中，因為ATP在所有細胞間隙中容

易被細胞表面上的外ATP酶、外ADP酶及外核苷酸酶降解。因此，亦證明BCRP轉運 $[^{32}\text{P}]\text{-}\gamma$ 標記之ATP，如圖3中所示。

另外，現已顯示藉由使用Sf9-BCRP微脂粒，可由BCRP受質藥物泮托拉唑及甲胺喋呤抑制BCRP介導之 $[^3\text{H}]$ ATP在低pH下的轉運(圖4)。然而，10 μM 泮托拉唑在低pH下使BCRP介導之ATP釋放減少15%，且需要高濃度的泮托拉唑(>1 mM)才可將ATP轉運減少50%。此外，就MTX而言，至今仍不能完全抑制轉運，100 μM (中等劑量)將ATP轉運抑制約46%。

藉由使用過度表現BCRP的膜微脂粒，現顯示5 μM 靛紅-3-脲(I-3-O)將典型受質藥物雌酮-3-硫酸酯(E3S)轉運抑制93%，而1 μM I-3-O將E3S轉運抑制81%，且將此情況與1 μM BCRP抑制劑Ko143對BCRP介導之E3S轉運的抑制(其為93%) (圖31)進行比較(72)。藉由使用Sf9-MRP4膜微脂粒，現已顯示5 μM 靛紅-3-脲將MRP4介導之去氫表雄酮3-硫酸酯(DHEAS)轉運抑制34% (73)，而150 μM MRP4抑制劑MK-571將DHEAS轉運抑制94% (圖31)。因此，靛紅-3-脲為BCRP (ABCG2)之強抑制劑。因此，本發明人假設靛紅-3-脲抑制BCRP介導之ATP轉運。

此外，使用活體外方法，可測試選自丹參酚酸、紫草酸、丹參酮、靛紅、苦木苦味素、原兒茶酸、黃蓍皂苷、苯酞、益母草鹼及銀杏苦內酯之群的各種草本化合物在低pH下、在泮托拉唑存在及不存在下對BCRP介導之ATP轉運的影響。另外，可測試替莫唑胺及青蒿素在生理性pH及/或低pH下是否為BCRP及/或MRP1-6之受質或抑制劑，且隨後可測試替莫唑胺及青蒿素在低pH下對BCRP介導之ATP轉運的影響。

在生理條件下，大多數細胞之細胞內ATP濃度為5-10 mM，而細胞外濃度據報導在低 μM 範圍內。在血液中，已發現細胞外ATP濃度在

刺激之後的2至4秒為0.2至2 μM 且在刺激之後的3至5分鐘為約20 μM 。此外，已顯示腫瘤間質組織中的ATP濃度在數百微莫耳濃度範圍內，且在健康組織中基本上偵測不到。

此與本發明之發現一致，現首次證明，在低pH之病理生理性(病理性)條件下，ATP由BCRP直接轉運，且在生理性pH下的轉運最少。

最近，已發現ATP釋放(例如自死亡、受損及壓力細胞釋放)至細胞外環境為引起NLRP3炎性體活化以及DC之募集及活化之事件級聯中的第一步驟。

此外，如Trabanelli等人所證明，250 nM ATP刺激增殖、細胞激素釋放、黏附分子表現，及黏附，1 mM ATP誘導細胞凋亡且抑制CD4+ T細胞功能(16)。

因此，伴隨性抑制BCRP與調節腫瘤微環境(酸性壓力)在誘導細胞凋亡及減少腫瘤生長中起重要作用。

為了研究ABC轉運子或其他路徑對ATP轉運及自上皮細胞及非上皮細胞之培養物釋放的作用，迄今已描述不同分析，亦即：

1. 放射性標記之 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP釋放分析，其中所裝載之放射性標記ATP之轉運及釋放係藉助於ATP清除酶己糖激酶量測且以經 ^{32}P 標記之葡萄糖-6-磷酸鹽形式截留。此分析設計之關鍵部分為包含己糖激酶(ATP清除劑)。與其他ATP清除劑(諸如ATP酶/ADP酶三磷酸腺苷雙磷酸酶)對比，己糖激酶使所釋放之 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP以葡萄糖-6- ^{32}P 磷酸鹽形式截留，隨後所培養細胞本身容易將經標記之ATP降解(26)。

2. 非放射性生物分析，其根據來自螢光素酶-螢光素反應的發光量測所釋放的ATP。釋放的每個ATP產生光子，用光度計收集。利用螢火蟲螢光素酶之ATP相關性量測殘餘ATP濃度，其中發光信號與激酶活性成反比(27)。

3. 對表現CFTR之細胞之現有膜片進行的單通道膜片鉗分析，

其中可量測 Cl^- 傳導性與 ATP^- 傳導性的關係(28)。

$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP釋放/截留分析(方法1)與ATP生物發光分析(方法2)均係量測完整ATP之釋放，而且此等方法係以間接方式量測ATP，亦即，此等分析中分別使用己糖激酶(一種ATP清除酶)及螢光素酶(一種催化劑)定量ATP。此外，己糖激酶分析中不可能對促效劑對ATP釋放的影響進行成對分析。雖然螢光素酶分析廣泛用於量測所分離粒線體及通透化全細胞中的ATP含量，但其為敏感性分析，其中為了可靠的結果需要考慮許多變數，例如反應混合物中之螢光素濃度須適於細胞中存在之ATP含量。對表現CFTR之細胞之現有膜片進行的單通道膜片鉗分析(方法3)係評估 Cl^- 及 ATP^- 之相對傳導性。量測傳導性時，此係指示CFTR自身之活性，但亦可能與傳導 ATP^- 陰離子之緊密關聯通道有關。

上述研究均未研究在低pH下，藉由藥物轉運子BCRP釋放ATP或均未顯示在低pH下，調節劑對藥物轉運子釋放ATP的影響。

本發明提供一種如下鑑定免疫調節劑的新穎方法：藉由使用膜微脂粒或藉由使用極化細胞單層，在低pH及/或缺氧的條件下，藉由選自由BCRP (ABCG2)及MRP1-6 (ABCC1-6)組成之ABC轉運子群組之一種類型的ABC藥物轉運子研究藥物或化合物(在不同劑量下)對釋放ATP、較佳 $[\text{}^{32}\text{P}]\gamma\text{-ATP}$ 、以及 $[\text{}^3\text{H}]$ ATP或未經標記之ATP的影響。欲知詳情，參見段落「藉由選自由BCRP (ABCG2)及MRP1-6 (ABCC1-6)組成之群之至少一種類型的ABC轉運子鑑定細胞釋放ATP之調節劑的活體外方法」。

量測腫瘤細胞功能的大多數活體外分析通常在中性至鹼性pH下進行。在瞭解活體內腫瘤行為時，此會引起明顯的不準確，原因在於腫瘤微環境展現低pH且每個pH單位轉移代表 H^+ 濃度之10倍變化。已顯示pH之輕微變化可對轉運子活性增強、從而引起細胞釋放ATP增加

具有深刻的影響。因此，研究化合物在(病理)生理性相關條件下的調節效應具有重要作用。由於現有活體外方法考慮腫瘤微環境參數低pH或腫瘤微環境參數缺氧，因此本發明活體外方法適用於將臨床前概念轉換為臨床概念，從而達成在臨床前選擇在臨床研究中成功潛在性較高的免疫調節劑。

新穎神經膠質瘤療法治療神經膠質瘤及神經膠質瘤幹細胞尤其受到關注，其係基於細胞外ATP在引發導致NLRP3炎性體活化及募集與樹突狀細胞活化之事件級聯中的作用，及BCRP在神經膠質瘤及神經膠質瘤幹細胞中的高度表現，及存在於神經膠質瘤環境中的低pH及缺氧。

在下文中，描述藉由至少一種類型的ABC轉運子鑑定細胞釋放ATP之調節劑的活體外方法。

藉由選自由BCRP (ABCG2)及MRP1-6 (ABCC1-6)組成之群之至少一種類型的ABC轉運子鑑定細胞釋放ATP之調節劑的活體外方法

膜微脂粒

經分離之質膜之微脂粒非常適於表徵轉運系統之功能特性。現今，可容易獲得膜微脂粒用於研究腎及肝膽管轉運，該等膜微脂粒係利用肝臟中之竇狀隙(底側)及膽小管(頂端)膜製備及利用腎臟中之刷狀緣(頂端)及底側膜製備。藉由使用膜微脂粒進行藥物轉運研究，可分別量測穿越底側膜及頂膜的藥物轉運，且可忽略細胞內結合及/或代謝。ABC藥物轉運子可經由轉染(使用逆轉錄病毒或桿狀病毒)或藥物選擇法而過度表現於細胞質膜中。在大部分應用中，利用穩固的桿狀病毒昆蟲細胞系統使轉運子表現於昆蟲細胞株中，例如Sf9昆蟲細胞。經分離之膜微脂粒亦可利用根據抗藥性所選擇之過度表現轉運子的人類細胞株(諸如HEK293及MDCKII細胞)製備。使用Sf9昆蟲細胞的優點在於，可獲得ABC轉運子之高表現量(29)。因此，可使用各種

細胞，較佳Sf9昆蟲細胞，以及HEK293、MDCKII細胞，表現經分離之膜微脂粒中的特定ABC藥物轉運子。

膜微脂粒(穩定地過度表現選自由BCRP (ABCG2)及MRP1-6 (ABCC1-6)組成之群之一種類型的ABC轉運子)可獲自Solvo Biotechnology或可如文獻(29,30)中所述製備。微脂粒緩衝液及各試劑之溶液須調節至適當pH (範圍為pH 5至pH 7.4)，如Breedveld等人, Mol Pharmacol 2007 (24)中所述。

當具有取向朝向細胞質之活性位點的ABC藥物轉運子(諸如MRP1-6 (ABCC1-6)或BCRP (ABCG2))過度表現於質膜中時，此可引起受質之ATP依賴性吸收至由內向外取向之膜微脂粒製劑中(30)。隨後，經微孔濾器過濾之後可定量受質之吸收(參見圖5)。為了容易研究膜微脂粒之吸收，需要使用放射性標記藥物及化合物，且此優點在於ABC轉運子介導之任何所關注化合物吸收可藉由放射化學分析直接量測。藉由測試不同濃度之「測試化合物」，可獲得藥物動力學參數，亦即Km及Vmax。對藥物吸收至膜微脂粒中的研究非常適用於具有親水性的藥物或化合物，因為大部分親脂性化合物容易黏附於膜。

藉由使用本身為受質藥物的放射性標記ATP，亦即較佳為 γ -[^{32}P]放射性標記之ATP，以及[^3H]-ATP，現可利用此活體外膜微脂粒分析測試藥物或化合物(在不同劑量下)在低pH條件下(較佳為pH 5-6.5、但低於7.0或7.1，)相較於在生理性pH (亦即7.3) (其範圍為7.1至7.4)下直接抑制或刺激ABC轉運子轉運ATP (在不同劑量下)的能力。為了測試化合物對ABC轉運子介導之低劑量ATP轉運的影響，較佳使用濃度為0.1至1 μM 的放射性標記ATP。為了測試化合物對ABC轉運子介導之高劑量ATP轉運的影響，較佳使用濃度為50 μM 至5 mM的ATP。

轉移盤分析(Transwell assay)

雖然可使用多種細胞進行此分析，但細胞必須(a)過度表現所關

注之藥物轉運子，且(b)形成功能上極化、完全實現緊密細胞外連接的細胞單層。就此而言，經各種藥物轉運子轉染的豬腎上皮細胞(LLC-PK1)或馬丁-達比犬(Madin-Darby canine)腎II上皮細胞(MDCKII)(雙重)有助於證明藥物轉運子活性。此等細胞所需的培養時間相對較短，使得LLC-PK1及MDCKII細胞成為鑑定藥物轉運子活性的優良工具，因為人類ABC轉運子可藉由轉染方法穩定地過度表現於此等細胞株中。然而，表現於親本及經轉染細胞株中的內源性藥物轉運子亦可促進此等細胞中之藥物轉運。舉例而言，內源性MDR1 P-gp存在於MDCKII親本細胞株中，且其在經MRP2轉染之MDCKII細胞中的表現甚至更高。抑制此等細胞中之內源性藥物轉運子對於正確評估所研究之藥物轉運蛋白在藥物轉運中的作用可為必需的。舉例而言，為了研究BCRP介導之轉運，需要用伐司撲達(valspodar)抑制內源性P-gp,伐司撲達可獲自商業供應商。為了研究MRP介導之藥物轉運，需要用依克立達(elacridar)抑制內源性P-gp及BCRP，依克立達可獲自商業供應商。

可使用轉移盤系統研究穿越單層的藥物轉運(圖6)。將所關注之(放射性標記)藥物或化合物施加於極化上皮細胞或內皮細胞之匯合單層之頂面或底側面，且化合物穿越匯合細胞單層之所得流量可藉由放射化學分析或藉由HPLC分析量測。如圖7中所示，頂端藥物流出轉運子(諸如P-gp、MRP2或BCRP)將其受質藥物自細胞中抽出，與自頂面向底側面(AB)轉運(亦即主動轉運)相比，使得自底側面向頂面(BA)的轉運增強。當化合物不為藥物流出轉運子之受質時，自底側面向頂面(BA)轉運相當於自頂面向底側面(AB)轉運，亦即非主動轉運(圖7)。當研究底側藥物流出轉運子(諸如MRP1 (ABCC1)或MRP3 (ABCC3))之受質藥物轉運時，觀測到相反結果：與自底側面向頂面(BA)轉運相比，藉由底側藥物流出轉運子進行的主動轉運使得自頂面向底側面

(AB)的轉運增強(未圖示)。因此，藥物流出活性可藉由藥物滲透性出現雙向差異來鑑定，藥物滲透性可受所述藥物流出轉運子之抑制劑影響。對藥物穿越單層流出的研究非常適用於具有親脂性的藥物或化合物，因為大部分親水性化合物不容易穿越膜而到達藥物流出轉運子。

在轉移盤分析中，藉由將培養基之pH調節至低pH (pH 5-7，較佳為pH 6-6.5，但低於7.0) (如Breedveld等人, Mol Pharmacol 2007 (24)中所述)，可模擬細胞外腫瘤pH。在此「低pH轉移盤分析」中，藉由使用放射性標記之ATP (較佳為 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP)作為受質，可測試穿越穩定過度表現ABC轉運子之細胞(諸如MDCKII細胞)單層的轉運。隨後，可量測測試化合物對ABC轉運子介導之細胞釋放ATP的影響與時間的關係。為了測試化合物對ABC轉運子介導之低劑量ATP轉運的影響，熟習此項技術者已知適合的量。適合量可為0.1至1 μM 放射性標記ATP之濃度。為了測試化合物對ABC轉運子介導之高劑量ATP轉運的影響，熟習此項技術者已知適合的量。適合量可為50 μM 至5 mM ATP之濃度。

另外，在各別實驗中，測試化合物在低(細胞外) pH下對ABC轉運子介導之細胞內ATP (已存在於細胞中)流出的影響可藉由隨時間定量細胞內ATP含量與定量ATP於頂端及底側隔室中的濃度來測定。ATP於此等隔室中的濃度可藉由HPLC分析量測，如Manfredi等人所述(27)。此外，此等實驗可在缺氧條件(0.5%-1% O_2 、5% CO_2)下如下進行：將MDCKII細胞在低氧條件下暴露48小時，隨後在缺氧氛圍控制的恆溫箱中起始實驗，保持細胞處於未操縱狀態48小時，藉此避免 O_2 壓力變化。

總體而言，此分析可為研究測試化合物在病理生理性/腫瘤樣條件(亦即細胞外低pH及/或缺氧細胞)下對ABC轉運子介導之細胞釋放ATP之影響的活體外模型。

為了治療神經膠質瘤，重要的是測試化合物穿過血腦障壁(BBB)。BBB係由專門化的腦內皮細胞組成，該等腦內皮細胞與星形膠質細胞、神經元及周皮細胞一起形成神經血管單元。形成血腦障壁的專門化微血管內皮細胞係藉由緊密接點連接，該等緊密接點充當限制細胞旁通道之物理障壁。此外，Cantrill等人已顯示，可利用轉移盤模型研究BBB處之遞送過程，該轉移盤模型使用豬腦內皮細胞(PBEC)與大鼠初級星形膠質細胞(CTX-TNA2細胞株)之共培養物(31)。此外，其顯示此等細胞中存在P-gp及BCRP活性。有關的是，其已顯示星形膠質細胞釋放ATP，從而介導微膠質細胞活化(20)。

因此，當使用豬腦內皮細胞與大鼠初級星形膠質細胞(CTX-TNA2細胞株)之共培養物替代MDCKII細胞時，本發明人的「病理生理性轉移盤分析」可為研究測試化合物在神經膠質瘤樣條件(亦即細胞外低pH及/或缺氧細胞)下對ABC轉運子介導之細胞釋放ATP之影響的理想活體外模型。

此外，研究測試化合物在低pH及/或缺氧條件下對ABC轉運子介導之神經膠質瘤細胞株(諸如人類U87-MG)或原發性兒科高度惡性神經膠質瘤(pHGG)或彌散性內因性腦橋神經膠質瘤(DIPG)或大鼠C6神經膠質瘤細胞株釋放(放射性標記之) ATP的影響另外與進一步篩選用於治療神經膠質瘤之潛在免疫調節劑高度關聯。

總而言之，「ABC藥物轉運子介導之ATP釋放分析」可用於測試藥物或化合物抑制或刺激ATP (例如放射性標記之 γ -[32 P] ATP、[3 H] ATP及細胞內ATP)藉由ABC轉運子之轉運，該等ABC轉運子選自由BCRP (ABCG2)及MRP1-6 (ABCC1-6)組成之群，該測試較佳在低pH (<7.1) (相較於生理性pH (pH 7.1-7.4))條件下及/或在缺氧條件(0-1% O₂、5% CO₂、94-95% N₂)下進行。在ABC藥物轉運子BCRP (ABCG2)的情況下，此顯示藥物或化合物是否可為BCRP介導之ATP釋放的有

效調節劑，且因此可為開發用於例如發炎及感染性疾病之新穎療法、尤其用於治療(高度惡性)多形性膠質母細胞瘤之新穎療法的有效免疫調節劑。

ABC藥物轉運子：一般性概述

ATP結合匣(ABC)轉運子超家族係由在功能上多種多樣的很多跨膜蛋白組成，其已再分成七個家族，表示為A至G。此等轉運子促進化學上多種多樣的受質(包括、脂質、無機離子、肽、醣類、金屬、外來物及蛋白質)單向移位穿過內皮膜。自細胞擠出之此現象係以活躍的ATP依賴性方式發生，且可依照陡削的濃度梯度發生。此等轉運子存在於幾乎所有的組織及細胞類型中。迄今為止，已鑑定出十六種成員與人類疾病有關。然而，迄今咸信嚴重影響癌症化學療法的主要ABC藥物轉運子僅有三種，包括P-醣蛋白(P-gp、MDR1、ABCB1)、多藥抗藥性蛋白1(MRP1；ABCC1)及BCRP(ABCG2；MXR)(32)。

170 kDa P-醣蛋白為第一個發現的ABC藥物轉運子且為研究最廣泛的ABC轉運子。P-gp於腫瘤細胞中的表現使此等細胞轉變為多藥抗藥性細胞。臨床上應用的鈣離子通道阻斷劑維拉帕米(verapamil)對多藥抗藥性白血病細胞株抑制藥物流出且恢復藥物敏感性的發現產生如下思想：抑制P-gp的化合物可逆轉患者中之P-gp介導性MDR，且促成P-gp抑制劑之開發。儘管開發出各種P-gp(及BCRP)抑制劑，但針對抗癌劑的抗藥性現今仍為癌症治療中的問題。

ABC轉運子家族中之所有成員均利用ATP水解所提供的能量使受質移位且MRP1-2及MRP4-5亦需要麩胱甘肽(GSH)之生理性濃度用於其正常轉運活性。

ABCG2 (BCRP)之表現

1998年，根據BCRP在阿黴素高度抗藥性MCF7乳癌細胞株中的過度表現，首次選殖BCRP。隨後研究揭示，首次選殖的BCRP cDNA代

表突變型BCRP，其在精胺酸482與野生型BCRP不同。人類BCRP編碼655胺基酸ABC蛋白，其含有單個N末端ATP結合匣、繼之為6個推定的跨膜區段(TMS)，且因此通常稱為「半轉運子」。BCRP屬於ABCG基因家族。根據與迄今所分析之其他ABC藥物流出轉運子的類似性，半轉運子BCRP似乎很可能起同二聚體的作用。

ABCG2 (BCRP)主要表現於體內的上皮細胞中，其中其定位於頂膜上。結果，BCRP受質自上皮之底側轉運至頂面。自細胞擠出之此現象係以活躍的ATP依賴性方式發生，且可依照陡削的濃度梯度發生。因此，BCRP具有重要的障壁功能。

ABCG2 (BCRP)於正常組織中之表現

ABCG2 (BCRP)表現於多種正常人類組織中。特定而言，已觀測到肝臟小管膜、胃腸道(小腸及結腸)之上皮、腎臟近端小管、胎盤合胞體滋養層以及乳房之導管及小葉中的顯著且一致性BCRP表現。亦在人類之泌乳乳腺、而非處女或非泌乳乳腺中，發現ABCG2基因在肺泡上皮細胞之頂膜上的高表現。此外，BCRP存在於靜脈及毛細血管內皮細胞中，包括腦內皮(亦即血腦障壁)，但不存在於動脈內皮中(33,34)。BCRP亦表現於多種幹細胞中，包括肌肉、神經、睪丸幹細胞及造血來源之彼等幹細胞，且為側群(SP)表型之分子決定子(35)(參見圖7)。另外，BCRP (ABCG2)表現於小鼠、恆河猴及人類之成熟紅血球上(74)。此外，BCRP表現於免疫細胞中；發現表皮郎格罕氏細胞(Langerhans cells, LC)及皮膚間質性樹突狀細胞(IDC)表現ABC藥物轉運子BCRP (ABCG2) (36)。經PPAR γ 活化的樹突狀細胞亦高量表現功能性ABCG2蛋白(37)。

ABCG2 (BCRP)於腫瘤組織中之表現

抗藥性為癌症治療中之常見現象。對化學療法產生抗性的一個原因為腫瘤細胞表現ABC轉運子，從而將此等細胞轉變為多藥抗藥性

細胞，因為不同化學類別之多種化合物為ABC藥物轉運子(諸如ABCG2 (BCRP)、ABCB1 (P-gp)及ABCC1-6 (MRP1-6))之受質。已針對收集到關於ABCG2導致抗藥性的大部分資料。在對來自患有實體腫瘤之未治療癌症患者的150個試樣使用抗ABCG2單株抗體BXP-21的研究中，所有21種腫瘤類型中均發現ABCG2表現，其中消化道、子宮內膜及肺之腺癌及黑色素瘤中出現的頻率相對提高。在胰管腺癌中，BCRP高表現為早期腫瘤復發及不良存活率的重要預後性因素。BCRP表現在肝細胞癌(HCC)中亦上調且在病理學分化不良型G3/G4級中的表現比在G1/G2 HCC組織中的表現高(38)。在一些實體腫瘤(諸如卵巢癌及乳癌)中，ABCG2表現頻繁地顯示與臨床結果不相關。有關的是，許多其他人類實體腫瘤(諸如肺癌及食道癌)中的ABCG2表現與消極預後有關(39)。此外，ABCG2在神經膠質腫瘤中顯示強表現。相較於低分級腫瘤，ABCG2 (BCRP)在高度惡性腫瘤中呈現更高表現量(34)。最近，已在神經膠質瘤幹細胞中偵測到ABCG2表現，且ABCG2之表現量與提高之神經膠質瘤病理學分級非常相關，亦即，在小於10%之低分級神經膠質瘤(分級I + II)中及在超過40%之高度惡性神經膠質瘤(分級III + IV)中觀測到ABCG2之免疫染色呈陽性，表明ABCG2可為神經膠質瘤進展之標記(40)。研究ABCG2於食道鱗狀癌細胞中之表現的最新研究中觀測到相同現象：ABCG2表現顯著地隨病理學分級及TNM分級提高而增加。此外，ABCG2於淋巴結轉移群組中的表現顯著於未轉移群組(39)。

ABCG2 (BCRP)於幹細胞中的表現

幹細胞具有自我更新(亦即表型無變化的增殖)與分化(亦即變成新表型)的能力。一些幹細胞已經歷相當多的分化，因此進一步分化侷限於單一細胞類型或譜系。其他幹細胞為多能幹細胞且分化成多種細胞類型(亦即造血幹細胞)。

側群(SP)細胞為具有長期重建能力之原生骨髓源幹細胞群。SP表型可根據螢光染料Hoechst 33342之流出來測定。ABC轉運子BCRP (ABCG2)主要決定著SP表型(亦即Hoechst染料之轉運)，至少決定骨髓中之SP表型。除BCRP之外，P-gp亦能夠使Hoechst染料流出，但流出程度比BCRP的能力小。存在於SP細胞中的MRP (亦即MRP1、3及4)均不能夠使Hoechst染料流出(35)。儘管來自*Mdr1a/1b*基因剔除小鼠的骨髓細胞含有正常數目個SP細胞，但觀測到*Bcrp1*^{-/-}小鼠之骨髓及骨骼肌中的SP細胞明顯減少，表明*Bcrp1*為SP之分子表型(35)。SP細胞因造血幹細胞(HSC)活性而高度富集。因重建能力而知名之典型幹細胞群KLS (ckit/Sca-1/Lin)中約70%亦具有SP表型。Zhou等人發現，不存在ABCG2 (BCRP)的造血細胞對BCRP受質米托蒽醌明顯更敏感。此結果表明，HSC中之ABCG2表現的生理功能可防止細胞毒性受質。Scharenberg等人顯示，BCRP於推定之造血幹細胞(分離為SP、341/382或341/KDR1群體)中的表現量相對較高且在定向祖細胞(341/381、341/331，或341/101)中的表現量急劇下降。大部分成熟群體中的表現仍較低，但在天然殺手細胞及紅血球母細胞中的表現再次上升。

Van Dijk等人顯示，BCRP在脂肪組織源幹細胞(ASC)中被表現且具有功能活性。ASC為再生性疾病(如心肌梗死之後)之有前景候選物。ASC (亦即具有間葉細胞來源)在培養時顯示高增殖速率且更容易大量收穫。另外，ASC已顯示具有向若干細胞類型(包括內皮細胞及心肌細胞)分化的能力。相反，僅發現P-gp之少量表現無功能活性。BCRP在早期繼代的ASC (繼代2)中的表現最顯著。重要的是，局部缺血誘發BCRP之表現。另外，若阻斷BCRP，則局部缺血1小時之後已發現死亡ASC顯著增加。因此，BCRP保護ASC以防發生局部缺血誘發之細胞死亡。

近年來，已變得明朗化的是，SP群體不僅存在於骨髓內，而且存在於其他造血器官中，諸如脾臟組織、臍帶血液、腦、腎臟、心臟、腸、皮膚及肺。在此等器官中，其在活體內再引入之後，仿佛具有分化成許多細胞類型的能力，包括骨骼及心肌、神經元及上皮細胞，如肝細胞，而且在致死性照射之小鼠中具有分化成造血細胞的能力。HSC之此多能分化能力表明此等細胞對組織重塑的貢獻明顯。BCRP之表現降低導致細胞分化，表明BCRP可經由分化表現來決定幹細胞誘發之組織重塑。在造血性分化期間，ABCG2含量初始下調，但蛋白質在一些成熟細胞類型(例如紅血球譜系)中再次被表現(低量)(35)。人類神經、視網膜及胚幹細胞中亦發生相同現象。當藉由使用逆轉錄病毒介導之轉導使ABCG2過度表現於視網膜祖細胞中時，分化被阻斷。Si-RNA介導之視網膜祖細胞表現ABCG2靜默可消耗SP群體且促進分化。

BCRP於癌症幹細胞中之表現

通常認為習知化學療法不能殺死所有腫瘤細胞，且對化學療法具有抗性且能夠引發腫瘤的較小細胞子群可能為復發及轉移之來源。此等細胞稱為癌症幹細胞(CSC)，其已發現於多種造血及實體腫瘤類型中，包括白血病、乳癌、前列腺癌、神經膠質瘤、髓母細胞瘤、胰臟癌、胃癌、肝癌、結腸直腸癌及卵巢癌。根據CSC模型，治療後的最小殘餘疾病及腫瘤復發將由剩餘的治療抗性CSC部分產生，而轉移潛在性將為CSC專門特性。

CSC可能具有正常幹細胞之許多共同特性，諸如自我更新及無限制的增殖潛在性。如正常組織，癌細胞株及原發瘤細胞含有SP。SP細胞之存在已證明在許多實體腫瘤之腫瘤生長及復發中起重要作用。舉例而言，來自胰臟癌細胞株之SP具有上皮細胞向間葉細胞傳導、侵入及轉移的強能力。因此，為了達成靶向此等細胞之有效治療策略，

需要分離及表徵CSC。就偵測CSC之方法而言，鑑定CSC之特定標記為較佳方法。CSC引發腫瘤及抗化學療法能力可歸因於若干ATP結合匣(ABC)轉運子(諸如ABCG2及MDR1)之表現。ABC轉運子BCRP(ABCG2)主要決定著SP表型。

在任何情況下，在若干實驗系統中，惡性SP細胞已顯示具有比非SP細胞高的選殖源性及致瘤潛在性。舉例而言，在對NOD/SCID小鼠之研究中，來自SK-MG-1 (人類神經膠質瘤細胞株)之癌症幹細胞樣細胞的SP群體在植入之後第8週，在此等小鼠之腦中產生腫瘤，而非SP細胞在腦中不產生任何腫瘤。作為另一實例，自HCC細胞株HCCLM3、MHCC97-H、MHCC97-L及Hep3B分選出的SP細胞具有癌症幹細胞，與轉移潛在性及治療抗性有關。由於此等特徵，因此SP細胞可決定著某些腫瘤之侵襲行為以及抗藥性之發展；因此，靶向此亞群之策略可具有治療意義。

BCRP於免疫細胞中之表現

抗原呈遞細胞(如樹突狀細胞)因將其所捕捉抗原呈遞給特異性T細胞而為免疫反應之重要調控者。一般而言，DC之成熟狀態為免疫反應將如何演變之關鍵決定因素。與本專利申請案有關的是，發現表皮郎格罕氏細胞(LC)及皮膚間質性樹突狀細胞(IDC)表現ABC藥物轉運子BCRP (ABCG2)。此外，CD34+血液DC前驅物上存在低BCRP表現且在其分化為LC時，表現增強(36)。核激素受體過氧化體增殖活化受體 γ (PPAR γ)直接且轉錄式誘發人類骨髓樣譜系之細胞類型(單核細胞源樹突狀細胞)表現ABCG2。經PPAR γ 活化的樹突狀細胞高量表現功能性ABCG2蛋白，且使擠出外來物的能力增強。此等特徵在免疫調控期間可對人類樹突狀細胞之存活及抗藥性具有重要影響且亦具有治療結果(37)。最近，Kooij等人已顯示，亦表現於多種免疫細胞(如單核細胞、DC、T及B細胞)上且涉及發炎分子(諸如類固醇、前列腺

素及細胞激素)流出的P-gp因控制DC成熟及隨後DC誘發之T細胞反應而在免疫反應中起作用。著者顯示，相較於野生型動物，P-gp基因剔除小鼠(*Mdr1a/1b*^{-/-})顯示的實驗性自體免疫腦脊髓炎(EAE)之臨床徵象減少。在*Mdr1a/1b*^{-/-}動物患病期間，所觀測到之差異與減少之腦發炎、CNS脫髓鞘及整體減少之T細胞反應有關。其假定P-gp藉由影響促炎性細胞激素(如TNF- α 及IFN- γ)之分泌來介導DC成熟，因為在DC與T細胞相互作用期間，偵測到此等細胞激素之含量較低。然而，有爭議的問題仍為P-gp本身是否能夠轉運細胞激素或P-gp涉及其他相關生理性受質(如血小板活化因子)之分泌，作為二次影響，此分泌又會影響細胞激素分泌(如IFN- γ) (41)。

根據本發明之發現，現已顯然，核苷酸ATP為藉由ABC藥物轉運子BCRP在病理生理性條件(諸如低pH及推測而知的缺氧，其尤其存在於腫瘤微環境中，特定而言，存在於轉移性細胞中)下釋放的相關生理性受質(42)。

BCRP於腦及中樞神經系統：血腦障壁、血液-腦脊髓液障壁及腦實質中的表現

迄今為止，用化學療法治療原發性或轉移性腦腫瘤因抗癌劑在腦組織中之分佈較低而受限制。此低功效的重要原因為腦針對藥物的有效阻止，此有效阻止牽涉兩種藥物滲透性障壁：(1)血腦障壁(BBB)及血液-腦脊髓液(CSF)障壁。BBB主要由腦中之毛細血管內皮形成。其相鄰邊緣處的內皮細胞形成緊密接點，從而防止極性溶質經由細胞旁路徑擴散性進入。腦毛細血管內皮中不存在窗孔、微脂粒運輸及胞飲，此進一步限制腦間質組織與血液之間的自由流動。一些疏水性藥物經由內皮細胞膜擴散被存在於此等細胞之頂端(腔)膜中的轉運子(諸如P-gp及BCRP)抵消。最近已顯示，ABC轉運子之內源性受質包括發炎介體，諸如前列腺素、白三烯、細胞激素，表明ABC轉運子在免疫

反應(包括發炎性腦病症)中的潛在作用。血液-CSF障壁係由脈絡叢之上皮形成，脈絡叢之上皮亦含有轉運蛋白，如MRP1，其充當某些藥物自血液進入之障壁。

BCRP已顯示可表現於BBB (亦即腦微血管內皮)中(33)。Aronica等人之報導(34)證明人類腦組織中存在BCRP蛋白。發現BCRP一致地表現於人類顳皮層及海馬狀突起之溶胞物中且其表現相較於其他ABC轉運子(諸如P-gp)相對較高。在來自難治性癲癇症患者的神經膠質腫瘤組織中，發現較強的BCRP蛋白表現。BCRP在高度惡性腫瘤中之表現量顯示高於低分級腫瘤。然而，在對照腦組織中，BCRP僅表現於血管中，且未發現神經膠質或神經元BCRP免疫反應性。BCRP在神經膠質瘤(星形細胞瘤、未分化星形細胞瘤、多形性膠質母細胞瘤、未分化寡樹突膠質瘤)及膠質神經元腫瘤中之微血管中的強表現可決定性地影響抗癌劑在腫瘤內之致癲癇區域中的轉運及生物可用性(34)。此外，Bhatia等人顯示，BCRP表現於多形性膠質母細胞瘤及星形細胞瘤細胞之核萃取物中(44)。

中樞神經系統中之藥物轉運不僅受血腦障壁及血液-腦脊髓液障壁，而且受腦實質的高度調控。實質細胞(諸如微膠質細胞及星形膠質細胞)之細胞膜充當藥物滲透性之第二「障壁」且表現其特性似乎類似於位於習知腦障壁之特性的轉運子。腦實質係由神經元及周圍神經膠質細胞組成。大神經膠質係由星形膠質細胞及寡突膠質細胞組成，且在整個生命期間增殖，尤其在對損傷作出反應時。微膠質細胞視為腦之常駐免疫細胞。在腦中，星形膠質細胞藉由釋放膠質遞質(諸如麩胺酸鹽及ATP)且從而形成神經元-神經膠質及神經膠質-神經膠質網路而在細胞至細胞信號傳導中起主動作用。星形細胞釋放ATP涉及調節多種神經元活性，影響興奮性、突觸傳導、細胞死亡、生長及存活。星形膠質細胞釋放ATP為星形膠質細胞中Ca²⁺波傳播及突觸

功能之反饋調節所必需的。細胞外ATP顯示可誘導含有豐富ATP之溶酶體發生部分胞吐。星形膠質細胞之經調控之溶酶體胞吐可促進細胞間信號傳導。鈣波傳播為星形膠質細胞當中細胞間信號傳導的最顯著形式，且此傳播主要藉由ATP釋放來介導。所有類型的膠質細胞均表現嘌呤激導性受體。星形膠質細胞釋放的ATP亦經由刺激嘌呤激導性受體來調節星形膠質細胞及微膠質細胞之活性；P2X7受體在星形細胞中為分佈廣泛的。ATP可活化星形細胞中之P2X7受體以釋放麩胺酸鹽、GABA，且ATP亦可調控神經元在某些病理學條件下的興奮性。已提出，星形細胞可藉由損傷細胞所釋放之ATP的量來感測CNS損傷之嚴重程度，且細胞外ATP濃度調節TNF- α 介導之發炎反應。星形細胞具有許多營養素及藥物轉運蛋白，包括若干核苷轉運子以及P-gp、BCRP及MRP1 (75)。除溶胞性ATP釋放之外，星形細胞已顯示可以非溶胞性方式釋放ATP，以回應於滲透性腫脹、機械性刺激、細胞外Ca²⁺之脫除、及麩胺酸鹽、UTP、去甲腎上腺素或NO之刺激。然而，非溶胞性ATP釋放的準確路徑仍存爭議(43)。腫脹誘導小鼠皮層星形細胞釋放ATP對於Pgp及MRP1轉運子之阻斷劑(格列本脲(glibenclamide)、丙磺舒(probenecid)、維拉帕米(verapamil))及P2X7受體之阻斷劑(亮藍G (brilliant blue G))不敏感。另外，發現連接蛋白及泛連接蛋白半通道阻斷劑(1-辛醇、卡本諾(carbenoxolone))及VSOR陰離子通道阻斷劑(根皮素(phloretin)、DCPIB)對腫脹誘導小鼠星形細胞釋放ATP的影響不明顯(43)。此外，胞吐在腫脹誘導星形細胞釋放ATP中似乎亦不起作用(43)。

因此，假設星形細胞釋放ATP在病理生理性條件下受ABC轉運子調控。

耐多藥性相關蛋白1-6 (ABCC1-6；MRP1-6)

耐多藥性相關蛋白(multi-drug resistance associated protein；

MRP)家族至少含有九個具有1325至1545胺基酸尺寸之成員(MRP1-9)。所有MRP成員具有疏水性跨膜結構域及細胞質核苷酸結合結構域。MRP可根據其結構中之第三(NH₂-末端)跨膜結構域之存在或不存在來分類。此拓撲特徵可在MRP1、MRP2、MRP3、MRP6及MRP7中發現，而MRP4、MRP5、MRP8及MRP9不具有其。具有此結構特徵之MRP有能力轉運共軛物，而不具有該結構特徵之MRP能夠轉運環核苷酸。

在中樞神經系統(Central Nervous System ; CNS)中之表現

如上文所描述，對於ABC藥物轉運子BCRP (ABCG2)，對CNS的主要屏障為血腦屏障(blood-brain-barrier ; BBB)及血液-腦脊髓液屏障。血液-CSF屏障在解剖學上由位於橫向、第三及第四心室之脈絡叢定義。包含此等屏障之細胞表現多個ATP依賴性、膜結合、流出轉運子，除了P-醣蛋白(P-glycoprotein, P-gp ; ABCB1)及BCRP (ABCG2)之外，耐多藥性相關蛋白(MRP)家族亦有助於降低藥物累積。藉由ABC轉運子預防化合物在CNS中之累積視細胞之與底外側相對的頂部表面上之轉運子的選擇性表現而定。舉例而言，ABC轉運子MRP1定位於脈絡叢上皮細胞之底外側膜處，而P-gp及BCRP在形成血腦屏障之大腦毛細管的內皮細胞之頂膜處表現。Mrp4表現係位於脈絡叢上皮之底外側膜及位於大腦毛細管內皮之頂膜處，進而限制藥物或化合物自血液移動至大腦中或至CSF中，進而保護大腦免於化學療法，如拓朴替康(topotecan)所示。大腦之細胞組分實質可經由許多相同轉運子之表現充當藥理學藥劑之腦滲透的第二屏障。在表2中，給出MRP/Mrp同功異型物在人類、小鼠及大鼠之不同腦隔室中的蛋白及/或基因表現之概述(45)。Nies等人展示了MRP4及MRP5但非MRP1、MRP2、MRP3或MRP6在皮層下白質之星形膠質細胞中之表現。

MRP在神經膠質瘤中之表現

Calatozollo等人研究了P-gp及MRP1、MRP3與MRP5在惡性神經膠質瘤患者中之表現。48個神經膠質瘤標本及21個原生培養物之細胞螢光分析展示了MRP1之較高位準、MRP5之中等位準及P-gp與MRP3之較低位準。25個神經膠質瘤標本之免疫組織化學展示了MRP1 (51.3%)、MRP5 (45.8%)、P-gp (34.8%)及MRP3 (29.9%)在腫瘤細胞中之表現。此外，藉由即時定量的PCR進行腫瘤樣本之分析展示了所有研究的MRP及P-gp之mRNA表現。在神經膠質瘤標本中及在腫瘤衍生的內皮細胞中分析的腫瘤脈管展示了所有研究蛋白之表現。非腫瘤腦樣本及正常人類星形膠質細胞與內皮細胞亦表現MRP1及MRP5。在原發或復發性神經膠質瘤之間未偵測到蛋白表現方面的顯著差異，表明神經膠質瘤化學抗性主要為內在的(46)。

Declèves等人亦研究了MRP在來自患有多形性膠質母細胞瘤之患者的2個相異神經膠質瘤細胞(GL15及8MG)中之功能性表現。在兩個細胞株中在mRNA與蛋白位準處偵測MRP1，其在主要在細胞膜處出現之8MG細胞中具有更高表現。藉由RT-PCR在兩個細胞株中偵測MRP3、MRP4、MRP5，然而MRP2未表現。此外，亦藉由免疫組織化學在兩個細胞株中偵測MRP3蛋白。相比之下，未在任一細胞株中偵測P-gp表現。

此外，原發性兒科神經膠質瘤組織上的免疫組織化學染色表明在腫瘤脈管之內皮細胞中存在P-gp、MRP1及BCRP，而僅MRP1亦表現於神經膠質瘤細胞中。然而，對於BCRP，在兒科神經膠質瘤培養物中可能形成寡聚物(46)。

腫瘤微環境

在腫瘤耐藥性方面，細胞之腫瘤微環境亦起重要作用。腫瘤環境以波動與慢性低氧、較低pH及由於血流量不足、炎症、糖酵解增強(所謂的瓦爾堡(Warburg)效應)、酸性代謝物之產生(乳酸產生)發生

的營養不足之區域為特徵。此外，由糖酵解改變所引起的過度 CO_2 釋放導致碳酸酐酶IX (CA-IX)之增加的腫瘤表現，因此促成細胞外腫瘤環境之進一步酸化。低氧亦活化低氧誘導因子(hypoxia-inducible factor; HIF)路徑，其反過來上調葡萄糖轉運子及CA-IX且導致腫瘤酸中毒額外加劇。因此，腫瘤組織中的細胞外pH可降至6.0或6.0以下之值且平均低於正常組織之值的0.2單位至1.0單位。哺乳動物細胞之細胞內pH通常維持在窄範圍內，亦即自7.1至7.3，且藉由特定離子交換器緊密地調節(參見表1)(3, 47)。因此，腫瘤細胞暴露於pH梯度。已所示此生物化學移位以浸潤宿主細胞(包括免疫細胞)為代價為腫瘤細胞提供選擇性生長優勢。變得日益顯而易見的是，在癌細胞中藉由包括糖酵解及與微環境酸化相關的細胞內鹼化之代謝變化發生的細胞動態靜止之慢性破壞為驅動腫瘤進展、侵入及癌轉移之主要因素。

此外，低氧出現在腫瘤發展過程之早期，因為快速增殖的腫瘤細胞生長超出宿主脈管之容量。含較低氧合之腫瘤具有較差預後，且強有力的證據表明此係由於低氧對惡性進展、血管生成、癌轉移及治療耐性之影響。低氧微環境選擇能夠在正常氧氣可用性不存在下存活(低氧耐受性)之細胞。

腫瘤微環境及pH：質子泵在腫瘤組織中之表現

靶向及利用腫瘤微環境之特徵來殺死癌細胞提供了癌症治療之更綜合的觀點。人類實體腫瘤之酸性主要藉由經由改變代謝誘導適應在惡劣條件下生存的細胞之選擇參與腫瘤進展及惡性腫瘤。對於動物模型以及患有口腔癌之患者的近期活體內研究已展示腫瘤病變中之酸性細胞外pH (pHe)及中性至鹼性細胞內pH (pHi)。酸性腫瘤pHe驅動增殖，有利於化學抗性且促進轉移潛能，而鹼性pHi之維持支撐對細胞毒性的耐性。

表徵腫瘤細胞之異常pH梯度係藉由包括空泡ATP酶(v-ATP酶)之

在人類腫瘤中具有增強的表現及活性之不同離子/質子泵精細地調整。v-ATP酶次單位c之基因阻斷減少了肝細胞癌之生長且使乳癌細胞對化學治療劑敏感且提供對腫瘤生長的協同效應。因此，最近已提議藥理學靶向v-ATP酶調節腫瘤pH或克服化學抗性作為新穎抗癌策略(42)。

因此，對於適當的相對中性細胞內pH、酸性管腔pH及酸性細胞外pH，空泡H⁺-ATP酶藉由經由離子交換機制或藉由在細胞質胞器內使隨後排出的H⁺分開來主動地泵取質子而起關鍵作用(對於離子交換泵之概述，參見表1)。在由de Milito等人進行的研究中，質子泵抑制劑(proton pump inhibitor; PPI)埃索美拉唑(esomeprazole)(及奧美拉唑(omeprazole))抑制活體外黑素瘤細胞之增殖且誘導由較低pH培養條件強有力地增強的細胞毒性。埃索美拉唑誘導的細胞死亡在pH 5.0處於培養基中培養的細胞中顯著增加而在中性pH處不可偵測細胞毒性效應。有趣的是，黑素瘤細胞中之埃索美拉唑誘導的細胞毒性效應伴隨有若干卡斯蛋白酶(caspases)之時間依賴性活化。其資料表明，經由埃索美拉唑阻斷質子泵來誘導人類黑素瘤細胞中之卡斯蛋白酶依賴性細胞死亡。埃索美拉唑投藥(2.5 mg/kg)至移植有人類黑素瘤的SCID小鼠減少了腫瘤生長，與腫瘤組織中之增殖性細胞減少及pH梯度明顯降低一致。此外，全身埃索美拉唑投藥在任何相關毒性不存在下大大增加了含人類黑素瘤之動物之存活率。此等資料展示了支持PPI用作黑素瘤之新穎治療策略、提供PPI標靶人類黑素瘤修飾腫瘤pH梯度之概念驗證之臨床前證據(42)。

此外，Calcinotto等人展示藉由質子泵抑制劑(PPI)埃索美拉唑之活體內投藥在腫瘤部位處之較低pH緩衝改進了腫瘤浸潤T-淋巴細胞(tumor-infiltrating T-lymphocytes; TIL)療效且延緩了含腫瘤之小鼠中的癌症進展(47)。此等資料突出腫瘤酸性作為免疫逃逸之機制，該機

制可靶向用於在患有癌症的患者中挽救有效腫瘤免疫力及實現疾病控制。一些報導已展示轉移性腫瘤比原發性腫瘤更具酸性，以及實體腫瘤(癌瘤或黑素瘤或肉瘤)比全身腫瘤(亦即白血病)更具酸性。因此，似乎可設想而知，質子泵抑制劑，諸如埃索美拉唑，可能針對極惡性腫瘤更具活性，其通常對目前療法完全無反應(42)。除此之外，亦已展示轉移性黑素瘤細胞可在酸性條件下生長，而源於原發性腫瘤之細胞當在相同條件下培養時死亡，需要適應更長週期來選擇耐酸細胞。實際上，酸性條件增加轉移性黑素瘤細胞對質子泵抑制劑之易感性。

所關注的是，最近在食道鱗狀癌細胞中展示，除了ABCG2之外，v-ATP酶表現亦隨著病理分級及TNM階段增加顯著增加。此外，v-ATP酶表現在淋巴癌轉移基團中比在非轉移性基團中亦顯著更高(39)。

腫瘤微環境、幹細胞環境及低氧：*ABCG2 (BCRP)*之表現

實體腫瘤之微環境以氧合之異質性為特徵。低氧出現在腫瘤發展過程之早期，因為快速增殖的腫瘤細胞生長超出宿主脈管之容量。含較低氧合(1-7%氧氣含量)之腫瘤具有較差預後，且強有力的證據表明此係由於低氧對惡性進展、血管生成、癌轉移及治療耐性之影響。低氧微環境選擇能夠在正常氧氣可用性不存在下存活(低氧耐受性)之細胞。低氧耐受性經由在低氧暴露期間調節ATP供應之增加的能力產生。低氧腫瘤細胞能夠減少其對ATP的需求。含較低氧合之腫瘤具有較差預後，且強有力的證據表明此係由於低氧對惡性進展、血管生成、癌轉移及治療耐性之影響。重要性在於，Krishnamurthy等人報導*Bcrp*表現係藉由若干人類譜系(胎盤/絨膜癌(JAR))細胞、骨肉瘤(Saos-2)細胞及來自患有急性骨髓白血病的患者之骨髓白血病細胞(OCI-AML3細胞株)中與胚細胞中之低氧上調(48) (49)。低氧誘導增加的BCRP活性，如由在較低氧氣條件下自細胞流出的染料赫斯特

(Hoechst)33342之7倍增加所展示(49)。增加的活性與*BCRP* mRNA在原發性鼠骨髓細胞及不同譜系之人類細胞株中之增加的表現相關(49)。

腫瘤微環境以及幹細胞均具有典型特徵：其具有能力在較低氧氣(低氧)條件下茁壯成長。值得注意的是，造血幹細胞集中於低氧區域中，且在低氧條件下，骨髓細胞具有重新填入致命照射小鼠之骨髓之改進的能力。

如由Krishnamurthy等人所示，ABCG2經由其與血紅素的相互作用提高造血幹細胞在低氧下之存活率。具體言之，ABCG2結合血紅素且減少卟啉(porphyrins)之細胞累積(49)。血紅素在細胞內之累積可最終導致鐵之累積且藉由芬頓(Fenton)反應產生細胞損傷反應性氧物質。Ahmed等人說明ABCG2之組成性表現在活體外及活體內均提高早期人類造血祖細胞之增殖性容量(50)。綜合而言，ABCG2藉由提高其存活容量及增殖潛能、基本的幹細胞維持及再生過程在保護幹細胞方面起作用。

因此，ABCG2 (BCRP)之表現在低氧條件下在腫瘤細胞及幹細胞存活策略方面均起作用。

腫瘤微環境及BCRP (ABCG2)之伴隨調變：ATP釋放之抑制

細胞外ATP在染色腫瘤細胞之上清液中累積而細胞內ATP濃度在細胞進入逐步過程導致細胞凋亡及繼發性壞死之前及在其期間降低。已展示水泡性胞外分泌在不同細胞類型中介導ATP釋放回應於麩胺酸、低滲暴露、機械應力或低氧。據報導，腫瘤組織在其間質中含有比健康組織所含的更高量之ATP (在數百微莫耳範圍內)，ATP在健康組織處將基本上不可偵測。已由Martins等人展示，化學治療劑誘使ATP自癌細胞釋放。細胞內ATP濃度在諸如粒線體跨膜潛能之消耗及質膜上的磷脂醯絲胺酸殘基之暴露之細胞凋亡特徵的表現之前及在該

表現期間降低(4)。

如前所述，實體腫瘤之細胞外(亦即間質)pH實質上比正常組織之pH更具酸性，且細胞質與細胞內胞器之間的pH梯度亦可參與對抗腫瘤藥物的耐性。Luciani等人展示用質子泵抑制劑預處理腫瘤細胞抑制了 $v\text{-H}^+$ -ATP酶活性且增加了細胞外pH與溶酶體胞器pH。PPI預處理誘使細胞毒性藥物之細胞質滯留方面的顯著增加，其中在抗癌劑小紅莓(doxorubicin)之情況下明顯靶向細胞核。作者亦展示 $v\text{-H}^+$ -ATP酶之亞細胞定位在用質子泵抑制劑奧美拉唑治療時改變：類 $v\text{-H}^+$ -ATP酶表現結構在經奧美拉唑治療之黑素瘤細胞之核周區域中累積，而在未經治療的細胞中， $v\text{-H}^+$ -ATP酶染色在細胞質中及在細胞膜下方呈現廣泛彌漫性。此定位之變化伴隨有細胞內ATP位準之變化。經奧美拉唑或埃索美拉唑治療之細胞具有比未經治療之細胞更高的細胞內ATP位準，表明 $v\text{-H}^+$ -ATP酶活性之有效抑制。然而，本發明說明質子泵抑制劑泮托拉唑(pantoprazole)藉由抑制BCRP (ABCG2)來抑制ATP自細胞釋放(51)。因此，抗腫瘤藥物耐性可藉由 $v\text{-H}^+$ -ATP酶之伴隨抑制及導致自腫瘤細胞釋放的ATP減少之ABC藥物轉運子BCRP來降低，因此增加細胞內ATP位準(51)。此對靶向腦轉移尤其重要，其甚至比腫瘤細胞更具酸性。

癌症類型

腦瘤及目前治療

高級神經膠質瘤、尤其多形性膠質母細胞瘤(glioblastoma multiforme；GBM)為成人中及最致命的人類癌症中最常見原發性腦瘤。患有惡性神經膠質瘤之患者由於局部復發具有較差預後，儘管手術、放射療法及替莫唑胺(temozolomide)化學療法，具有5年存活率僅為9.8%。神經膠質瘤根據WHO分類分為1級(更良性)至4級(高度惡性；GBM)，WHO分類係基於組織學特徵(例如有絲分裂靜止活性、

微血管內皮增殖)。可將GBM區分為原發性GBM，其快速出現而無先前存在的較低級病變之臨床跡象；及繼發性GBM，其經由自低級星形細胞瘤或退行性星形細胞瘤之進展而發展。

GBM以彌漫性浸潤至周圍的健康腦組織中為特徵。GBM之位置及腫瘤細胞廣泛浸潤至周圍的關鍵腦結構中為所有治療干預的障礙。提高GBM患者存活率的真實挑戰為設計針對許多無法藉由手術切除移除的惡性細胞之療法，因為其已遷移(深入地)至正常周圍腦實質中。放射療法展示過多神經毒性副作用增大高劑量標靶體積以包括此等神經膠質瘤細胞。此外，大部分化學治療劑無法到達侵入性腫瘤細胞，因為此等劑存在於其中脈管為基本完好具有功能BBB特性之區域中。

此外，人類高級神經膠質瘤由庇護漏泄血管之高度血管生成區域組成。然而，亦存在許多侵入性神經膠質瘤細胞使用預先存在的具有完好BBB之脈管。腫瘤中之毛細管表現藥物流出轉運子BCRP通常處於增加的位準，表明此等腫瘤血管可限制藥物攝取。誘導血管生成為腫瘤生長及進展之基本前提條件。一旦腫瘤達到一定尺寸(大約 1 mm^3)，氧氣及營養之簡單擴散不足以為所有腫瘤細胞供應必要因子。此產生低氧區域，觸發腫瘤脈管之形成，稱為血管生成轉換。以此方式，腫瘤建立其自身獨立血液供應，其因此促進腫瘤進一步擴大。GBM為大部分血管化人類癌症中之一者，且腫瘤相關血管之形成發生在腫瘤進展期間的早期。實際上，內皮增殖為用於將神經膠質瘤分級為如高級之病理準則中之一者，指示較差預後。除了為腫瘤細胞供應氧氣及營養之外，內皮細胞被認為在GBM中形成型實體。內皮細胞與CSC密切地相互作用且維持其呈幹細胞樣狀態。反之亦然，GBM CSC能夠藉由分泌VEGF、刺激其自身龕體形成來補充內皮細胞。此外，GBM CSC可分化至非常接近地類似於腫瘤相關血管內皮

細胞之細胞中，表明GBM CSC可分化至蠃型細胞中。因此，內皮細胞在腫瘤生長中發揮主要作用。儘管輻射及TMZ治療，腫瘤微血管內皮細胞能夠刺激GBM細胞之生長及幹性，其係藉由該等細胞之廣泛細胞死亡阻抗實現。

最近，據報導，神經膠質瘤細胞在pH 6.5下於培養基中之長期培養誘導幹細胞表型。神經膠質瘤幹細胞(Glioma stem cell; GSC)並不均勻地分佈，但確切而言位於特定蠃處，表明癌症幹細胞表型係藉由腫瘤微環境調節。Hjelmeland等人最近說明，獨立於受限氧氣之酸性條件促進GSC標記、自身再生及腫瘤生長之表現(52)。GSC經由加工血管生成因子對腫瘤生長發揮旁分泌作用，且較低pH條件增強與低氧誘導性因子2a (hypoxia inducible factor 2a; HIF2a) (GSC特定調節因子)之誘導相關的此表現。HIF2a之誘導及以酸性壓力計之其他GSC標記可藉由活體外升高pH來恢復，表明提高瘤內pH可能有益於靶向GSC表型。

因此，基於靶向腫瘤pH調節及流出轉運子BCRP兩者之抗癌治療可為用於靶向GSC之有效方法，進而減少腫瘤生長及耐藥性。

術後伴隨放射療法及替莫唑胺療法為多形性膠質母細胞瘤之標準治療。用於多形性膠質母細胞瘤、腦轉移及原發性中樞神經系統淋巴瘤之潛在有前景的替代方法為免疫療法(53)。活性免疫療法，其旨在刺激或擴增患者之自身免疫反應，具有所示前景。常見策略為提供已被迫表現靶抗原(DC疫苗)但仍處於發展中之抗原呈現細胞、通常樹突狀細胞(53)。

此外，酪胺酸激酶抑制劑甲磺酸伊馬替尼(imatinib) (格列維克(Gleevec))，其用於慢性骨髓白血病及胃腸基質腫瘤之治療，已在臨床前研究中展示有效地抑制PDGF誘導的神經膠母細胞瘤細胞生長。然而，在臨床研究中的效果較不顯著且Razis等人(54)之結果未表明來

自以單一劑形式位於未選定多形性膠質母細胞瘤患者群體中的伊馬替尼之益處，儘管已展示伊馬替尼存在於多形性膠質母細胞瘤組織中且展示在患者之一子集中的分子效果(54)。在活體外及活體內臨床前研究中，展示了伊馬替尼為P-gp及BCRP兩者之基質藥物。BCRP及P-gp抑制劑、諸如泮托拉唑及依克立達(elacridar)之共同投藥導致伊馬替尼之增加的腦滲透(54)。

當前處於對成人及/或兒童的復發性及高級神經膠母細胞瘤之研究中的其他治療為例如貝伐單抗(bevacizumab)及/或舒尼替尼(sunitinib)及/或索拉非尼(sorafenib)及/或埃羅替尼(erlotinib)及/或吉非替尼(gefitinib)、VEGF及/或PDGFR及/或EGFR之所有抑制劑、參與血管生成及神經膠母細胞瘤細胞生長之激酶。然而，此等治療已展示不同程度的成功，且遇到發展阻力。已展示舒尼替尼、索拉非尼、吉非替尼及埃羅替尼之大腦滲透受P-gp (ABCB1)及BCRP (ABCG2)限制。BCRP為索拉非尼轉運跨越BBB之主要轉運子。舒尼替尼之腦累積在Abcb1a/b/Abcg2(-/-)小鼠中顯著(23倍)增加，但在Abcb1a/b(-/-)小鼠中僅略微(2.3倍)增加，且在Abcg2(-/-)小鼠中未增加。重要的是，對野生型小鼠進行口服依克立達及口服舒尼替尼之臨床上實際共投藥導致Abcb1a/1b/Abcg2(-/-)小鼠中之舒尼替尼腦累積、相等位準顯著增加。吉非替尼之穩態的腦比血漿濃度比與野生型小鼠相比在Mdr1a/1b (-/-) Bcrp1 (-/-)小鼠中為70倍更高。在吉非替尼之階段II試驗中，患有復發性或進行性高級神經膠質瘤之患者展示無客觀反應，具有在6個月下的13%至14%之無進展存活率。同樣，在GBM患者中在第一次復發時未觀測到整體存活率提高。

因此，倘若在血腦屏障中、在(高級)腦瘤中及在癌症幹細胞中存在BCRP，則伴隨抑制腫瘤微環境的更有效BCRP抑制劑之發展及藉由經BCRP釋放ATP介導之免疫反應可能為癌症患者之腦瘤、尤其高級

神經膠質瘤及腦轉移之治療中的重要治療應用。

胰腺癌，特定言之胰管腺癌

胰腺癌為胰腺之惡性贅瘤。早期偵測為困難的，因為患者在胰腺癌之早期階段很少展現特定的疾病症狀，導致後期診斷。大多數胰腺癌在診斷時為晚期且不可切除的。胰腺癌在所有惡性腫瘤之中具有最低存活率，具有小於5%之5年存活率。目前對於胰腺癌的治療為非常受限制及無效的。吉西他濱(gemcitabine)及吉西他濱與埃羅替尼之組合為FDA審批通過的唯一用於不可切除性胰腺癌之標準治療。已研究基於若干吉西他濱之組合療法用於胰腺癌之治療，其中無一者已展示優於吉西他濱單藥療法之任何顯著益處。

癌症類型	抗癌劑	參與耐藥性之ABC轉運子
胰腺	吉西他濱	MRP5 (及多形現象) P-gp，MRP1
	吉西他濱+埃羅替尼	P-gp，BCRP

肝細胞癌(Hepatocellular carcinoma；HCC)及目前治療

肝細胞癌(HCC)為全世界第五最常見類型的癌症。HCC構成85%-90%的原發性肝癌且其為癌症相關死亡之第三主要原因。整體存活率仍小於10%。由B型或C型肝炎感染所引起的病毒肝炎為HCC之主要原因。用於不具有肝硬化之HCC患者的標準治療為部分肝切除，但此僅可能用於小於20%之患者，且已研發若干最低限度地侵入性切除方法。僅存在有限治療選項，且對習知化學療法及放射線療法之耐性為主要問題。

直至最近，不存在可獲得的有效全身化學療法來治療此侵襲性疾病。最近，索拉非尼-多重激酶抑制劑(除其他VEGFR及PDGFR-β)最近在HCC治療中具有突破且現被認為晚期HCC之標準治療。

已展示索拉非尼藉由P-gp與BCRP兩者在活體外及活體內模型中

轉運。Agarwal及Elmqvist展示P-gp與BCRP一起限制索拉非尼之大腦分佈，其中BCRP為主要轉運子。

治療應用：藉由ABCG2 (BCRP)進行ATP釋放之伴隨調變及空泡ATP酶作為標靶用於樹突狀細胞疫苗之發展

用於治療包括高級神經膠質瘤之癌症的免疫療法之領域正移至使用自體樹突狀細胞作為媒介用於免疫接種之活性特異性免疫療法的方向中。

此外，用於治療包括神經膠質瘤、胰腺癌及食道癌之癌症的新穎策略為與如所示例如替莫唑胺及吉西他濱之抗癌藥物組合之樹突狀細胞療法(55、56)。

樹突狀細胞

樹突狀細胞(Dendritic cell；DC)為填入所有淋巴及非淋巴器官之骨髓衍生細胞。該等細胞在自體免疫之耐受性誘導及預防至抗腫瘤免疫之誘導及保護免於感染性藥劑之範圍內的免疫調節中具有中心作用。

DC被視為天然的佐劑且具有識別外來抗原、將其加工成較小肽用於向T細胞受體呈現於MHC分子上(T cell receptor；TCR)及提供基本共刺激分子用於未處理CD4+T細胞及CD8+T細胞之活化的潛能。隨後，CD4+T細胞為長壽漿細胞之B細胞類別轉換及誘導提供幫助。DC在特定用於抗原攝取之周邊組織中具有不成熟表型，但在識別外來物質遷移至淋巴結T細胞副皮質區時其變為成熟細胞，表現所有共刺激分子且已喪失佔用抗原的能力。DC對暴露於外來抗原之反應為先天性免疫反應的一部分，且藉由提供抗原識別與抗原處理之間的連接以向未處理T細胞呈現，此等細胞橋接先天性與適應性免疫。

源自多能造血幹細胞之人類DC可分成至少三個亞群：駐留在皮膚及淋巴器官中的間質DC及血液DC之兩個子集、CD11c+骨髓與

CD11c-漿細胞樣DC。血液DC之兩個子集不僅有差異地表現CD11c及CD123 (IL-3R α 鏈)，且亦藉由細胞激素展示Toll樣受體表現及調節之相異模式。循環血液DC為罕見的(其占人類PBMC的<1%)且難在培養中維持。

DC的生物學之進一步理解已揭示，三個互動信號衝射淋巴細胞反應且對於疫苗發展中的考慮為重要的以便實現先天性與適應性抗腫瘤免疫之最佳活化：(i)MHC-肽複合物之足夠DC呈現用於誘導抗原特異性T細胞，其中同時表現活化配位體用於刺激先天性自然殺傷(natural killer；NK)細胞；(ii)經由諸如CD40、CD80及CD86之分子顯性陽性共刺激及(iii)分泌在Th1/Tc1方向上使免疫反應極化之細胞激素以產生最佳抗腫瘤反應。

藉由病原體活化DC之方式可為直接的，經由識別如Toll樣受體(Toll-like receptor；TLR)上的內毒素、肽聚糖或未甲基化CpG基元之病原體相關微生物模式(pathogen-associated microbial pattern；PAMP)，或為間接的，經由識別如ATP、尿酸或HMGB-1之損傷相關分子模式(damage associated molecular pattern；DAMP)，在由病原體造成的細胞應激或組織損傷時釋放。

DC疫苗及疫苗佐劑

廣泛的有力免疫刺激及調節功能已使DC靶向疫苗發展策略。此包括細胞接種疫苗用於治療癌症或感染性疾病，以及「陰性接種疫苗」用於治療自體免疫疾病及預防同種異體移植排斥反應。

第一次基於DC的臨床試驗之結果強調DC品質、尤其其遷移能力及誘導有效T細胞反應的能力之重要性。值得注意的是，在目前試驗中注入的DC之僅較小百分比實際上自注入部位遷移至引流淋巴結中以向T細胞呈現抗原。

接種疫苗策略旨在誘導免疫力來對抗癌症或感染性疾病，需要

包括使靶向DC成熟的手段。成熟及活化刺激可全身性地施用，目標靶載體分離。

現清楚的是，諸如細菌內毒素、單磷醯基脂質A、弗氏佐劑(Freund's adjuvant)、細菌CpG基元、MF59及半乳糖神經醯胺之對於免疫反應具有佐劑活性之許多藥劑經由誘導樹突狀細胞(DC)成熟來增強免疫力。

藉由細胞外ATP進行樹突狀細胞(DC)活化作為疫苗佐劑之作用機制：鋁佐劑及炎性體活化

在獸醫學及人類疫苗中最廣泛使用的佐劑為鋁化合物(57)。理解當前使用的佐劑(諸如氫氧化鋁)之機制將有益於新佐劑之發展。儘管已描述若干機制，仍需要更好地理解鋁化合物之佐劑機制。由於鋁佐劑具有包括局部反應、IgE反應增強、對一些抗原無效及不能增強細胞介導的免疫反應、尤其細胞毒性T細胞反應之侷限性，需要發現新佐劑(57)。

一種常用的解釋為鋁延遲了自注入部位清除。然而，近期工作展示了在抗原不吸附至磷酸鋁的情況下亦發生藉由鋁進行免疫增強。另一解釋為可溶性抗原可在吸附時以可促進抗原靶向之微粒方式向免疫活性細胞呈現，亦即，鋁有利於抗原呈現細胞攝取抗原。

近期研究展示了佐劑氫氧化鋁經由活化NALP3炎性體來活化發炎性樹突狀細胞。此活化可直接經由藉由礬晶體觸發NALP3炎性體發生或間接經由活化NALP3已知的兩個危險信號(即ATP與尿酸)中之一者在由病原體造成的細胞應激及組織損傷時之釋放發生(58)。具有抗原之礬免疫接種在小鼠中產生強Th2偏斜免疫反應，包括IgE及IgG1抗體同型之誘導。源於此等研究之激發應用處於新疫苗佐劑之發展中，其中基於TLR之佐劑迄今已證實太具毒性且關於如何標靶及調變適應性免疫之分子理解一直具有挑戰性。儘管將可能證明礬具有多個免疫

刺激特性，基於核苷酸寡聚化結構域(nucleotide oligomerization domain；NOD)樣受體(NLR)之活化在先天適應性範例中似乎為有效替代策略以產生免疫力，可建構該免疫力來調適新產生的佐劑。

最近，已由 Vono 等人(76)確認細胞外 ATP 可與接種疫苗成功有關。其展示了由佐劑 MF59 誘導的先天性及適應性免疫反應需要暫時 ATP 釋放。來自肌肉的 ATP 釋放對疫苗佐劑 MF59 之作用機制為至關重要的，產生有效 CD4+T 細胞激活及較高抗體效價。

鋁佐劑及空泡 H^+ -ATP 酶與細胞微環境

傳統地，已基於酸中和能力應用氫氧化鋁 (Alhydrogel，Malgeldrate)作為抗胃酸劑。

已展示鋁在根端處藉由永久地改變質膜表面電位抑制質膜 H^+ -ATP 酶活性。相比之下，Hamilton 等人展示了空泡 ATP 酶及粒線體 ATP 合成酶係由鋁誘導。

氫氧化鋁佐劑展現在液態培養基中的極低可溶性，但可溶性在酸性或鹼性培養基中增加。氫氧化鋁佐劑之吸附特性與表面積以及表面基團相關。表面係由配位至鋁的羥基組成。該等羥基被稱為金屬羥基，在表面處可接受質子以產生陽性部位或可給予質子以產生陰性部位。因此，氫氧化鋁佐劑之表面電荷為 pH 依賴性的。

鋁佐劑為結晶。膠體化學之基本原理為：帶電粒子靜電吸引相反電荷之離子(相對離子)以形成古伊-查普曼(Gouy-Chapman)雙層。帶負電表面吸引包括質子之陽離子以形成雙層。因此，雙層區域之 pH (亦即，微環境 pH)將低於散裝 pH。相似地，帶正電粒子周圍的雙層將富含陰離子(包括羥基)，且微環境 pH 將高於散裝 pH。吸附至含鋁佐劑之抗原可能暴露於不同於散裝 pH 之 pH，尤其若佐劑具有表面電荷。微環境 pH 與散裝 pH 之間的 pH 差異可為約 2 個 pH 單位，進而影響酸催化的水解之速率。

*ATP*釋放之伴隨調變及細胞內*pH*作為標靶用於感染性疾病之疫苗發展中的免疫調節或作為標靶用於抗瘧疾及/或抗病毒治療瘧疾

在瘧疾中，感染性疾病係由感染及破壞其宿主之紅血球的瘧原蟲屬之原蟲寄生蟲所引起，紅細胞內寄生蟲利用其宿主之嘌呤信號傳遞來使紅血球適應其需求。

已進入紅血球，侵入寄生蟲處於休眠下幾個小時(環階段)，在其之後其開始快速生長(滋養體階段)隨後分裂(分裂生殖)之時期，導致20-30個新寄生蟲之產生。瘧疾滋養體之代謝及生物合成活性為強烈的。寄生蟲完全依賴糖酵解作為其能量來源，且其消耗葡萄糖且以高於正常未感染紅血球的產出速率之約100倍的速率產生乳酸。寄生蟲之較高代謝活性產生實質性細胞內酸負荷。此外，在活體內情況下，瘧疾感染通常導致顯著細胞外酸中毒。對於寄生蟲保持活力，其必須因此具有保護其細胞內*pH* (intracellular *pH* ; *pHi*)免於細胞內及細胞外酸負荷之有效手段。

一旦侵入紅血球，瘧疾寄生蟲建立蟲空液泡，其在該液泡內部發展。此外，寄生蟲輸出膜網至宿主細胞質中。插入至紅血球宿主膜中的蛋白中之一者為編碼(V)-H⁺-ATP酶之功能性瘧疾寄生蟲。此泵在受感染紅血球之細胞內*pH* (*pHi*)之維持中起作用(59)。

成熟人類紅血球表現功能性離子移變P₂X嘌呤受體。已展示經陰離子通道在宿主紅血球膜中之ATP釋放藉由瘧疾寄生蟲參與感染(21)。此外，最近已展示，「危險信號」尿酸，其類似ATP，係自受傷或染色細胞釋放且刺激樹突狀細胞之成熟，在複製惡性瘧原蟲之蟲空液泡內的惡性瘧原蟲感染之紅血球內累積，且隨後在受感染紅血球破裂時釋放(60)。尿酸沈澱誘導活體外人類樹突狀細胞之成熟，且在尿酸耗盡時顯著抑制此反應。發明人假定尿酸沈澱之此效果可能為在紅

血球中表現的藥物轉運子BCRP之側面處降低pH之結果。因此，在較低pH下藉由BCRP進行危險信號ATP及尿酸之釋放調變提供了瘧疾治療中的新穎標靶。重要性在於，亦在惡性瘧原蟲(*Plasmodium falciparum*)中表現ABC轉運子，導致對諸如青蒿素(artemisinin)之抗瘧疾藥物之耐性。

最近，已由Alvarez等人確認，人類紅血球之惡性瘧原蟲感染強有力地活化來自紅血球之ATP釋放，且此依賴於寄生蟲血症之位準。藉由使用泛連接蛋白1抑制劑說明泛連接蛋白1參與ATP釋放。

病毒感染

此外，包膜病毒，諸如流感病毒，在合併其膜與細胞膜之後穿透其細胞標靶。在此相互作用之後，流感病毒粒子在內體中內化。內體維持略微酸性內部pH。為了使流感病毒有效進入細胞中，pH梯度為必要的。內體之酸化藉由各種因子調節，該等因子諸如質子漏泄、ClC氯化物通道或Na⁺/K⁺-ATP酶，但主要藉由ATP依賴性空泡ATP酶之活性確定(22)。值得注意的是，Na⁺/K⁺-ATP酶為細胞中最消耗ATP的過程；已報導Na⁺/K⁺使用>30%之基底ATP濃度。對於有效病毒循環，有必要維持相當恆定的細胞內ATP位準。在病毒複製之後，流感病毒自病毒感染細胞之質膜出芽。出芽為病毒複製中之關鍵步驟。流感病毒出芽視來自ATP水解的能量之供應而定；ATP位準之降低對應於病毒釋放之抑制。因此，細胞內ATP位準與來自細胞的有效病毒釋放具有關聯性。

因此，藉由空泡ATP酶及/或Na⁺/K⁺ATP酶及/或BCRP (ABCG2)之伴隨抑制，pH梯度與進入內體中的ATP攝取減少，因此(部分地)抑制病毒感染之內體路徑。除了流感之外，此亦適用於經由內吞作用進入的其他病毒感染，諸如登革熱(dengue)病毒、黃熱病病毒、西尼羅河病毒(West Nile Virus)、SARS冠狀病毒、C型肝炎病毒、B型肝炎、牛

痘病毒、人類免疫缺乏病毒(human immunodeficiency virus；HIV-1)、呼吸道融合性病毒(respiratory syncytial virus；RSV)、人類巨細胞病毒、風疹(Rubella)病毒、狂犬病(Rabies)病毒、麻疹病毒、塞姆利基森林病毒(Semliki forest virus)。

抗瘧疾治療

第一個廣泛使用的可用抗瘧疾藥物為奎寧(quinine)，自黃金雞納(Cinchona calisaya)樹之樹皮萃取的天然產物。奎寧之合成衍生物為例如派馬喹(primaquine)、甲氟喹(mefloquine)及氯喹(chloroquine)。在所有情況下，已出現對此等藥物之耐性。

導致當今時代的惡性瘧原蟲感染治療之關鍵事件可追溯至由中國科學家在1972年發現的倍半萜烯內酯青蒿素(被稱為Qing hau su)。其為自青蒿(sweet wormwood)、黃花蒿(Artemisia annua)之葉子分離的含有內過氧化物之天然產物。隨後研發了青蒿素之更有效衍生物，包括二氫青蒿素(dihydroartemisinin)、蒿甲醚(artemether)、蒿乙醚(artemotil)及青蒿琥酯(artesunate)。不同於其他抗瘧疾藥物，青蒿素快速終止寄生蟲之所有血液階段。此外，青蒿素亦終止配子體階段，進而減少傳輸。

耐藥性之風險可藉由組合療法降低。組合具有不同作用機制之兩種或兩種以上藥品降低了耐藥寄生蟲將呈現的概率，其亦為由WHO建議的對於無併發症惡性瘧原蟲之推薦治療(青蒿素組合療法(Artemisinin Combination Therapie；ACT))。

組合應提供改進的功效。適當選擇的組合必須至少療效增加，且可提供協同活性。藥物組合增加了以下可能性：在耐藥性之設置中，至少一個藥劑將為臨床上有效的。藥物組合應減少耐抗瘧疾藥性之選擇。理想地，組合療法將合併均為新的之兩種藥劑(以致耐任一藥劑的寄生蟲尚未循環)，提供有效療效且較佳具有相似藥物動力學

概況。不利的是，此等為並不由目前可用的任何組合滿足之具有挑戰性的要求。

當前，不存在可用的瘧疾疫苗，且最先進的候選物最近已報導適度的30%療效。用於瘧疾之佐劑處於臨床前及/或臨床研究中，包括鋁、MF59、AS03、蒙塔尼德(Montanide)、病毒樣粒子、皂角苷(saponine) (QS-21，ISCOM)、咪唑喹啉 {Mata，2013 620 /id}。

藉由使用基於藉由ELISA量測之富含組胺酸蛋白II (histidine rich protein II；HRPII)之標準化瘧疾藥物靈敏度分析(77)，吾等確定抗瘧疾藥劑青蒿素(圖11)、雙氫青蒿素(圖14)及氯喹(圖15)或諸如丹參酮(tanshinone) IIA (圖23B)、靛玉紅-3-肟(indirubin-3-oxime) (圖24B)、丹參酸B鎂(Mg lithospermate B) (圖27A)、益母草鹼(leonurine) (圖29A)、丹酚酸B (salvianolic acid B) (圖中未示)、丹參素(danshensu) (圖中未示)之草本化合物針對惡性瘧原蟲之抗寄生物藥效果。此外，吾等測試與質子泵抑制劑泮托拉唑(圖12、圖14、圖16、圖20、圖22、圖26、圖27B、圖29B、圖30)及/或ATP (圖13、圖14、圖17、圖18、圖21)之組合是否為協同的。此外，吾等測試草本化合物及/或泮托拉唑及/或ATP與青蒿素(圖11至圖14；圖23、圖24、圖26)、雙氫青蒿素(圖19至圖22)或氯喹(圖15至圖18；圖25)之組合之活體外抗瘧疾活性。藉由青蒿素與丹參酮IIA (圖23)、青蒿素與靛玉紅-3-肟(圖24)、氯喹與靛玉紅-3-肟(圖25)、青蒿素與靛玉紅-3-肟在50 μ M泮托拉唑存在下(圖26)之等輻射分析針對純系3D7評估抗瘧疾藥物組合。靛玉紅-3-肟與丹參酮IIA均展示了在與青蒿素組合且具有或不具有泮托拉唑時之協同活性的增加。靛玉紅-3-肟與氯喹之組合為加成的。

出於篩選目的，潛在的新化合物應在較低濃度(亦即大約10 μ M以下的IC₅₀)下具有抗瘧疾活性。

因此，吾等得出結論：由於針對惡性瘧原蟲純系3D7觀測到的

IC50值在大約10 μM 與更低(0.1-14 μM)的範圍內，在單獨給予時，靛玉紅-3-肟、丹參酮IIA、丹參酸B鎂及益母草鹼為潛在的抗瘧疾化合物。

因此，藉由抗瘧疾藥物及此等草本化合物中之一或多者及/或質子泵抑制劑及/或ATP進行組合療法將為有效抗瘧疾治療提供許多新策略，其中耐藥性變化減少。

高病原性RNA病毒之抗病毒治療

目前，已正式特許約40種抗病毒藥物用於人類，主要用於具有人類免疫缺乏病毒(HIV)、B型肝炎病毒(hepatitis B virus; HBV)及疱疹病毒感染之治療。可用於高病原性RNA病毒感染之治療的特許抗病毒藥物之數目非常有限。此等係用於流感：M2通道抑制劑，三環癸胺(amantadine)與金剛乙胺(rimantadine)；及神經胺糖酸苷酶(neuraminidase)抑制劑，奧司他韋(oseltamivir)與紮那米韋(zanamivir)。特許病毒唑用於呼吸道融合性病毒(RSV)及C型肝炎病毒(hepatitis C virus; HCV)感染之治療且亦用於拉沙熱(Lassa fever)之治療。鑒於以下事實：僅有限數目的抗病毒藥物為可用且已報導例如對於三環癸胺在流感H1N1病毒中之耐藥性的較高發生率，對RNA病毒複製之有效抑制劑存在未滿足的需要，其應具有儘可能寬的光譜。

重要性在於，ABC轉運子在對抗病毒藥物之耐性中起作用且在此等抗病毒藥物之藥物動力學概況中發揮作用。舉例而言，對於奧司他韋，大腦分佈藉由Mrp4及Oat3跨越血腦屏障受其活性流出限制(78)。因此，假設抑制ABC轉運子與ABC轉運子介導的ATP釋放之抗病毒藥物與草本化合物及/或質子泵抑制劑之組合策略可潛在地有益於病毒感染及炎症之治療且降低抗病毒耐性。

總之，目前發現的用於篩選在較低pH (具有或不具有v-ATP酶之伴隨抑制)下藉由藥物轉運子ABCG2 (BCRP)或耐多藥性相關轉運子

ABCC1-6 (MRP1-6)調變ATP轉運之新的免疫調節劑之活體外方法有助於癌症(特定言之高級神經膠質瘤及腦轉移)及感染性疾病(諸如瘧疾與流感、RSV及C型肝炎)之疫苗及/或免疫治療劑的發展。

草本產物及尋找新穎疫苗佐劑

現如今已認識到，草本產物，諸如傳統中藥(traditional Chinese medicine；TCM)、阿育吠陀(Ayurvedic)藥、植物萃取物(根或葉萃取物)及植物衍生化合物(植物化學成分)，為提供臨床上相關療法或指南之潛在來源。此之典型的實例為抗瘧疾藥物青蒿素之發展，其係自己由中藥師使用兩千年以上的草本植物—植物青蒿(*Artemisia annua*)分離。植物衍生化合物之其他突出實例為自短葉紅豆杉(*Taxus brevifolia*)分離之抗癌藥物紫杉醇(paclitaxel)及自中國幸福樹(Chinese Happy Tree)(喜樹(*Xi Su*，*Camptotheca accumulata*))分離之喜樹鹼(camptothecin)，其衍生物伊立替康(irinotecan)及拓朴替康(topotecan)在臨床上確立於癌症治療中。

迄今為止，僅少數佐劑已特許用於人類。缺乏有效佐劑之主要原因為免疫刺激化合物之毒性，例如脂多醣(lipopolysaccharide；LPS)即為此情況。除無毒之外，最佳佐劑亦應產生成本低、可生物降解、生物相容、免疫學上惰性、穩定且具有長的存放期。其應不僅促進體液免疫，且亦誘導細胞免疫反應而不誘導IgE抗體(亦即，為非過敏原性)。

已經在文獻中建議草本產物可用作(來源)免疫佐劑且可滿足最佳佐劑之準則(61)。舉例而言，Quan等人展示了在不活化流感病毒A (PR8)之情況下的韓國紅參(人參(*Panax ginseng*))或丹參(*Salviae radix*)萃取物之鼻內共同投藥與用單獨的PR8免疫接種相比增加流感特異性抗體之位準且中和活性。丹參萃取物之共同投藥顯著增強Th1類型細胞激素IFN- γ 及IL-2，而人參增強Th2類型細胞激素反應(IL-4，IL-

5)。有趣的是，Rivera等人展示人參萃取物及氫氧化鋁在與天竺鼠中的不活化豬小病毒組合時協同充當疫苗佐劑(62)。另一實例，自人參根分離的人參皂苷Re (ginsenoside Re)與小鼠中的分裂不活化H3N2流感病毒抗原之共投與顯著增強了血清特異性IgG、IgG1、IgG2a及IgG2b反應、HI效價、淋巴細胞增殖反應以及IFN- γ 與IL-5分泌，表明Th1與Th2均被活化。此外，已展示源於諸如人參(根、莖及葉)、黃芪屬(根)、三七(*Panax notoginseng*) (根)、葫蘆科(*Mormordica*) (種子)、甘草(*Glycyrrhiza*) (根及根莖)、牛膝(*Achyranthes bidentatae*) (根)及桔梗之TCM之皂苷具有免疫調節效果。

另一實例，最近展示了抗致瘤蘑菇姬松茸 (*Agaricus blazei* Murill; AbM)增強IL-1 β 之轉錄且在人類THP-1巨噬細胞中觸發NLRP3炎性體介導的IL-1 β 分泌。AbM介導的IL-1 β 分泌在缺乏NLRP3及ASC之巨噬細胞中顯著減少，說明NLRP3炎性體對AbM誘導的IL-1 β 分泌為至關重要的。此外，卡斯蛋白酶-1經活化且參與蛋白水解分裂及IL-1 β 在經AbM治療之巨噬細胞中的分泌。重要的是，展示了AbM誘導的炎性體活化需要ATP釋放、細胞外ATP結合至嘌呤受體P₂X₇、產生反應性氧物質及鉀流出。

有趣的是，展示了銀杏葉萃取物及其組分中之一者白果內酯可能藉由用粒線體保持ATP再生來抑制活體外內皮細胞中之低氧誘導的ATP含量減少。此外，Eckert等人展示了銀杏葉萃取物降低反應性氧物質之位準，包括超氧陰離子自由基，在經GBE治療之小鼠的大腦中與對照組相比減少。在大齡小鼠中，GBE藉由增加神經元中之三磷酸腺苷之產生來產生保護作用。

此外，最近極其說明，薑黃素(curcumin)之奈米調配物顯著降低食道腺癌細胞之增殖、顯著上調共刺激分子CD86在DC中之表現且顯著減少來自活體外活化T細胞的促發炎性細胞激素之分泌(56)。

ABC轉運子在轉運草本化合物中之作用

如前所述，P-gp (ABCB1)、MRPs (MRP1-5, ABCC1-5)及BCRP (ABCG2)可充當屏障(在腸、腦等中)，限制包括許多草本組分在內的許多藥物及內源性化合物之吸收及消除。

迄今為止，大部分研究僅針對藉由植物化學成分抑制P-gp功能或刺激P-gp表現(63)。舉例而言，已展示P-gp在存在於丹參萃取物中的三種化合物丹參酮IIA、丹參酮IIB及隱丹參酮之主動轉運中起作用(64)。此意味著可潛在地自中草藥識別P-gp抑制劑。僅少數研究研究了MRP1及/或MRP2在植物衍生化合物之轉運中之作用。Yu等人展示丹參酮IIB為ABCC1 (MRP1)之基質。MRP1及/或MRP2可能在丹參酮IIA之轉運中起作用。尚未描述關於BCRP或MRP4的研究。由於丹參酮具有類固醇樣結構，假設BCRP及/或MRP4參與丹參酮之轉運，因為已知BCRP與MRP4均轉運類固醇硫酸酯(72、73)。

在活體外研究(65)中展示BCRP (ABCG2)受存在於許多草本植物中(諸如在銀杏葉中(65)) 的類黃酮(flavonoids)(芹黃素(apigenin)、雞豆黃素A (biochanin A)、金黃素(chrysin)、大豆黃素(daidzein)、黃豆苷(daidzin)、非瑟酮(fisetin)、染料木素(genistein)、橙皮素(hesperetin)、堪非醇(kaempferol)、葉黃酮(luteolin)、柚配質(naringenin)、根皮素(phloretin)、槲皮素(quercetin)、水飛薊賓(silybin)及西利馬靈(silymarin))顯著抑制。Enokizono等人亦展示了Bcrp限制小鼠中之口服生物可用性及染料木素滲透至大腦、睪丸及附睪中及植物雌激素大豆黃素與香豆雌酚滲透至腦及睪丸中。Van de Wetering等人亦展示了ABCG2藉由導引植物雌激素硫酸鹽共軛物經由糞便排泄來限制對許多不同植物雌激素之全身性暴露量。

亦展示白藜蘆醇—主要存在於葡萄及葡萄產物中的膳食芪類酚類化合物係在較低pH下而非在生理pH下藉由BCRP轉運(24)。此外，已

展示多酚化合物薑黃素—源於多年生草本植物薑黃屬(*Curcuma longa* Linn)(通常被稱為薑黃)之乾燥根莖的薑黃素在小鼠中及在人類中為BCRP抑制劑且展示具有化學敏化、輻射敏化、傷口癒合、抗微生物、抗病毒、抗菌、膽汁排出、消炎及免疫調節活性。

此外，展示人參皂苷(源於人參)之代謝物在MCF -7/MX細胞中抑制BCRP (66)。

出於接種疫苗目的使用成熟DC

活體外產生較大數目的樹突狀細胞(DC)之技術的發展產生了探究基於DC之接種疫苗策略的多個研究。第一臨床研究涉及B細胞淋巴瘤患者且使用靜脈內投與的不成熟DC (iDC)。iDC負載有由各腫瘤產生的免疫球蛋白(個體基因型蛋白)，因為惡性細胞為單株，其為腫瘤特異性的，且將產生具有獨特抗原可變區之相同免疫球蛋白受體。後續研究改變了產生、負載有抗原或投與DC之方式。最初研究使用iDC直至發現其誘導耐受性而非免疫，導致向使用成熟DC (mDC)之轉換。

成熟DC展現降低的吞噬細胞活性及增加的MHC共刺激分子表現且分泌較大量之免疫刺激性細胞激素。成熟DC亦改變其趨化因子受體表現模式，使DC對淋巴趨化因子敏感。藉此，成熟DC獲得遷移至排水二級淋巴器官之T細胞區域的能力，在該等區域中其遇到未處理T細胞且起始適應性免疫反應。

在接種疫苗研究中所用的DC類型包括FLT3L擴增DC、CD34+DC、經IFN α 或IFN β 產生的DC及同種異體DC。DC經肽脈衝，負載有蛋白或經編碼特異性抗原之RNA (定義的RNA)轉染。為了增加所呈現的腫瘤特異性抗原之範圍，DC經腫瘤衍生的RNA轉染或與腫瘤細胞融合以產生DC-腫瘤雜交。此外，出於接種疫苗目的使用DC衍生外來體。外來體為由許多細胞類型分泌之細胞內吞起源的膜囊泡。

經肽脈衝之DC衍生外來體能夠誘導肽特異性T細胞反應。若干臨床試驗評估了基於DC之治療與諸如調節性T細胞之耗竭、IFN γ 化學療法或投藥之其他治療之組合。當前臨床試驗中的新穎策略包括使用TLR配位體活化之DC，使用不同DC子集及基於DC之治療與靶向諸如CTLA4、OX40、4-1BB或PD1之共刺激分子之策略組合。4-1BB，腫瘤壞死因子受體總科成員9。

活體外產生成熟DC

活體外產生的單核細胞衍生之DC在臨床試驗中係用作對抗癌症之細胞疫苗。為了能夠在免疫療法期間誘導有效腫瘤特異性CTL反應，DC必須能夠遷移至淋巴結且在淋巴結中遇到T細胞時產生Th1極化細胞激素IL-12p70。然而，大部分臨床上使用的DC並未在T細胞接觸時產生IL-12p70且缺乏誘導1型免疫之能力(67)。

目前用於臨床試驗之「最高準則」DC成熟混合液為由首次由Jonuleit等人報導的促發炎介體TNF α 、IL-1 β 、IL-6及PGE $_2$ 組成之單核細胞改良性培養基模擬物，其誘導向淋巴結表現CCR7配位體之較高遷移潛能。然而，此混合液並不誘導對適當CTL反應之產生為重要之IL-12p70的產生(68)。通常，用GM-CSF及IL-4培養單核細胞5-7天以產生必須經微生物、促炎性或T細胞衍生刺激活化另外2-3天之不成熟DC以獲得具有完全T刺激能力之成熟DC (69)。

Dauer等人展示了在用GM-CSF及IL-4培養24 h之後將促發炎介體(TNF α 、IL-1 β 、IL-6及PGE $_2$)添加至單核細胞DC以加快DC成熟時，細胞在僅48 h之完整培養時期之後顯示完全成熟DC免疫表型(CD83 $^+$ CD40 $^+$ CCR7 $^+$ CD14 $^-$ CD80 $^+$ CD86 $^{\text{高}}$ MHCII $^{\text{高}}$) (69)。

Frankenberger及Schendel研究了使用TLR促效劑調節幼小mDC中之特異性細胞激素產量，允許其提供在Th1方向上的CD4 $^+$ T細胞反應之極化的適當信號，以有效刺激CD8 $^+$ CTL反應且活化自然殺傷細

胞。其說明培養3天之mDC藉由TLR促效劑變成熟，顯示對未處理T細胞之比單獨藉由TNF α 、IL-1 β 、IL-6及PGE₂變成熟的3d mDC更高的刺激能力。

現在，藉由本發明有可能篩選可用於為DC疫苗發展產生成熟DC或可與DC疫苗組合特定言之用於治療高級神經膠質瘤或瘧疾之ABC轉運子介導的ATP釋放之調節劑。

材料及方法

ABC轉運子研究

材料

[γ -³²P]-ATP係自Perkin Elmer Inc.(Boston, USA)獲得。[³H]-ATP係自Moravek Biochemicals (Brea, CA, USA)獲得。泮托拉唑(Pantozol[®] 40 mg靜脈內)係來自Altana Pharma, Hoofddorp, The Netherlands及MTX (Emthexate PF[®] 25 mg/ml)係來自Pharmachemie, the Netherlands。PSC333係來自Novartis (Basel, Switzerland)。磷酸肌酸及肌酸激酶係自Boehringer Mannheim (Almere, the Netherlands)獲得且OE67過濾器係來自Schleicher及Schuell (Dassel, Germany)。所有其他化學品及試劑均為分析級且購自Sigma (St.Louis, MO)。

膜囊泡之製備及水泡轉運分析

在由50 mM Tris及250 mM蔗糖組成之調節至pH 7.4之等滲囊泡緩衝液中製備來自(經ABC轉運子轉染)Sf9細胞之膜囊泡。在如前所述的水泡轉運分析緩衝液(50 mM HEPES/KOH, 100 mM KCl)中進行水泡轉運分析(Breedveld等人, 2004、2007)。藉由添加等分試樣之較低pH的HCl (37% w/w)將水泡轉運分析緩衝液及轉運分析中所用的所有其他試劑之溶液調節至適當pH (pH 6或pH 7.4)。控制最終溶液之pH (Breedveld等人, 2007)。在如先前所述(Breedveld等人, 2004)的快速過濾方法之後研究時間依賴性及濃度依賴性攝取放射性標記基質至膜

囊泡中。

跨越MDCKII單層轉運

如前所述培養MDCKII細胞(穩定表現所關注的ABC轉運子)或CTX-TNA2細胞(Breedveld等人, 2004) (Pavek等人, 2005) (Cantrill等人, 2012)。如先前所述(Breedveld等人, 2004)藉由例如 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 或 $[^3\text{H}]\text{ATP}$ 、較佳 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 之適當(放射性標記)模型基質且在具有或不具有測試化合物之情況下進行經上皮轉運分析。用HCl (37% w/w)將培養基調節至pH 6.0或7.4且在緊接著添加放射性標記基質之前適當地緩衝。

動力學與統計分析

使用套裝軟體Graphpad Prism版本4 (GraphPad Software, San Diego, USA)藉由非線性回歸分析進行曲線擬合。根據經典的米-曼氏模型(Michaelis-Menten model) (方程式1)分析來自濃度依賴性轉運分析之資料 (Rowland and Tozer, 1995):

$$v = \frac{V_{\max} \times [S]}{K_m + [S]} \quad (1)$$

其中 v 為轉運速率, $V_{\max}$ 為最大速度, S 為基質濃度, 及 K_m 為在半最大速度下之基質濃度。期間使用兩邊不成對的學生 t 檢驗來分析兩組資料之間的差異之統計顯著性。結果表示為平均值 $\pm$ 標準誤差。認為在 $P < 0.05$ 時差異為統計顯著的。

活體外及活體內ABC轉運子研究

材料。

丹酚酸A與B、丹參酮I與IIA、隱丹參酮、二氫丹參酮I、迷迭香酸、原兒茶酸(乙酯)、2'-z-靛玉紅及靛玉紅-3'-胍、益母草鹼、黃芪甲苷IV、替莫唑胺、泮托拉唑、埃索美拉唑、依克立達、青蒿素、青蒿琥酯及氯喹係購自Sigma (Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, The

Netherlands)。丹參根萃取物及板藍根萃取物係自 HerbaSinica (Rednitzhembach, Germany) 獲得及丹參酸 B 單甲酯係自 Wuhan Chemfaces Biochemical 公司 (Wuhan, China) 獲得，貝伐單抗來自 Genentech/Hoffmann-laRoche，舒尼替尼及索拉非尼係購自 Sequoia Research Products (Pangbourne, UK)。泮托拉唑(Pantozol® 40 mg靜脈內)係來自 Altana Pharma, Hoofddorp, the Netherlands 及 MTX (Emthexate PF® 25 mg/ml)係來自 Pharmachemie, the Netherlands。

肝素(Heparin) (5000 IU/ml)係自 Leo Pharma BV (Breda, the Netherlands)獲得。鋰肝素微維特(microvette)及二鉀-EDTA微維特係自 Sarstedt (Numbrecht, Germany)獲得。EDTA二鈉鹽(pH 8.0)係來自 Cambrex BioScience Inc. (Rockland, ME)。牛血清白蛋白(Bovine serum albumin; BSA)級分 V 係購自 Roche (Mannheim, Germany)。異氟醚(Forane)係來自 Abbott Laboratories (Queenborough, Kent, UK)。所有其他化學品及試劑係自 Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany)獲得。

活體外ABC轉運子實驗

草本化合物在較低pH下對BCRP介導之ATP轉運之影響。

藉由使用 Sf9-BCRP 膜囊泡，吾等研究了選自丹酚酸、紫草酸、丹參酮、原兒茶酸、靛玉紅、益母草鹼、黃芪甲苷、苦木苦味素及苯酞之群之草本化合物在 pH 6 及 pH 7.4 下對 BCRP 介導之 1 μ M 及 100 μ M [³²P]ATP 轉運之影響，且對此轉運與在相同所選 pH 值下在 Sf9 野生型囊泡中之 [³²P]ATP 轉運進行比較。此外，吾等測試了所選擇的草本化合物與 BCRP 及質子泵抑制劑泮托拉唑(10 μ M)或埃索美拉唑之共同投藥在相同條件下對 [³²P]ATP 轉運之影響。

抗癌藥物在較低pH下對BCRP介導之ATP轉運之影響。

藉由使用 Sf9-BCRP 膜囊泡，吾等研究了選自抗癌及/或抗瘡疾藥

劑替莫唑胺、青蒿素、青蒿琥酯、貝伐單抗、舒尼替尼及索拉非尼之群之化合物在pH 6及pH 7.4下對BCRP介導之1 μ M及100 μ M [32 P]ATP轉運之影響，且對此轉運與在相同所選pH值下在Sf9野生型囊泡中之[32 P]ATP轉運進行比較。吾等使用在pH 6及pH 7.4下的BCRP介導之[3 H]-MTX轉運作為對照組。此外，吾等測試了BCRP與質子泵抑制劑泮托拉唑或埃索美拉唑(10 μ M與250 μ M)及/或選自丹酚酸B、丹參酮IIA、丹參酸B鎂、益母草鹼、黃芪甲苷IV及靛玉紅-3-脲之群之草本化合物(1 μ M、10 μ M、100 μ M、1 mM)之共同投藥在相同條件下對[32 P]ATP轉運之影響。

除了膜囊泡研究之外，吾等研究了較低pH是否亦影響BCRP介導之自完好細胞的ATP流出。為此目的，吾等在傳斯維爾模型中分析在pH 7.4下及在pH 6.5下MDCKII-BCRP細胞中之ATP轉運且對此轉運與在相同pH值下對照細胞中之ATP轉運進行比較，且吾等量測細胞內ATP濃度。此外，吾等測試了BCRP與質子泵抑制劑泮托拉唑或埃索美拉唑(20 μ M或100 μ M)及/或選自丹酚酸、紫草酸、丹參酮、原兒茶酸、靛玉紅、益母草鹼、黃芪甲苷、苦木苦味素及苯酞之群之草本化合物在相同條件下對[32 P]ATP轉運之影響，且吾等對此影響與5 μ M依克立達(作為對照組)之投藥進行比較。此外，吾等測試了抗癌劑伊馬替尼或索拉非尼(1 μ M)之伴隨投藥。

傳斯維爾模型中之此等實驗將亦藉由共培養豬腦內皮細胞(porcine brain endothelial cell; PBEC)與原發性大鼠星形膠質細胞(CTX-TNA2細胞株)作為完好細胞來進行。

較低pH對藉由MRP1-6 (ABCC1-6)之ATP轉運之影響。

藉由使用Sf9-MRP1、Sf9-MRP2、Sf9-MRP3、Sf9-MRP4、Sf9-MRP5或Sf9-MRP6膜囊泡，吾等研究了pH (pH 6及pH 7.4)對MRP1-6介導之1 μ M及100 μ M [32 P]ATP轉運之影響，且對此轉運與在相同所

選pH值下Sf9野生型囊泡中之 $[^{32}\text{P}]$ ATP轉運進行比較。吾等研究了選自丹酚酸、紫草酸、丹參酮、原兒茶酸、靛玉紅、益母草鹼、黃芪甲苷、苦木苦味素及苯酞之群之草本化合物在pH 6及pH 7.4下對MRP介導之1 μM 及100 μM $[^{32}\text{P}]$ ATP轉運之影響。

草本化合物對化學療法誘導之來自腦腫瘤細胞株之ATP釋放之影響。

吾等將一組(副群)神經膠母細胞瘤細胞(人類U87-MG、U118-MG、U-138 MG)曝露於替莫唑胺或當前處於研究中之用於治療多形性膠質母細胞瘤之化學治療劑，亦即例如貝伐單抗、舒尼替尼、索拉非尼或伊馬替尼。此外，吾等測試了來自丹參根萃取物(水可溶酚類化合物、丹酚酸A與B及丹參酸B鎂及親脂性丹參酮)及來自板藍根萃取物(吡咯生物鹼)之不同草本化合物之伴隨投藥之影響。吾等分析了在分別隔夜曝露或72 h曝露於該等化合物之後的短期及長期形態變化、生長抑制及細胞死亡(藉由MTT分析)且量測細胞內與細胞外ATP濃度。

活體內ABC轉運子實驗

動物

根據符合荷蘭立法(Dutch legislation)之機構準則安置及處理小鼠。所用動物為9週齡與14週齡之間具有可比遺傳背景(FVB或混合129/Ola與FVB)之雄性Bcrp1^{-/-} (Bcrp1基因剔除)及野生型小鼠。動物保持在其中12-h光照/12-h黑暗循環之溫控環境中且接收標準膳食(AM-II; Hope Farms, Woerden, The Netherlands)及任意酸化水。

藥物製備

將甲苯磺酸索拉非尼溶解於DMSO (25 mg/ml)中且用聚氧乙烯蓖麻油(Cremophor EL)/乙醇/水(1:1:6, v/v/v)稀釋25倍。將蘋果酸舒尼替尼溶解於在25 mg/ml之濃度下的DMSO中且進一步用50 mM乙酸鈉緩衝液(pH 4.6)稀釋以產生1 mg/ml之濃度。在10 mg/kg體重下經口投

與索拉非尼與舒尼替尼(10 ml/kg)。用NaCl 0.9%將一瓶泮托拉唑稀釋至8 mg/ml之最終濃度。將丹酚酸B溶解於聚氧乙烯蓖麻油/乙醇/水(1:1:6, v/v/v)中且將靛玉紅溶解於在25 mg/ml之濃度下的DMSO中且進一步用50 mM乙酸鈉緩衝液(pH 4.6)稀釋以產生1 mg/ml之濃度。

血漿藥物動力學及索拉非尼與舒尼替尼在小鼠中之相對腦累積

為了將在口服投藥時的吸收之變化降至最低，在具有或不具有使用平端針藉由管飼法灌入胃中之泮托拉唑(120 mg/m²)及/或丹酚酸B或靛玉紅之伴隨投藥的情況下投與索拉非尼或舒尼替尼之前使小鼠空腹3 h。為了防止血液凝固，肝素用於舒尼替尼藥物動力學實驗，而EDTA用於索拉非尼藥物動力學實驗。在口服投藥之後在0.25 h、0.5 h、1 h、2 h及4 h時間點處使用含有二鉀-EDTA之微維特或鋰肝素進行尾靜脈血液取樣。在口服投藥6小時之後，用異氟醚麻醉小鼠且藉由心臟穿刺收集血液，其中0.5 M二鈉-EDTA或5000 IU/ml肝素係用作抗凝劑。緊接著其後，藉由頸位錯法殺死小鼠且快速移除大腦。藉由在4°C下以2,100 g離心6 min使血漿自血液分離，收集血漿部分且在-20°C下儲存直至分析。用1 ml之4%BSA均質化大腦且在-20°C下儲存直至分析。口服投藥之後的相對腦累積係藉由在相對於血漿AUC_{0-6h}之6 h處確定藥物腦濃度來計算，因為在口服投藥之後AUC比在6 h處的血漿濃度更好地反映大腦隨時間之整體藥物曝露。

藥物分析

血漿及腦勻漿中之索拉非尼濃度及舒尼替尼濃度係藉由耦合至串聯質譜分析之液相層析分析。定量下限 (Lower limit of quantification; LLQ)值對於舒尼替尼及對於血漿與腦勻漿分別為5 ng/ml、15.6 ng/g。LLQ值對於索拉非尼及血漿與腦勻漿分別為10 ng/ml、31.2 ng/g。

統計分析

藥物動力學參數係藉由非間隔方法計算。血漿濃度-時間曲線下方的面積係使用梯形規則計算，而不推斷為無窮大。血漿中之最大藥物濃度(C_{max})及在血漿中達到最大藥物濃度之時間(T_{max})係直接自平均濃度-時間資料確定。資料表示為平均值±SD。為了參數統計分析，將除了血漿濃度及AUC_{0-6h}值之所有資料轉化為對數以獲得方差等同性。使用單向方差分析(ANOVA)確定組之間的差異之統計顯著性，在其之後，藉由包法隆尼(Bonferroni)校正進行事後測試以在個別組之間進行比較。認為差異在 $P<0.05$ 時統計顯著。

草本BCRP調節劑及質子泵抑制劑對使用高級神經膠質瘤之基因工程化小鼠模型藉由替莫唑胺進行高級多形性膠質母細胞瘤之治療之影響。

極適用於干預研究之高級神經膠質瘤小鼠模型係由de Vries等人(70)描述。此係藉由將Cre慢病毒載體顱內注入至Ink4a/Arf;K-Rasv12、Pten;Ink4a/Arf;K-Rasv12及p53;Ink4a/Arf;K-Rasv12 LoxP條件性成年小鼠中來實現。腫瘤發生率及惡性腫瘤級別在後一基因型中為最高。腫瘤再現人類神經膠質瘤之特徵之許多組織學特徵，包括腫瘤細胞異質性、侵襲性、血管滲透性及BBB特徵。條件性LucR基因之交叉允許監測腫瘤生長充分長時間段以具有干預之時間窗口。特定言之，當使用慢病毒CMVCre時在p53;Ink4a/Arf;K-Rasv12小鼠中可見的較短潛伏時間及極高發病率使得此為用於治療干預研究之實際模型，其展示於使用口服替莫唑胺100 mg/kg 9天之療效研究中。吾等測試了來自丹參或板藍根之草本萃取物或草本BCRP調節劑(丹酚酸B、丹參酸B鎂或靛玉紅)及/或泮托拉唑或埃索美拉唑及/或ATP及替莫唑胺(4週治療)之共同投藥對神經膠母細胞瘤腫瘤生長之減少之影響。

植物萃取化合物之抗寄生蟲活性之確定

目標

- 植物萃取化合物之活體外IC₅₀及其在與青蒿素(或衍生物)組合對抗惡性瘧原蟲時的加成/協同效應之確定。

- 在具有或不具有三磷酸腺苷(adenosine triphosphate ; ATP)之情況下與質子泵抑制劑組合之青蒿素/雙氫青蒿素之加成/協同活性之確定。

方法

針對寄生蟲之無性階段進行測試化合物之抗瘧原蟲活性測試。此階段為在活體內周邊血液中之最高濃度處發生之階段且為造成疾病之症狀的原因。

血液中之無性繁殖循環經歷4個主要階段：裂殖子侵入紅血球。接著為細胞內，其緊接著形成環階段，該環階段持續大約24小時。隨後，其生長成滋養體—在細胞分裂之後，其形成裂殖體。在總計48小時之後，寄生蟲變成熟，紅血球爆裂且自各個別感染紅血球釋放約16-24個裂殖子。活體內，寄生蟲血症可在每μl血液幾個寄生蟲至多1,000,000寄生蟲之間變化。

在標準化藥物靈敏度分析中，在環階段處添加測試化合物且用化合物培育總計72小時。隨後，寄生蟲之完整生長係藉由富含組胺酸蛋白II (HRPII)之濃度藉由ELISA間接量測。HRPII為由寄生蟲高度產生的蛋白。此量測給出讀出，允許藉由統計分析確定施用的植物衍生測試化合物之IC₅₀及IC₉₀。

藉由等輻射分析針對純系3D7評估抗瘧疾藥物組合。在各實驗中自歸一化部分抑菌濃度(FIC)值建構等效線圖。

基於方程式(1)計算各藥物之部分抑菌濃度(FIC)，其中IC₅₀ A_(B)為藥物A在藥物B存在下之50%抑菌濃度。

$$FIC_{\text{藥物A}} = IC_{50} A_{(B)} / IC_{50} A \quad (1)$$

基於FIC總和(ΣFIC)之計算之等效線圖分析給出相互作用是否為

拮抗、加成或協同性之指示。儘管不存在抗瘧疾組合之定義的斷點，研究定義拮抗作用為 $\Sigma\text{FIC}>2.0$ 及協同作用為 $\Sigma\text{FIC}<0.5$ 。基於 IC_{50} 及 IC_{90} 值分析相互作用可產生不同結果且預期研究之間的變化。

材料及方法

寄生蟲培養及試劑

- Pf 3D7 A寄生蟲(環階段，藉由5%山梨糖醇治療同步)
- RPMI w/o 麩醯胺酸 w/ 25 mM HEPES (下文稱為 RPMI)，

2×MCM

- 具有個別蓋之96孔組織培養培養盤，無菌
- 於RPMI中之8 mM EDTA，無菌
- 化合物，根據表1及表2
- 包括適當抗體之HRP2-ELISA培養盤
- TMB單一溶液(Invitrogen Cat # 00-2023)，1 M HCl

實驗程序

藥物及化合物之4×儲備液製備

將化合物、ATP/PP及抗瘧疾藥稀釋至RPMI中之4×最終濃度。

2×儲備液製備

對於單一化合物滴定、ATP/PP滴定及抗瘧疾藥滴定，在RPMI中以1:1稀釋4×化合物以獲得2×儲備液。

為了分析化合物與ATP/PP之間的協同作用，同樣以各1:1混合4×化合物與4×ATP/PP以獲得2×化合物-ATP/PP混合物。另外以1:1混合4×ATP/PP儲備液與RPMI以獲得2x儲備液。

作為陰性對照組，同樣稀釋溶解培養基(DMSO及甲醇)。

培養盤準備

對於滴定(1:2或1:3)，將200 μl /150 μl 吸入稀釋系列之第一孔。將100 μl 之RPMI (單一化合物滴定)或2×PP/ATP (協同作用之分析)吸入

稀釋系列之剩餘7個孔。第一孔之100 μ l/50 μ l係使用多注式吸液管吸取且在各別預吸取稀釋培養基(RPMI，2 $\times$ PP/ATP)中以1:2/1:3連續稀釋。

將100 μ l之在2 $\times$ 濃度下的對照組吸入各別對照孔。

寄生蟲基RBC之準備

寄生蟲在分析開始之前經由山梨糖醇治療6天、4天及2天達到同步且接著在2 $\times$ MCM (=2 $\times$ 寄生蟲)中在3%血容比(hct) (最終1.5%)下製備為0.05%寄生蟲血症。

亦在2 $\times$ MCM中將RBC製備為3% hct (=2 $\times$ RBC)。

將100 μ l之寄生蟲/RBC添加至孔中。以此，將2 $\times$ 化合物稀釋至1 $\times$ =分析濃度。寄生蟲血症保持相同且將3% hct稀釋至1.5% hct=最終hct。

根據表3中之兩種例示性藥物A及B之所示流程填充96孔培養盤。按個別結果表中所陳述使用濃度：

表1

EDTA	藥物A [nM]								10 μM PP	裂殖體對照組	RBC
	50	25	12.5	6.25	3.12	1.56	0.78	0.39			
	藥物A [nM]+10 μM PP										
	50	25	12.5	6.25	3.12	1.56	0.78	0.39			
	藥物B [nM]										
	50	25	12.5	6.25	3.12	1.56	0.78	0.39			
藥物B [nM]+10 μM PP								稀釋劑對照組			
50	25	12.5	6.25	3.12	1.56	0.78	0.39				

免疫研究

草本BCRP調節劑在較低pH及/或低氧條件下對卡斯蛋白酶-1之活化、來自免疫細胞的細胞激素釋放及對DC成熟之影響。

氫氧化鋁為廣泛使用的佐劑且已被展示活化卡斯蛋白酶-1以誘導趨化因子之分泌及促進單核細胞向樹突狀細胞分化。

在此研究中，吾等研究了選自丹酚酸、紫草酸、丹參酮及靛玉

紅之群之草本BCRP調節劑在較低pH及/或低氧條件下對來自免疫細胞的BCRP介導之ATP釋放、卡斯蛋白酶-1之活化、細胞激素分泌之誘導及對單核細胞向樹突狀細胞之分化的影響，且吾等在具有或不具有質子泵抑制劑泮托拉唑或氫氧化鋁之伴隨投藥之情況下對此進行比較。脂多醣(LPS)用作對照組，因為細胞激素釋放可直接由革蘭氏(gram)陰性細菌層組分LPS誘發。

材料、細胞培養及細胞分離

試劑

LPS (大腸桿菌055:B5)、鋁膠(礬凝膠，13 mg/mL)、丹酚酸A與B、丹參酮I與IIA、2'-z-靛玉紅、靛玉紅-3'-胥係購自Sigma (Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, The Netherlands)。丹參根萃取物及板藍根萃取物係自NatuurApotheek (Pijnacker, the Netherlands)獲得。丹參酸B鎂係自Wuhan Chemfaces Biochemical公司(Wuhan, China)獲得。

RPMI 1640、台氏(Tyrode's)緩衝液、胎牛血清及非必需胺基酸係購自Gibco BRL Life Technologies (GIBCO-BRL-Invitrogen公司, Carlsbad, CA, USA)。針對IL-1 β 、卡斯蛋白酶-1及GAPDH之兔多株抗體係分別自細胞信號傳遞(Cell signaling) (Bioke, Leiden, The Netherlands)及Stressgen (恩佐生命科學公司(Enzo Life Sciences BV), Zandhoven, Belgium)獲得。精度蛋白標準物及PVDF膜係購自Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Veenendaal, The Netherlands)。辣根過氧化酶(Horseradish peroxidase; HRP)結合之兔抗小鼠IgG及山羊抗兔IgG係購自Dako Diagnostics (Dako B.V. Heverlee, Belgium)。

PBMC、單核細胞、DC及嗜中性白血球之分離及刺激

白血球層係自經知情同意之健康血液供體獲得且藉由菲科爾(Ficoll)密度離心分離。

回收PBMC層，用RPMI 1640培養基洗滌三次且再懸浮於完全培

養基(補充有1-麩醯胺酸及25 mM HEPES之RPMI 1640，含有10%FCS (海克隆實驗室(HyClone Laboratories))及1%青黴素/鏈黴素/麩醯胺酸)中。以 4×10^5 細胞/孔之密度在96孔平底培養盤中培養PBMC。

使用MACS系統(Miltenyi Biotec)藉由用抗CD14珠粒分離磁性細胞使單核細胞自PBMC分離。以 2×10^5 細胞/孔之密度在96孔平底培養盤中之完全培養基中培養細胞。

單核細胞衍生之DC係藉由以 3×10^6 細胞/毫升之密度在細胞培養皿中之DC培養基(補充有10% FCS之RPMI 1640 (海克隆實驗室))、1%非必需胺基酸補充劑、1%丙酮酸鹽、1%格魯塔瑪(Glutamax)、IL-4 (10 ng/ml)及GM-CSF (10 ng/ml)中培養單核細胞獲得。在培育期結束時，細胞係藉由溫和吸液分離且在96孔培養盤中之完全培養基中培養。對於DC分化之時間過程實驗，在具有或不具有ATP (1 μ M、250 μ M或1 mM)之情況下在草本萃取物(丹參根或板藍根)、草本化合物(丹酚酸、紫草酸鎂或靛玉紅)及/或泮托拉啞(10 μ M)或礬(13 μ g/ml)存在下或在LPS (100 pg/ml)存在下用DC培養基在96孔平底培養盤中直接培養單核細胞。此等DC分化實驗係在生理條件下或在病理生理條件(較低pH及/或低氧)下進行。其中指示，以5珠粒/細胞之濃度將螢光乳膠珠粒(1 μ m，Fluoresbrite YG微球；Polysciences)添加至單核細胞且藉由FACS觀測由細胞攝取的珠粒。細胞在無進一步成熟作用之情況下經分析為不成熟DC (iDC)或藉由在最後24 h培育期間添加發炎性混合物(10 ng/ml IL-1 β 、IL-6及TNF- α 及1 μ M PGE₂)變成熟。

骨髓DC係藉由分類譜系陰性(CD3⁻, CD14⁻, CD19⁻, CD56⁻)CD11c^{bright}細胞之FACS自PBMC分離。以 1×10^4 細胞/孔之密度在完全培養基中培養分類細胞。

為了分析來自新鮮完整血液之細胞，自經知情同意之健康志願者收集靜脈血液。用ACK溶解緩衝液(150 mM Nh₄Cl、10 mM

KHCO₃、0.1 mM EDTA (pH 7.3))溶解RBC 5-10 min，且洗滌剩餘細胞且在15 ml離心管中於完全培養基中培養。

漿細胞樣樹突狀細胞係藉由使用CD304微珠(磁性細胞分類/MACS/；Miltenyi Biotec，Utrecht，the Netherlands)用鑽石漿細胞樣樹突狀細胞分離套組自PBMC分離。藉由CD123之流動細胞學分析評估純度。在具有5% CO₂之潮濕氛圍下在37°C下用不同刺激物在V底96孔培養盤中培養人類pDC 8 h以評估細胞激素產量(10⁶/ml)。

人類嗜中性白血球係藉由菲科爾-海帕克(Ficoll-Hypaque)離心隨後沈積於5%聚葡萄糖/0.9%鹽水中自肝素化靜脈血液白血球層獲得。嗜中性白血球係藉由溶解於0.15M NH₄Cl、0.01M NaHCO₃與0.01M四EDTA之溶液中自紅血球分離。將回收的嗜中性白血球再懸浮於供應有10%胎牛血清及基本胺基酸與10 mM 4-(2-羥乙基)-1-哌嗪乙磺酸(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid；HEPES)之RPMI 1640培養基(pH 7.2)中且洗滌三次。嗜中性白血球製劑之純度係藉由細胞離心塗片製劑之瑞氏(Wright's)染色確定。

用於混合淋巴細胞反應分析(mixed lymphocyte reaction assay；MLR)之T細胞係使用MACS未處理CD4⁺ T細胞分離套組(Miltenyi Biotec)藉由磁性細胞分離自PBMC分離。在於5%CO₂中37°C下，在補充有10%加熱不活化FBS、2 mM左旋穀氨酸(L-glutamine)、100 U/mL青黴素及100 µg/mL鏈黴素之RPMI 1640培養基中培養CD4⁺ T細胞。在可溶性抗CD28單抗(mAb)存在下預塗佈有抗CD3單抗之平底96孔培養盤中活化CD4⁺ T細胞3 d。

對於刺激實驗，將5×10⁶ PBMC或1×10⁶ DC塗於24孔培養盤中之0.5 ml RPMI 1640/10%FCS中且用不同測試化合物(丹參根萃取物、板藍根萃取物、丹酚酸、紫草酸鎂及/或泮托拉唑及/或礬及/或LPS)在不同劑量及時間跨度下刺激。

細胞激素分泌

收集不含細胞之培養上清液且在-20℃下儲存直至分析。細胞激素分泌係藉由Bio-Plex分析(27叢面板) (Bio-Rad)根據製造商之說明書量測。分析以下可溶性蛋白：IL-1 β 、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12p70、IFN- γ 、IP-10、MCP-1 (CCL2)、MIP-1 α (CCL3)、MIP-1 β (CCL4)、TNF- α 。此外，藉由ELISA量測上清液中之IL-18。

流動細胞學表型分析

在具有或不具有ATP之情況下的48 h培育之後，使用螢光異硫氰酸鹽 (fluorescein isothiocyanate ; FITC)、磷脂醯乙醇胺 (phosphatidylethanolamine ; PE)或別藻藍蛋白結合之以下單株抗體免疫表型DC：抗CD1a (1:25)、抗CD54 (1:25)、抗CD86 (1:25)、抗CD40 (1:10 ; BD Pharmingen , San Diego , CA)、抗CD14 (1:25)、抗HLA-DR (1:25 ; BD Biosciences , San Jose , CA)、抗蘭格素 (langerin) (CD207)、抗CD83 (1:10 ; Immunotech , Marseilles , France)、抗CD80、抗CD86 (BD Pharmingen , San Diego , CA)及抗CD34 (1:10 ; Sanquin , Amsterdam , The Netherlands)；在補充有0.1%牛血清白蛋白及0.02% NaN₃之磷酸鹽緩衝鹽水(phosphate buffered saline ; PBS)中洗滌2.5個至5 $\times$ 10⁴個細胞且在4℃下用特異性或相應對照組Mab培育30分鐘。趨化因子受體7 (CCR7)表現係藉由用大鼠抗CCR7單抗培育、隨後用螞蟻-大鼠IgG2a-生物素化單抗培育及用抗生蛋白鏈菌素-別藻藍蛋白(BD PharMingen)培育來確定。在裝備有CellQuest分析軟體之FACS流式細胞儀(BD Biosciences , San Jose , CA)上分析細胞。

細胞遷移分析

將含有培養基之細胞培養上清液或趨化因子置放於96孔傳斯維爾培養盤(微孔尺寸：5 μ m ; Millipore)之下部室中。以10⁴細胞/孔之密度將細胞添加至上部室且允許其反式遷移3 h。反式遷移細胞之數

目係藉由FACS評估。

單核細胞衍生之DC上之BCRP表現

藉由由van de Ven等人描述的lightcycler RT-PCR及西方墨點分析(western blot analysis)分析單核細胞衍生之DC (不成熟moDC及成熟moDC)之BCRP表現(36)。

MLR分析

將APC置放於以 4×10^4 細胞/孔之起始細胞密度進入96孔平底培養盤之連續稀釋液(1/3)中。每孔添加總計 2×10^5 未處理 $CD4^+$ T細胞，且共培養細胞5天。在培育期結束前24 h，抽取50 μ l培養上清液用於細胞激素分析且用0.5 μ Ci之 $[^3H]$ 胸苷(Amersham Biosciences)脈衝細胞培養物。增殖性細胞中併入的 $[^3H]$ 胸苷係藉由液體閃爍計數器(Packard)量測。

內吞作用分析

用草本萃取物或化合物及/或泮托拉唑或礬或LPS培養PBMC 24 h。在整個培育期期間藉由10珠粒/細胞共培養之後分析螢光乳膠珠粒(1 μ m，Fluoresbrite YG微球；Polysciences)之吞噬作用。用抗CD14別藻藍蛋白染色CD14之細胞，且分析 $CD14^+$ 單核細胞在FITC通道(FI-1)中之平均螢光強度。

同樣藉由用草本萃取物或化合物及/或泮托拉唑或礬或LPS連同液相染料螢光黃CH (英維羅根生命技術(Invitrogen Life Technologies))共培養的PBMC中之 $CD14^+$ 單核細胞之分析評估內吞作用。

死亡細胞或凋亡細胞之分析

為了在培養期結束時識別死亡細胞或凋亡細胞，用磷脂結合蛋白V-PE細胞凋亡偵測套組I (BD Pharmingen)根據製造商之說明書染色細胞。磷脂結合蛋白V之凋亡細胞染色陽性，而死亡細胞為磷脂結合蛋白V/7-胺基放線菌素D雙陽性。

炎性體信號傳遞之西方墨點分析

蛋白濃度係藉由BCA蛋白分析套組(Pierce)確定。使溶解產物(25 μ g)經受SDS/PAGE [10% (w/v)凝膠]。將分離蛋白電轉染至PVDF膜(Bio-Rad)上。膜接著用含有159 mM NaCl及1%Tween 20 (TBS-T)之Tris/HCl (pH 7.4)洗滌一次，且接著在超阻斷緩衝液(Pierce)中阻斷1 h。在用TBS-T洗滌膜之後，如由供應商指示在4°C下添加針對IL-1 β 及卡斯蛋白酶-1之抗體24 h。在用TBST洗滌三次之後，用IL-1 β 之HRP結合的山羊抗兔IgG及卡斯蛋白酶-1之兔抗山羊IgG處理膜1 h，在TBS-T中稀釋至1:20,000。在用TBS-T洗滌三次之後，藉由增強型化學發光西方墨點分析系統(Amersham Pharmacia Biotech)顯示免疫活性蛋白條帶。掃描膜且在裝備有一個數量v. 4.0.3軟體(Bio-Rad)之GS7-10校準成像密度計上進行分析。為了偵測凝膠上之相等載入蛋白，藉由剝離緩衝液(Pierce)剝離該等膜，用GAPDH之抗體培育作為管家蛋白且藉由ECL觀測。

草本化合物之免疫-腫瘤效果之測試

工作分項1

1a)草本化合物對DC表型及功能之影響

經由CD14選擇自周邊血液單核細胞(peripheral blood mononuclear cell; PBMC)獲得的人類樹突狀細胞及IL4/GM-CSF培養物係用於分析較低pH條件下的表面標記表現與細胞激素分泌及LPS誘導之細胞活化。評估單獨的草本化合物或與埃索美拉唑(250 μ M)或ATP (1 mM)(為了協同作用)組合及與單獨的埃索美拉唑(250 μ M)或ATP (1 mM)相比對此等端點之影響。藉由來自不同供體之n=8樣本進行活體外研究。

	LPS		埃索美拉唑	ATP	HC	
草本化合物						
組1	-		-	-	+	
組2	+		-	-	+	
組3	+		+	-	+	
組4	+			+	+	
對照組						
組5	+		+	-	-	
組6	+		-	+	-	
組7	+		-	-	-	

HC：草本化合物

HC-1：靛玉紅-3-脲

HC-2：丹參酮IIA

HC-3：丹參酸B鎂

在共培育之後，收穫細胞及上清液。

偵測培養上清液中之以下細胞激素：IL-1β、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12p70、IL-18、IFN-γ、IP-10、CCL2、CCL3、CCL4及TNF-α。

細胞係使用針對以下標記之抗體藉由多維流動式細胞測量術分析：CD1a、CD54、CD40、CD14、HLA-DR、CD207、CD83、CD80、CD86、CD34及CCR7。

1b)草本化合物對卡斯蛋白酶-1活性之影響

藉由脂多醣 (lipopolysaccharide；LPS)在草本化合物存在或不存在下刺激人類PBMC且與LPS加鋁膠進行比較。端點：裂解卡斯蛋白酶-1 p20次單位及Pro-IL-1β與成熟IL-1β。n=8樣本來自不同供體。

	LPS	化合物
組1	+	-
組2	+	HC-1
組3	+	HC-2
組4	+	HC-3
組5	+	鋁膠

HC-1：靛玉紅-3-脲

20

HC-2：丹參酮IIA

HC-3：丹參酸B鎂

1C)草本化合物對DC表型及功能之影響

經由CD14選擇自周邊血液單核細胞(PBMC)獲得的人類樹突狀細胞及IL4/GM-CSF培養物係用於分析較低pH條件下的表面標記表現與細胞激素分泌及LPS誘導之細胞活化。評估單獨的草本BCRP化合物或與氫氧化鋁(為了協同作用)組合及與單獨的氫氧化鋁相比對此等端點之影響。將藉由來自不同供體之n=8樣本進行活體外研究。

	LPS	鋁	埃索美拉唑	ATP	HC-1	HC-2	HC-3
組12	+	+	-	-	+	-	
組13	+	+	-	-	-	+	
組14	+	+	-	-	-	-	+

HC-1、HC-2、HC-3：草本化合物1及草本化合物2與草本化合物3。

在共培育之後，收穫細胞及上清液。

偵測培養上清液中之以下細胞激素：IL-1β、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12p70、IL-18、IFN-γ、IP-10、CCL2、CCL3、CCL4及TNF-α。

細胞係使用針對以下標記之抗體藉由多維流動式細胞測量術分析：CD1a、CD54、CD40、CD14、HLA-DR、CD207、CD83、CD80、CD86、CD34及CCR7。

工作分項2 草本化合物對ATP誘導的增殖及活化T輔助細胞與調節T細胞之細胞凋亡之影響

人類CD4+ T (TH)細胞及Foxp3+調節T細胞係藉由根據磁性分離套組(Miltenyi)自PMBC獲得。細胞群體之純度將藉由流動細胞學分析確定。TH細胞將藉由CD3/CD28抗體活化。將研究草本BCRP調節劑在具有或不具有埃索美拉唑之情況下對ATP誘導增殖及細胞凋亡之影

響。將使用兩種不同劑量之ATP：250nM (較低)及1000nM (較高)。增殖將藉由CFSE標記之減少來量測。早期及後期細胞凋亡將藉由7AAD/磷脂結合蛋白V染色評估。n=8樣本來自不同供體。

	較低劑量ATP	較高劑量ATP	埃索美拉唑	化合物
組1	+		-	-
組2	+		+	-
組3	+		-	HC-1、HC-2或HC-3
組4	+		+	HC-1、HC-2或HC-3
組5		+	-	-
組6		+	+	-
組7		+	-	HC-1、HC-2或HC-3
組8		+	+	HC-1、HC-2或HC-3

HC-1：靛玉紅-3-脲

HC-2：丹參酮IIA

HC-3：丹參酸B鎂

工作分項3 在化學療法之後草本化合物對腫瘤細胞之ATP釋放及CD133表現之影響

共培養(副群)神經膠母細胞瘤細胞(人類U87-MG、U118-MG、U-138 MG)與替莫唑胺(TEM)、埃索美拉唑及草本化合物。腫瘤細胞生長動力學、細胞凋亡及CD133表現係藉由流動式細胞測量術確定。確定細胞內及細胞外ATP濃度。

	TEM	埃索美拉唑	HC-1、HC-2或HC-3
組1	+	-	-
組2	+	-	+
組3	+	+	+
組4	-	-	+
組5	+	-	-
組6	+	-	-
組7	+	+	-
組8	-	-	-

TEM：替莫唑胺

HC-1：靛玉紅-3-脲

HC-2：丹參酮IIA



HC-3：丹參酸B鎂

工作分項4a 草本化合物在人類巨噬細胞中之毒性

在理解草本化合物在H1N1感染後的此等細胞中之影響之前，首先進行MTT分析以確定標靶細胞中之細胞毒性。在具有或不具有奧司他韋之伴隨投藥之情況下，在不同濃度之草本化合物或埃索美拉唑存在下培養原發性人類巨噬細胞。以技術上一式三份及n=3生物複製進行實驗。

	化合物	濃度	奧司他韋
組1	埃索美拉唑	250 μM	-
組2	埃索美拉唑	250 μM	+
組3	HC-1、HC-2或HC-3	c1	-
組4	HC-1、HC-2或HC-3	c1	+
組5	HC-1、HC-2或HC-3	c2	-
組6	HC-1、HC-2或HC-3	c2	+
組7	HC-1、HC-2或HC-3	c3	-
組8	HC-1、HC-2或HC-3	c3	+
組9	HC-1、HC-2或HC-3	c4	-
組10	HC-1、HC-2或HC-3	c4	+

工作分項4b 草本化合物對H1N1感染之巨噬細胞中的細胞激素功能障礙之影響

人類巨噬細胞將藉由基於CD14之分離及塑膠黏附自PBMC分離，感染有H1N1且在具有或不具有埃索美拉唑之情況下與HC-1、HC-2、HC-3共培養。將分析IL-1β、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12p70、IL-18、IFN-γ、IP-10、CCL2、CCL3、CCL4及TNF-α之上清液。n=8樣本來自不同供體。

HC-1：靛玉紅-3-脲；HC-2：丹參酮IIA；HC-3：丹參酸B鎂

結果

較低pH對藉由BCRP (ABCG2)之ATP轉運之影響。

最近，據報導BCRP (ABCG2)在較低pH下更有效地轉運基質藥物。此係對於MTX、其主要代謝物7-OH-MTX、MTX穀胺酸、葉酸、米托蒽醌(mitoxantrone)、拓朴替康及白藜蘆醇之展示(24)。

儘管在調節細胞ATP滲透性之機制方面的極大關注，來自內皮細胞之(非溶解的)ATP釋放之分子基體仍為爭論的問題。因此，吾等研究了ATP在存在於腫瘤微環境中時是否由於較低pH (其為病理生理學條件)藉由BCRP釋放。

藉由使用Sf9-BCRP膜囊泡，吾等研究了pH (pH 6及pH 7.4)對BCRP介導之 $[^3\text{H}]$ ATP轉運之影響，且對此與Sf9野生型囊泡中在相同所選pH值下之 $[^3\text{H}]$ ATP轉運進行比較(圖1A)。在Sf9野生型膜囊泡中，在pH 7.4下的100 μM $[^3\text{H}]$ ATP之攝取與在pH 6下的攝取相比不存在顯著差異(圖1A)。藉由BCRP之100 μM $[^3\text{H}]$ ATP轉運在0.5 min處在pH 6下比在生理pH下3.8倍更高。對進入Sf9野生型膜囊泡中之 $[^3\text{H}]$ ATP攝取之此等結果進行校正(圖1B)。在pH 6下， $[^3\text{H}]$ ATP轉運為可飽和的，其中明顯的 K_m 值及 $V_{\max}$ 值為2.0 mM及1.5納莫耳/毫克蛋白/分鐘(圖2A)。在pH 7.4下，轉運速率隨著ATP濃度高達5 mM線性增加(圖2B)。

吾人可認為，觀測到的轉運並非為ATP，但在藉由外生ATP酶、外生ADP酶及外生核苷酸酶在所有細胞外空間中在細胞表面處對ATP進行降解時將其分解產物(二磷酸腺苷(ADP)或單磷酸腺苷(AMP))轉運至囊泡中。因此，亦說明BCRP轉運 $[^{32}\text{P}]\text{-}\gamma$ 標記之ATP，如圖3中所示。與藉由BCRP之 $[^3\text{H}]\text{-ATP}$ 轉運相比，BCRP介導之 $[^{32}\text{P}]\text{-}\gamma$ 標記的ATP轉運在生理pH下最小，但在pH 6下0.5 min處之攝取為80 pmol/mg蛋白，其線性增加至10 min處之194 pmol/mg蛋白(圖3)。因此，BCRP在較低pH下轉運ATP，而在生理pH下之轉運為最小。

BCRP抑制劑在較低pH下對BCRP介導之ATP轉運之影響

之前已展示，質子泵抑制劑泮托拉唑與抗葉酸藥物甲胺喋呤兩者在生理pH下均藉由BCRP轉運(Breedveld等人，2004)。對於MTX，說明了在較低pH下與在生理pH下相比之轉運增加(24)。

現已藉由使用 Sf9-BCRP 囊泡展示，在較低 pH 下的 BCRP 介導之 [^3H]ATP 轉運可藉由 BCRP 基質藥物泮托拉唑及甲胺喋呤抑制(圖 4)。然而，10 μM 泮托拉唑降低了在較低 pH 下的 BCRP 介導之 ATP 釋放大約 15% 且需要較高濃度的泮托拉唑(>1 mM)來減少 50% 的 ATP 轉運。亦在 MTX 之情況下，尚未完全抑制轉運，100 μM 中等劑量抑制了大約 46% ATP 轉運。

靛玉紅-3-肟對雌酮-3-硫酸鹽之 BCRP 介導的轉運之影響。

現已首次藉由使用 BCRP 膜囊泡展示，在生理 pH 下的 BCRP 介導之 1 μM 雌酮-3-硫酸鹽轉運可藉由 5 μM 靛玉紅-3-肟抑制 93% 及藉由 1 μM 靛玉紅-3-肟抑制 81% (圖 31)。此與有效 BCRP 抑制劑 Ko143 之抑制效果類似，其在 1 μM 之濃度下為 93%。因此，靛玉紅-3-肟為 BCRP 之強力抑制劑。

靛玉紅-3-肟對脫氫表雄酮(dehydroepiandrosterone ; DHEAS)之 MRP4 介導之轉運之影響。

現已首次藉由使用 Sf9-MRP4 膜囊泡展示，在生理 pH 下的 MRP4 介導之 0.5 μM 脫氫表雄酮(DHEAS)轉運可藉由 5 μM 靛玉紅-3-肟抑制 34%；其中 1 μM 靛玉紅-3-肟之抑制為可忽略的(<20%) (圖 32)。MRP4 抑制劑 MK-571 抑制了 94% 的 DHEAS 轉運。因此，靛玉紅-3-肟為 MRP4 之適度抑制劑。

藉由 HRP2 分析之抗瘧疾藥及/或草本化合物及/或質子泵抑制劑及/或 ATP 之活體外抗瘧疾活性

藉由使用基於藉由 ELISA 量測之組胺酸豐富蛋白 II (histidine rich protein II ; HRPII) 之標準化瘧疾藥物靈敏度分析(77)，吾等確定抗瘧疾藥劑青蒿素(圖 11)、雙氫青蒿素(圖 14)及氯奎(圖 15)或諸如丹參酮(tanshinone) IIA (圖 23B)、靛玉紅-3-肟(indirubin-3-oxime) (圖 24B)、鎂酚酸(Mg lithospermate) B (圖 27A)、益母草鹼(leonurine) (圖 29A)、

丹酚酸(salvianolic acid) B (圖中未示)、丹參素(danshensu) (圖中未示)之草本化合物針對惡性瘧原蟲之抗寄生物藥效果。此外，吾等測試與質子泵抑制劑泮托拉唑(圖12、圖14、圖16、圖20、圖22、圖26、圖27B、圖29B、圖30)及/或ATP (圖13、圖14、圖17、圖18、圖21)之組合是否為協同的。此外，吾等測試草本化合物及/或泮托拉唑及/或ATP與青蒿素(圖11至圖14；圖23、圖24、圖26)、雙氫青蒿素(圖19至圖22)或氯奎(圖15至圖18；圖25)之組合之活體外抗瘧疾活性。藉由青蒿素與丹參酮IIA (圖23)、青蒿素與靛玉紅-3-脲(圖24)、氯奎與靛玉紅-3-脲(圖25)、青蒿素與靛玉紅-3-脲在50 μ M泮托拉唑存在下(圖26)之等輻射分析針對純系3D7評估抗瘧疾藥物組合。靛玉紅-3-脲與丹參酮IIA均展示了在與青蒿素組合且具有或不具有泮托拉唑時之協同活性的增加。靛玉紅-3-脲與氯奎之組合為加成的。

參考文獻

1. Burnstock, G. 2006. Purinergic signalling. *Br. J. Pharmacol.* 147 Suppl 1: S172-S181.
2. Idzko, M., H. Hammad, M. van Nimwegen, M. Kool, M. A. Willart, F. Muskens, H. C. Hoogsteden, W. Luttmann, D. Ferrari, F. Di Virgilio, J. C. Virchow, Jr., and B. N. Lambrecht. 2007. Extracellular ATP triggers and maintains asthmatic airway inflammation by activating dendritic cells. *Nat. Med.* 13: 913-919.
3. Tannock, I. F., and D. Rotin. 1989. Acid pH in tumors and its potential for therapeutic exploitation. *Cancer Res.* 49: 4373-4384.
4. Martins, I., A. Tesniere, O. Kepp, M. Michaud, F. Schlemmer, L. Senovilla, C. Seror, D. Metivier, J. L. Perfettini, L. Zitvogel, and G. Kroemer. 2009. Chemotherapy induces ATP release from tumor cells. *Cell Cycle* 8: 3723-3728.

5. Duewell, P., H. Kono, K. J. Rayner, C. M. Sirois, G. Vladimer, F. G. Bauernfeind, G. S. Abela, L. Franchi, G. Nunez, M. Schnurr, T. Espevik, E. Lien, K. A. Fitzgerald, K. L. Rock, K. J. Moore, S. D. Wright, V. Hornung, and E. Latz. 2010. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature* 464: 1357-1361.
6. Lohman, A. W., M. Billaud, and B. E. Isakson. 2012. Mechanisms of ATP release and signalling in the blood vessel wall. *Cardiovasc. Res.* 95: 269-280.
7. Tu, J., G. Le, and H. J. Ballard. 2010. Involvement of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in the acidosis-induced efflux of ATP from rat skeletal muscle. *J. Physiol* 588: 4563-4578.
8. Schwiebert, L. M., W. C. Rice, B. A. Kudlow, A. L. Taylor, and E. M. Schwiebert. 2002. Extracellular ATP signaling and P2X nucleotide receptors in monolayers of primary human vascular endothelial cells. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 282: C289-C301.
9. Qu, Y., S. Misaghi, K. Newton, L. L. Gilmour, S. Louie, J. E. Cupp, G. R. Dubyak, D. Hackos, and V. M. Dixit. 2011. Pannexin-1 is required for ATP release during apoptosis but not for inflammasome activation. *J. Immunol.* 186: 6553-6561.
10. Braunstein, G. M., R. M. Roman, J. P. Clancy, B. A. Kudlow, A. L. Taylor, V. G. Shylonsky, B. Jovov, K. Peter, T. Jilling, I. I. Ismailov, D. J. Benos, L. M. Schwiebert, J. G. Fitz, and E. M. Schwiebert. 2001. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator facilitates ATP release by stimulating a separate ATP release channel for

autocrine control of cell volume regulation. *J. Biol. Chem.* 276: 6621-6630.

11. Reddy, M. M., P. M. Quinton, C. Haws, J. J. Wine, R. Grygorczyk, J. A. Tabcharani, J. W. Hanrahan, K. L. Gunderson, and R. R. Kopito. 1996. Failure of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to conduct ATP. *Science* 271: 1876-1879.

12. Li, C., M. Ramjeesingh, and C. E. Bear. 1996. Purified cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) does not function as an ATP channel. *J. Biol. Chem.* 271: 11623-11626.

13. Abraham, E. H., B. Shrivastav, A. Y. Salikhova, K. M. Sterling, N. Johnston, G. Guidotti, S. Scala, T. Litman, K. C. Chan, R. J. Arceci, K. Steiglit, L. Herscher, and P. Okunieff. 2001. Cellular and biophysical evidence for interactions between adenosine triphosphate and P-glycoprotein substrates: functional implications for adenosine triphosphate/drug cotransport in P-glycoprotein overexpressing tumor cells and in P-glycoprotein low-level expressing erythrocytes. *Blood Cells Mol. Dis.* 27: 181-200.

14. Osawa, R., K. L. Williams, and N. Singh. 2011. The inflammasome regulatory pathway and infections: role in pathophysiology and clinical implications. *J. Infect.* 62: 119-129.

15. Ghiringhelli, F., L. Apetoh, A. Tesniere, L. Aymeric, Y. Ma, C. Ortiz, K. Vermaelen, T. Panaretakis, G. Mignot, E. Ullrich, J. L. Perfettini, F. Schlemmer, E. Tasdemir, M. Uhl, P. Genin, A. Civas, B. Ryffel, J. Kanellopoulos, J. Tschopp, F. Andre, R. Lidereau, N. M. McLaughlin, N. M. Haynes, M. J. Smyth, G. Kroemer, and L. Zitvogel. 2009. Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces

IL-1beta-dependent adaptive immunity against tumors. *Nat. Med.* 15: 1170-1178.

16. Trabanelli, S., D. Ocadlikova, S. Gulinelli, A. Curti, V. Salvestrini, R. P. Vieira, M. Idzko, V. F. Di, D. Ferrari, and R. M. Lemoli. 2012. Extracellular ATP exerts opposite effects on activated and regulatory CD4⁺ T cells via purinergic P2 receptor activation. *J. Immunol.* 189: 1303-1310.

17. Spies, C. M., R. H. Straub, and F. Buttgerit. 2012. Energy metabolism and rheumatic diseases: from cell to organism. *Arthritis Res. Ther.* 14: 216.

18. Ramakers, B. P., N. P. Riksen, J. G. van der Hoeven, P. Smits, and P. Pickkers. 2011. Modulation of innate immunity by adenosine receptor stimulation. *Shock* 36: 208-215.

19. Wilhelm, K., J. Ganesan, T. Muller, C. Durr, M. Grimm, A. Beilhack, C. D. Krempf, S. Sorichter, U. V. Gerlach, E. Juttner, A. Zerweck, F. Gartner, P. Pellegatti, V. F. Di, D. Ferrari, N. Kambham, P. Fisch, J. Finke, M. Idzko, and R. Zeiser. 2010. Graft-versus-host disease is enhanced by extracellular ATP activating P2X7R. *Nat. Med.* 16: 1434-1438.

20. Cao, X., L. P. Li, Q. Wang, Q. Wu, H. H. Hu, M. Zhang, Y. Y. Fang, J. Zhang, S. J. Li, W. C. Xiong, H. C. Yan, Y. B. Gao, J. H. Liu, X. W. Li, L. R. Sun, Y. N. Zeng, X. H. Zhu, and T. M. Gao. 2013. Astrocyte-derived ATP modulates depressive-like behaviors. *Nat. Med.* 19: 773-777.

21. Akkaya, C., E. Shumilina, D. Bobballa, V. B. Brand, H. Mahmud, F. Lang, and S. M. Huber. 2009. The *Plasmodium falciparum*-

induced anion channel of human erythrocytes is an ATP-release pathway. *Pflugers Arch.* 457: 1035-1047.

22. Guinea, R., and L. Carrasco. 1995. Requirement for vacuolar proton-ATPase activity during entry of influenza virus into cells. *J Virol* 69.

23. van Aubel, R. A., P. H. Smeets, J. J. van den Heuvel, and F. G. Russel. 2005. Human organic anion transporter MRP4 (ABCC4) is an efflux pump for the purine end metabolite urate with multiple allosteric substrate binding sites. *Am. J. Physiol Renal Physiol* 288: F327-F333.

24. Breedveld, P., D. Pluim, G. Cipriani, F. Dahlhaus, M. A. van Eijndhoven, C. J. de Wolf, A. Kuil, J. H. Beijnen, G. L. Scheffer, G. Jansen, P. Borst, and J. H. Schellens. 2007. The effect of low pH on breast cancer resistance protein (ABCG2)-mediated transport of methotrexate, 7-hydroxymethotrexate, methotrexate diglutamate, folic acid, mitoxantrone, topotecan, and resveratrol in in vitro drug transport models. *Mol. Pharmacol.* 71: 240-249.

25. de Wolf, C., R. Jansen, H. Yamaguchi, H. M. de, W. K. van de, J. Wijnholds, J. Beijnen, and P. Borst. 2008. Contribution of the drug transporter ABCG2 (breast cancer resistance protein) to resistance against anticancer nucleosides. *Mol. Cancer Ther.* 7: 3092-3102.

26. Schwiebert, E. M., M. E. Egan, and W. B. Guggino. 1998. Assays of dynamics, mechanisms, and regulation of ATP transport and release: implications for study of ABC transporter function. *Methods Enzymol.* 292: 664-675.

27. Manfredi, G., L. Yang, C. D. Gajewski, and M. Mattiazzi. 2002. Measurements of ATP in mammalian cells. *Methods* 26: 317-326.

28. Higashi, T., A. Isomoto, I. Tyuma, E. Kakishita, M. Uomoto, and K. Nagai. 1985. Quantitative and continuous analysis of ATP release from blood platelets with firefly luciferase luminescence. *Thromb. Haemost.* 53: 65-69.
29. Ozvegy, C., T. Litman, G. Szakacs, Z. Nagy, S. Bates, A. Varadi, and B. Sarkadi. 2001. Functional characterization of the human multidrug transporter, ABCG2, expressed in insect cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 285: 111-117.
30. Breedveld, P., N. Zelcer, D. Pluim, O. Sonmezer, M. M. Tibben, J. H. Beijnen, A. H. Schinkel, O. van Tellingen, P. Borst, and J. H. M. Schellens. 2004. Mechanism of the Pharmacokinetic Interaction between Methotrexate and Benzimidazoles: Potential Role for Breast Cancer Resistance Protein in Clinical Drug-Drug Interactions. *Cancer Res* 64: 5804-5811.
31. Cantrill, C. A., R. A. Skinner, N. J. Rothwell, and J. I. Penny. 2012. An immortalised astrocyte cell line maintains the in vivo phenotype of a primary porcine in vitro blood-brain barrier model. *Brain Res.* 1479: 17-30.
32. Szakacs, G., J. K. Paterson, J. A. Ludwig, C. Booth-Genthe, and M. M. Gottesman. 2006. Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5: 219-234.
33. Maliepaard, M., G. L. Scheffer, I. F. Faneyte, M. A. van Gastelen, A. C. Pijnenborg, A. H. Schinkel, M. J. van de Vijver, R. J. Scheper, and J. H. Schellens. 2001. Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues. *Cancer Res.* 61: 3458-3464.

34. Aronica, E., J. A. Gorter, S. Redeker, E. A. van Vliet, M. Ramkema, G. L. Scheffer, R. J. Scheper, d. van, V, S. Leenstra, J. C. Baayen, W. G. Spliet, and D. Troost. 2005. Localization of breast cancer resistance protein (BCRP) in microvessel endothelium of human control and epileptic brain. *Epilepsia* 46: 849-857.

35. Zhou, S., J. D. Schuetz, K. D. Bunting, A. M. Colapietro, J. Sampath, J. J. Morris, I. Lagutina, G. C. Grosveld, M. Osawa, H. Nakauchi, and B. P. Sorrentino. 2001. The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat. Med.* 7: 1028-1034.

36. van de Ven., J. J. Lindenberg, A. W. Reurs, R. J. Scheper, G. L. Scheffer, and T. D. de Gruijl. 2012. Preferential Langerhans cell differentiation from CD34(+) precursors upon introduction of ABCG2 (BCRP). *Immunol. Cell Biol.* 90: 206-215.

37. Szatmari, I., G. Vamosi, P. Brazda, B. L. Balint, S. Benko, L. Szeles, V. Jeney, C. Ozveggy-Laczka, A. Szanto, E. Barta, J. Balla, B. Sarkadi, and L. Nagy. 2006. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-regulated ABCG2 expression confers cytoprotection to human dendritic cells. *J. Biol. Chem.* 281: 23812-23823.

38. Sukowati, C. H., N. Rosso, D. Pascut, B. Anfuso, G. Torre, P. Francalanci, L. S. Croce, and C. Tiribelli. 2012. Gene and functional up-regulation of the BCRP/ABCG2 transporter in hepatocellular carcinoma. *BMC. Gastroenterol.* 12: 160.

39. Huang, L., Q. Lu, Y. Han, Z. Li, Z. Zhang, and X. Li. 2012. ABCG2/V-ATPase was associated with the drug resistance and tumor

metastasis of esophageal squamous cancer cells. *Diagn. Pathol.* 7: 180.

40. Jin, Y., Z. Q. Bin, H. Qiang, C. Liang, C. Hua, D. Jun, W. A. Dong, and L. Qing. 2009. ABCG2 is related with the grade of glioma and resistance to mitoxantone, a chemotherapeutic drug for glioma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 135: 1369-1376.

41. Kooij, G., R. Backer, J. J. Koning, A. Reijerkerk, H. J. van, S. M. van der Pol, J. Drexhage, A. Schinkel, C. D. Dijkstra, J. M. den Haan, T. B. Geijtenbeek, and H. E. de Vries. 2009. P-glycoprotein acts as an immunomodulator during neuroinflammation. *PLoS. ONE.* 4: e8212.

42. De Mito. A., R. Canese, M. L. Marino, M. Borghi, M. Iero, A. Villa, G. Venturi, F. Lozupone, E. Iessi, M. Logozzi, M. P. Della, M. Santinami, M. Rodolfo, F. Podo, L. Rivoltini, and S. Fais. 2010. pH-dependent antitumor activity of proton pump inhibitors against human melanoma is mediated by inhibition of tumor acidity. *Int. J. Cancer* 127: 207-219.

43. Liu, H. T., A. H. Toychiev, N. Takahashi, R. Z. Sabirov, and Y. Okada. 2008. Maxi-anion channel as a candidate pathway for osmosensitive ATP release from mouse astrocytes in primary culture. *Cell Res.* 18: 558-565.

44. Bhatia, P., M. Bernier, M. Sanghvi, R. Moaddel, R. Schwarting, A. Ramamoorthy, and I. W. Wainer. 2012. Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) localises to the nucleus in glioblastoma multiforme cells. *Xenobiotica* 42: 748-755.

45. Dallas, S., D. S. Miller, and R. Bendayan. 2006. Multidrug resistance-associated proteins: expression and function in the central

nervous system. *Pharmacol. Rev.* 58: 140-161.

46. Calatozzolo, C., M. Gelati, E. Ciusani, F. L. Sciacca, B. Pollo, L. Cajola, C. Marras, A. Silvani, L. Vitellaro-Zuccarello, D. Croci, A. Boiardi, and A. Salmaggi. 2005. Expression of drug resistance proteins Pgp, MRP1, MRP3, MRP5 and GST-pi in human glioma. *J. Neurooncol.* 74: 113-121.

47. Calcinotto, A., P. Filipazzi, M. Grioni, M. Iero, M. A. De, A. Ricupito, A. Cova, R. Canese, E. Jachetti, M. Rossetti, V. Huber, G. Parmiani, L. Generoso, M. Santinami, M. Borghi, S. Fais, M. Bellone, and L. Rivoltini. 2012. Modulation of microenvironment acidity reverses anergy in human and murine tumor-infiltrating T lymphocytes. *Cancer Res.* 72: 2746-2756.

48. Ross, D. D., J. E. Karp, T. T. Chen, and L. A. Doyle. 2000. Expression of breast cancer resistance protein in blast cells from patients with acute leukemia. *Blood* 96: 365-368.

49. Krishnamurthy, P., D. D. Ross, T. Nakanishi, K. Bailey-Dell, S. Zhou, K. E. Mercer, B. Sarkadi, B. P. Sorrentino, and J. D. Schuetz. 2004. The stem cell marker Bcrp/ABCG2 enhances hypoxic cell survival through interactions with heme. *J. Biol. Chem.* 279: 24218-24225.

50. Ahmed, F., N. Arseni, H. Glimm, W. Hiddemann, C. Buske, and M. Feuring-Buske. 2008. Constitutive expression of the ATP-binding cassette transporter ABCG2 enhances the growth potential of early human hematopoietic progenitors. *Stem Cells* 26: 810-818.

51. Luciani, F., M. Spada, A. De Mito, A. Molinari, L. Rivoltini, A. Montinaro, M. Marra, L. Lugini, M. Logozzi, F. Lozupone, C. Federici, E. Iessi, G. Parmiani, G. Arancia, F. Belardelli, and S. Fais.

2004. Effect of Proton Pump Inhibitor Pretreatment on Resistance of Solid Tumors to Cytotoxic Drugs. *J Natl Cancer Inst* 96: 1702-1713.

52. Hjelmeland, A. B., Q. Wu, J. M. Heddleston, G. S. Choudhary, J. MacSwords, J. D. Lathia, R. McLendon, D. Lindner, A. Sloan, and J. N. Rich. 2011. Acidic stress promotes a glioma stem cell phenotype. *Cell Death. Differ.* 18: 829-840.

53. Aarntzen, E. H., I. J. de Vries, W. J. Lesterhuis, D. Schuurhuis, J. F. Jacobs, K. Bol, G. Schreibelt, R. Mus, J. H. De Wilt, J. B. Haanen, D. Schadendorf, A. Croockewit, W. A. Blokx, M. M. Van Rossum, W. W. Kwok, G. J. Adema, C. J. Punt, and C. G. Figdor. 2013. Targeting CD4(+) T-helper cells improves the induction of antitumor responses in dendritic cell-based vaccination. *Cancer Res.* 73: 19-29.

54. Razis, E., P. Selviaridis, S. Labropoulos, J. L. Norris, M. J. Zhu, D. D. Song, T. Kalebic, M. Torrens, A. Kalogera-Fountzila, G. Karkavelas, S. Karanastasi, J. A. Fletcher, and G. Fountzilas. 2009. Phase II study of neoadjuvant imatinib in glioblastoma: evaluation of clinical and molecular effects of the treatment. *Clin. Cancer Res.* 15: 6258-6266.

55. Fritzell, S., E. Sanden, S. Eberstal, E. Visse, A. Darabi, and P. Siesjo. 2013. Intratumoral temozolomide synergizes with immunotherapy in a T cell-dependent fashion. *Cancer Immunol. Immunother.*

56. Milano, F., and K. K. Krishnadath. 2008. Novel therapeutic strategies for treating esophageal adenocarcinoma: the potential of dendritic cell immunotherapy and combinatorial regimens. *Hum. Immunol.* 69: 614-624.

57. Gupta, R. K. 1998. Aluminum compounds as vaccine

adjuvants. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 32: 155-172.

58. Li, H., S. Nookala, and F. Re. 2007. Aluminum hydroxide adjuvants activate caspase-1 and induce IL-1 β and IL-18 release. *J. Immunol.* 178: 5271-5276.

59. Marchesini, N., M. Vieira, S. Luo, S. N. Moreno, and R. Docampo. 2005. A malaria parasite-encoded vacuolar H(+)-ATPase is targeted to the host erythrocyte. *J. Biol. Chem.* 280: 36841-36847.

60. van de Hoef, D. L., I. Coppens, T. Holowka, M. C. Ben, O. Branch, and A. Rodriguez. 2013. Plasmodium falciparum-derived uric acid precipitates induce maturation of dendritic cells. *PLoS. ONE.* 8: e55584.

61. Rey-Ladino, J., A. G. Ross, A. W. Cripps, D. P. McManus, and R. Quinn. 2011. Natural products and the search for novel vaccine adjuvants. *Vaccine* 29: 6464-6471.

62. Rivera, E., S. Hu, and C. Concha. 2003. Ginseng and aluminium hydroxide act synergistically as vaccine adjuvants. *Vaccine* 21: 1149-1157.

63. Eichhorn, T., and T. Efferth. 2012. P-glycoprotein and its inhibition in tumors by phytochemicals derived from Chinese herbs. *J. Ethnopharmacol.* 141: 557-570.

64. Yu, X. Y., S. G. Lin, Z. W. Zhou, X. Chen, J. Liang, P. Q. Liu, W. Duan, B. Chowbay, J. Y. Wen, C. G. Li, and S. F. Zhou. 2007. Role of P-Glycoprotein in the intestinal absorption of tanshinone IIA, a major active ingredient in the root of *Salvia miltiorrhiza* Bunge. *Current Drug Metabolism* 8: 325-340.

65. Morris, M. E., and S. Zhang. 2006. Flavonoid-drug

interactions: effects of flavonoids on ABC transporters. *Life Sci.* 78: 2116-2130.

66. Jin, J., S. Shahi, H. K. Kang, H. W. van Veen, and T. P. Fan. 2006. Metabolites of ginsenosides as novel BCRP inhibitors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 345: 1308-1314.

67. ten Brinke A., M. L. Karsten, M. C. Dieker, J. J. Zwaginga, and S. M. van Ham. 2007. The clinical grade maturation cocktail monophosphoryl lipid A plus IFNgamma generates monocyte-derived dendritic cells with the capacity to migrate and induce Th1 polarization. *Vaccine* 25: 7145-7152.

68. Jonuleit, H., U. Kuhn, G. Muller, K. Steinbrink, L. Paragnik, E. Schmitt, J. Knop, and A. H. Enk. 1997. Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *Eur. J. Immunol.* 27: 3135-3142.

69. Dauer, M., B. Obermaier, J. Hertel, C. Haerle, K. Pohl, S. Rothenfusser, M. Schnurr, S. Endres, and A. Eigler. 2003. Mature dendritic cells derived from human monocytes within 48 hours: a novel strategy for dendritic cell differentiation from blood precursors. *J. Immunol.* 170: 4069-4076.

70. de Vries, N. A., S. W. Bruggeman, D. Hulsman, H. I. de Vries, J. Zevenhoven, T. Buckle, B. C. Hamans, W. P. Leenders, J. H. Beijnen, L. M. van, A. J. Berns, and T. O. van. 2010. Rapid and robust transgenic high-grade glioma mouse models for therapy intervention studies. *Clin. Cancer Res.* 16: 3431-3441.

71. Essien, E. M., and A. G. White. 1998. Elevated plasma

adenosine triphosphate (ATP) concentration in human acute malaria infection. *Thromb. Haemost.* 80: 867-868.

72. Zelcer, N., G. Reid, P. Wielinga, A. Kuil, d. H. van, I, J. D. Schuetz, and P. Borst. 2003. Steroid and bile acid conjugates are substrates of human multidrug-resistance protein (MRP) 4 (ATP-binding cassette C4). *Biochem. J.* 371: 361-367.

73. Grube, M., S. Reuther, S. H. Meyer zu, K. Kock, K. Draber, C. A. Ritter, C. Fusch, G. Jedlitschky, and H. K. Kroemer. 2007. Organic anion transporting polypeptide 2B1 and breast cancer resistance protein interact in the transepithelial transport of steroid sulfates in human placenta. *Drug Metab Dispos.* 35: 30-35.

74. Zhou, S., Y. Zong, P. A. Ney, G. Nair, C. F. Stewart, and B. P. Sorrentino. 2005. Increased expression of the Abcg2 transporter during erythroid maturation plays a role in decreasing cellular protoporphyrin IX levels. *Blood* 105: 2571-2576.

75. Ronaldson, P. T., Y. Persidsky, and R. Bendayan. 2008. Regulation of ABC membrane transporters in glial cells: relevance to the pharmacotherapy of brain HIV-1 infection. *Glia* 56: 1711-1735.

76. Vono, M., M. Taccone, P. Caccin, M. Gallotta, G. Donvito, S. Falzoni, E. Palmieri, M. Pallaoro, R. Rappuoli, V. F. Di, G. E. De, C. Montecucco, and A. Seubert. 2013. The adjuvant MF59 induces ATP release from muscle that potentiates response to vaccination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 110: 21095-21100.

77. Noedl, H., W. H. Wernsdorfer, R. S. Miller, and C. Wongsrichanalai. 2002. Histidine-rich protein II: a novel approach to malaria drug sensitivity testing. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46:

1658-1664.

78. Ose, A., M. Ito, H. Kusuhara, K. Yamatsugu, M. Kanai, M. Shibasaki, M. Hosokawa, J. D. Schuetz, and Y. Sugiyama. 2009. Limited brain distribution of [3R,4R,5S]-4-acetamido-5-amino-3-(1-ethylpropoxy)-1-cyclohexene-1-carboxylate phosphate (Ro 64-0802), a pharmacologically active form of oseltamivir, by active efflux across the blood-brain barrier mediated by organic anion transporter 3 (Oat3/Slc22a8) and multidrug resistance-associated protein 4 (Mrp4/Abcc4). *Drug Metab Dispos.* 37: 315-321.

79. Jansen, R. S., S. Duijst, S. Mahakena, D. Sommer, F. Szeri, A. Varadi, A. Plomp, A. A. Bergen, R. P. Elferink, P. Borst, and K. van de Wetering. 2014. ATP-Binding Cassette Subfamily C Member 6-Mediated ATP Secretion by the Liver Is the Main Source of the Mineralization Inhibitor Inorganic Pyrophosphate in the Systemic Circulation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*

【符號說明】

無

申請專利範圍

1. 一種選自由以下組成之群之化合物組合

A) (i)抗瘧疾藥劑，其視情況能夠藉由抑制三磷酸腺苷結合匣轉運子(ABC轉運子)乳癌抗藥性蛋白(BCRP；ABCG2)介導之ATP轉運來調節細胞釋放三磷酸腺苷(ATP)；及

(ii)空泡ATP酶(v-ATP酶)抑制劑，及視情況存在之

(iii) ATP；

B) (i)抗瘧疾藥劑，其視情況能夠藉由抑制三磷酸腺苷結合匣轉運子(ABC轉運子)乳癌抗藥性蛋白(BCRP；ABCG2)介導之ATP轉運來調節細胞釋放三磷酸腺苷(ATP)；及

(ii)能夠藉由抑制該三磷酸腺苷結合匣轉運子(ABC轉運子)乳癌抗藥性蛋白(BCRP；ABCG2)介導之ATP轉運來調節細胞釋放三磷酸腺苷(ATP)的化合物，及選自丹參酮(tanshinone)之群的化合物；及視情況存在之

(iii)空泡ATP酶(v-ATP酶)抑制劑，及視情況存在之

(iv) ATP；

C) (i)抗瘧疾藥劑，其視情況能夠藉由抑制該三磷酸腺苷結合匣轉運子(ABC轉運子)乳癌抗藥性蛋白(BCRP；ABCG2)介導之ATP轉運來調節細胞釋放三磷酸腺苷(ATP)；及

(ii)靛紅(indirubin)或其衍生物，及視情況存在之

(iii)空泡ATP酶(v-ATP酶)抑制劑，及視情況存在之

(iv) ATP；

D) (i)抗瘧疾藥劑，其視情況能夠藉由抑制該三磷酸腺苷結合匣轉運子(ABC轉運子)乳癌抗藥性蛋白(BCRP；ABCG2)介導之ATP轉運來調節細胞釋放三磷酸腺苷(ATP)；及

(ii) ATP；

E) (i)樹突狀細胞或樹突狀細胞疫苗，及

(ii)能夠藉由抑制該三磷酸腺苷結合匣轉運子(ABC轉運子)乳癌抗藥性蛋白(BCRP；ABCG2)介導之ATP轉運來調節細胞釋放三磷酸腺苷(ATP)的化合物；及

F) (i)樹突狀細胞或樹突狀細胞疫苗，及

(ii)空泡ATP酶(v-ATP酶)抑制劑；及

G) (i)樹突狀細胞或樹突狀細胞疫苗，

(ii)空泡ATP酶(v-ATP酶)抑制劑，及

(iii)能夠藉由抑制該三磷酸腺苷結合匣轉運子(ABC轉運子)乳癌抗藥性蛋白(BCRP；ABCG2)介導之ATP轉運來調節細胞釋放三磷酸腺苷(ATP)的化合物，

該組合係用於治療瘧疾，

限制條件為在上述所有子項中，(i)、(ii)及若存在之(iii)之該等化合物分別不同。

2. 如請求項1之用於治療瘧疾之化合物組合，其中該抗瘧疾藥劑為青蒿素(artemisinin)或其衍生物，或氯喹(chloroquine)，及/或其中能夠藉由抑制該三磷酸腺苷結合匣轉運子(ABC轉運子)乳癌抗藥性蛋白(BCRP；ABCG2)介導之ATP轉運來調節細胞釋放三磷酸腺苷(ATP)的該(等)化合物為草本化合物，較佳為選自由以下組成之群的一或多種草本化合物：丹參酚酸(salvianolic acid)；

迷迭香酸(rosmarinic acid)或衍生物；

紫草酸(lithospermic acid)；

原兒茶酸(protocatechuic acid)；

丹參酮；

生物鹼，及



三萜(triterpene)；

更佳地，該一或多種草本化合物係選自由以下組成之群：丹參酚酸B、紫草酸鎂B及靛紅或其衍生物靛紅-3-肟，及選自丹參酮之群的化合物。

3. 如請求項1之用於治療瘧疾的化合物組合，其中該等化合物為

(i)抗瘧疾藥劑青蒿素或其衍生物，其中該等衍生物係選自由以下組成之群：蒿甲醚(artemether)、青蒿琥酯(artesunate)、阿替夫林(arteflene)、阿替莫特(artemotil)、二氫青蒿素(dihydroartemisinin)及蒿乙醚(arteether)，及

(ii)草本化合物靛紅或其衍生物，其中該等衍生物係選自由吡啶生物鹼及靛紅-3-肟組成之群，及視情況存在之

(iii)質子泵抑制劑，及視情況存在之

(iv) ATP。

4. 如請求項1至3中任一項之化合物組合，其用於治療發生於組織中之癌症，相較於健康組織，ATP轉運受該(等)化合物抑制或刺激的對應ABC轉運子調節劑在發生癌症之組織中被表現，較佳過度表現。

5. 如請求項4之化合物組合，其用於治療腦腫瘤及/或腦轉移，較佳為神經膠質瘤，更佳為高度惡性多形性膠質母細胞瘤。

6. 如請求項1至3中任一項之化合物組合，其用於抗病毒治療。

7. 一種選自由以下組成之群之化合物組合

a) (i)一或多種抗癌藥物，及

(ii)空泡ATP酶(v-ATP酶)抑制劑，及視情況存在之

(iii)能夠藉由抑制或刺激三磷酸腺苷結合匣轉運子(ABC轉運子)乳癌抗藥性蛋白(BCRP；ABCG2)介導之ATP轉運來調節細胞釋放三磷酸腺苷(ATP)的化合物；

b) (i)一或多種抗癌藥物，及

(ii)能夠藉由抑制或刺激該三磷酸腺苷結合匣轉運子(ABC轉運子)乳癌抗藥性蛋白(BCRP；ABCG2)介導之ATP轉運來調節細胞釋放三磷酸腺苷(ATP)的化合物；

c) (i)一或多種抗癌藥物；

(ii) ATP；及視情況存在之

(iii)能夠藉由抑制或刺激該三磷酸腺苷結合匣轉運子(ABC轉運子)乳癌抗藥性蛋白(BCRP；ABCG2)介導之ATP轉運來調節細胞釋放三磷酸腺苷(ATP)的化合物；

d) (i)甲胺喋呤(methotrexate)及/或伊馬替尼(imatinib)，及

(ii)能夠藉由抑制或刺激該三磷酸腺苷結合匣轉運子(ABC轉運子)乳癌抗藥性蛋白(BCRP；ABCG2)介導之ATP轉運來調節細胞釋放三磷酸腺苷(ATP)的化合物；及視情況存在之

(iii)空泡ATP酶(v-ATP酶)抑制劑；

e) (i) ATP，及

(ii)能夠藉由抑制或刺激該三磷酸腺苷結合匣轉運子(ABC轉運子)乳癌抗藥性蛋白(BCRP；ABCG2)介導之ATP轉運來調節細胞釋放三磷酸腺苷(ATP)的化合物；或

(ii)空泡ATP酶(v-ATP酶)抑制劑；

f) (i)樹突狀細胞或樹突狀細胞疫苗，及

(ii)能夠藉由抑制或刺激該三磷酸腺苷結合匣轉運子(ABC轉運子)乳癌抗藥性蛋白(BCRP；ABCG2)介導之ATP轉運來調節細胞釋放三磷酸腺苷(ATP)的化合物；及

g) (i)樹突狀細胞或樹突狀細胞疫苗，及

(ii)質子泵抑制劑

該組合係用於治療癌症，

限制條件為在上述所有子項中，(i)、(ii)及若存在之(iii)之該等化合物分別不同。

8. 如請求項7之用於治療癌症的化合物組合，其中

該一或多種抗癌藥物係選自由替莫唑胺(temozolomide)、貝伐珠單抗(bevacizumab)、舒尼替尼(sunitinib)及索拉非尼(sorafenib)組成之群；及/或其中

能夠藉由抑制該三磷酸腺苷結合匣轉運子(ABC轉運子)乳癌抗藥性蛋白(BCRP；ABCG2)介導之ATP轉運來調節細胞釋放三磷酸腺苷(ATP)的該(等)化合物為草本化合物，較佳為選自以下之群的一或多種草本化合物：丹參酚酸；

迷迭香酸或衍生物；

紫草酸；

原兒茶酸；

丹參酮；

生物鹼，及

三萜；

更佳地，該一或多種草本化合物係選自由丹參酚酸B、紫草酸鎂B及靛紅及其衍生物靛紅-3-脲組成之群，及/或

其中該空泡ATP酶(v-ATP酶)抑制劑為質子泵抑制劑，較佳選自普拉唑(prazole)之群，更佳為選自由以下組成之群之普拉唑：奧美拉唑(omeprazole)、蘭索拉唑(lansoprazole)、右蘭索拉唑(dexlansoprazole)、雷貝拉唑(rabeprazole)、艾美拉唑(esomeprazole)及泰妥拉唑(tenatoprazole)，甚至更佳地，該普拉唑為艾美拉唑。

9. 如請求項7或8之化合物組合，其用於治療腦腫瘤及/或腦轉移，較佳為神經膠質瘤，更佳為高度惡性多形性膠質母細胞瘤。

10. 如請求項7e)、f)及/或g)之化合物組合，其用於治療晚期胰管腺癌或高度惡性肝細胞癌。
11. 一種醫藥組合物，包含
 - (a)抗原，
 - (b)能夠藉由刺激三磷酸腺苷結合匣轉運子(ABC轉運子)乳癌抗藥性蛋白(BCRP；ABCG2)介導之ATP轉運來調節細胞釋放三磷酸腺苷(ATP)的化合物，其中該組合物能夠引發針對該抗原(a)的免疫反應。
12. 如請求項16至24中任一項之能夠抑制ATP釋放的化合物，其用於DC成熟。
13. 如請求項12之用於DC成熟的化合物，其中該化合物如請求項22至24中任一項所定義。
14. 一種醫藥組合物，包含
 - (i)抗病毒藥物，其視情況能夠藉由抑制三磷酸腺苷結合匣轉運子(ABC轉運子)乳癌抗藥性蛋白(BCRP；ABCG2)介導之ATP轉運來調節細胞釋放三磷酸腺苷(ATP)，該抗病毒藥物係選自由治療病原性RNA病毒感染的抗病毒藥物組成之群，包括針對流感的M2通道抑制劑金剛烷胺(amantadine)及金剛烷乙胺(rimantadine)，及神經胺糖酸苷酶抑制劑奧司他韋(oseltamivir)及紮那米韋(zanamivir)，及
 - (ii)能夠藉由調節、較佳抑制該三磷酸腺苷結合匣轉運子(ABC轉運子)乳癌抗藥性蛋白(BCRP；ABCG2)介導之ATP轉運來調節細胞釋放三磷酸腺苷(ATP)的化合物，較佳為具有該特性的草本化合物。
15. 一種醫藥組合物，包含
 - (i)抗病毒藥物，其視情況能夠藉由抑制三磷酸腺苷結合匣轉

運子(ABC轉運子)乳癌抗藥性蛋白(BCRP；ABCG2)介導之ATP轉運來調節細胞釋放三磷酸腺苷(ATP)，該抗病毒藥物係選自由治療高病原性RNA病毒感染的抗病毒藥物組成之群，包括針對流感的M2通道抑制劑金剛烷胺及金剛烷乙胺，及神經胺糖酸苷酶抑制劑奧司他韋及紮那米韋，

(ii)質子泵抑制劑，及視情況存在之

(iii)能夠藉由調節、較佳抑制該三磷酸腺苷結合匣轉運子(ABC轉運子)乳癌抗藥性蛋白(BCRP；ABCG2)介導之ATP轉運來調節細胞釋放三磷酸腺苷(ATP)的化合物，較佳為具有該特性的草本化合物。

16. 一種用於鑑定測試化合物的活體外方法，該等測試化合物能夠藉由抑制或刺激三磷酸腺苷結合匣轉運子(ABC轉運子)乳癌抗藥性蛋白(BCRP；ABCG2)介導之ATP轉運來調節細胞釋放三磷酸腺苷(ATP)，該方法包含以下步驟：

- a)提供包含該ABC轉運子的測試系統，其中此測試系統包括至少兩個隔室且其中該ABC轉運子能夠使ATP在該至少兩個隔室之間轉運，

- b)使步驟a)之該測試系統中的至少一個隔室與測試化合物接觸，此接觸的方式及時段應足以使該測試化合物接觸到該ABC轉運子，

其中在該測試化合物已接觸到該等隔室中之至少一者之前、期間或之後，將ATP添加至該測試系統之至少一個隔室中，ATP可自該隔室轉運至其他隔室，

- c)測定ATP轉運至或自其轉運出之該測試系統之至少一個隔室中的ATP量，

- d)將步驟(c)之該(等) ATP測定量與使用該同一測試系統所測定

的ATP量進行比較

- A)在該測試化合物之不同濃度下；
 - B)在該測試化合物不存在下；及/或
 - C)在參考化合物而非該測試化合物存在下；
- 及

e)根據(d)中之該比較情況推斷出該測試化合物是否能夠藉由抑制或刺激該ABC轉運子介導之ATP轉運來調節細胞釋放ATP，

其中添加該測試化合物之至少該隔室之pH值在添加該測試化合物之時間點時為約7或低於7。

17. 如請求項16之方法，其中步驟b)中所添加之ATP為經標記之ATP，較佳為放射性標記之ATP，更佳為 $[^{32}\text{P}] \gamma\text{-ATP}$ 。
18. 如請求項16或17之方法，其中該pH值為約6.8或小於6.8，較佳為約6.5或小於6.5，或處於約7至約4或約6.8至約4之範圍內，或處於約6.5至約4之範圍內，較佳處於約6.5至約5之範圍內。
19. 如請求項16至18中任一項之方法，其中該方法係在缺氧下進行，其中較佳地，該缺氧之特徵為氧氣含量在0至7% O_2 範圍內，較佳在0至5% O_2 範圍內，或較佳在0.5%至5% O_2 範圍內。
20. 如請求項16至19中任一項之方法，其中若ATP轉運至其中之該至少一個隔室中的ATP測定量減少，其中該減少幅度較佳為25%或大於25%，且/或若ATP自其中轉運出之該至少一個隔室中的ATP測定量增加，其中該增加幅度較佳為25%或大於25%，則將該測試化合物歸類為ATP釋放抑制劑，且

其中若ATP轉運至其中之該至少一個隔室中的ATP測定量增加，其中該增加幅度較佳為25%或大於25%，且/或若ATP自其中轉運出之該至少一個隔室中的ATP測定量減少，其中該減少幅度較佳為25%或大於25%，則將該測試化合物歸類為ATP釋放刺激

劑。

21. 如請求項16至20中任一項之方法，其中步驟a)之該測試系統穩定表現、較佳過度表現該(等) ABC轉運子，且/或其中步驟b)係藉由添加該測試化合物至該等隔室中之至少一者中來進行。
22. 如請求項16至21中任一項之方法，其中待測試之物質代表源於植物或源於植物之任何適合部分的草本化合物，該草本化合物較佳代表植物或植物之任何適合部分的萃取物，較佳為乾燥萃取物。
23. 如請求項22之方法，其中該草本化合物獲自(含水)醇萃取物，較佳為70%至100%甲醇或乙醇。
24. 如請求項22或23之方法，其中該草本化合物係選自由以下組成之群：

丹參酚酸，諸如親水性丹參酚酸A、B、C、D、E；較佳為諸如丹參酚酸A或B之丹參酚酸；

紫草酸，較佳為親水性紫草酸，更佳為紫草酸鎂，諸如紫草酸鎂B；

原兒茶酸，較佳為親水性原兒茶酸，諸如迷迭香酸，亦較佳為原兒茶醛；

丹參酮，較佳為雙萜丹參酮，較佳為親脂性雙萜丹參酮，諸如隱丹參酮、丹參酮I、丹參酮IIB、二氫丹參酮；

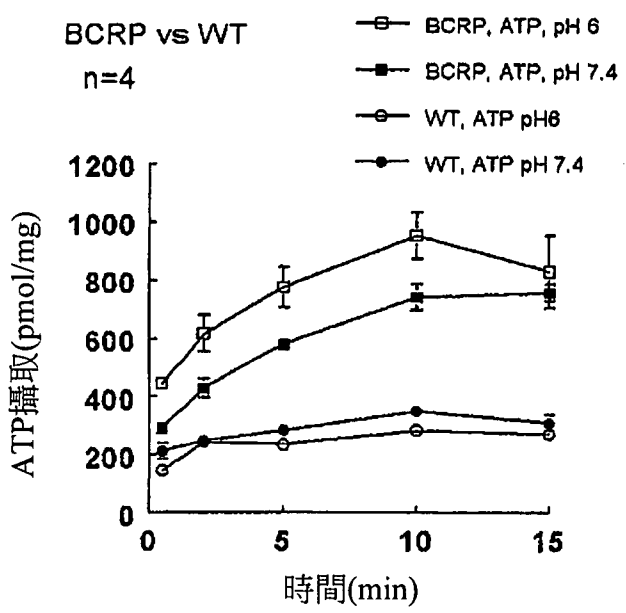
生物鹼，較佳為親水性生物鹼，諸如吲哚生物鹼靛紅及靛紅衍生物，或益母草鹼(leonurine)或水蘇鹼(stachydrine)；及

三萜，較佳為親脂性三萜，較佳為苦木苦味素(quassinoid)；

較佳地，該草本化合物選自由丹參酚酸B、紫草酸鎂B及靛紅及其衍生物靛紅-3-脲組成之群。

圖式

1A)



1B)

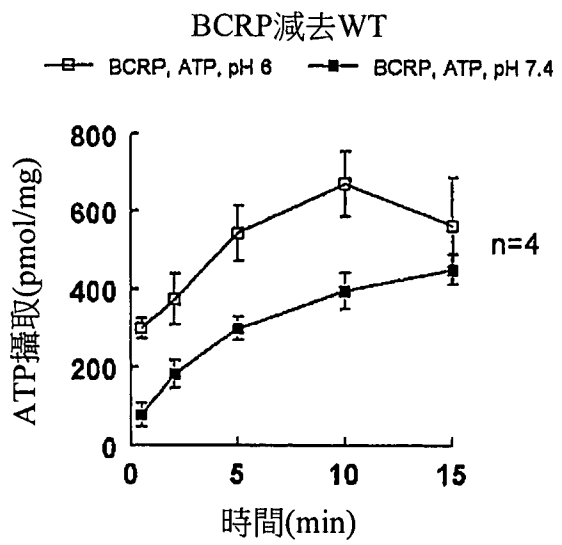
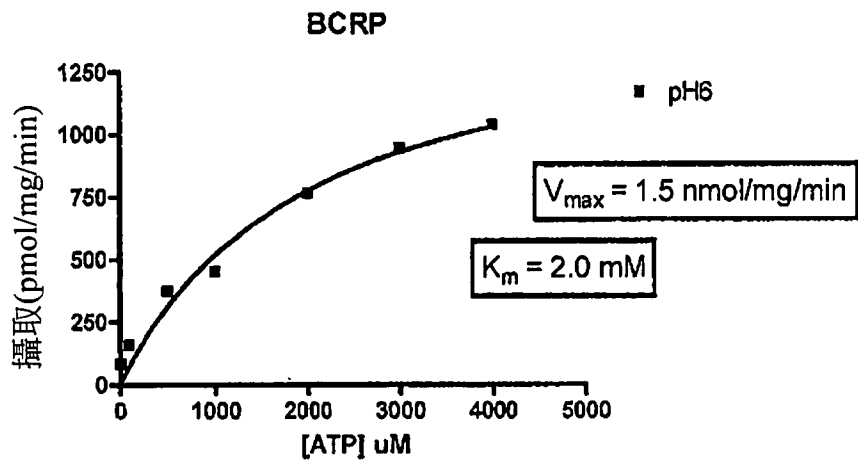


圖 1

2A)



2B)

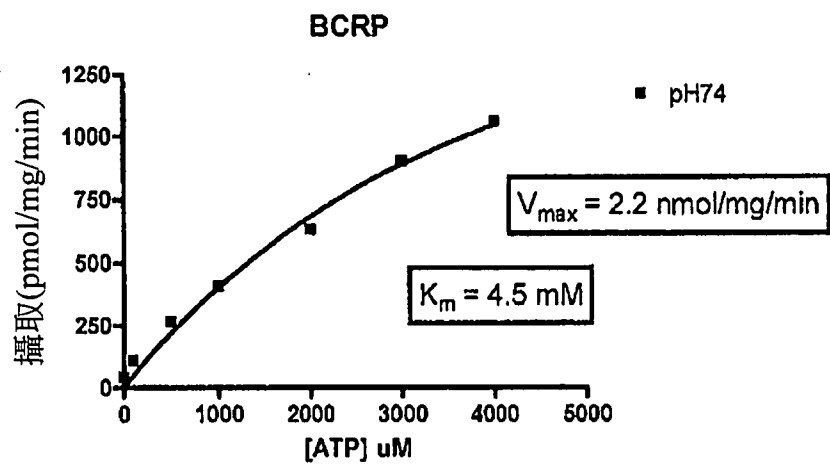


圖2



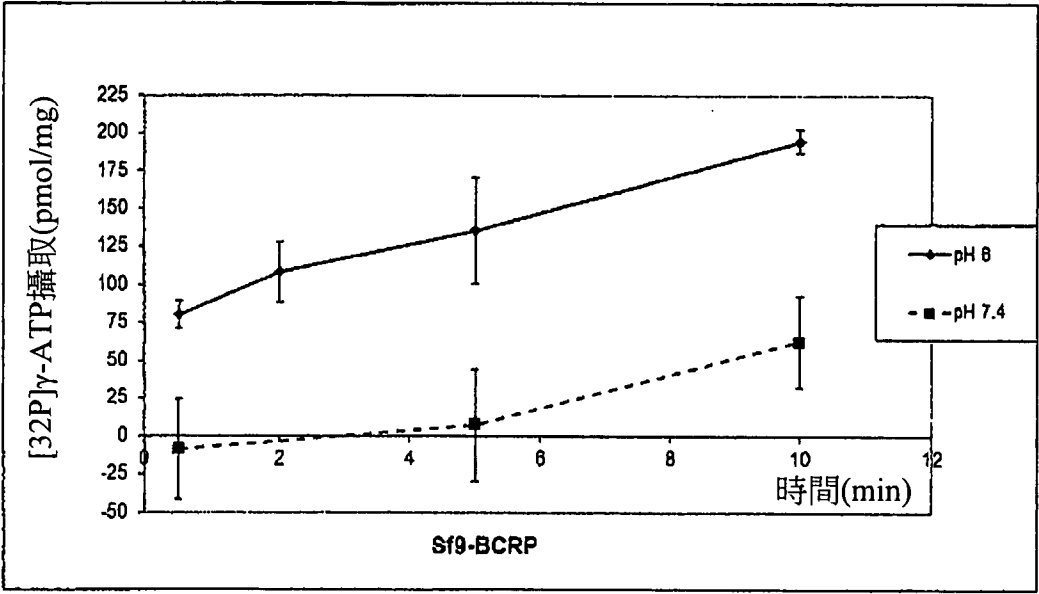
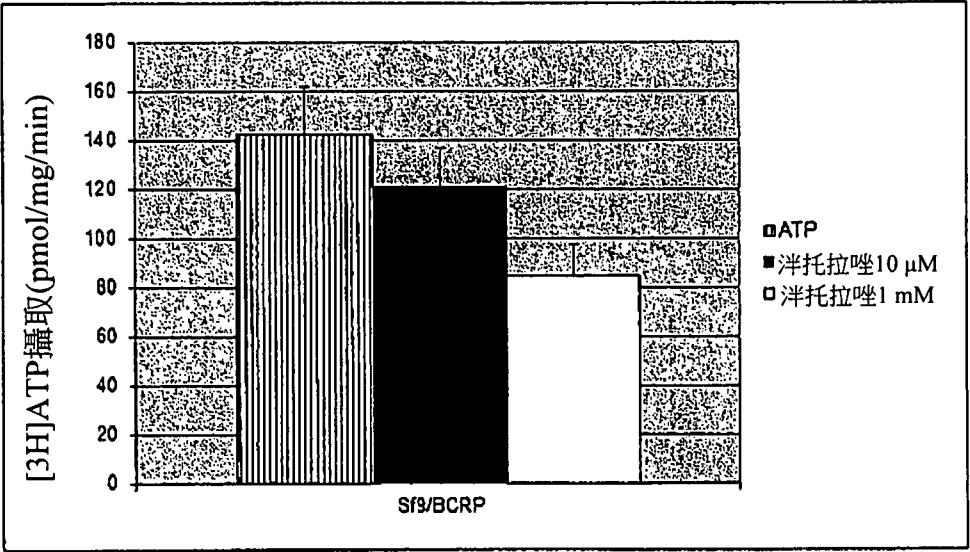


圖3

4A)



4B)

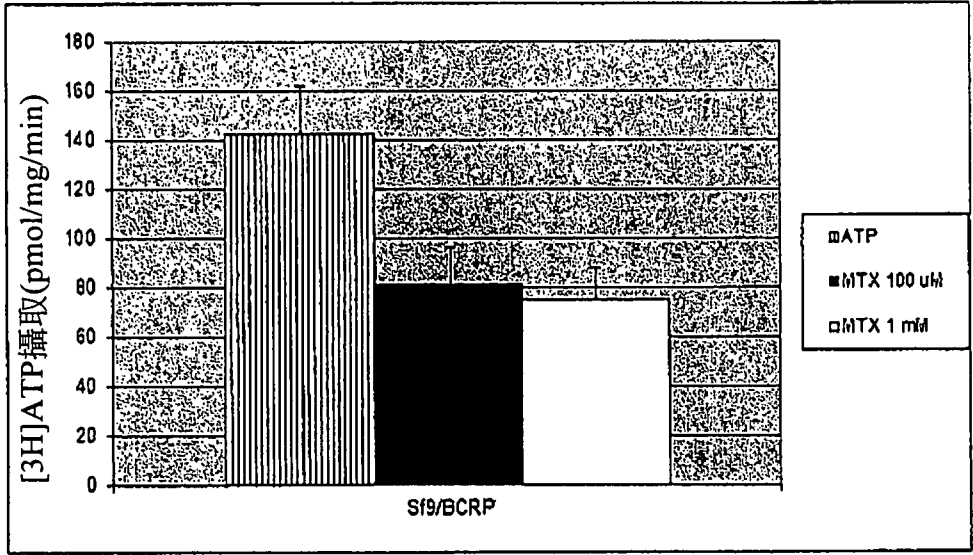


圖4



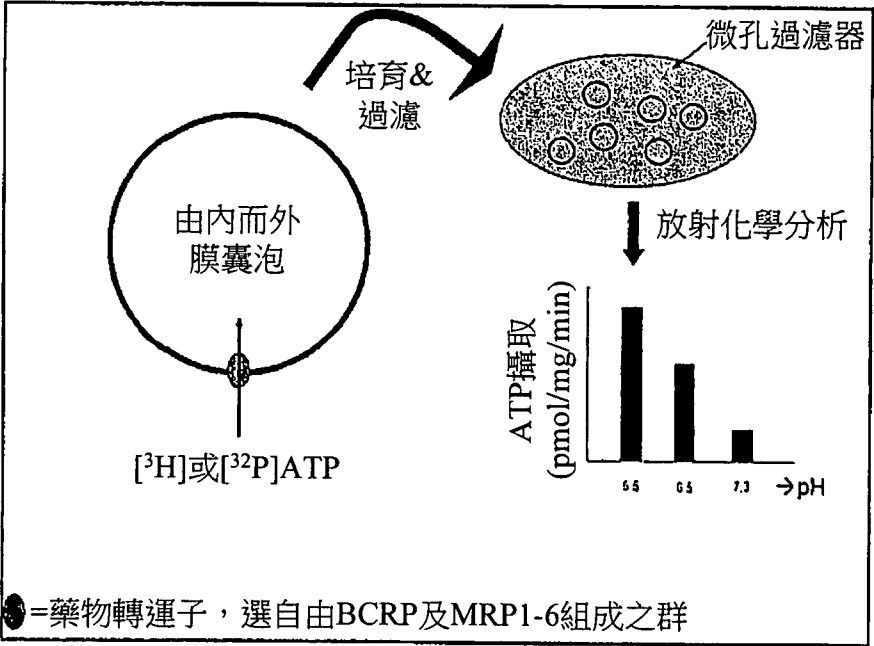


圖5

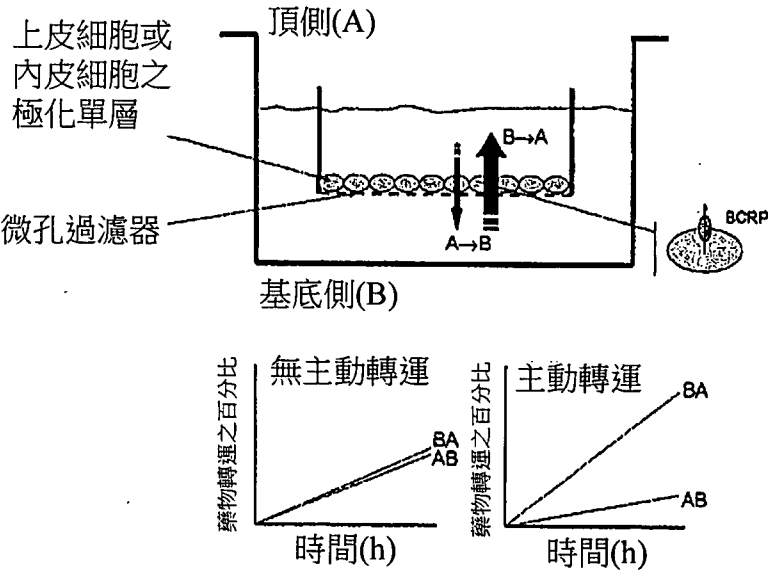


圖6

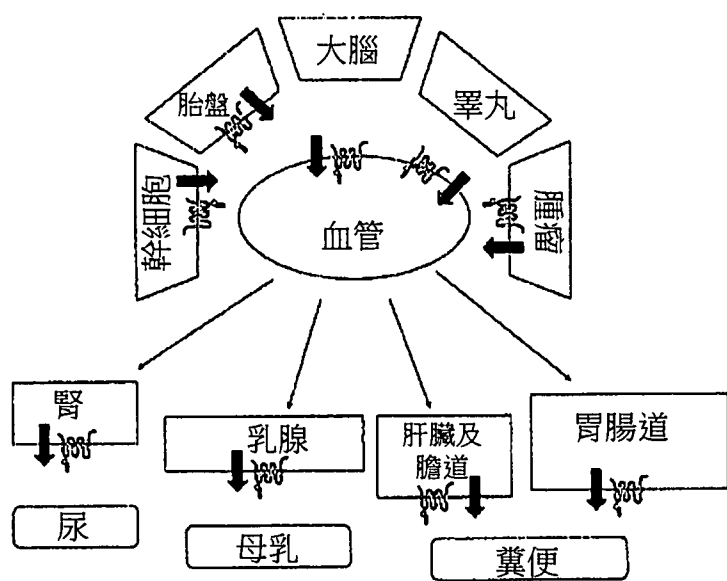


圖7

表1

泵之類型	細胞定位	功能
H ⁺ -ATP酶	細胞質質膜及酸性胞器	細胞外微環境及內溶酶體隔室之酸化
Na ⁺ /H ⁺ -ATP酶	細胞質質膜	細胞溶質之鹼化及細胞外微環境之酸化
MCT1 (H ⁺ /乳酸同向轉運體)	細胞質質膜	消除乳酸作為葡萄糖分解代謝產物及細胞外環境之酸化
碳酸酐酶	細胞質質膜	調節細胞內pH及pH梯度
H ⁺ /K ⁺ -ATP酶	胃壁細胞	調節細胞外pH

圖8

表2

同功異型物	CNS表現				
	WB	BBB	CP	MG	AST
MRP1	H,M,R	H,M,R	H,M,R	R	H,M,R
MRP2	R	H,R	M,R	R	H,R
MRP3	R		M,R	R	R
MRP4	H,M,R	H,M	H,M,R	R	H,R
MRP5	H,M,R	H,M	M,R	R	H,R
MRP6	H,M		M,R	R	H,R

WB，全腦勻漿；BBB，血腦屏障；CP，脈絡叢；MG，微神經膠質細胞；AST，星形膠質細胞；H，人；M，小鼠；R，大鼠。

圖9

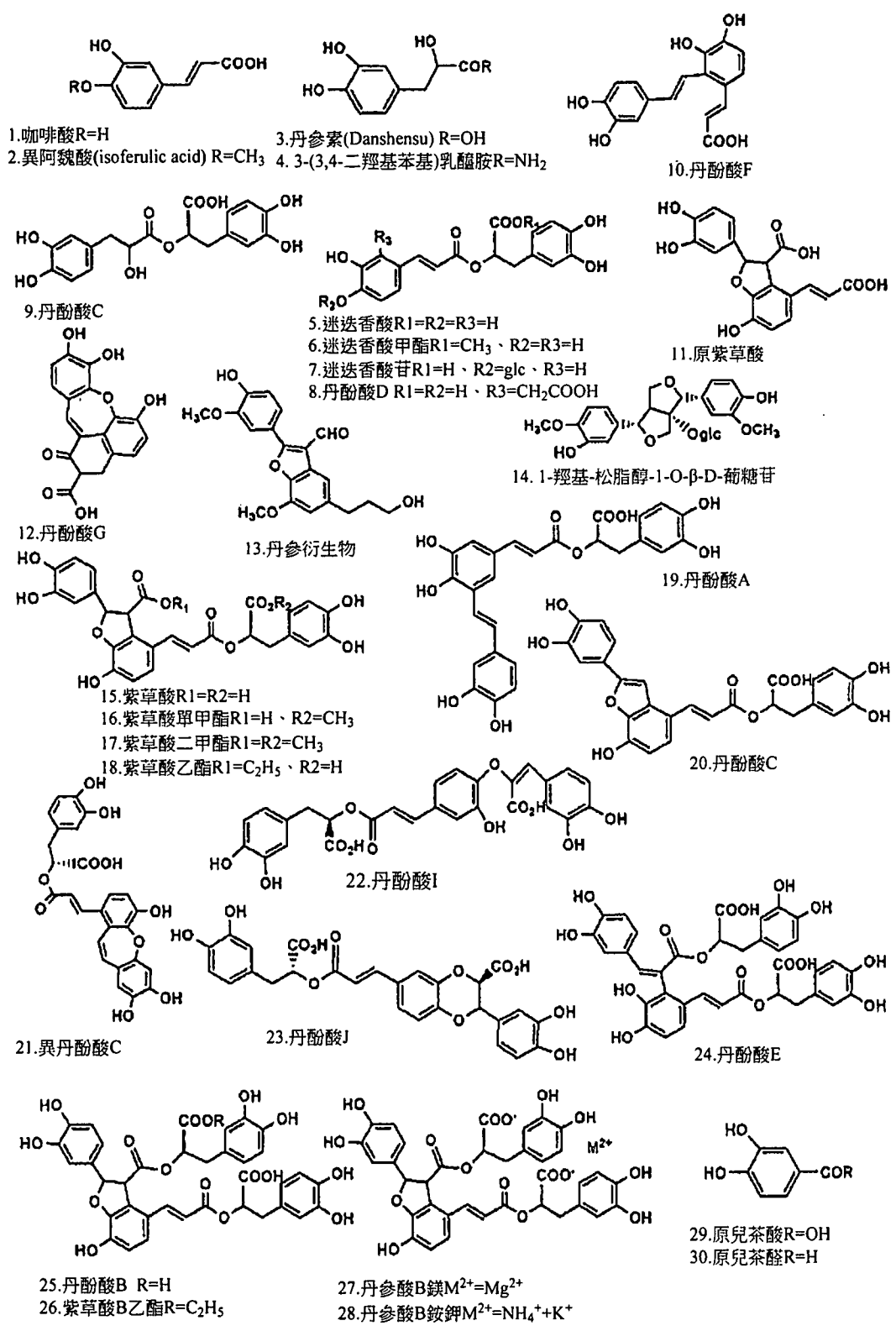


圖10A



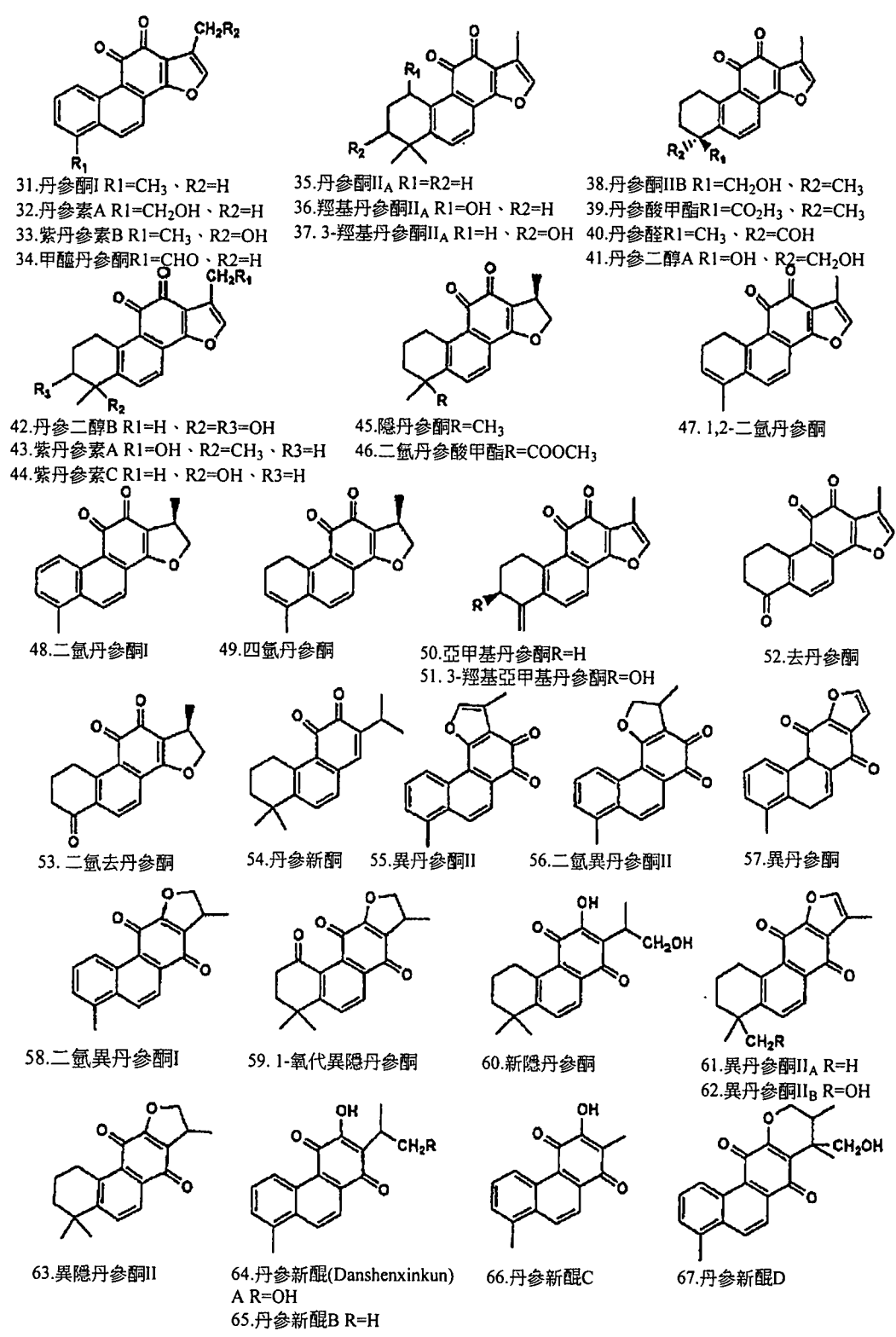
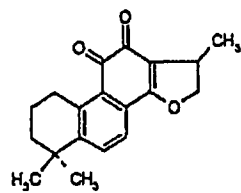
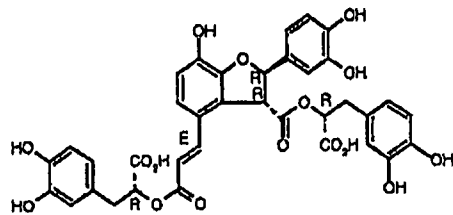


圖10A(續)



隱丹參酮

圖10B



丹酚酸B

圖10C

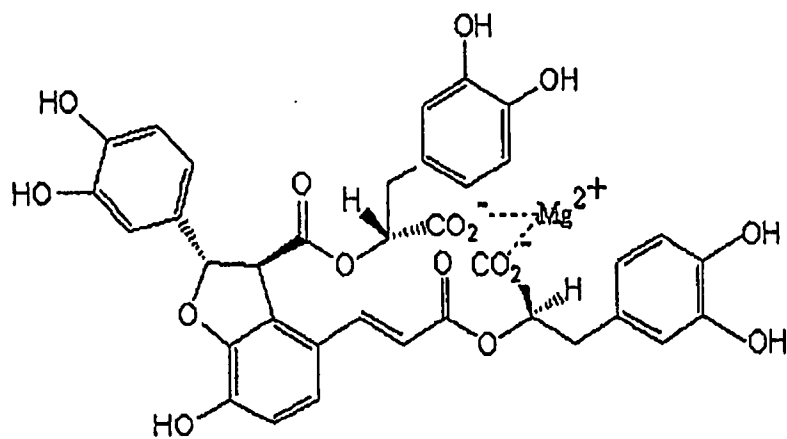


圖 10D



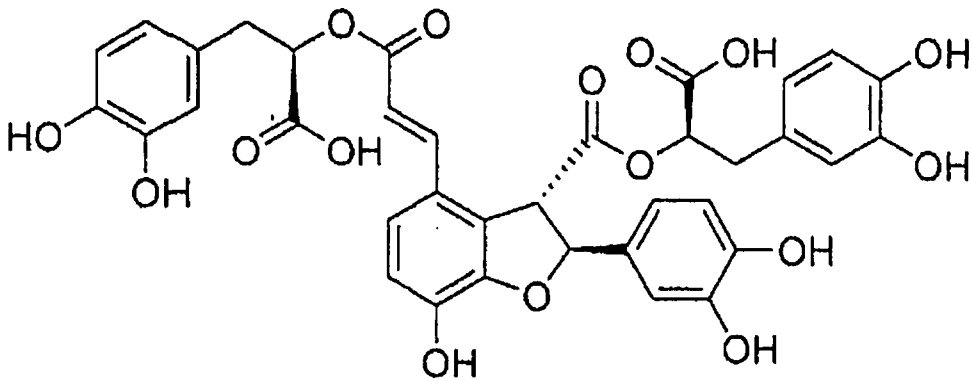


圖10E

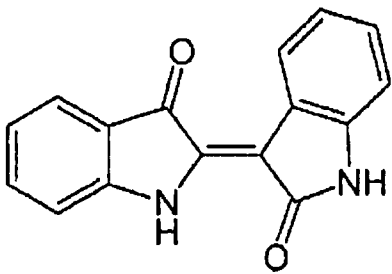


圖10F

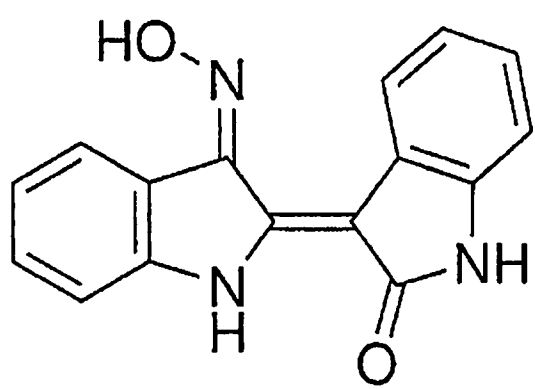


圖10G

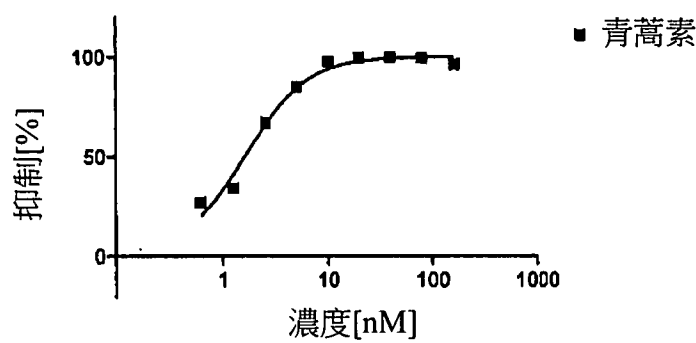


圖11

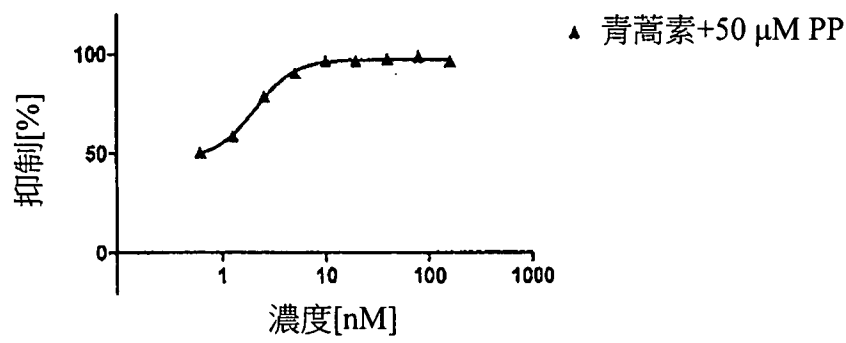


圖12



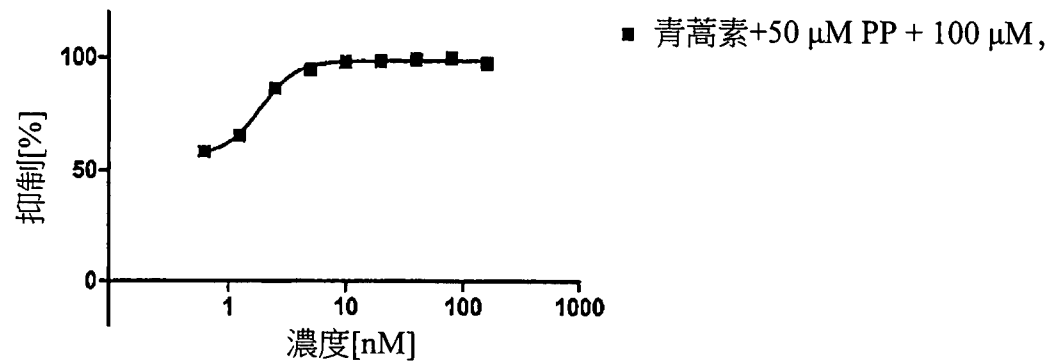


圖13

	化合物	IC ₅₀ (nM)
(i)	青蒿素	1.6
(ii)	青蒿素+50 μ M PP	0.7
(iii)	青蒿素+50 μ M PP+100 μ M ATP	0.5

圖14

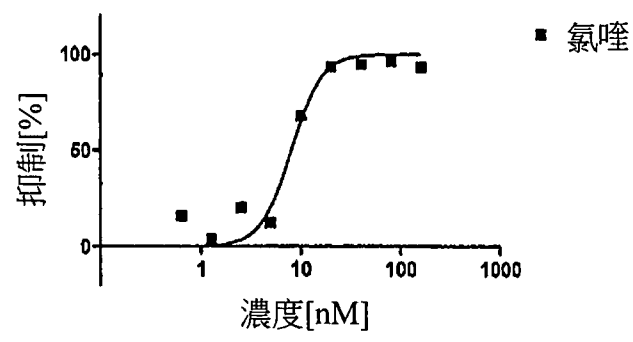


圖15

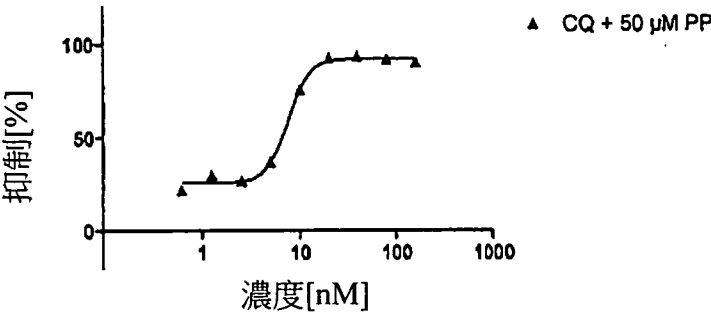


圖16

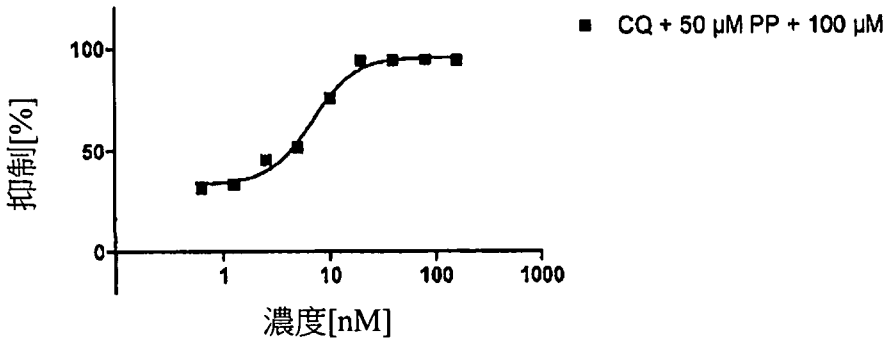


圖17

	化合物	IC ₅₀ (nM)
(i)	氯喹	8.1
(ii)	氯喹+50 μ M PP	4.6
(iii)	氯喹+50 μ M PP+100 μ M ATP	2.8

圖18



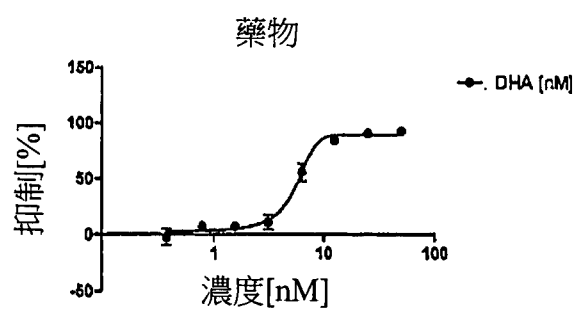


圖 19

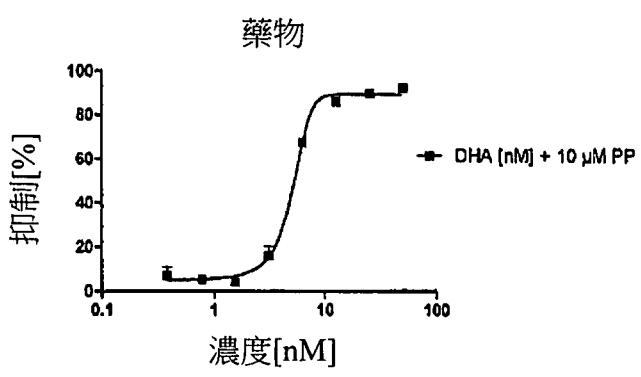


圖 20

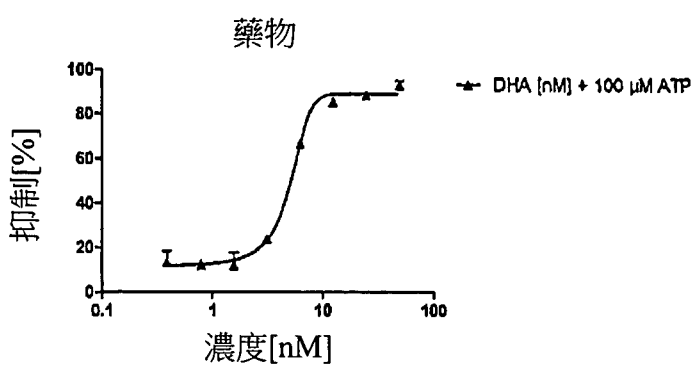


圖 21

	化合物	IC ₅₀ (nM)
(i)	二氫青蒿素	7.9 +/- 2.2
(ii)	二氫青蒿素+10 μM PP	4.9
(iii)	二氫青蒿素+100 μM ATP	5.0

圖22

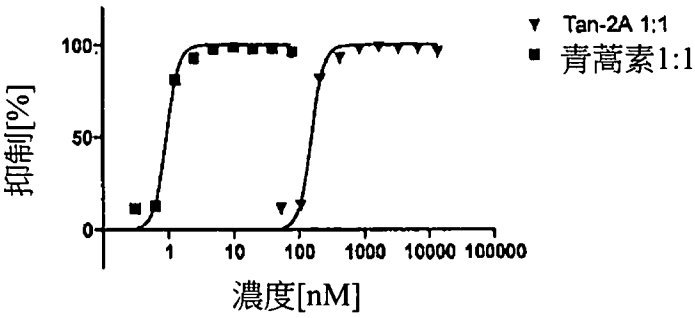


圖23A



IC ₅₀ 丹參酮IIA (nM)	IC ₅₀ 青蒿素(nM)	TSIIA:青蒿素比率
614.7	-	1:0
-	1.606	0:1
157	0.9233	1:1
154	0.4529	2:1
67.54	0.7945	1:2
242.2	0.3561	4:1
47.74	1.123	1:4

圖23B

TSIIA-青蒿素理論比率	FIC (丹參酮-IIA)	FIC (青蒿素)	FIC之和
0:1	0.00	1.00	
1:0	1.00	0.00	
1:1	0.26	0.57	0.83
2:1	0.25	0.28	0.53
1:2	0.11	0.49	0.60
4:1	0.39	0.22	0.62
1:4	0.08	0.70	0.78

圖23C

FIC之和分析：保守詮釋：

$\Sigma FIC > 2$ ：拮抗的

$\Sigma FIC < 0.5$ ：協同的

$0.5 < \Sigma FIC < 2$ ：加成的

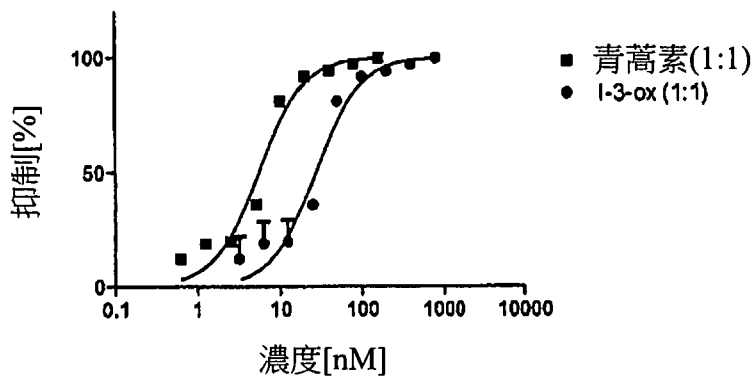


圖24A

IC ₅₀ 靛紅-3-肟(nM)	IC ₅₀ 青蒿素(nM)	青蒿素/l-3-O比率
129.3		1:0
	10.5	0:1
27.5	5.5	1:1
45.1	4.51	1:2
17.9	7.2	2:1
53.8	2.7	1:4
13.1	10.51	4:1

圖24B



I-3-O:青蒿素			
理論比率	FIC (I-3-o)	FIC (青蒿素)	FIC之和
0:1	0.00	1.00	
1:0	1.00	0.00	
1:1	0.21	0.52	0.74
2:1	0.35	0.43	0.78
1:2	0.14	0.69	0.82
4:1	0.42	0.26	0.67
1:4	0.10	1.00	1.11

FIC之和分析：保守詮釋：

$\sum FIC > 2$ ：拮抗的

$\sum FIC < 0.5$ ：協同的

$0.5 < \sum FIC < 2$ ：加成的

圖24C

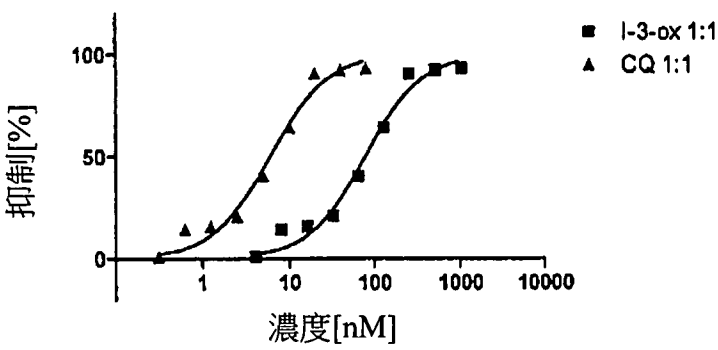


圖25A

IC ₅₀ 靛紅-3-脲(nM)	IC ₅₀ 氯喹(nM)	I-3-O:氯喹比率
108		1:0
	8.069	0:1
78.95	6.073	1:1
64.1	2.466	2:1
36.43	5.605	1:2
63.6	1.223	4:1
35.88	11.04	1:4

圖25B



I-3-O:氯喹 理論比率	FIC (I-3-o)	FIC(氯喹)	FIC之和
0:1	1.00	0.00	1.00
1:0	0.00	1.00	1.00
1:1	0.73	0.75	1.48
2:1	0.59	0.31	0.90
1:2	0.34	0.69	1.03
4:1	0.59	0.15	0.74
1:4	0.38	1.37	1.70

FIC之和分析：保守詮釋：

$\sum FIC > 2$ ：拮抗的

$\sum FIC < 0.5$ ：協同的

$0.5 < \sum FIC < 2$ ：加成的

圖25C

IC ₅₀ 靛紅-3-脲(nM)	IC ₅₀ 青蒿素(nM)	青蒿素:I-3-O比率
補充藥物：50 μM泮托拉唑		
254	-	1:0
-	7.9	0:1
36.7	7.3	1:1
68.9	6.9	1:2
20.3	8.1	2:1
114.7	5.7	1:4
8	6.4	4:1

圖26A

I-3-O:青蒿素 理論比率	FIC (I-3-o)	FIC (青蒿素)	FIC之和
0:1	0.00	1.00	1.00
1:0	1.00	0.00	1.00
1:1	0.14	0.93	1.08
2:1	0.27	0.88	1.15
1:2	0.08	1.03	1.11
4:1	0.45	0.73	1.18
1:4	0.03	0.81	0.84

圖26B

FIC之和分析：保守詮釋：

$\sum FIC > 2$ ：拮抗的

$\sum FIC < 0.5$ ：協同的

$0.5 < \sum FIC < 2$ ：加成的

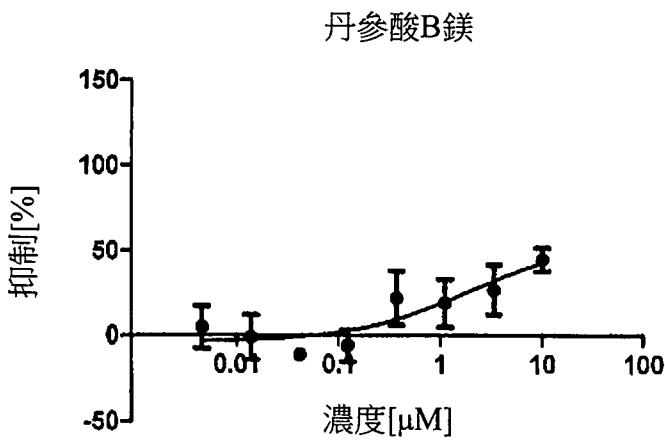


圖27A

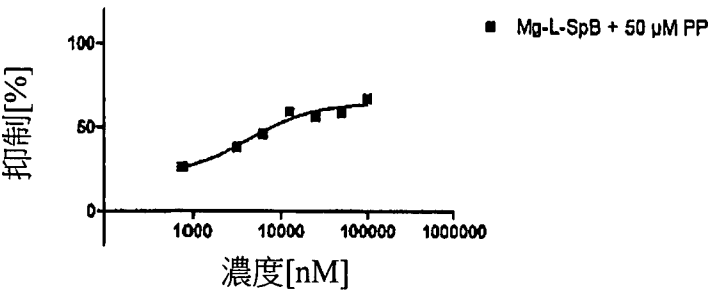


圖27B

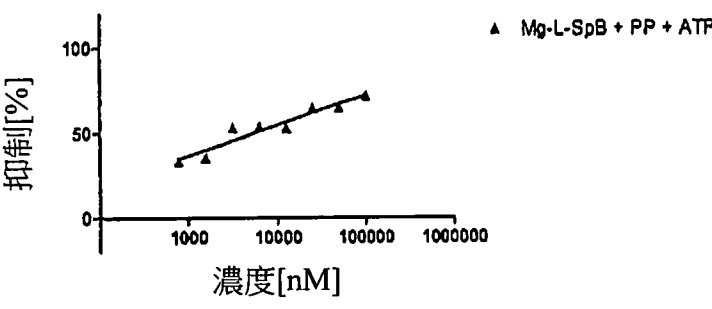


圖27C

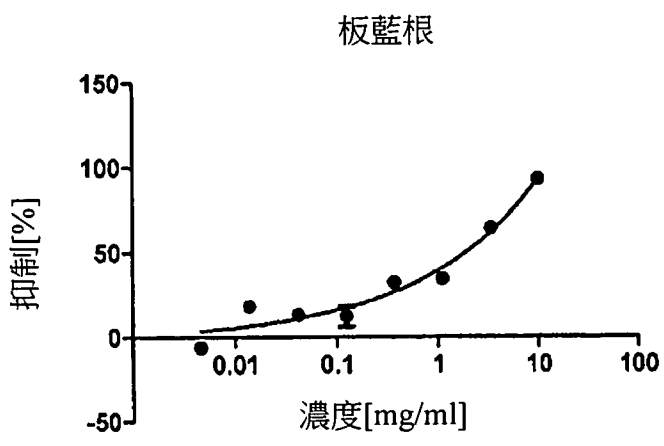


圖28

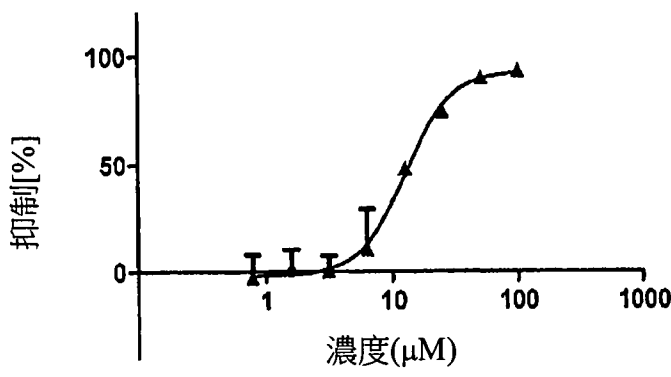


圖29A



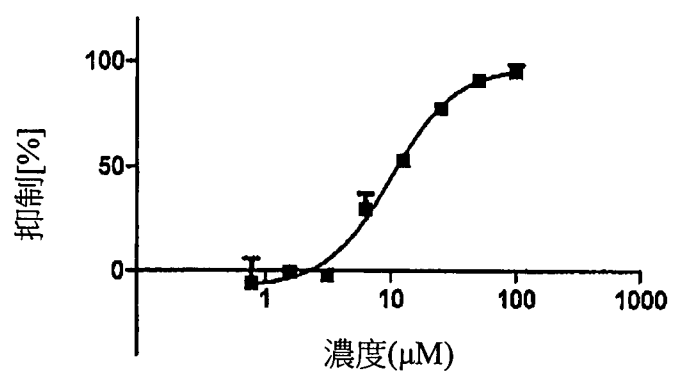


圖29B

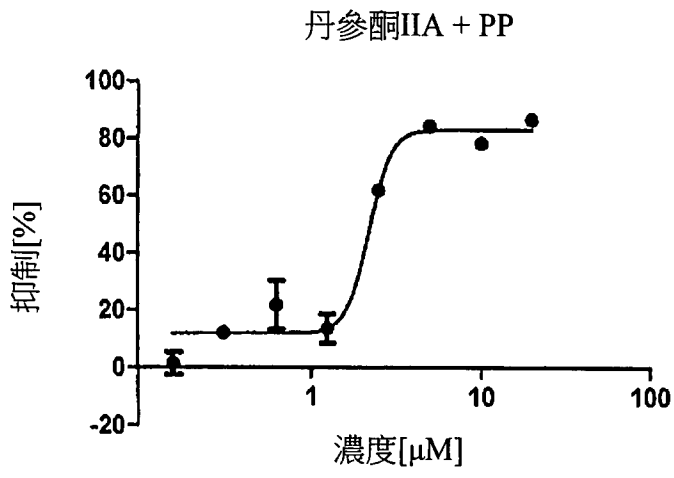


圖30

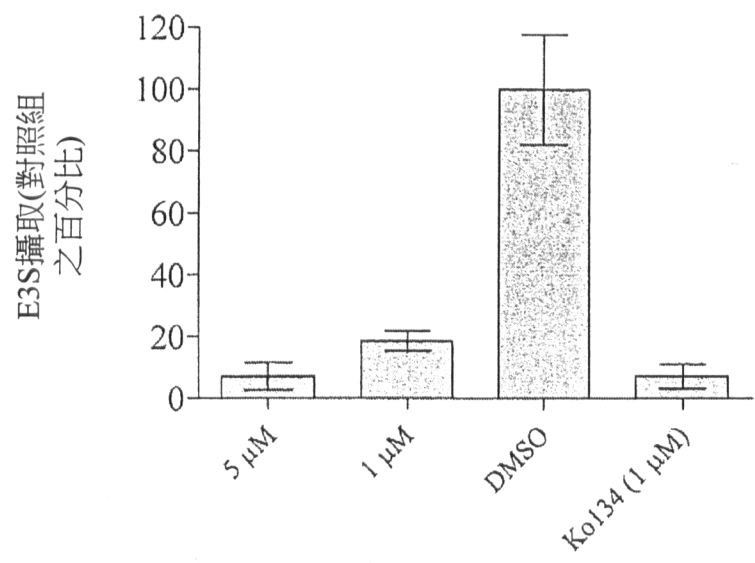


圖31

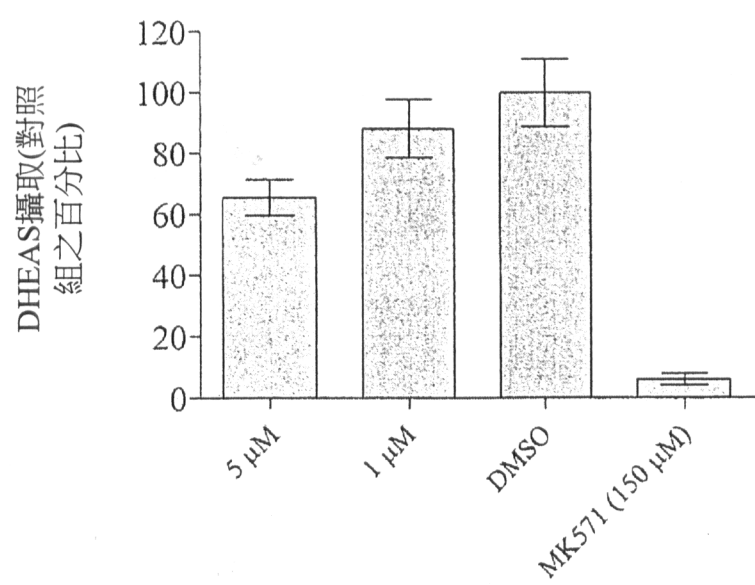


圖32