

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：94105533

※申請日期：94.2.24

※IPC 分類：G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/52 (2006.01)
C12N 5/06 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

以病毒持續性感染細胞系統篩選抗黃病毒感染化合物之方法

A METHOD FOR SCREENING COMPOUNDS AGAINST FLAVIVIRUSES INFECTION
BY USING PERSISTENT VIRUS-INFECTED CELL SYSTEMS

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

財團法人佛教慈濟綜合醫院

TZU CHI BUDDHIST GENERAL HOSPITAL

代表人：(中文/英文) 林欣榮 / LIN, SHINN-ZONG

住居所或營業所地址：(中文/英文)

花蓮市中央路三段 707 號

No. 707, Sec. 3, Chung-Yang Rd., Hualien, Taiwan, R. O. C.

國 籍：(中文/英文) 中華民國/R. O. C.

三、發明人：(共 1 人)

姓 名：(中文/英文)

陳立光 / CHEN, LI-KUANG

國 籍：(中文/英文) 中華民國/R. O. C.

四、聲明事項：

主張專利法第二十二條第二項 第一款或 第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

主張專利法第三十條生物材料：

須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於抗黃病毒感染化合物之篩選方法。具體而言，本發明係以黃病毒持續感染性細胞系統篩選抗黃病毒化合物。

【先前技術】

黃病毒科 (Flaviviridae) 家族包含黃病毒屬 (Flavivirus)、瘟病毒 (Pestivirus) 及肝病毒 (Hepacivirus)。黃病毒基因體為一條正股線形 RNA，總基因體長約 10000 至 11000 鹼基，其結構大致呈現為 5'-結構基因-非結構基因-3'。其 5' 端有甲基化核苷帽蓋 (methylated nucleotide cap) 或基因體聯結蛋白 (genome-linked protein)，但 3' 端無 poly A。病毒結構基因 (包括 C, prM 及 E 基因) 在 5' 端，約佔基因體的 1/4，其餘則為非結構 (non-structural) 基因。病毒型微粒為扁圓球形，直徑約 40 至 60nm，含三種結構蛋白：(1) 封套蛋白突刺 (E 蛋白) (2) 封套膜蛋白 (M 蛋白) (3) 核套殼蛋白 (C 蛋白)。黃病毒感染細胞中，病毒非結構蛋白的數目尚不一定，但至少有三種非結構蛋白已確定存在於黃熱病病毒感染的細胞中，這些非結構蛋白似乎與病毒 RNA 複製有關，其中至少有一種具有蛋白分解酵素的作用。封套 E 蛋白表面突刺是病毒之血凝素，可使被感染細胞吸附紅血球。該 5' UTR 為病毒基因體中最高度保留之部分且為多蛋白轉譯作用之起始及控制之重要部分 (Turner C., et al., J Gen Virol. 2004 May;85(Pt

5):1113-24 ; Henchal E.A. and Putnak J.R. Clin Microbiol Rev. 1990 October; 3(4): 376-396 ; Chambers T.J. et al., Annu Rev Microbiol. 1990;44:649-88.)。

黃病毒屬中包含至少 65 種人類或人畜共通之病原體 (pathogens)。除了 C 型肝炎病毒係經由體液接觸傳染之外，其餘各病毒之傳播媒介為例如蚊子或虱子之節肢動物。感染黃病毒會產生三種臨床症狀包括由聖路易腦炎病毒 (St. Louis encephalitis)、墨磊山谷病毒 (Murray valley encephalitis)、日本腦炎 (Japanese encephalitis) 等所引起之中樞神經系統疾病；由黃熱病毒 (yellow fever virus) 侵入內臟所引起之全身性疾病；及由西奈病毒 (west nile virus)、登革熱病毒 (dengue fever virus) 等所引起嚴重肌肉痛 (例如急性無力肢體麻痺 (AFP)、吉蘭-巴雷氏症候群 (Guillain-Barré Syndrome ; GBS)、脊髓炎 (anterior myelitis) 等) 及出血性熱 (hemorrhagic fever)。根據世界衛生組織 (WHO) 的統計，單以登革熱病毒而言，每年在全球造成近 2 千萬人感染，平均造成約 2 萬 4000 人的死亡。而根據美國疾病管制局 (CDC, USA) 於 2004 年 11 月 8 日所發表的統計數字顯示，由 2004 年 1 月至 11 月，西奈病毒在美國造成 2 千餘人的感染個案，其中有 77 個死亡報告。黃病毒感染已成為世界性公共流行病學之一大課題。

黃病毒感染之確認需藉由分離病毒及血清學鑑定，其中只有黃熱病毒、登革熱病毒及某些由蟲子傳播之腦炎可由血液中分離病毒，而由於各病毒血清形之交叉抗體保護

性不大，因此病毒之血清學鑑定對於其治療幫助並不大。此外，日本腦炎雖已有疫苗問世多年，然而該疫苗為活性減毒疫苗，免疫力價的維持時間有限。以往人類接受疫苗注射後可藉由蚊子叮咬而獲得自然追加(natural boost)，然而在衛生條件大幅改善的今天，自然追加的機會減低，因此仍有已接受疫苗注射之成人感染日本腦炎之案例。目前市面上販售的抗病毒藥物，大都是針對 HIV、疱疹病毒(造成像唇疱疹或腦炎等各種不同疾病)以及 B 型和 C 型肝炎病毒(兩者都可導致肝癌)。而目前黃病毒感染之臨床治療上，並無針對各病毒之確效藥物，多半均採用症狀支持性療法。因此極需要一種篩選方法，可由大量存在的天然或人工合成化合物收集庫中，簡便快速地篩選可能治療黃病毒感染的化合物，作為研發抗黃病毒感染之藥物。

以往抗病毒藥物之篩選方法，係使細胞感染病毒，在培養基中培養經病毒感染之細胞，然後在培養基內加入已知可能抑制病毒活性的化學藥品，找出一些能夠降低病毒數目的藥品做深入研究。這種做法相當不具經濟效益，因為研究人員需不斷的重複使細胞感染病毒的步驟，而且篩選所得之化合物不一定能抑制細胞內病毒蛋白的表現，因此仍有所篩選藥物能否進入細胞的問題及細胞毒性問題。

【發明內容】

針對目前藥物或藥物先導化合物之篩選方法所存在之障礙，本發明係一種抗黃病毒感染化合物之篩選方法，包含係包括下列步驟：(a)製備黃病毒持續性感染細胞株

(persistent flavivirus infected cell lines)，(b)使用該黃病毒持續性感染細胞株製備單株抗體，(c)將預選定之化合物與黃病毒持續性感染細胞株接觸及(d)使用該單株抗體經由免疫酵素法測定該預選定之化合物對該黃病毒抗原之抑制性。

本發明之篩選方法主要係結合病毒持續性感染細胞株與單株抗體兩項技術，而應用於篩選合適作為抗黃病毒感染之化合物。使用本發明之方法，可避免習知技術中，需重複進行病毒感染細胞之操作。再者，藉由單株抗體之製備，而使用免疫酵素法測定預選定化合物對黃病毒抗原之抑制性，可使用一般實驗室現存之免疫酵素法，無須使用放射性物質，且極易與一般實驗室現存之96-微孔盤自動化操作平台結合，無須另行增購設備，即可快速且簡便地進行大量篩選。

於上述本發明之篩選方法中，該單株抗體較佳為具有該黃病毒之非結構性蛋白(NS1)抗原性或封套蛋白(E protein)抗原性者，尤以具有上述兩種單株抗體之混合液者最佳。

由上述方法所篩選之化合物係用於治療及/或預防黃病毒感染。本發明又一具體例為一種篩選抗黃病毒感染化合物之套組，係包含係包括(a)黃病毒持續性感染細胞株(persistent flavivirus infected cell lines)及(b)使用該病毒持續性感染細胞株製備單株抗體。

此具體例中，該單株抗體較佳為具有該黃病毒之非結

構性蛋白(NS1)抗原性或封套蛋白(E protein)抗原性者，尤以具有具有上述兩種單株抗體之混合液者最佳。由此具體例所篩選之化合物係用於治療及/或預防黃病毒感染。

本發明復提供一種製劑，可用於治療及/或預防黃病毒感染，其係使用由本發明之方法所篩選之化合物所製備者。

本發明之篩選方法可適用之黃病毒為黃病毒科(Flaviviridae)之黃病毒屬(Flavivirus)，包括壁虱性病毒(Tick-borne viruses)(例如俄羅斯春夏病毒(Russian spring-summer virus)、鄂木斯克出血性熱病毒(Omsk hemorrhagic fever virus)、玻瓦桑病毒(Powassan virus)、皇家農場病毒(Royal Farm virus)、卡爾士病毒(Karshi virus)、壁虱性腦炎病毒(Tick-borne encephalitis virus)、紐道爾夫病毒(Neudoerfl virus)、跳躍病病毒(Louping ill virus)、海鳥壁虱性病毒(Seabird tick-borne virus)等)；蚊子性病毒(Mosquito-borne viruses)(例如阿羅病毒(Aroa virus)、布斯奎拉病毒(Bussuquara virus)、艾古亞普病毒(Iguape virus)、登革熱病毒(Dengue virus)包含1至4型、科得固病毒(Kedougou virus)、日本腦炎病毒(Japanese encephalitis virus)、卡西帕科爾病毒(Cacipacore virus)、墨累谷腦炎病毒(Murray Valley encephalitis virus)、艾爾夫病毒(Alfuy virus)、聖路易腦炎病毒(St. Louis encephalitis virus)、烏蘇土病毒(Usutu virus)、西奈病毒(West Nile virus)、庫京病毒(Kunjin virus)、容得病毒(Yaounde virus)、科科貝拉病毒(Kokobera virus)、史翠夫得病毒(Stratford

virus)、塔亞病毒(Ntaya virus)、巴加札病毒(Bagaza virus)、伊利烏斯病毒(Ilheus virus)、羅西奧病毒(Rocio virus)、以色列土耳其腦膜腦脊髓炎(Israel turkey meningoencephalomyelitis virus)、淡布蘇病毒(Tembusu virus)、斯彭威尼病毒(Spondweni virus)、齊卡病毒(Zika virus)、黃熱病毒(Yellow fever virus)、班齊病毒(Banzi virus)、玻布伊病毒(Bouboui virus)、邊山病毒(Edge Hill virus)、朱格拉病毒(Jugra virus)、撒玻亞病毒(Saboya virus)、波提斯昆病毒(Potiskum virus)、西皮科病毒(Sepik virus)、烏干達 S 病毒(Uganda S virus)、威塞爾斯布隆病毒(Wesselsbron virus)等)；無已知節肢動物媒介之病毒 (Viruses with no known arthropod vector)(例如恩德培病毒(Entebbe virus)、恩德培蝙蝠病毒(Entebbe bat virus)、蘇可魯科病毒(Sokoluk virus)、悠可西病毒(Yokose virus)、莫達科病毒(Modoc virus)、阿波伊病毒(Apoi virus)、牛骨脊病毒(Cowbone Ridge virus)、朱提阿帕病毒(Jutiapa virus)、聖培利他病毒(San Perlita virus)、里奧布雷歐病毒(Rio Bravo virus)、布卡拉薩蝙蝠病毒(Bukalasa bat virus)、開瑞島病毒(Carey Island virus)、達卡蝙蝠病毒(Dakar bat virus)、蒙大拿高山鼠耳蝠白質腦炎病毒(Montana myotis leukoencephalitis virus)、金邊蝙蝠病毒(Phnom Penh bat virus)、巴土洞病毒(Batu Cave virus)等)。

本發明之篩選方法中，用於製備病毒持續性感染細胞株的方法，可參照發明人已發表之文獻(Virology, 217:220,

J.V. 71:5963, J.V.72:9844), 或其他已知用於製備病毒持續性感染細胞株之方法。本發明之病毒持續性感染細胞株於懸浮性培養可使用 K562 細胞, 於吸附性培養可使用 BHK-21 細胞或 B2-5 細胞株及 Bcl-2 表現 BHK-21 細胞株與黃病毒接觸進行感染。在多數細胞病變效果 (cytopathogenic effect; CPE) 細胞消失後, 殘餘的增生性強的細胞 (proliferating cells) 會增加, 而其黃病毒感染之持續性係使用黃病毒-專一性單株抗體 (製備方法述於後文) 作為初級抗體, 以 FITC-共軛 (fluorescein isothiocyanate-conjugated) 或 HRP-共軛 (horseradish peroxidase-conjugated) 之山羊抗老鼠 Ig 抗體作為二級抗體, 進行間接螢光抗體偵測法 (indirect fluorescent antibody test, IFA) 及酵素聯結免疫吸附分析 (enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA) 測定。

本發明之篩選方法中, 單株抗體之抗原可為黃病毒之任一抗原決定基 (epitope), 包括抗 E 蛋白、M 蛋白、C 蛋白、結構性及非結構性蛋白等。本發明之單株抗體係使用融合瘤技術而製備, 亦即包含下列步驟: (1) 製備黃病毒抗原決定基與載體之結合物, 形成可引起免疫反應之結合物, 以便在施行體內免疫後, 獲得黃病毒抗原決定基之抗體; (2) 建立分析系統 (IFA 及 ELISA) 以測定免疫反應, 測知並篩選已引起免疫反應之動物血清或脾臟細胞; (3) 製造及篩選融合瘤: 篩選出對黃病毒抗原決定基具特異性之老鼠脾臟細胞與骨髓瘤細胞融合瘤; (4) 利用融合瘤大量生

產並純化單株抗體。

本發明之方法中所使用之免疫酵素法可為酵素聯結免疫吸附分析(enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA)(後文中簡稱 ELISA)，直接或間接之酵素聯結免疫吸附分析，較佳為三明治酵素聯結免疫吸附分析為佳(sandwich enzyme-linked immunosorbent assay)。各個單株抗體之三明治 ELISA 測定條件均需經過最適化。

本發明將以下列實施例進一步具體說明，惟該等實施例之揭示不應視為任何限制本發明之意圖。

【實施方式】

病毒持續性感染細胞株之建立

建立黃病毒持續性感染細胞株的方法可使用任一種已知或習用的方法，或使用本發明人已發表於文獻之方法(Virology. 217:220; J. V. 71:5963; J. V. 72:9844)。以 B2-5 細胞株及 Bcl-2 表現 BHK-21 細胞株進行如表 1 所示之黃病毒感染。在多數細胞病變效果(cytopathogenic effect; CPE)細胞消失後，殘餘的增生性強的細胞(proliferating cells)會增加，而其黃病毒感染之持續性係使用黃病毒-專一性單株抗體(製備方法述於後文)作為初級抗體，以 FITC-共軛(fluorescein isothiocyanate-conjugated)或 HRP-共軛(horse radish peroxidase-conjugated)之山羊抗老鼠 Ig 抗體作為二級抗體，進行間接螢光抗體偵測法(indirect fluorescent antibody test, IFA)及酵素聯結免疫吸附分析(enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA)測定。

表 1. 用於免疫反應及持續性感染之黃病毒

病毒	病毒株名稱	來源
登革熱病毒 1 型	HAWAII	ATCC
登革熱病毒 2 型	PLO46	ATCC
登革熱病毒 3 型	H-87	ATCC
登革熱病毒 4 型	H-241	ATCC
西奈病毒	VR-1510	ATCC
日本腦炎病毒	RP9	發明人實驗室
黃熱病毒	17D	ATCC

由融合瘤技術製備黃病毒-專一性單株抗體

以持續性黃病毒(表 1)感染細胞株之培養上清液對 BALB/c 小鼠進行免疫，以增加於培養上清液中獲得抗經分泌黃病毒蛋白之單株抗體的機會。在進行免疫後，於細胞融合前以 IFA 及 ELISA 測定經敏化血清中專一性抗體力價。之後將抗體(B 細胞)與骨髓瘤細胞(myeloma)融合。因為一般的 B 細胞無法在培養皿中存活太久，而骨髓瘤是一種淋巴癌細胞，與 B 細胞的背景相似，並且可以在培養皿中永久繼代(passage)。因此將這兩種細胞混合，並以化學試劑 PEG (polyethylene glycol) 誘導其相互融合，兩組染色體混合之後可能產生重組，當細胞分裂數次之後，染色體數目回復正常，將可能有子代細胞同時兼具分泌抗體及永久繼代兩種特性，稱為融合瘤 (hybridoma)。當目標之黃病毒-專一性單株抗體產生融合瘤，以基於該單株抗體之特性篩選獲得之後，由於來自宿主小鼠之天然免疫球蛋白之污染最低率，抗體之大量生產以於 NOD/scid 小鼠

中誘發腹水而完成。由腹水純化專一性單株抗體係根據來自 ELISA 之同型(isotype)資訊，經由蛋白 A 或蛋白 G 管柱進行。單株抗體所辨識之抗原性目標分子之特性可由西方墨點法(Western blotting)著色帶之分子量而推知。

三明治 ELISA 反應條件之最適化

用於三明治 ELISA 之單株抗體之選擇性係根據單株抗體能於黃病毒持續性感染細胞株之上清液中捕捉病毒蛋白之資訊。為決定一級抗體與二級抗體之配對，需完成競爭性測試以確定由該兩級抗體所辨識之抗原決定基不同。當有超過一種之黃病毒蛋白分泌致培養上清液中，用於三明治 ELISA 之一級抗體可為多個單株抗體(oligoclonal antibodies)之混合物(cocktail)。同樣的原則也可適用於三明治 ELISA 所使用之二級抗體篩選。

三明治 ELISA 之詳細步驟敘述如下：將抗黃病毒之 E 蛋白及 NS1 蛋白等之單株抗體混合物作為捕捉分泌之黃病毒抗原之一級抗體，於 4°C 下覆蓋於 ELISA-微孔盤之微孔中一夜。以含有 1%封阻(blocked)BSA(bovine serum albumine)之 PBS (phosphate buffer saline)清洗 3 次後，將得自持續性感染細胞株之培養上清液添加至微孔中，並於 37°C 培養 90 分鐘。以含有 1% BSA 之 PBS 清洗 3 次後，添加配對之 Biotin-共軛之二級抗體之混合物，並於 37°C 培養 90 分鐘。添加 HRP-streptavidin 至微孔中並於室溫培養 30 分鐘後，以 PBS 清洗 3 次。以 TMB 受質於室溫反應 30 分鐘後以 PBS 清洗 3 次，再以 ELISA 讀值機(ELISA-reader)

測定於 O.D. 405nm 之結果。試驗之陰性或陽性對照組係分別使用偽裝(mock)或經黃病毒感染之細胞病變性 BHK-21 細胞之培養上清液進行測試。

病毒持續性感染細胞株上清液中病毒抗原分泌之一致性連續長時間(長至 6 個月)培養持續性黃病毒感染細胞株之分泌至培養上清液之病毒抗原，使用起初所使用之三明治 ELISA 進行測定仍可測得。再者，經過 1 週凍存及 2 週解凍培養之過程連續 5 次後，由三明治 ELISA 之結果得知，持續性黃病毒感染細胞株分泌與起始時相同量之病毒抗原。而由第 3 圖之結果可知，本發明所建立之病毒持續性感染細胞株之培養上清液中所含有之病毒抗原，可增加病毒抗原之分泌濃度。

MTT ELISA

本發明之方法中，以培養上清液進行 sandwich ELISA 時，可同時以培養的細胞進行 MTT-ELISA 而完成化合物之細胞毒性測試。3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基-2H-四唑溴鹽化物(MTT)為基於四唑鹽還原之測定及製備之敏感試劑。由滋養因子(trophic factors)、生長抑制劑(growth inhibitors)或細胞凋亡(apoptosis)之誘發或抑制所造成細胞增生活性之變化，可使用 MTT 分析定量測定。MTT 會經由相關於代謝活性之細胞線粒體之脫氫酶還原為水不溶之黃色甲臍染料 (Formazan dye)。MTT 之還原主要源於細胞內糖解活性(glycolytic activity)，而且依賴於 NADH 及 NADPH 之存在。甲臍染料可溶於異丙醇而於 570nm 以

分光光學法測定。在活性增生細胞中之 MTT 轉化定量會增加。試驗之陰性或陽性對照組係分別使用偽裝 (mock) 或經黃病毒感染之細胞病變性 BHK-21 細胞之培養上清液進行測試。

化合物篩選系統之設計

由天然或人工合成化合物資料庫中，開發抗病毒藥物之以細胞為主之本發明之篩選系統，如第 1 圖所示，包含兩部分。其中一者為病毒感染部分，其係用於測試添加至持續性黃病毒感染細胞培養基之候選化合物之效果，包括病毒持續性感感染細胞株之建立。本系統之另一部份為抗原決定基專一性之單株抗體融合瘤之製備及該單株抗體之大量生產與純化。收集持續性黃病毒感染細胞培養上清液，而且上清液中病毒蛋白之產生會使用抗原決定基專一性之單株抗體進行 sandwich ELISA 分析。候選化合物之細胞毒性會使用 MTT ELISA，於殘存細胞中測定存活率而進行分析。

本發明之篩選系統具有下列優點：不必使用放射性同位素，無放射性廢棄物之後續處理問題；可配合常見於一般實驗室之自動化微孔盤操作系統平台，無須另行添購自動化設備；病毒持續性感感染細胞株之建立可避免每次試驗再次準備病毒感染的繁瑣人工操作及病毒不穩定性；化合物對細胞毒性之測試可以 MTT ELISA 同時一次進行，無須另外測定；以病毒持續性感感染細胞為基礎之測定方法，所篩選之化合物為可抑制細胞內病毒蛋白表現者，無須在

進行化合物之修改以使該化合物進入細胞；以病毒之抗原決定基專一性之單株抗體測試化合物抑制病毒效果，靈敏度高且不易受其他因素干擾；本發明可採用單株抗體混合物(cocktail)逕行 sandwich ELISA 測試，可同時測定不同之病毒抗原蛋白，提高抗病毒化合物之準確性。

篩選結果之解析

本發明對於篩選結果之解析並不複雜。然而在決定有效結論之前必須先歸納出個別的特殊條件，以避免由所添加之化合物引起之抗原-抗體結合所造成之可能的錯誤解讀。該等條件可在 sandwich ELISA 進行之前將有興趣之化合物添加至陰性對照組所引起之 OD 值降低而提供。

【圖式簡單說明】

第 1 圖為本發明之化合物篩選系統之設計圖；

第 2 圖為本發明之 sandwich ELISA 之簡單圖式；

第 3 圖為登革熱病毒第 2 型持續感染細胞培養上清液中含有分泌之病毒抗原以 sandwich ELISA 測定之結果。

【主要元件符號說明】

本發明之圖式無元件符號說明。

五、中文發明摘要：

本發明係提供一種抗黃病毒感染化合物之篩選方法。具體而言，本發明係以病毒持續感染性細胞系統篩選抗黃病毒之天然或人工合成化合物。本發明之篩選方法包含(a)製備黃病毒持續性感染細胞株(persistent virus infected cell lines)，(b)使用該黃病毒持續性感染細胞株製備單株抗體，(c)將預選定化合物與黃病毒持續性感染細胞株接觸(共同培養)及(d)使用該單株抗體經由免疫酵素法測定該預選定化合物對黃病毒之抑制性。

六、英文發明摘要：

This invention provides a screening method for compounds of anti-flavivirus infection. Specifically, this invention uses persistent virus infected cell system to screen compounds of anti-flavivirus, comprising (a) preparation of persistent flavivirus infected cell lines, (b) preparation of monoclonal antibodies by using said persistent flavivirus infected cell lines, (c) said persistent virus infected cell lines are contacted to (incubated with) candidate compounds, (d) the inhibition of the candidate compounds to flavivirus are determined by immuno enzymatic method using the above monoclonal antibodies.

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (1) 圖。

(二)本代表圖之元件代表符號簡單說明：

本案圖式無元件符號。

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

本案無化學式。

96年12月12日修(更)正本

(96年12月12日)

公告本

十、申請專利範圍：

1. 一種抗黃病毒感染化合物之篩選方法，係包括下列步驟：(a)製備黃病毒持續性感染細胞株(persistent flavivirus infected cell lines)，(b)使用該黃病毒持續性感染細胞株製備單株抗體，(c)將預選定之化合物與黃病毒持續性感染細胞株接觸及(d)使用該單株抗體經由免疫酵素法測定該預選定之化合物對該黃病毒抗原之抑制性。
2. 如申請專利範圍第 1 項之篩選方法，其係用於由天然化合物中篩選抗黃病毒感染化合物。
3. 如申請專利範圍第 1 項之篩選方法，其係用於由人工合成化合物中篩選抗黃病毒感染化合物。
4. 如申請專利範圍第 1 項之篩選方法，其中，該黃病毒持續性感染細胞株係使用懸浮性細胞株製得者。
5. 如申請專利範圍第 4 項之篩選方法，其中，該懸浮性細胞株為 K562 細胞株。
6. 如申請專利範圍第 1 項之篩選方法，其中，該黃病毒持續性感染細胞株係使用吸附性細胞株製得者。
7. 如申請專利範圍第 6 項之篩選方法，其中，該吸附性細胞株為 BHK-21 細胞株、B2-5 細胞株或 Bcl-2 表現 BHK-21 細胞株。
8. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中，該預選定化合物與該黃病毒持續性感染細胞株接觸之方法係將兩者共同培養。

9. 如申請專利範圍第 1 項之篩選方法，其中，該免疫酵素法為酵素連結免疫吸附分析 (enzyme-link immunosorbent assay ; ELISA)。
10. 如申請專利範圍第 9 項之篩選方法，其中，該酵素連結免疫吸附分析為三明治酵素連結免疫吸附分析 (sandwich ELISA)。
11. 如申請專利範圍第 9 或 10 項之篩選方法，其中，於該免疫酵素法中用於免疫酵素法之抗體可為單一之單株抗體或多個單株抗體之混合物。
12. 如申請專利範圍第 1 項之篩選方法，其中，該單株抗體為對該黃病毒之抗原決定基具有專一性者。
13. 如申請專利範圍第 12 項之篩選方法，其中，該單株抗體為對該黃病毒之非結構性蛋白(NS1)的抗原決定基具有專一性。
14. 如申請專利範圍第 11 項之篩選方法，其中，該單株抗體為對該黃病毒之封套蛋白(E protein)的抗原決定基具有專一性。