I544918

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本 **(11)證書號數：TW I544918 B**

(45)公告日： 中華民國 105 (2016) 年 08 月 11 日

(21)申請案號：104121680 (22)申請日： 中華民國 104 (2015) 年 07 月 03 日

(51)Int. Cl.： *A61K31/09 (2006.01)* *A61K31/36 (2006.01)*
A61K31/122 (2006.01) *A61P31/14 (2006.01)*

(71)申請人：高雄醫學大學 (中華民國) KAOHSIUNG MEDICAL UNIVERSITY (TW)
高雄市三民區十全一路 100 號

(72)發明人：李景欽 LEE, JIN CHING (TW)；陳彥旭 CHEN, YEN HSU (TW)；吳宇軒 WU, YU HSUAN (TW)；陳威均 CHEN, WEI CHUN (TW)；王惠君 WANG, HUI CHUN (TW)

(74)代理人：黃耀霆

(56)參考文獻：

CN 102603836A

TH3 JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY VOL. 286,NO. 45,PP. 39546-39559, Nov 11, 2011

審查人員：吳敏翠

申請專利範圍項數：4 項 圖式數：17 共 40 頁

(54)名稱

五味子甲素之用途

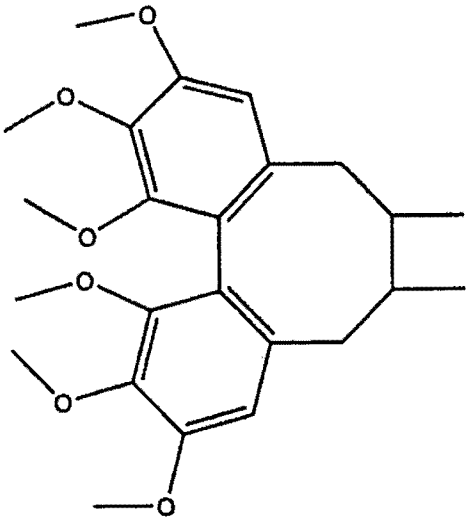
A USE OF SCHZANDRIN A

(57)摘要

一種五味子甲素之用途，係用以製備抗登革熱病毒之藥物，其中，五味子甲素係投予一所需個體，以抑制一登革熱病毒感染該所需個體。

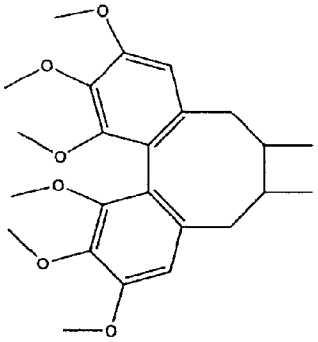
A use of schzandrin for manufacturing a drug against dengue virus is disclosed. Schzandrin is administered to a subject in need thereof to inhibit the infection of dengue virus.

指定代表圖：

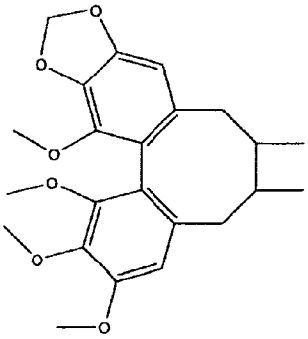


第 1a 圖

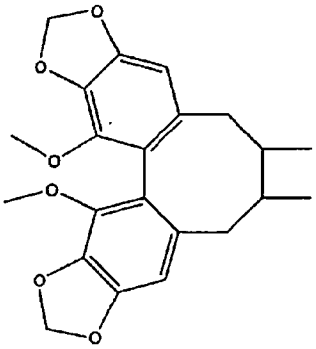
特徵化學式：



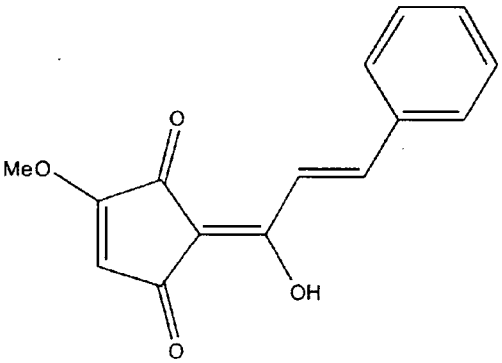
五味子甲素（schzandrin A）



五味子乙素（schzandrin B）



五味子丙素（schzandrin C）



赤芝酮（lucidone）

I544918

公告本

105年2月24日修正替換本

發明摘要

年 月 日 修正 補充

※ 申請案號：104121680

※ 申請日：104.7.3

※IPC 分類：A61K 31/09 (2006.01) A61K 31/36 (2006.01) A61K 31/122 (2006.01) A61P 31/14 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

五味子甲素之用途 / A Use of Schzandrin A

【中文】

一種五味子甲素之用途，係用以製備抗登革熱病毒之藥物，其中，五味子甲素係投予一所需個體，以抑制一登革熱病毒感染該所需個體。

【英文】

A use of schzandrin for manufacturing a drug against dengue virus is disclosed. Schzandrin is administered to a subject in need thereof to inhibit the infection of dengue virus.

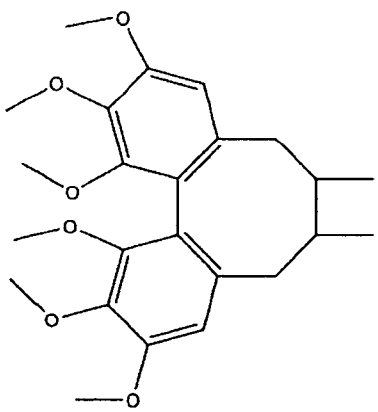
【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ 1a ）圖。

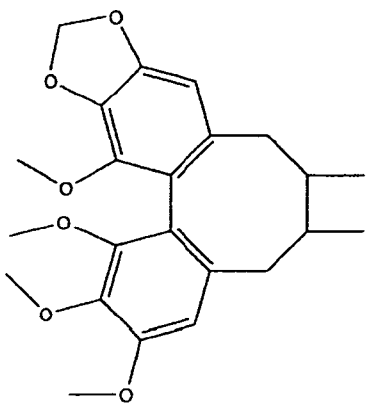
【本代表圖之符號簡單說明】：

（無）

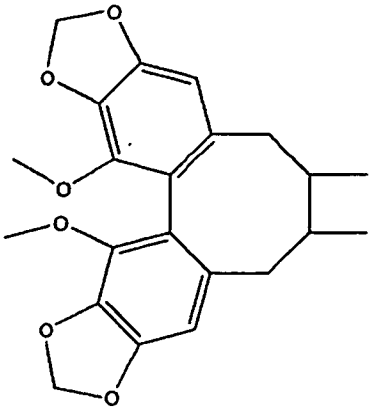
【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：



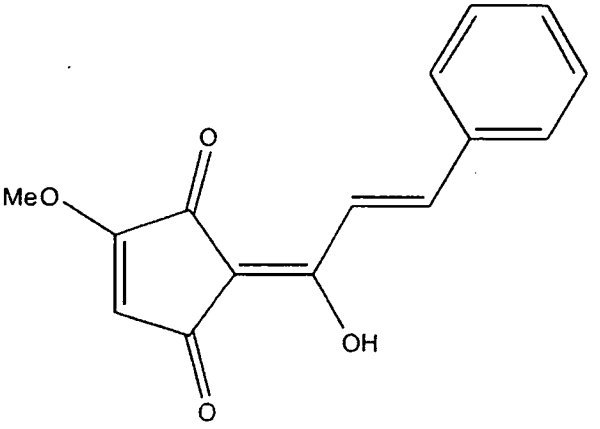
五味子甲素（schzandrin A）



五味子乙素（schzandrin B）



五味子丙素（schzandrin C）



赤芝酮（lucidone）

105 年 2 月 24 日修正替換本

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】（中文/英文）

五味子甲素之用途 / A Use of Schzandrin A

【技術領域】

【0001】 本發明係關於一種五味子甲素之用途，特別關於一種五味子甲素用以製備抗登革熱病毒之藥物的用途；本發明另關於五味子甲素作爲抗登革熱病毒之保健食品或營養補充品的用途。

【先前技術】

【0002】 黃病毒屬（flavivirus）爲一群單股正鏈 RNA 病毒，其係藉由感染之節肢動物（例如，蚊子或壁蝨等）的叮咬而傳遞，其中包含西尼羅河病毒（West Nile virus）、登革熱病毒（dengue virus）、日本腦炎病毒（Japanese encephalitis virus）、黃熱病毒（yellow fever virus）等。

【0003】 黃病毒屬病毒由於其染色體爲容易發生變異之 RNA，習用抗黃病毒屬病毒之藥物多係藉由抑制病毒之蛋白質活性以達成其療效，惟卻容易產生抗藥性，故確實仍有改善之空間。

【發明內容】

【0004】 本發明係提供一種五味子甲素之用途，係將五味子甲素用以製備抗登革熱病毒之藥物、保健食品或營養補充品者。

【0005】 本發明所述之五味子甲素之用途，係用以製備抗登革熱病毒之藥物，其中，五味子甲素係投予一所需個體，以抑制一登革熱病毒感染該所需個體。

【0006】 其中，五味子甲素係以口服之方式投予該所需個體。

【0007】 其中，五味子甲素係以每天每公斤體重之該所需個體投予 5～20 毫克之劑量投予該所需個體。

【0008】 其中，五味子甲素係以每天每公斤體重之該所需個體投予 10 毫克之劑量投予該所需個體。

【0009】 本發明之五味子甲素係可以抑制登革熱病毒之複製，且誘導登革熱病毒所抑制之干擾素生成作用，因而可以作爲製備抗登革熱病毒之藥物的活性成分，亦可以作爲抗登革熱病毒之保健食品或營養補充品的活性成分，爲本發明之功效。

【圖式簡單說明】

【0010】

第 1a 圖：係本發明五味子甲素之化學結構式。

第 1b 圖：係本發明五味子乙素之化學結構式。

第 1c 圖：係本發明五味子丙素之化學結構式。

第 2a 圖：係證實本發明五味子甲素對肝癌細胞無細胞毒性。

第 2b 圖：係證實本發明五味子乙素對肝癌細胞無細胞毒性。

第 2c 圖：係證實本發明五味子丙素對肝癌細胞無細胞毒性。

第 3a 圖：係證實本發明五味子甲素抑制登革熱病毒於肝癌細胞中之 RNA 複製能力。

第 3b 圖：係證實本發明五味子甲素抑制登革熱病毒於肝癌細胞中之非結構蛋白合成能力。

第 4a 圖：係證實本發明五味子乙素抑制登革熱病毒於肝癌細胞中之 RNA 複製能力。

第 4b 圖：係證實本發明五味子乙素抑制登革熱病毒於肝癌細胞中之非結構蛋白合成能力。

第 5a 圖：係證實本發明五味子丙素抑制登革熱病毒於肝癌細胞中之 RNA 複製能力。

第 5b 圖：係證實本發明五味子丙素抑制登革熱病毒於肝癌細胞中之

非結構蛋白合成能力。

第 6a 圖：係證實本發明五味子甲素誘導肝癌細胞表現干擾素 IFNα-2。

第 6b 圖：係證實本發明五味子甲素誘導肝癌細胞表現干擾素 IFNα-5。

第 6c 圖：係證實本發明五味子甲素誘導肝癌細胞表現干擾素 IFNα-17。

第 7a 圖：係證實本發明五味子甲素誘導肝癌細胞表現抗病毒基因 OAS-1。

第 7b 圖：係證實本發明五味子甲素誘導肝癌細胞表現抗病毒基因 OAS-2。

第 7c 圖：係證實本發明五味子甲素誘導肝癌細胞表現抗病毒基因 OAS-3。

第 7d 圖：係證實本發明五味子甲素誘導肝癌細胞表現抗病毒基因 PKR。

第 8a 圖：係證實本發明五味子甲素提升受登革熱病毒感染之乳鼠的臨床成績。

第 8b 圖：係證實本發明五味子甲素提升受登革熱病毒感染之乳鼠的生長狀態。

第 8c 圖：係證實本發明五味子甲素提升受登革熱病毒感染之乳鼠的存活率。

第 9a 圖：係證實本發明五味子甲素、五味子乙素、五味子丙素抑制日本腦炎病毒於肝癌細胞中之 RNA 複製能力。

第 9b 圖：係證實本發明五味子甲素、五味子乙素、五味子丙素抑制日本腦炎病毒於肝癌細胞中之非結構蛋白合成能力。

第 10 圖：係本發明赤芝酮之化學結構式。

第 11 圖：係證實本發明赤芝酮對肝癌細胞無細胞毒性。

第 12a 圖：係證實本發明赤芝酮抑制登革熱病毒於肝癌細胞中之 RNA 複製能力。

第 12b 圖：係證實本發明赤芝酮抑制登革熱病毒於肝癌細胞中之非結構蛋白合成能力。

第 13 圖：係證實本發明赤芝酮抑制登革熱病毒於肝癌細胞中之蛋白酶活性。

第 14a 圖：係證實本發明赤芝酮誘導肝癌細胞表現干擾素。

第 14b 圖：係證實本發明赤芝酮誘導肝癌細胞表現干擾素 IFNα-2。

第 14c 圖：係證實本發明赤芝酮誘導肝癌細胞表現干擾素 IFNα-17。

第 15a 圖：係證實本發明赤芝酮誘導肝癌細胞表現抗病毒基因 OAS-1。

第 15b 圖：係證實本發明赤芝酮誘導肝癌細胞表現抗病毒基因 OAS-2。

第 15c 圖：係證實本發明赤芝酮誘導肝癌細胞表現抗病毒基因 OAS-3。

第 15d 圖：係證實本發明赤芝酮誘導肝癌細胞表現抗病毒基因 PKR。

第 16a 圖：係證實本發明赤芝酮提升受登革熱病毒感染之乳鼠的生長狀態。

第 16b 圖：係證實本發明赤芝酮提升受登革熱病毒感染之乳鼠的存活率。

第 17a 圖：係證實本發明赤芝酮抑制日本腦炎病毒於肝癌細胞中之 RNA 複製能力。

第 17b 圖：係證實本發明赤芝酮抑制日本腦炎病毒於肝癌細胞中之非結構蛋白合成能力。

【實施方式】

【0011】 爲讓本發明之上述及其他目的、特徵及優點能更明顯易懂，下文特舉本發明之較佳實施例，並配合所附圖式，作詳細說明如下：

【0012】 本發明第一實施例所述之「五味子素」係爲五味子甲素

（schzandrin A，具有如第 1a 圖所示之化學結構式），其 IUPAC 名稱爲(6R,7S)-1,2, 3,10,11,12-六甲氧基-6,7-二甲基-5,6,7,8-環辛烯[a,c][8]輪烯（(6*R*,7*S*)-1,2,3,10,11,12-hexamethoxy-6,7-dimethyl-5,6,7,8-tetrahydrodibenzo[a,c][8]annulene）、五味子乙素（schzandrin B，具有如第 1b 圖所示之化學結構式），其 IUPAC 名稱爲(6R,7S)- 1,2,3,13-四甲氧基-6,7-二甲基-5,6,7,8-四氫苯並[3',4']環辛基 [1',2':4,5] 苯並 [1,2-d] [1,3] 間二氧環戊基（(6R,7S)-1,2,3,13-tetramethoxy-6,7-dimethyl-5,6,7,8-tetrahydrodibenzo[3',4']cycloocta[1',2':4,5]benzo[1,2-d][1,3]dioxole）及五味子丙素（schzandrin C，具有如第 1c 圖所示之化學結構式），其 IUPAC 名稱爲(6R,7S, 13aS)-5,6,7,8-四氫基-13,14-甲氧基-6,7-二甲基環辛基[1,2-f:3,4-f'] 雙 [1,3] 亞甲二氧基苯（(6R,7S,13aS)-5,6,7,8-tetrahydro-13,14-dimethoxy-6,7-dimethylcycloocta [1,2-f:3,4-f']bis[1,3]benzodioxole）之統稱，其可以爲化學合成之化合物，亦可以爲萃取自五味子（*Schisandra chinensis*）等植物之天然化合物，於此不加以限制。

【0013】 本發明第一實施例之五味子素係可以投予一所需個體，其劑量可以依據該所需個體之狀況加以調整，例如以每天每公斤體重之該所需個體投予 5～20 毫克之劑量將五味子素以口服之方式投予該個體，較佳能夠以每天每公斤體重之該所需個體投予 10 毫克之劑量將五味子素以口服之方式投予該個體，進而可以抑制黃病毒屬病毒之複製，且可以誘導黃病毒屬病毒所抑制之干擾素生成作用，因而可以作爲製備抗黃病毒屬病毒之藥物，或作爲抗黃病毒屬病毒之保健食品或營養補充品。

【0014】 爲證實本發明第一實施例之五味子素確實可以抑制黃病毒屬病毒之複製，且可以誘導黃病毒屬病毒所抑制之干擾素生成作用，進而可以應用於製備抗黃病毒屬病毒之藥物，遂進行以下試驗：

【0015】 （A）五味子素對肝癌細胞之細胞毒性

【0016】 請參照第 1 表所示，本試驗係選用人類肝癌細胞株 Huh-7 進行，係分別以 0、25、30、35、40 μM 之五味子素（溶於 0.1%之 DMSO）處理該肝癌細胞，於三天後以細胞毒性測試套組（MTS assay kit）觀察該肝癌細胞之細胞存活率，以未處理五味子素之肝癌細胞的細胞存活率作爲 100%。

【0017】 第 1 表、本試驗各組條件

組別	濃度
第 A0 組	0.1% DMSO
第 A1 組	25 μM 五味子素
第 A2 組	30 μM 五味子素
第 A3 組	35 μM 五味子素
第 A4 組	45 μM 五味子素

【0018】 請參照第 2a 圖所示，五味子甲素對該肝癌細胞並無顯著細胞毒性；此外，於第 2b 圖所示之五味子乙素、第 2c 圖所示之五味子丙素亦有相同的結果。

【0019】 （B）五味子素抑制登革熱病毒之生理活性

【0020】 請參照第 2 表所示，本試驗係分別以 0、25、30、35、40 μM 之五味子素處理受登革熱病毒感染之肝癌細胞，於三天後分別收取總蛋白質及總 RNA，以西方墨點法偵測非結構蛋白 NS2B 之蛋白質含量，另以反轉錄即時定量聚合酶連鎖反應（RT-qPCR）偵測非結構蛋白 NS5 之 RNA 含量，並以 GAPDH 之蛋白質含量及 RNA 含量作爲內控制組。

【0021】 第 2 表、本試驗各組條件

組別	登革熱病毒感染	濃度

第 B0 組	+	0.1% DMSO
第 B1 組	+	25 μM 五味子素
第 B2 組	+	30 μM 五味子素
第 B3 組	+	35 μM 五味子素
第 B4 組	+	45 μM 五味子素

【0022】 請參照第 3a、3b 圖所示，五味子甲素對於登革熱病毒之蛋白質生成、RNA 複製均有顯著抑制效果，且其濃度與抑制效果呈正相關；此外，於第 4a、4b 圖所示之五味子乙素、第 5a、5b 圖所示之五味子丙素亦有相同的結果。

【0023】 （C）五味子素提升肝癌細胞之抗病毒能力

【0024】 請參照第 3 表所示，本試驗係分別以 0、25、30、35、40 μM 之五味子甲素處理受登革熱病毒感染之肝癌細胞，於三天後收取總 RNA，以反轉錄即時定量聚合酶連鎖反應（RT-qPCR）偵測干擾素基因 IFNα-2、IFNα-5 及 IFNα-17 之 RNA 含量，並以 GAPDH 之 RNA 含量作爲內控制組。

【0025】 第 3 表、本試驗各組條件

組別	登革熱病毒感染	濃度
第 C0 組	+	0.1% DMSO
第 C1 組	+	25 μM 五味子甲素
第 C2 組	+	30 μM 五味子甲素
第 C3 組	+	35 μM 五味子甲素
第 C4 組	+	45 μM 五味子甲素

【0026】 請參照第 6a 圖所示，五味子甲素可以有效提升干擾素 IFNα-2 的合成，且其濃度與提升效果呈正相關；此外，於第 6b 圖所示之

IFNα-5、第 6c 圖所示之 IFNα-17 亦有相同的結果。

【0027】 仍請參照第 3 表所示，本試驗續分別以 0、25、30、35、40 μM 之五味子甲素處理受登革熱病毒感染之肝癌細胞，於三天後收取總 RNA，以反轉錄即時定量聚合酶連鎖反應（RT-qPCR）偵測抗病毒基因 2'-5' 寡腺苷酸合成酶 1（2'-5'-oligoadenylate synthetase 1，簡稱 OAS1）、OAS2、OAS3 及蛋白質激酶 R（protein kinase R，簡稱 PKR）之 RNA 含量，並以 GAPDH 之 RNA 含量作爲內控制組，其結果如第 7a 圖所示，五味子甲素可以有效提升抗病毒基因 OAS1 的合成，且其濃度與提升效果呈正相關；此外，於第 7b 圖所示之 OAS2、第 7c 圖所示之 OAS3 及第 8d 圖所示之 PKR 亦有相同的結果。

【0028】 （D）五味子素提升乳鼠對抗登革熱病毒之能力

【0029】 請參照第 4 表所示，本試驗係選用 ICR 乳鼠，以腦內注射之方式將 2.5×10^5 PFU 之登革熱病毒感染出生後 4 天之乳鼠，並於感染後的第 1、3、5 天分別投予五味子甲素；於試驗過程中每天觀察該乳鼠之外觀、活動行爲，評估其臨床成績，另紀錄該乳鼠之體重增長，以及該乳鼠之存活率。

【0030】 第 4 表、本試驗各組條件

組別	登革熱病毒感染	投藥
第 D0 組	－ （感染已失活之病毒）	－
第 D1 組	＋	－
第 D2 組	＋	五味子甲素 （10 mg/kg/次）

【0031】 請參照第 8a 圖所示，感染登革熱病毒之第 D1 組乳鼠的臨床

成績呈上升勢，顯示其生理狀態漸漸惡化，而同時投予五味子甲素之第 D2 組乳鼠的臨床成績的上升趨勢則較爲緩和，顯示五味子甲素可以改善感染登革熱病毒之症狀；續請參照第 8b 圖所示，五味子素之投予亦可以改善感染登革熱病毒後的體重下降現象；另請參照第 8c 圖所示，同時投予五味子甲素更可以有效改善感染登革熱病毒所造成之死亡現象。

【0032】 （E）五味子素抑制日本腦炎病毒之生理活性

【0033】 請參照第 5 表所示，本試驗係分別以 0、25、30、35、40 μM 之五味子素處理受日本腦炎病毒感染之肝癌細胞，於三天後分別收取總蛋白質及總 RNA，以西方墨點法偵測非結構蛋白 NS2B 之蛋白質含量，另以反轉錄即時定量聚合酶連鎖反應（RT-qPCR）偵測非結構蛋白 NS5 之 RNA 含量，並以 GAPDH 之蛋白質含量及 RNA 含量作爲內控制組。

【0034】 第 5 表、本試驗各組條件

組別	日本腦炎病毒感染	濃度
第 E0 組	+	0.1% DMSO
第 E1 組	+	30 μM 五味子甲素
第 E2 組	+	40 μM 五味子甲素
第 E3 組	+	30 μM 五味子乙素
第 E4 組	+	40 μM 五味子乙素
第 E5 組	+	30 μM 五味子丙素
第 E6 組	+	40 μM 五味子丙素

【0035】 請參照第 9a、9b 圖所示，五味子甲素、五味子乙素及五味子丙素對於日本腦炎病毒之蛋白質生成、RNA 合成均有顯著抑制效果。

【0036】 綜合上述試驗結果，本發明第一實施例之五味子素可以抑制黃病毒屬病毒之 RNA 的複製及蛋白質的生成，同時亦可以誘導黃病毒屬病

毒所抑制之干擾素生成作用，使受感染之細胞能夠正常生成干擾素，進而可以使干擾素下游之抗病毒基因正常作用，因而本發明之五味子素可以改善受到黃病毒屬病毒感染之哺乳類動物的正常生理狀態，改善哺乳動物受到黃病毒屬病毒感染所造成之死亡現象。

【0037】 又，本發明第二實施例所述之「赤芝酮」係具有如第 10 圖所示之化學結構式，其 IUPAC 名稱爲 2-[(1Z,2E)-1-羥基-3-苯基-2-亞丙烯基]-4-甲基-4-環戊基-1,3-二酮（2-[(1Z,2E)-1-hydroxy-3-phenyl-2-propenylidene]-4-methoxy-4-cyclopentene-1,3-dione），其可以爲化學合成之化合物，或者爲萃取自靈芝（*Ganoderma lucidum*）、紅果釣樟（*Lindera erythrocarpa* Makino）等植物之天然化合物，於此不加以限制。

【0038】 本發明第二實施例之赤芝酮係可以投予一所需個體，其劑量可以依據該所需個體之狀況加以調整，例如以每天每公斤體重之該所需個體投予 2～5 毫克之劑量將赤芝酮以靜脈注射之方式投予該所需個體，較佳能夠以每天每公斤體重之該所需個體投予 4.8 毫克之劑量將赤芝酮以靜脈注射之方式投予該所需個體，進而可以抑制黃病毒屬病毒之複製，且可以誘導黃病毒屬病毒所抑制之干擾素生成作用，因而可以作爲製備抗黃病毒屬病毒之藥物，或作爲抗黃病毒屬病毒之保健食品或營養補充品。

【0039】 爲證實本發明第二實施例之赤芝酮確實可以抑制黃病毒屬病毒之複製，且可以誘導黃病毒屬病毒所抑制之干擾素生成作用，進而可以應用於製備抗黃病毒屬病毒之藥物，遂進行以下試驗：

【0040】 （F）赤芝酮對肝癌細胞之細胞毒性

【0041】 請參照第 6 表所示，本試驗係分別以 0、5、10、20、40 μM 之赤芝酮（溶於 0.1%之 DMSO）處理該肝癌細胞，於三天後以細胞毒性測試套組（MTS assay kit）觀察該肝癌細胞之細胞存活率，以未處理赤芝酮

之肝癌細胞的細胞存活率作爲 100%。

【0042】 第 6 表、本試驗各組條件

組別	濃度
第 F0 組	0.1% DMSO
第 F1 組	5 μM 赤芝酮
第 F2 組	10 μM 赤芝酮
第 F3 組	20 μM 赤芝酮
第 F4 組	40 μM 赤芝酮

【0043】 請參照第 11 圖所示，赤芝酮對該肝癌細胞並無顯著細胞毒性。

【0044】 （G）赤芝酮抑制登革熱病毒之生理活性

【0045】 請參照第 7 表所示，本試驗係分別 0、5、10、20、40 μM 之赤芝酮處理受登革熱病毒感染之肝癌細胞，於三天後分別收取總蛋白質及總 RNA，以西方墨點法偵測非結構蛋白 NS2B 之蛋白質含量，另以反轉錄即時定量聚合酶連鎖反應（RT-qPCR）偵測非結構蛋白 NS5 之 RNA 含量，並以 GAPDH 之蛋白質含量及 RNA 含量作爲內控制組。

【0046】 第 7 表、本試驗各組條件

組別	登革熱病毒感染	濃度
第 G0 組	+	0.1% DMSO
第 G1 組	+	5 μM 赤芝酮
第 G2 組	+	10 μM 赤芝酮
第 G3 組	+	20 μM 赤芝酮
第 G4 組	+	40 μM 赤芝酮

【0047】 請參照第 12a、12b 圖所示，赤芝酮對於登革熱病毒之蛋白質生成、RNA 複製均有顯著抑制效果，且其濃度與抑制效果呈正相關。

【0048】 仍請參照第 7 表所示，本試驗另於受登革熱病毒感染之肝癌細胞轉染 NS2B/3 表現載體 pCMV-NS2B/3-Myc 及 NS2B/3 反應載體 pEGFP-LRRG-SEAP，續以 0、5、10、20、40 μM 之赤芝酮處理前述肝癌細胞，於三天後偵測 SEAP 之活性，其結果如第 13 圖所示，赤芝酮對於登革熱病毒之蛋白酶活性具有顯著抑制效果，且其濃度與抑制效果呈正相關。

【0049】 （H）五味子素提升肝癌細胞之抗病毒能力

【0050】 請參照第 8 表所示，本試驗係於受登革熱病毒感染之肝癌細胞轉染 IFN 冷光報導載體 pISRE-Luc，並分別以 0、5、10、20、40 μM 之赤芝酮處理受登革熱病毒感染之肝癌細胞，於三天後收取總蛋白質，並分析冷光酵素活性。

【0051】 第 8 表、本試驗各組條件

組別	登革熱病毒感染	濃度
第 H0 組	+	0.1% DMSO
第 H1 組	+	5 μM 赤芝酮
第 H2 組	+	10 μM 赤芝酮
第 H3 組	+	20 μM 赤芝酮
第 H4 組	+	40 μM 赤芝酮

【0052】 請參照第 14a 圖所示，赤芝酮有效提升 IFN 冷光酵素活性，且其濃度與提升效果呈正相關。

【0053】 仍請參照第 8 表所示，本試驗續分別以 0、20、40 μM 之赤芝酮處理受登革熱病毒感染之肝癌細胞，於三天後收取總 RNA，以反轉錄即時定量聚合酶連鎖反應（RT-qPCR）偵測干擾素 IFNα-2 及 IFNα-17 之

RNA 含量，並以 GAPDH 之 RNA 含量作爲內控制組，其結果如第 14b 圖所示，赤芝酮可以有效提升干擾素 IFNα-2 的合成，且其濃度與提升效果呈正相關；此外，於第 14c 圖所示之 IFNα-17 亦有相同的結果。

【0054】 仍請參照第 8 表所示，本試驗續分別以 0、20、40 μM 之赤芝酮處理受登革熱病毒感染之肝癌細胞，於三天後收取總 RNA，以反轉錄即時定量聚合酶連鎖反應（RT-qPCR）偵測抗病毒基因 OAS1、OAS2、OAS3 及 PKR 之 RNA 含量，並以 GAPDH 之 RNA 含量作爲內控制組，其結果如第 15a 圖所示，赤芝酮可以有效提升抗病毒基因 OAS1 的合成，且其濃度與提升效果呈正相關；此外，於第 15b 圖所示之 OAS2、第 15c 圖所示之 OAS3 及第 15d 圖所示之 PKR 亦有相同的結果。

【0055】 （I）赤芝酮提升乳鼠對抗登革熱病毒之能力

【0056】 請參照第 9 表所示，本試驗係選用 ICR 乳鼠，以腦內注射之方式將 2×10^5 PFU 之登革熱病毒感染出生後 6 天之乳鼠，並於感染後的第 1、3、5 天分別投予赤芝酮；於試驗過程中每天該乳鼠之體重增長，以及該乳鼠之存活率。

【0057】 第 9 表、本試驗各組條件

組別	登革熱病毒感染	投藥
第 I0 組	－ （感染已失活之病毒）	－
第 I1 組	＋	－
第 I2 組	＋	赤芝酮 （0.4 mg/kg/次）
第 I3 組	＋	赤芝酮 （1 mg/kg/次）

【0058】 請參照第 16a 圖所示，感染登革熱病毒之第 I1 組乳鼠的體重幾乎沒有增長，顯示其生理狀態漸漸惡化，而同時投予赤芝酮則可以改善感染登革熱病毒後的體重下降現象；另請參照第 16b 圖所示，同時投予赤芝酮亦可以有效改善感染登革熱病毒所造成之死亡現象。

【0059】 此外，本試驗另將第 I1、I2 組乳鼠於感染 6 天後犧牲，續取乳鼠腦部組織之病毒上清液感染倉鼠腎臟細胞，並以結晶紫染色計算病毒數量，其結果如第 10 表所示，同時投予赤芝酮可以減低乳鼠腦部組織之病毒數量。

【0060】 第 10 表、本試驗各組病毒數量

組別	病毒數量（PFU/g）
第 I1 組	5×10^{6}
第 I2 組	2.5×10^{4}

【0061】 （J）赤芝酮抑制日本腦炎病毒之生理活性

【0062】 請參照第 11 表所示，本試驗係分別以 0、20、40 μM 之赤芝酮處理受日本腦炎病毒感染之肝癌細胞，於三天後分別收取總蛋白質及總 RNA，以西方墨點法偵測非結構蛋白 NS2B 之蛋白質含量，另以反轉錄即時定量聚合酶連鎖反應（RT-qPCR）偵測非結構蛋白 NS5 之 RNA 含量，並以 GAPDH 之蛋白質含量及 RNA 含量作爲內控制組。

【0063】 第 11 表、本試驗各組條件

組別	日本腦炎病毒感染	濃度
第 J0 組	+	0.1% DMSO
第 J1 組	+	20 μM 赤芝酮
第 J2 組	+	40 μM 赤芝酮

【0064】 請參照第 17a、17b 圖所示，赤芝酮對於日本腦炎病毒之蛋白質生成、RNA 合成均有顯著抑制效果。

【0065】 綜合上述試驗結果，本發明第二實施例之赤芝酮可以抑制黃病毒屬病毒之 RNA 的複製及蛋白質的生成，同時亦可以誘導黃病毒屬病毒所抑制之干擾素生成作用，使受感染之細胞能夠正常生成干擾素，進而可以使干擾素下游之抗病毒基因正常作用，因而本發明之赤芝酮可以改善受到黃病毒屬病毒感染之哺乳類動物的正常生理狀態，改善哺乳動物受到黃病毒屬病毒感染所造成之死亡現象。

【0066】 綜合上述，本發明之五味子甲素係可以抑制登革熱病毒之複製，且誘導登革熱病毒所抑制之干擾素生成作用，因而可以作爲製備抗登革熱病毒之藥物的活性成分，或作爲抗登革熱病毒之保健食品或營養補充品的活性成分，爲本發明之功效。

【0067】 雖然本發明已利用上述較佳實施例揭示，然其並非用以限定本發明，任何熟習此技藝者在不脫離本發明之精神和範圍之內，相對上述實施例進行各種更動與修改仍屬本發明所保護之技術範疇，因此本發明之保護範圍當視後附之申請專利範圍所界定者爲準。

【符號說明】

（無）

【生物材料寄存】

國內寄存資訊【請依寄存機構、日期、號碼順序註記】

（無）

國外寄存資訊【請依寄存國家、機構、日期、號碼順序註記】

（無）

【序列表】(請換頁單獨記載)

公告本

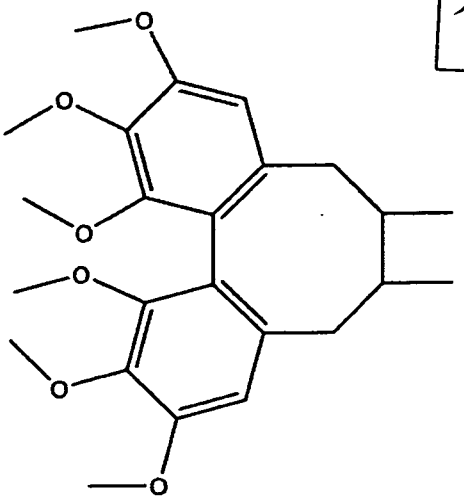
105 年 2 月 24 日修正替換本

申請專利範圍

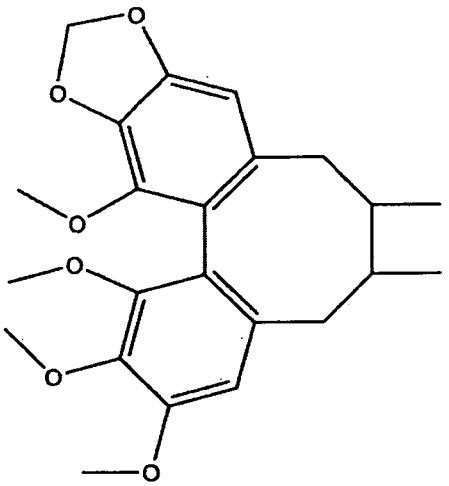
1. 一種五味子甲素之用途，係用以製備抗登革熱病毒之藥物、保健食品或營養補充品，其中，五味子甲素係投予一所需個體，以抑制一登革熱病毒感染該所需個體。
2. 如申請專利範圍第 1 項所述之五味子甲素之用途，其中，五味子甲素係以口服之方式投予該所需個體。
3. 如申請專利範圍第 1 或 2 項所述之五味子甲素之用途，其中，五味子甲素係以每天每公斤體重之該所需個體投予 5～20 毫克之劑量投予該所需個體。
4. 如申請專利範圍第 3 項所述之五味子甲素之用途，其中，五味子甲素係以每天每公斤體重之該所需個體投予 10 毫克之劑量投予該所需個體。

圖式

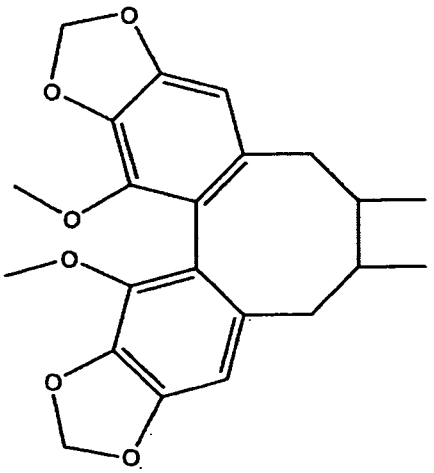
公告本



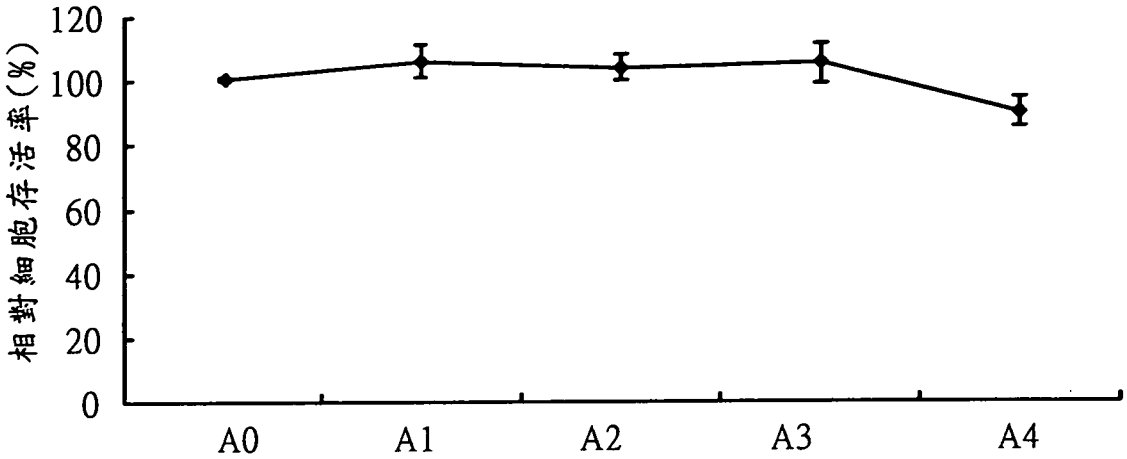
第 1a 圖



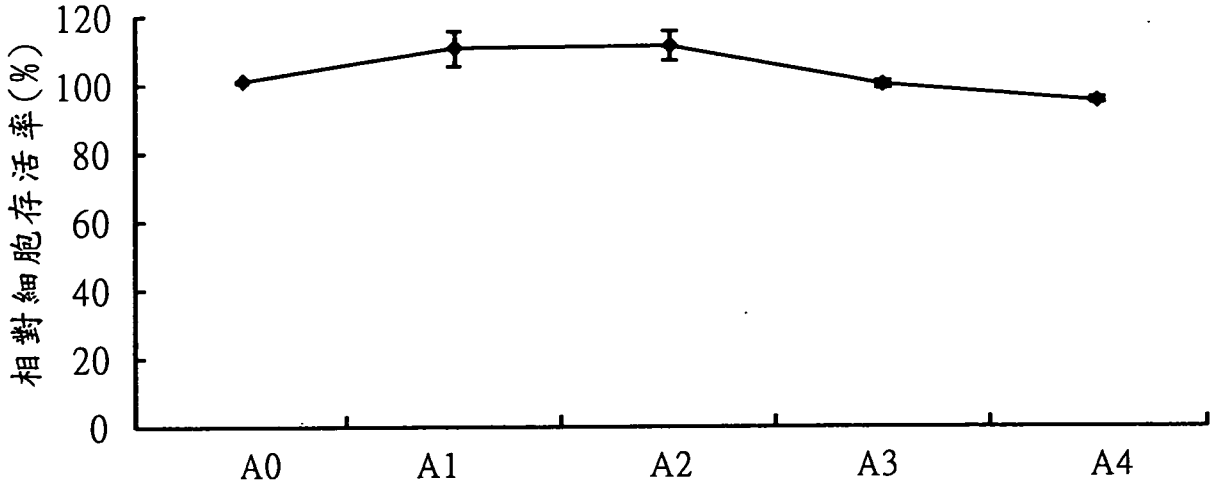
第 1b 圖



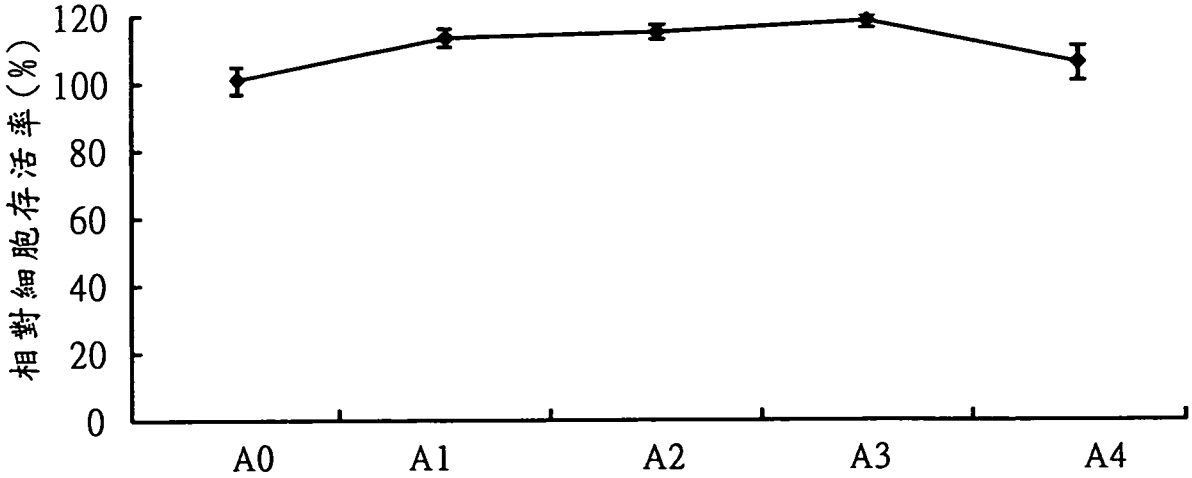
第 1c 圖



第 2a 圖



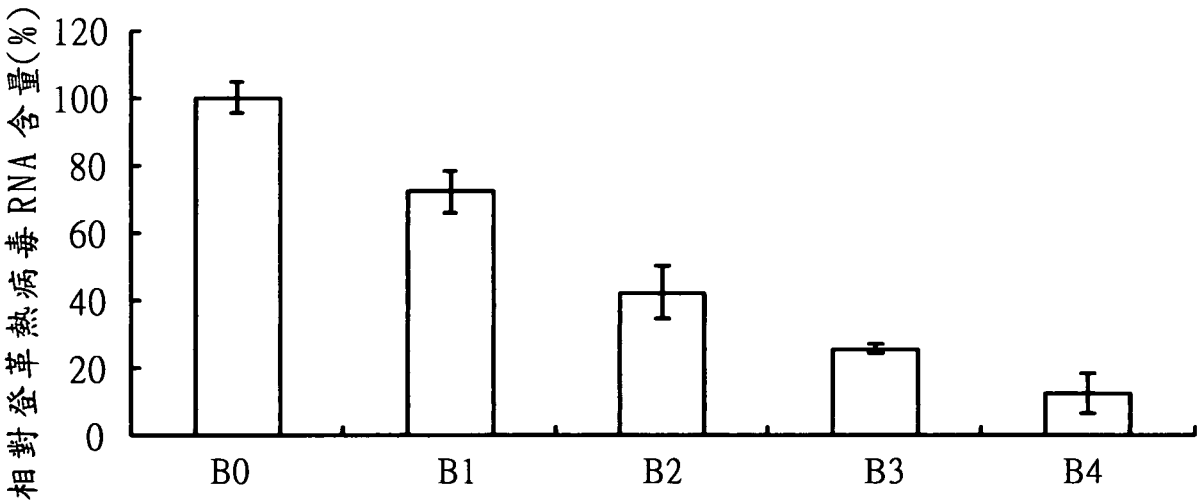
第 2b 圖



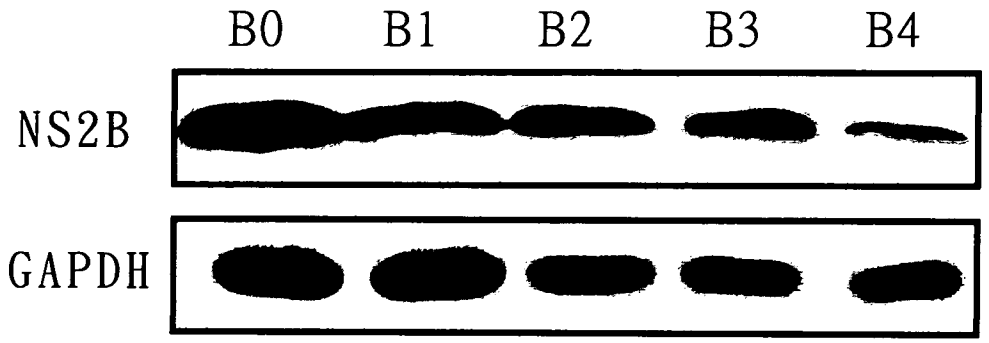
第 2c 圖

B0
B1
B2
B3
B4
NS2B
GAPDH

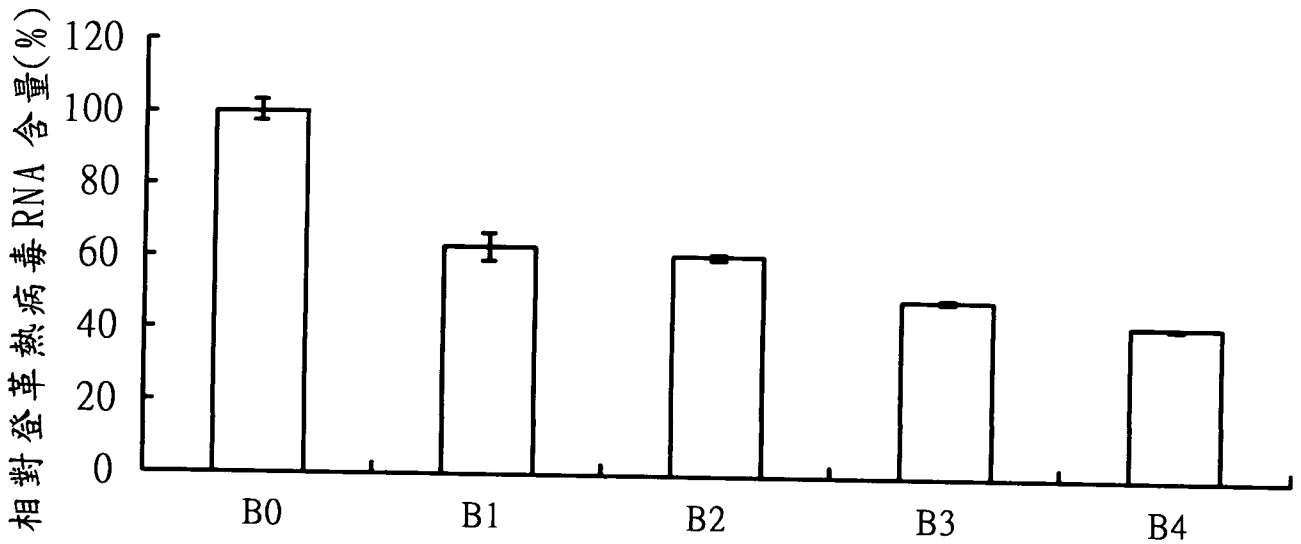
第 3a 圖


相對登革熱病毒 RNA 含量(%)
120
100
80
60
40
20
0
B0
B1
B2
B3
B4

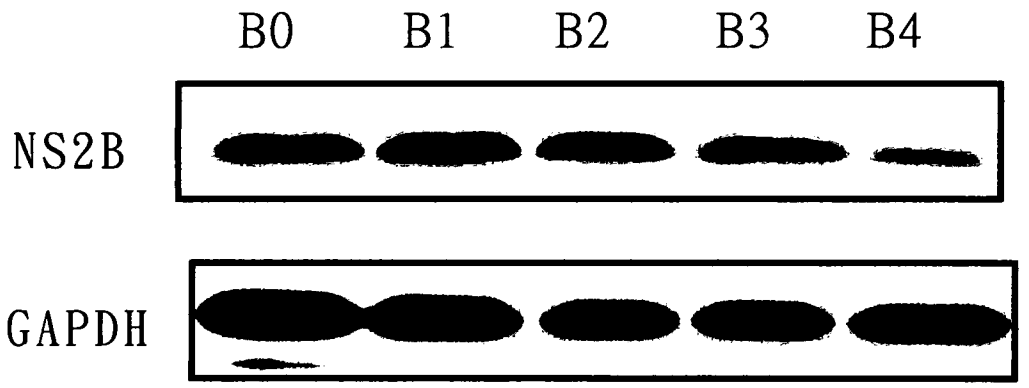
第 3b 圖


B0
B1
B2
B3
B4
NS2B
GAPDH

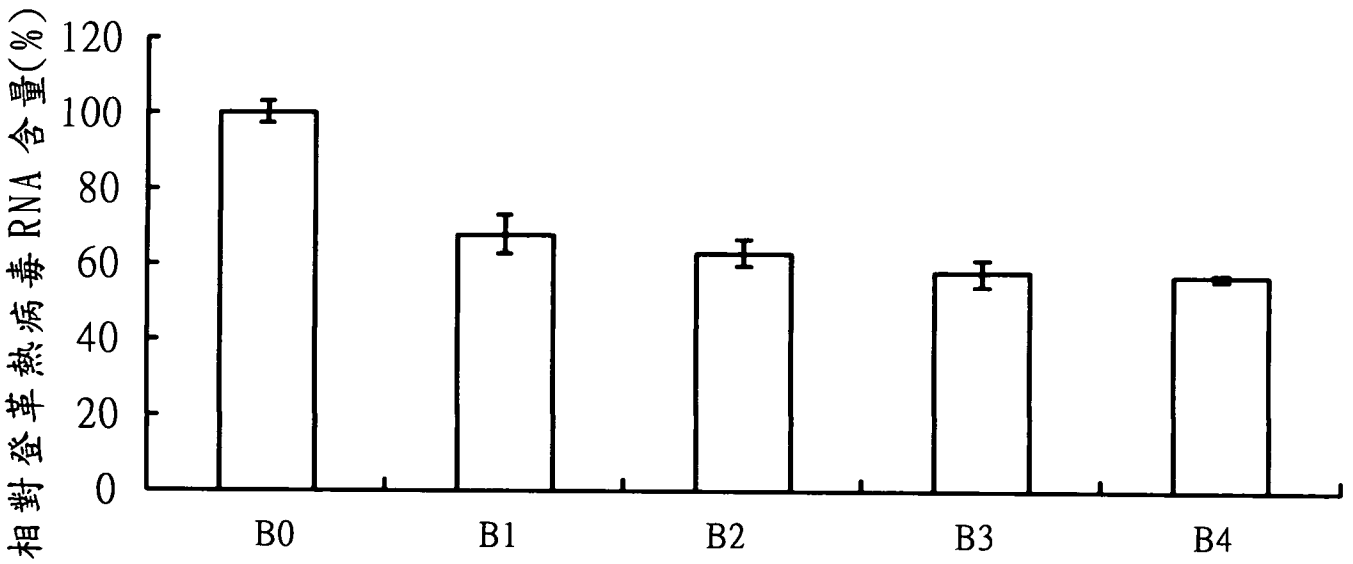
第 4a 圖


相對登革熱病毒RNA含量(%)
120
100
80
60
40
20
0
B0
B1
B2
B3
B4

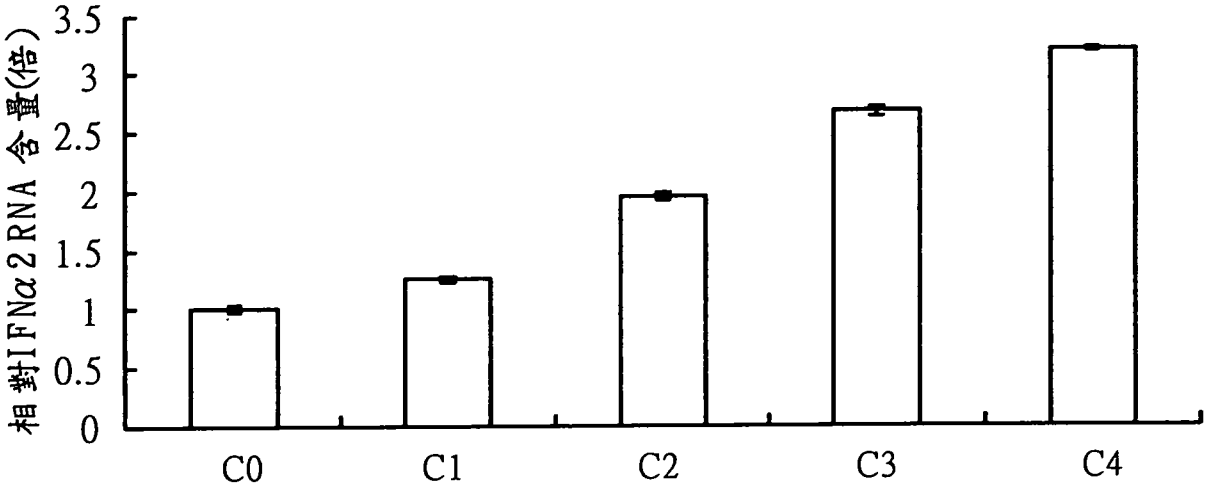
第 4b 圖


B0
B1
B2
B3
B4
NS2B
GAPDH

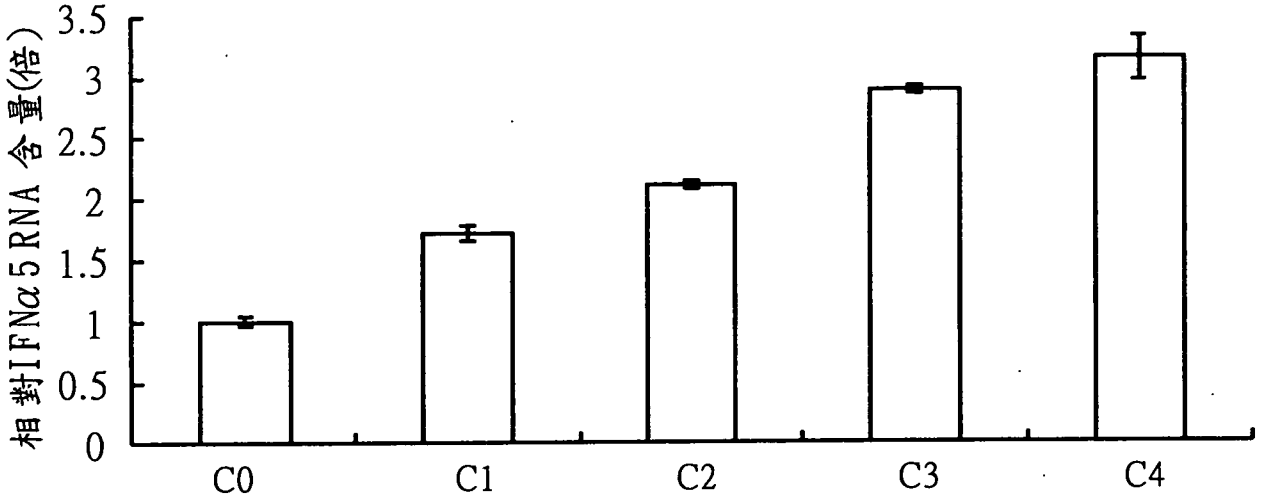
第 5a 圖


相對登革熱病毒RNA含量(%)
120
100
80
60
40
20
0
B0
B1
B2
B3
B4

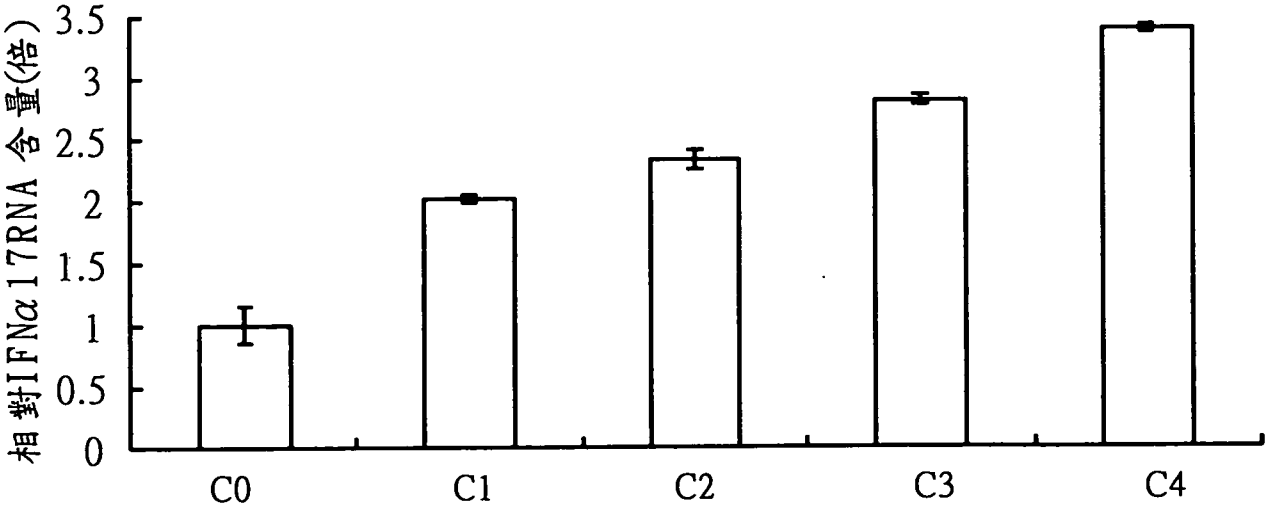
第 5b 圖



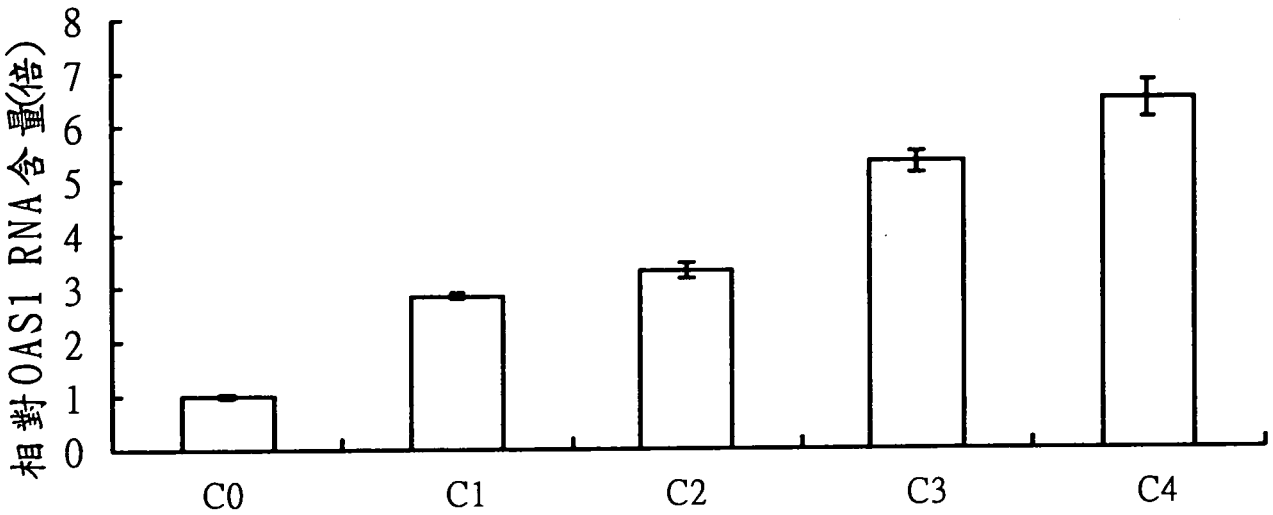
第 6a 圖



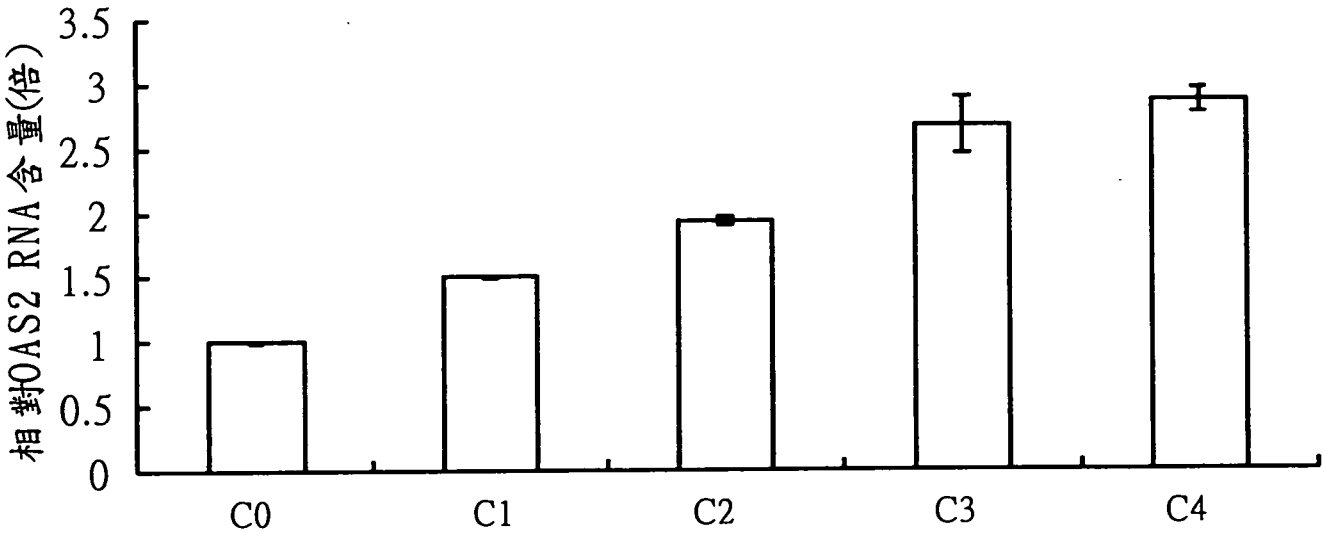
第 6b 圖



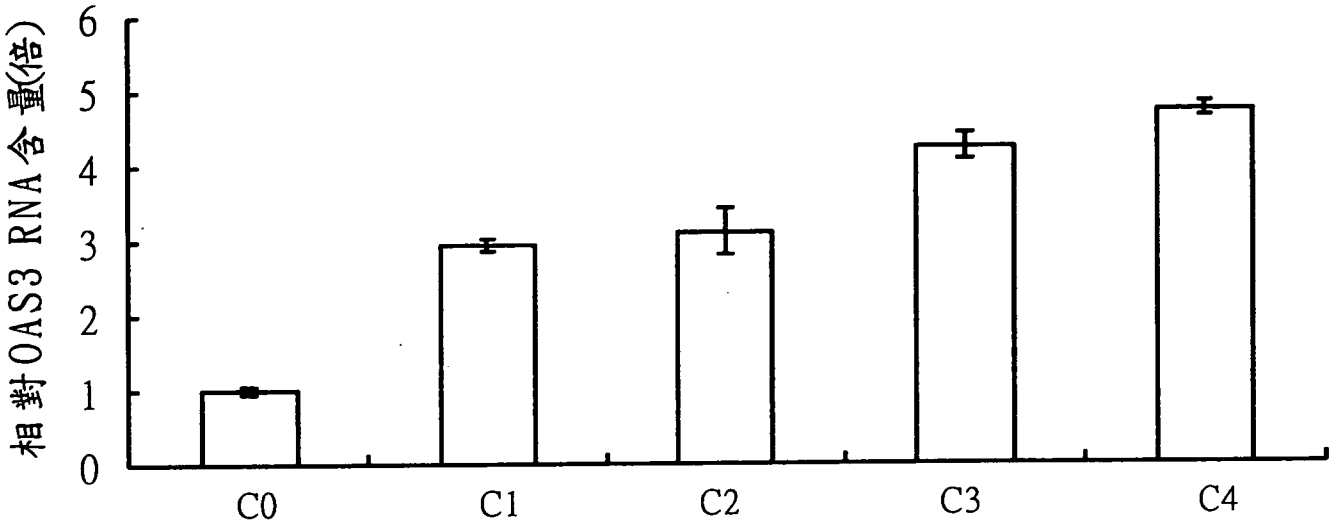
第 6c 圖


相對OAS1 RNA含量(倍)
0
1
2
3
4
5
6
7
8
C0
C1
C2
C3
C4

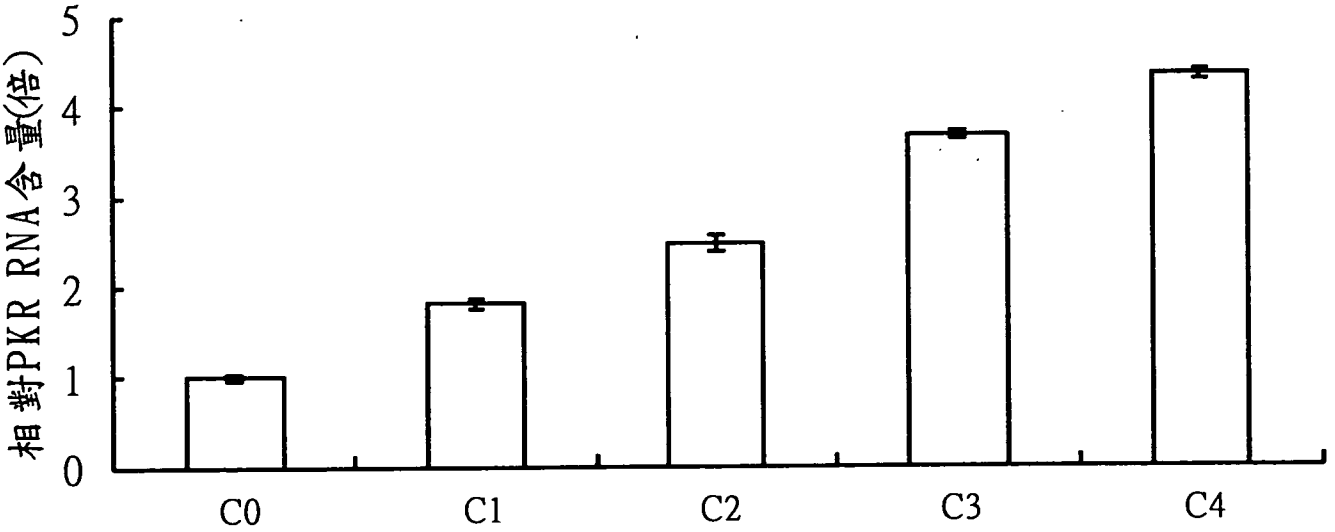
第 7a 圖


相對OAS2 RNA含量(倍)
0
0.5
1
1.5
2
2.5
3
3.5
C0
C1
C2
C3
C4

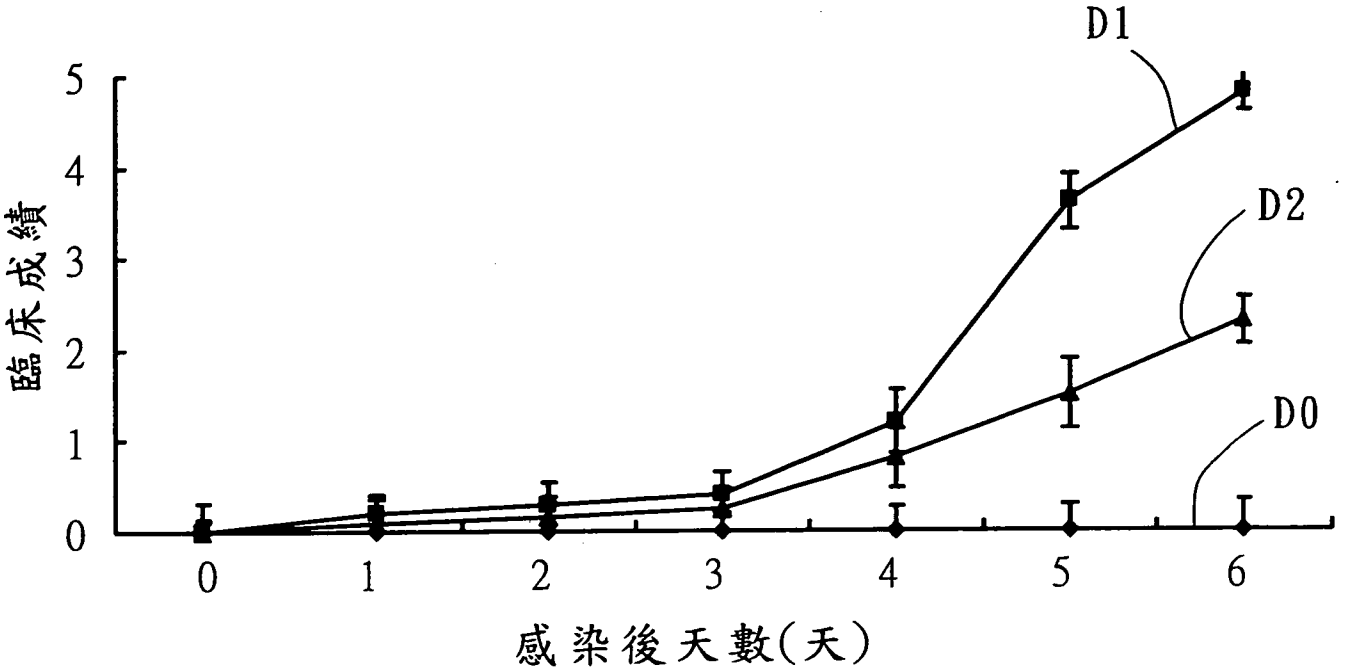
第 7b 圖


相對OAS3 RNA含量(倍)
0
1
2
3
4
5
6
C0
C1
C2
C3
C4

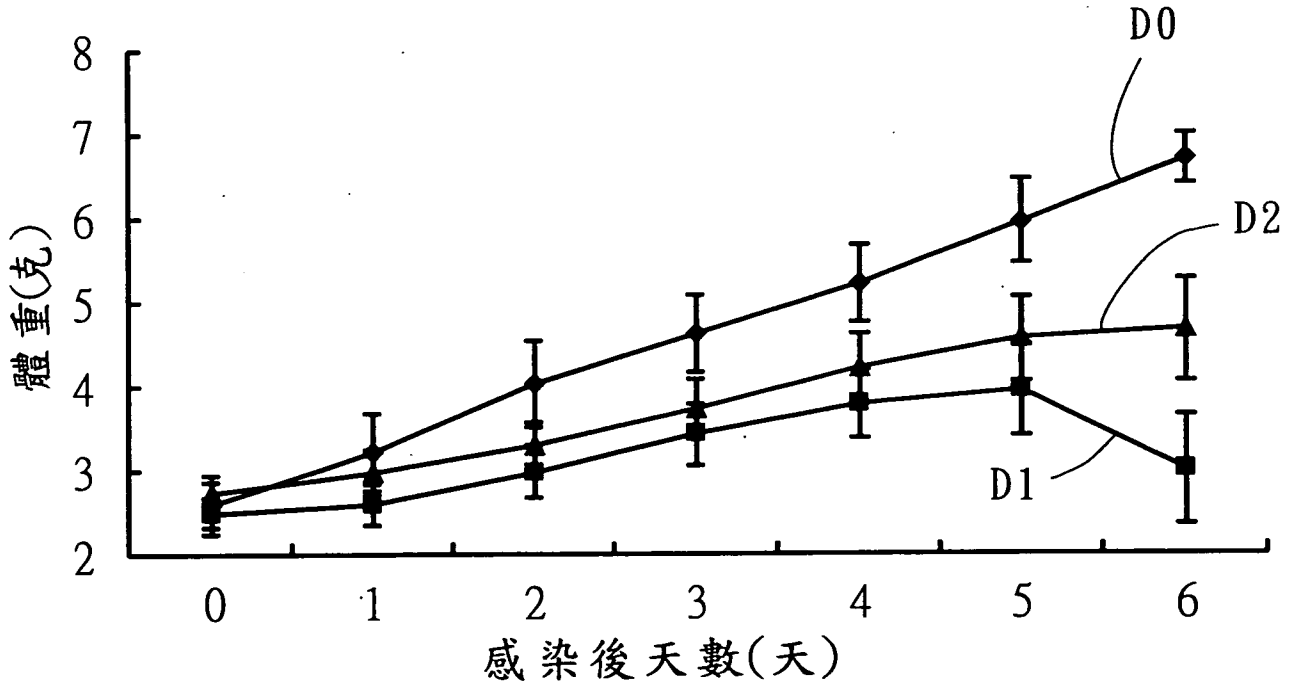
第 7c 圖


相對PKR RNA含量(倍)
0
1
2
3
4
5
C0
C1
C2
C3
C4

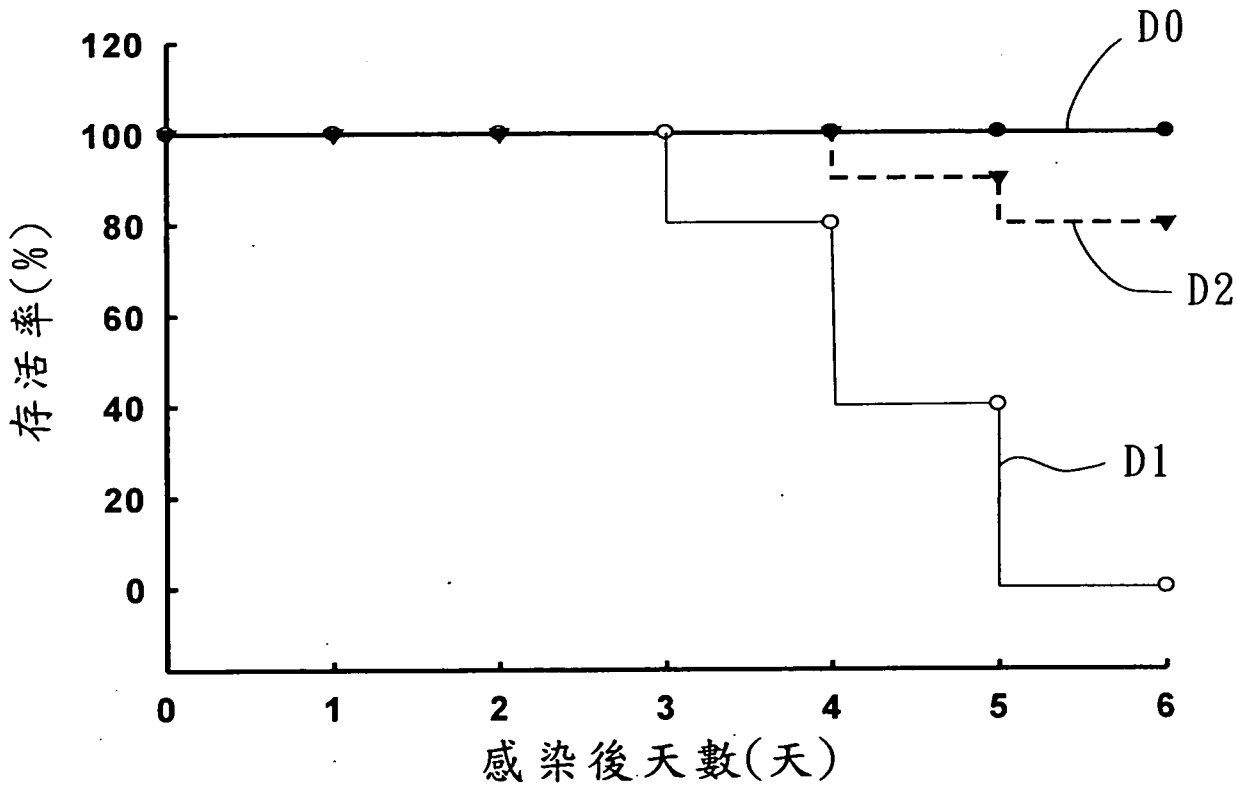
第 7d 圖


D1
D2
D0
臨床成績
0
1
2
3
4
5
0
1
2
3
4
5
6
感染後天數(天)

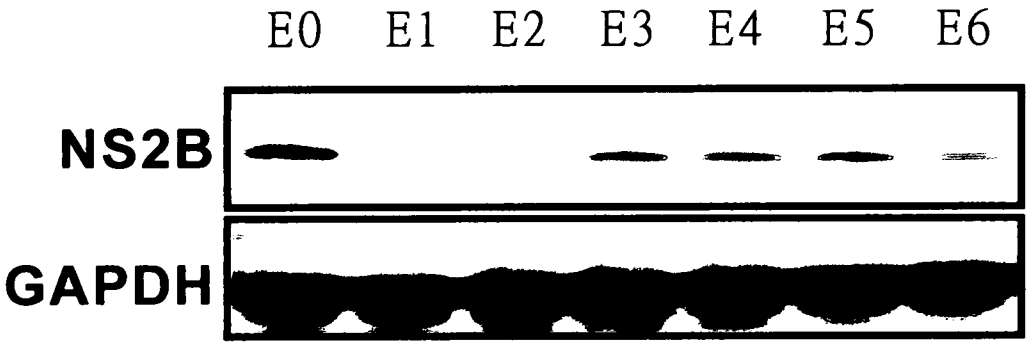
第 8a 圖


D0
D2
D1
體重(克)
2
3
4
5
6
7
8
0
1
2
3
4
5
6
感染後天數(天)

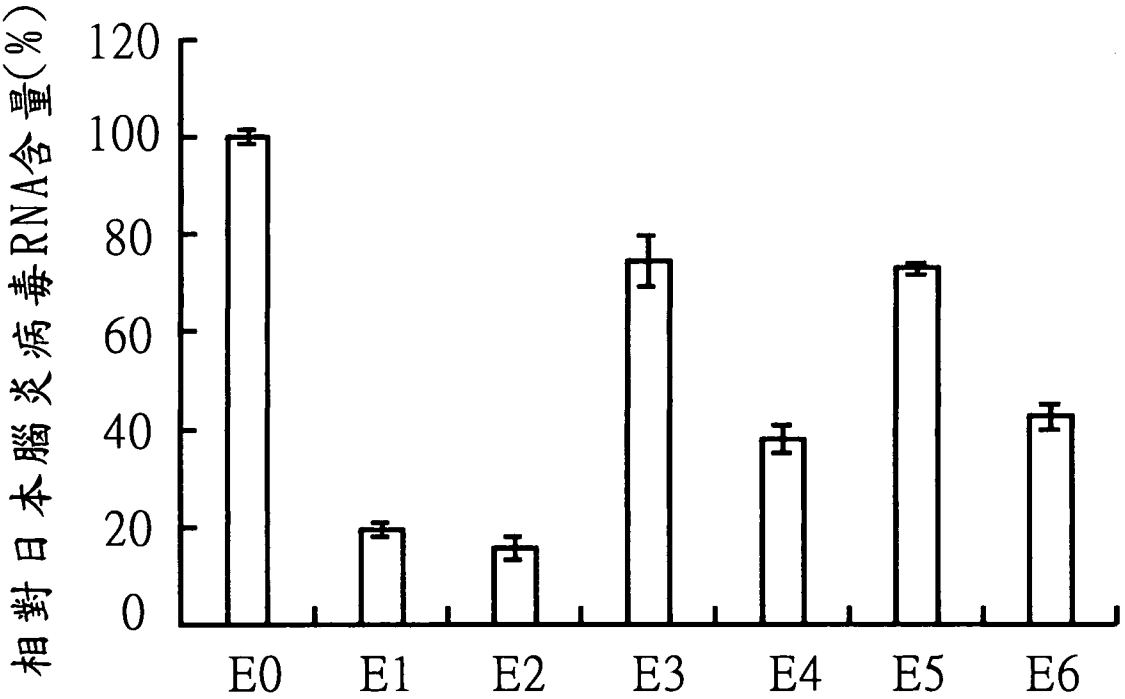
第 8b 圖



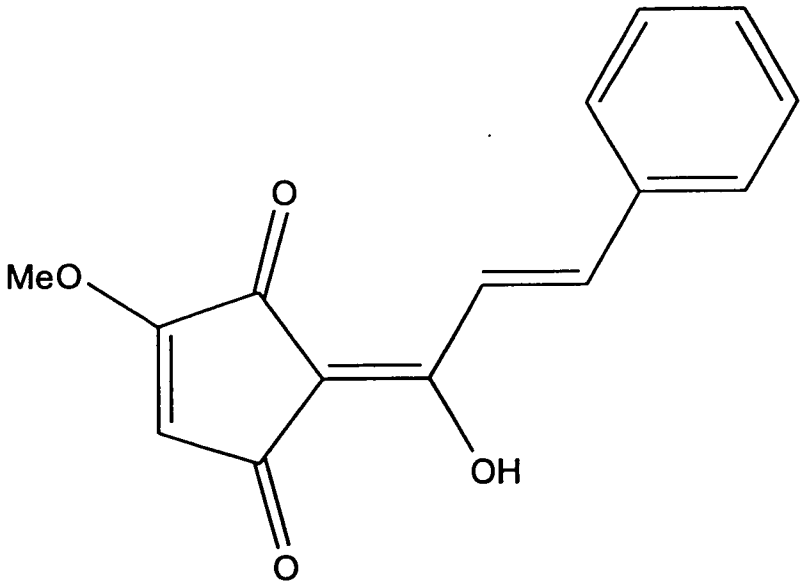
第 8c 圖


E0
E1
E2
E3
E4
E5
E6
NS2B
GAPDH

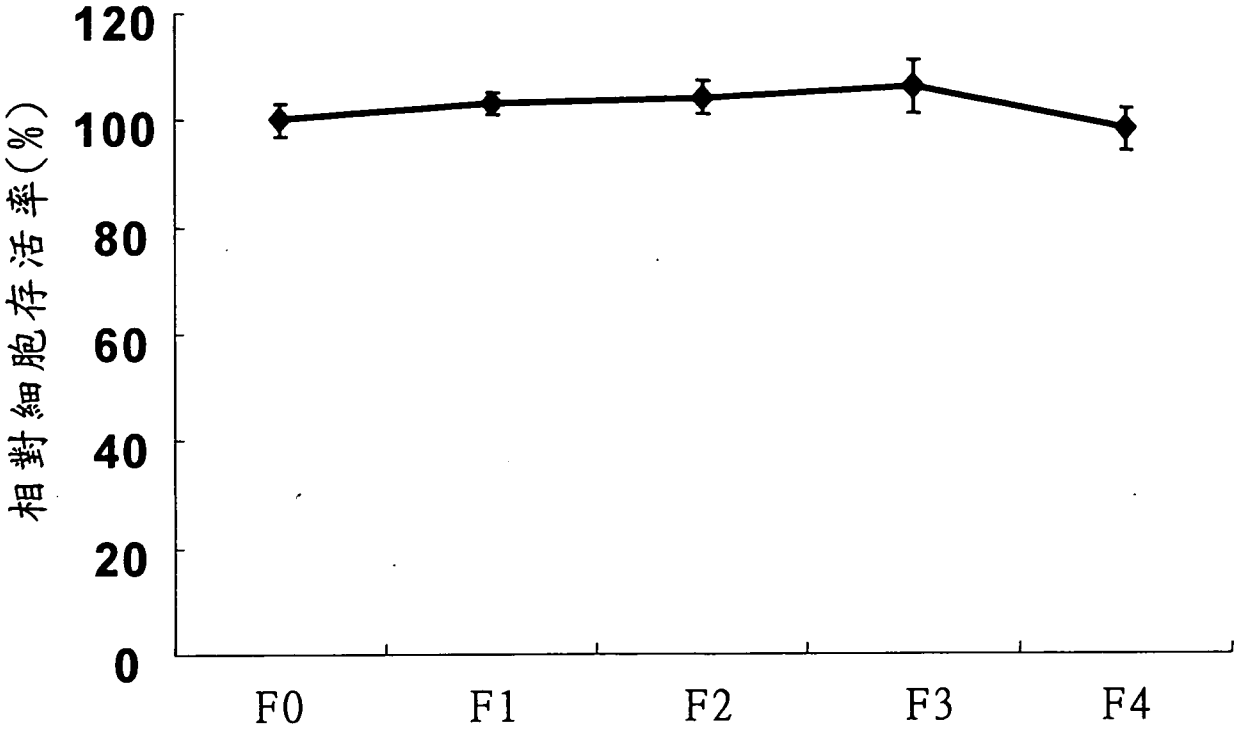
第 9a圖


相對日本腦炎病毒RNA含量(%)
120
100
80
60
40
20
0
E0
E1
E2
E3
E4
E5
E6

第 9b 圖



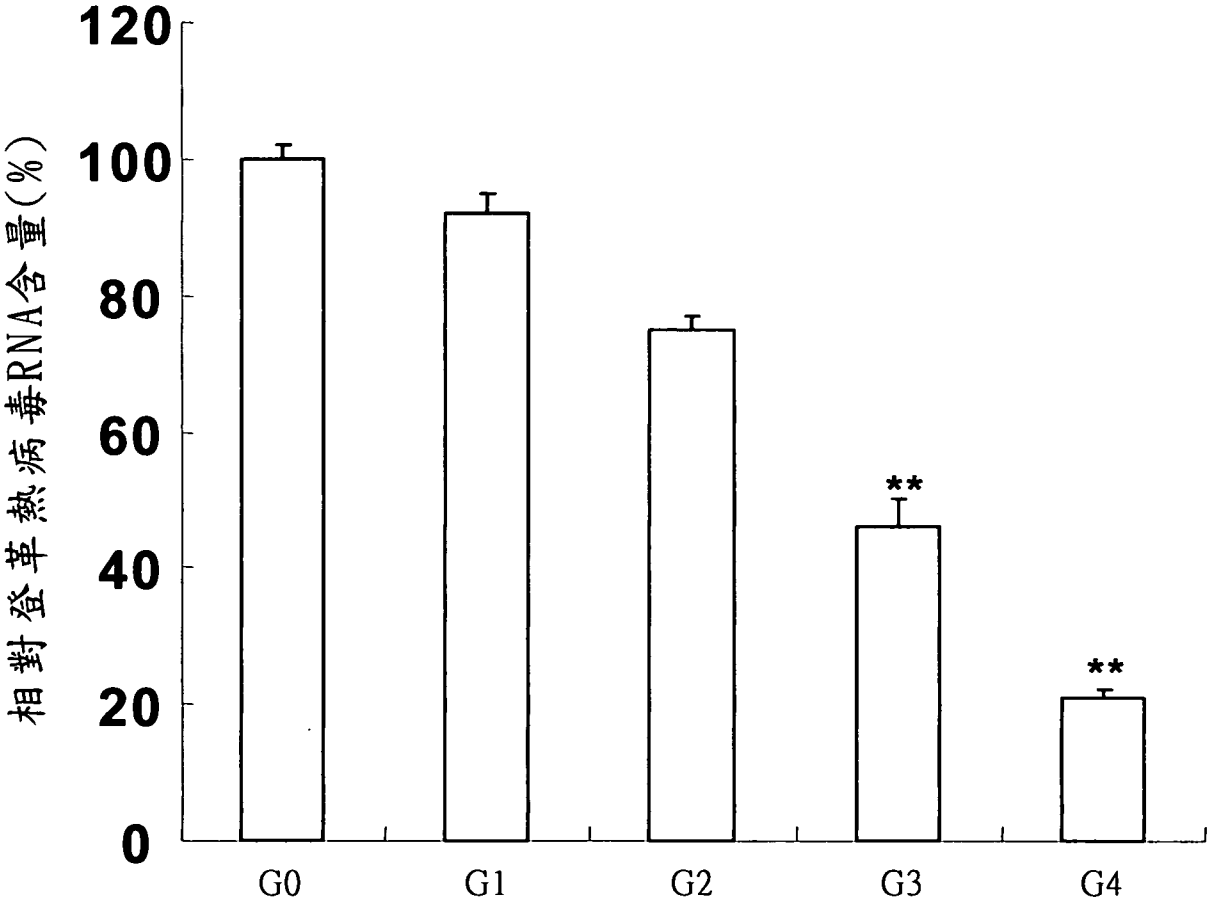
第 10 圖



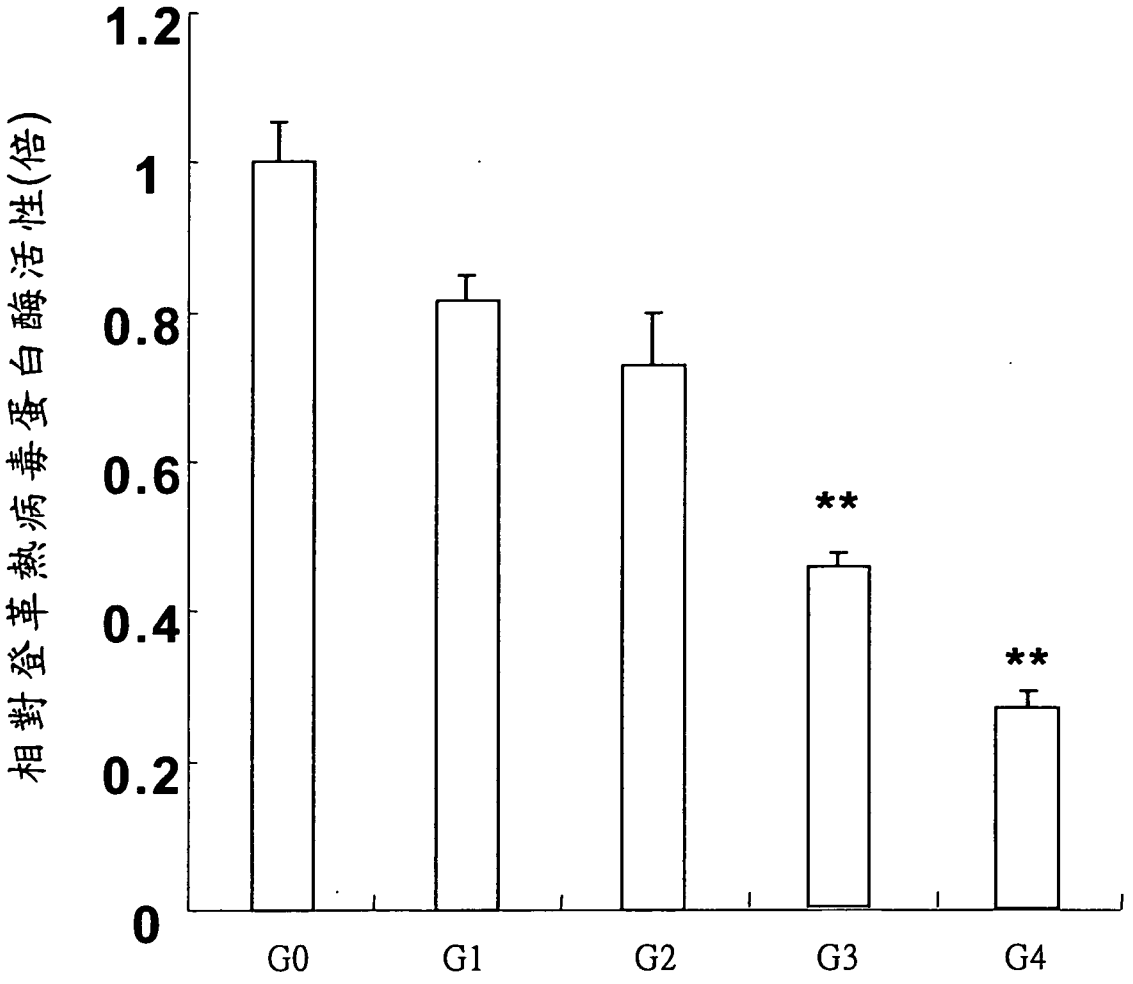
第 11 圖

G0
G1
G2
G3
G4
NS2B
GAPDH

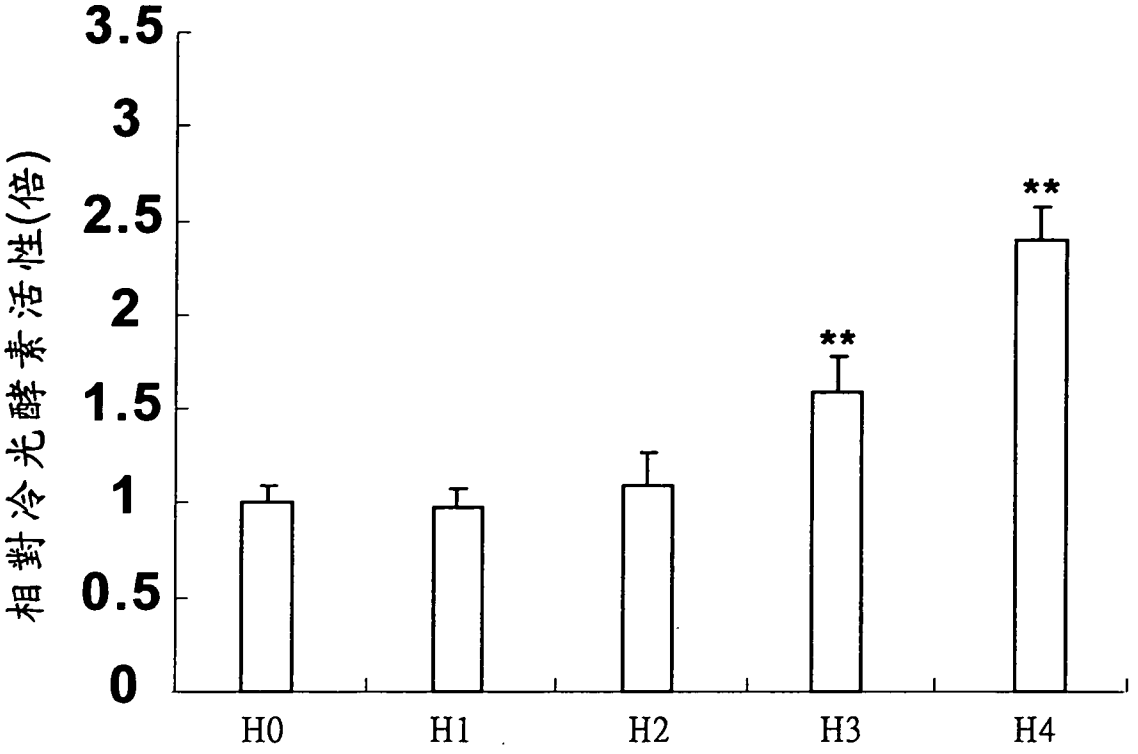
第 12a 圖


相對登革熱病毒RNA含量(%)
120
100
80
60
40
20
0
**
**
G0
G1
G2
G3
G4

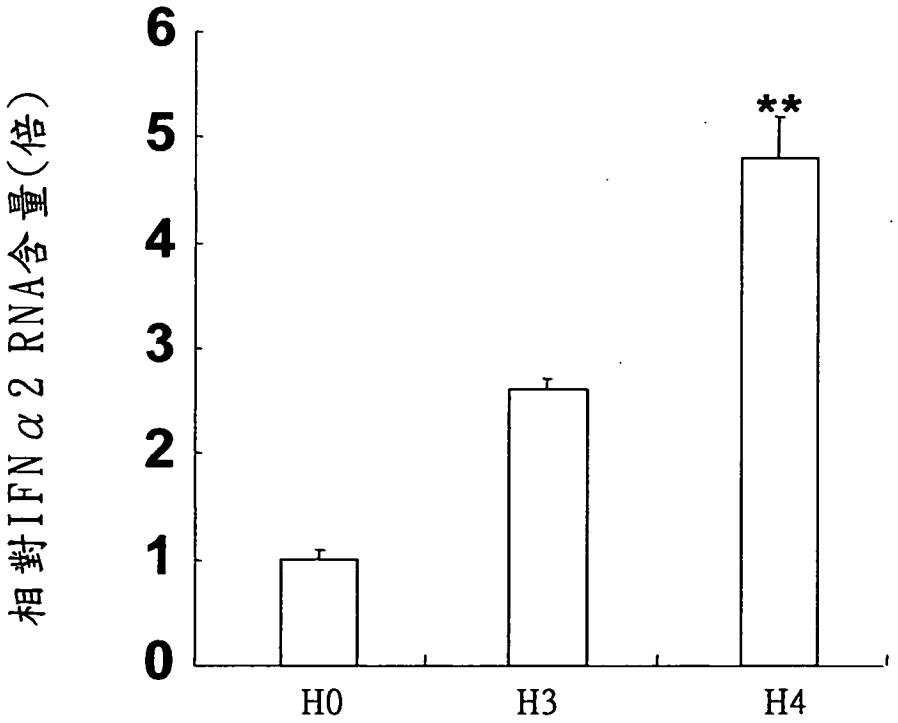
第 12b 圖



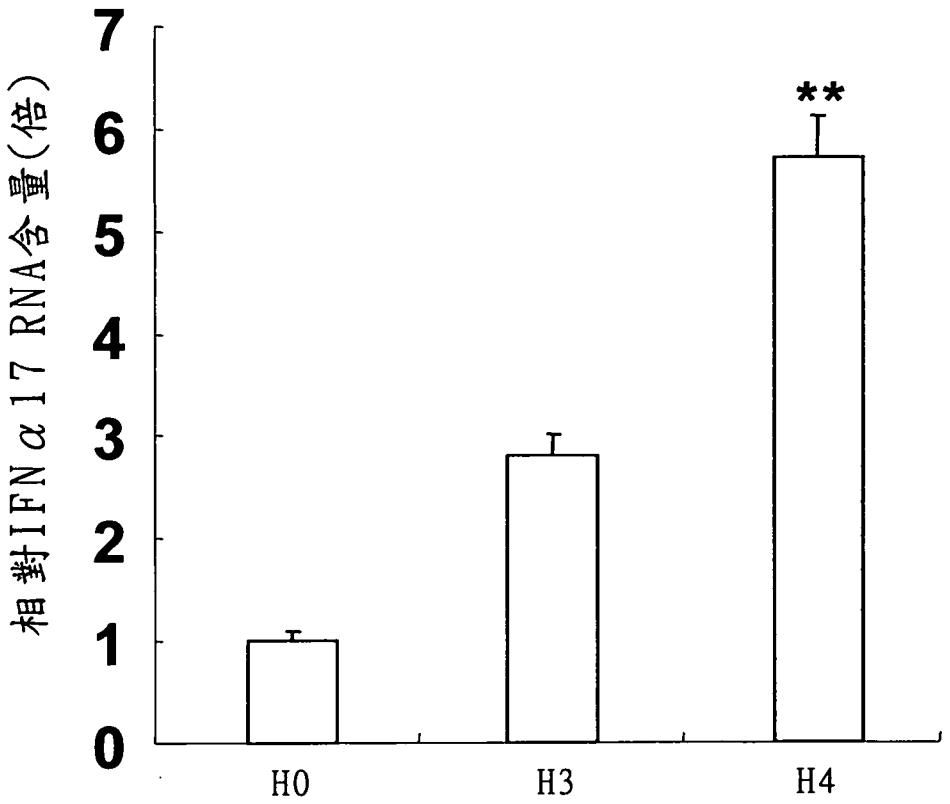
第 13 圖


相對冷光酵素活性(倍)
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
**
**
H0
H1
H2
H3
H4

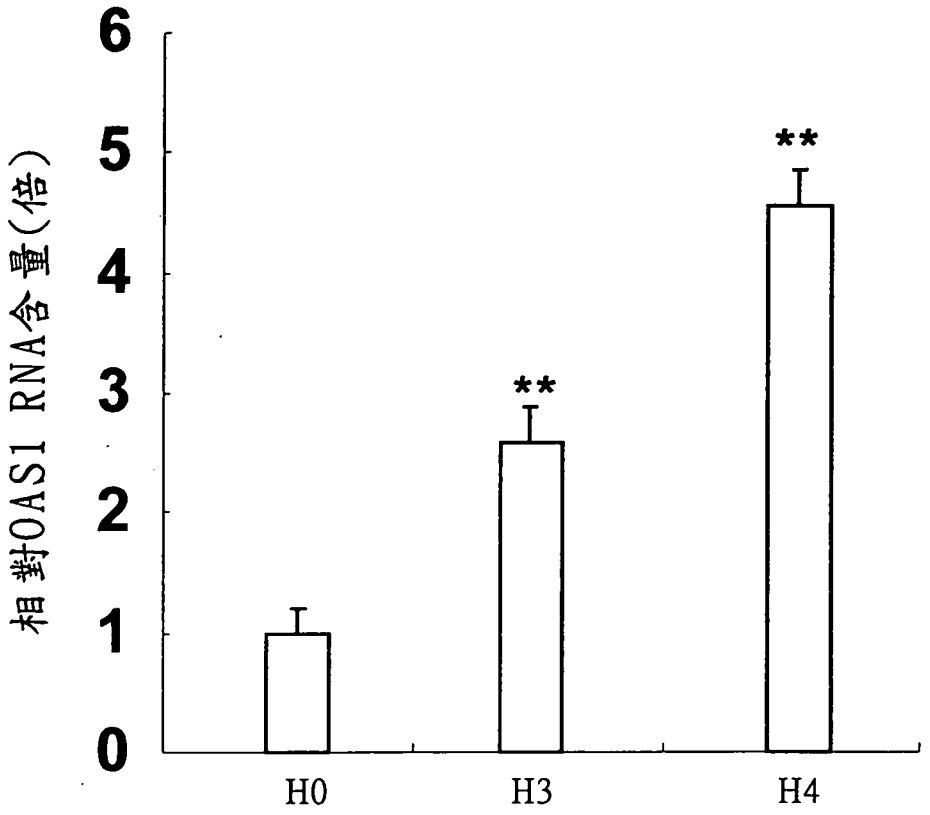
第 14a 圖


相對IFNα2 RNA含量(倍)
6
5
4
3
2
1
0
**
H0
H3
H4

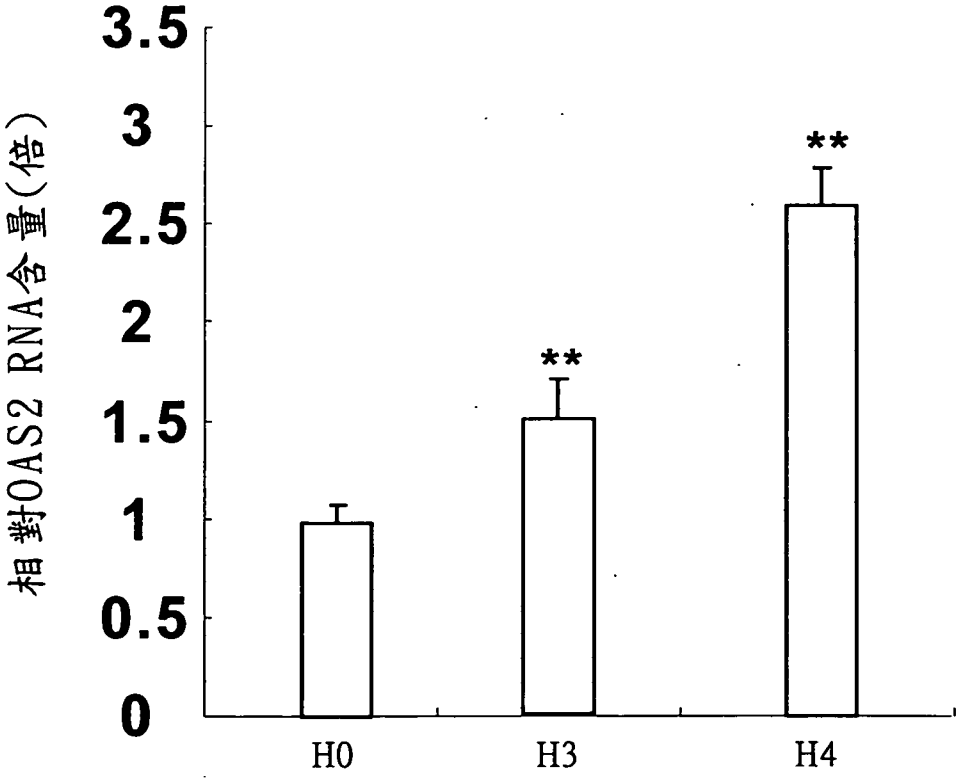
第 14b 圖



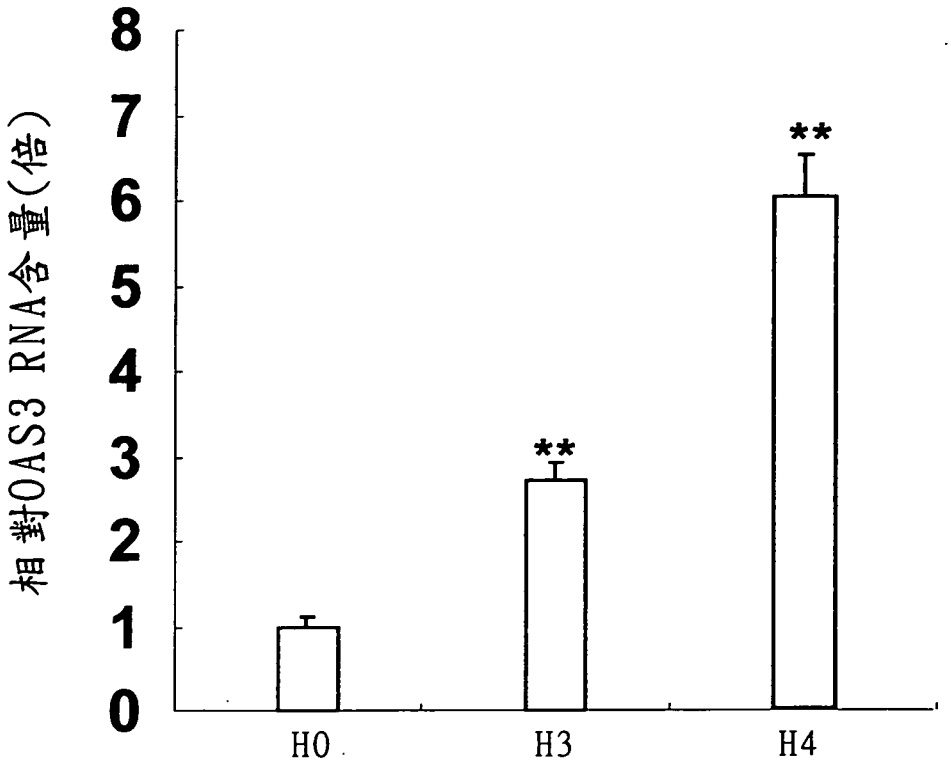
第 14c 圖


相對OAS1 RNA含量(倍)
6
5
4
3
2
1
0
**
**
H0
H3
H4

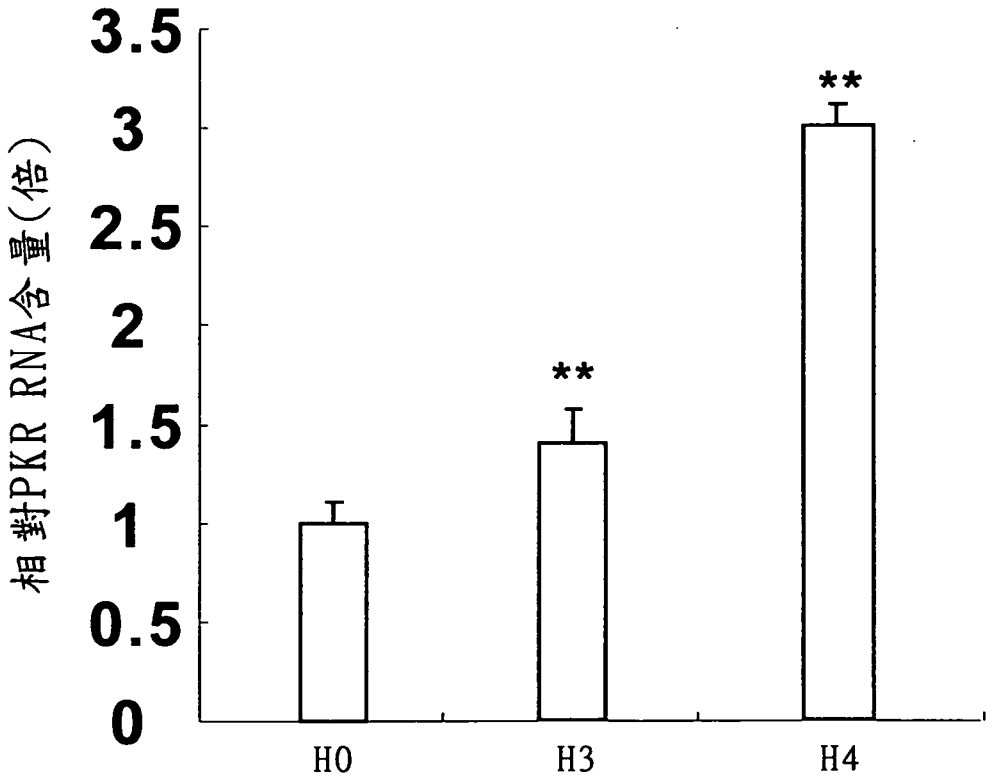
第 15a 圖


相對OAS2 RNA含量(倍)
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
**
**
H0
H3
H4

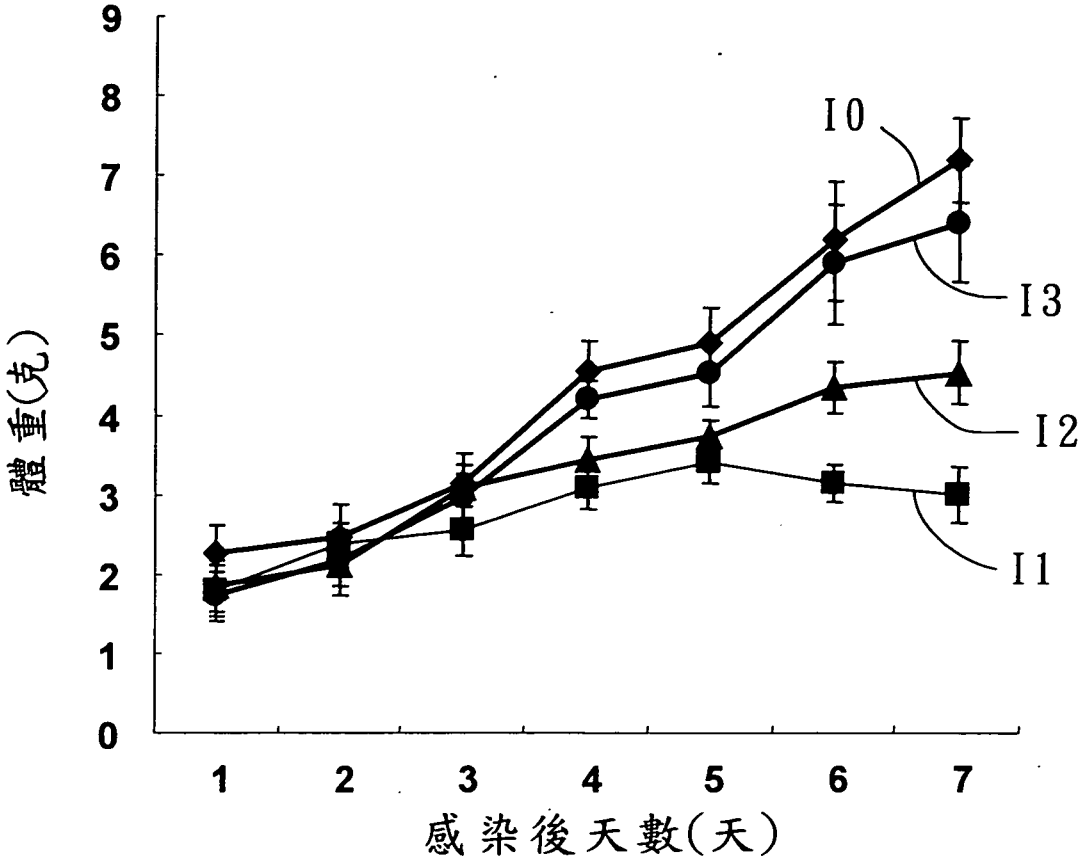
第 15b 圖


相對OAS3 RNA含量(倍)
8
7
6
5
4
3
2
1
0
**
**
H0
H3
H4

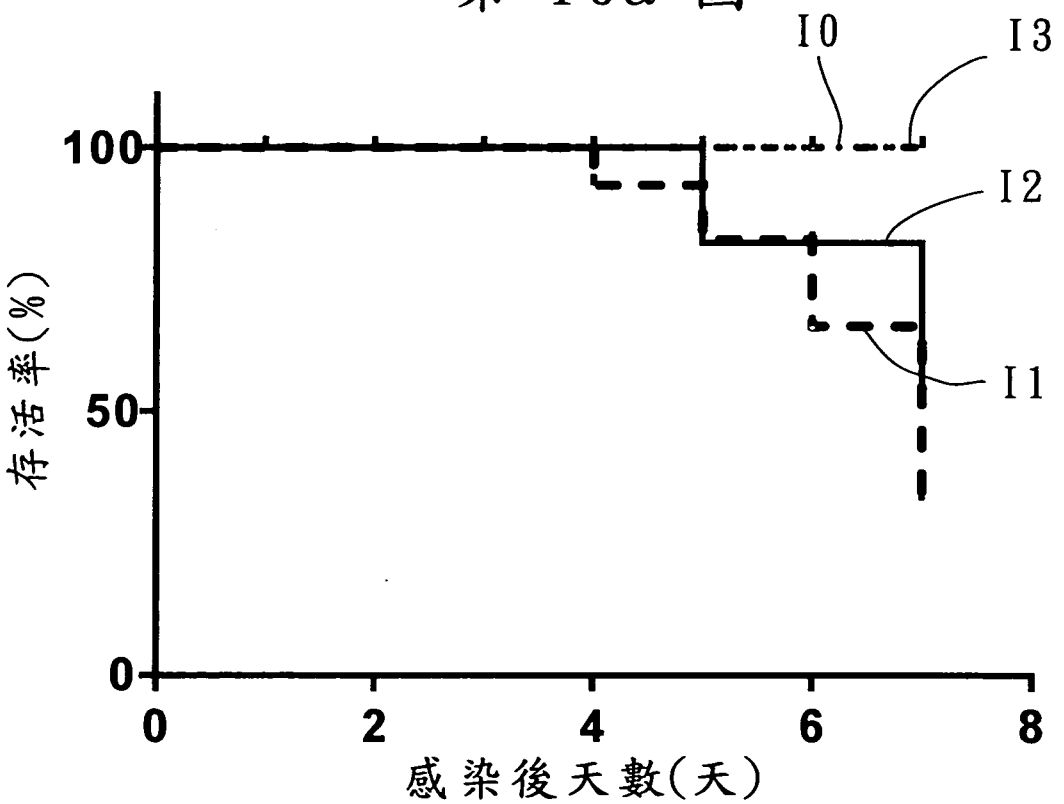
第 15c 圖


相對PKR RNA含量(倍)
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
**
**
H0
H3
H4

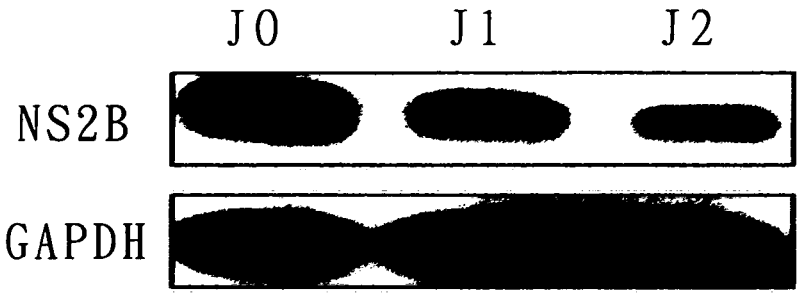
第 15d 圖


9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
體重(克)
I0
I3
I2
I1
1
2
3
4
5
6
7
感染後天數(天)

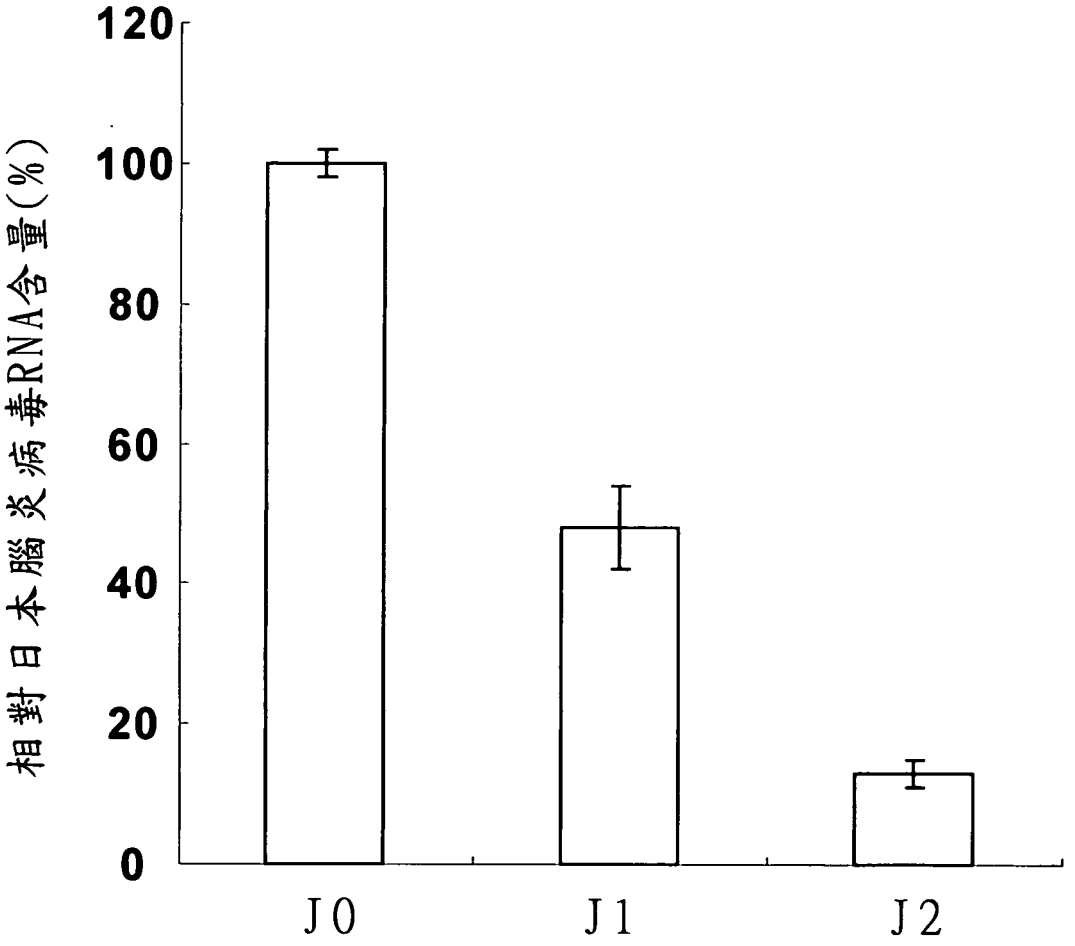
第 16a 圖


I0
I3
I2
I1
100
50
0
存活率(%)
0
2
4
6
8
感染後天數(天)

第 16b 圖



第 17a 圖



第 17b 圖