



(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 I605822 B

(45)公告日：中華民國 106 (2017) 年 11 月 21 日

(21)申請案號：104111384

(22)申請日：中華民國 104 (2015) 年 04 月 09 日

(51)Int. Cl. : A61K36/54 (2006.01)

A61K31/047 (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)；陳益昇 CHEN, IH SHENG (TW)；張訓碩 CHANG, HSUN SHUO (TW)；曾敬凱 TSENG, CHIN KAI (TW)；林俊光 LIN, CHUN KUANG (TW)

(74)代理人：林文杰

(56)參考文獻：

李景欽、陳益昇 等人, "酪梨萃取物抗 C 型肝炎及登革病毒之活性成分及其保肝效果分析", 科技部補助產學合作研究計畫成果精簡報告 (計畫編號: NSC 102-2622-B-037-005-CC3), 2015 年 1 月 21 日。

Ying-Chen Lu, Ih-Sheng Chen et al, "Secondary metabolites from the unripe pulp of Persea americana and their antimycobacterial activities", Food Chemistry, 2012, 135(4): 2904-2909.

審查人員：簡正芳

申請專利範圍項數：7 項 圖式數：13 共 48 頁

(54)名稱

酪梨萃取物、avocadenol B 及 (2R, 4R)-1, 2, 4-三羥基十七碳-16-炔的用途，以及包含酪梨萃取物之保健食品

USES OF AN AVOCADO EXTRACT, AVOCADENOL B, AND (2R,4R)-1,2,4-

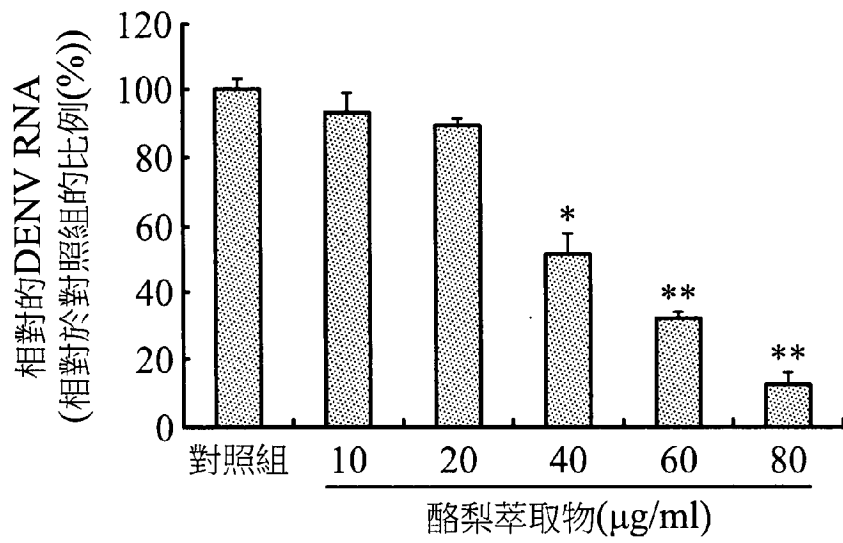
TRIHIDROXYHEPTADEC-16-YNE, AND HEALTH FOOD CONTAINING THE AVOCADO EXTRACT

(57)摘要

本發明係有關酪梨萃取物的用途，其係用於製備預防黃熱病毒科病毒感染的保健食品或食物添加物之用途。本發明亦提供一種 avocadenol B 用於製備治療或預防黃熱病毒科病毒感染的藥物之用途。本發明亦提供一種(2R,4R)-1,2,4-三羥基十七碳-16-炔用於製備治療或預防黃熱病毒科病毒感染的藥物之用途。本發明更提供一種抑制黃熱病毒科病毒複製活性或病毒性發炎反應之保健食品，包括有效量之酪梨萃取物為活性成分以及醫藥學上可接受之載劑。

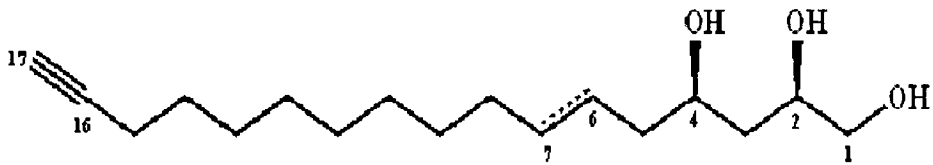
Uses of an avocado extract for manufacturing a health food or a food additive for preventing the infection of Flaviviridae viruses are provided. Use of avocadenol B for manufacturing a medicine for treating or preventing the infection of Flaviviridae viruses is provided. Use of (2R, 4R)-1, 2, 4-trihydroxyheptadec-16-yne) for manufacturing a medicine for treating or preventing the infection of Flaviviridae viruses is provided. A health food for inhibiting the replicative activity of Flaviviridae viruses or the viral inflammatory response is further provided, wherein the health food contains: an effective amount of avocado extract serving as an active ingredient, and a pharmaceutically acceptable carrier.

指定代表圖：



第 2A 圖

特徵化學式：



| |
|-----|
| 公告本 |
|-----|

發明摘要

※ 申請案號：104111384

※ 申請日：104. 4. 09

A61K 36/34 (2006.01)

※IPC 分類：A61K 31/047 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

【發明名稱】

酪梨萃取物、avocadenol B及(2R,4R)-1,2,4-三羥基十七碳-16-炔的用途，以及包含酪梨萃取物之保健食品

Uses of an avocado extract, avocadenol B, and (2R,4R)- 1,2,4-trihydroxyheptadec-16-yne, and health food containing the avocado extract

【中文】

本發明係有關酪梨萃取物的用途，其係用於製備預防黃熱病毒科病毒感染的保健食品或食物添加物之用途。本發明亦提供一種avocadenol B用於製備治療或預防黃熱病毒科病毒感染的藥物之用途。本發明亦提供一種(2R,4R)-1,2,4-三羥基十七碳-16-炔用於製備治療或預防黃熱病毒科病毒感染的藥物之用途。本發明更提供一種抑制黃熱病毒科病毒複製活性或病毒性發炎反應之保健食品，包括有效量之酪梨萃取物為活性成分以及醫藥學上可接受之載劑。

【英文】

Uses of an avocado extract for manufacturing a health food or a food additive for preventing the infection of Flaviviridae viruses are provided. Use of avocadenol B for manufacturing a

medicine for treating or preventing the infection of Flaviviridae viruses is provided. Use of (2*R*, 4*R*)-1, 2, 4-trihydroxyheptadec-16-yne) for manufacturing a medicine for treating or preventing the infection of Flaviviridae viruses is provided. A health food for inhibiting the replicative activity of Flaviviridae viruses or the viral inflammatory response is further provided, wherein the health food contains: an effective amount of avocado extract serving as an active ingredient, and a pharmaceutically acceptable carrier.

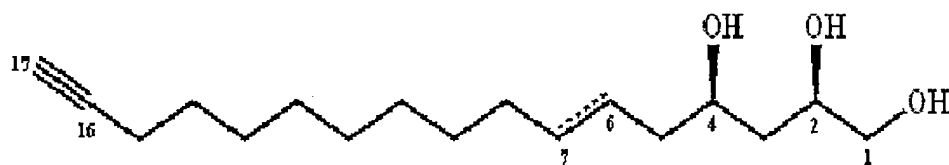
【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ 2A ）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】：



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】

酪梨萃取物、avocadenol B及(2*R*, 4*R*)-1, 2, 4-三羥基十七碳-16-炔的用途，以及包含酪梨萃取物之保健食品

Uses of an avocado extract, avocadenol B, and (2*R*, 4*R*)-1, 2, 4-trihydroxyheptadec-16-yne, and health food containing the avocado extract

【技術領域】

【0001】 本發明係有關於一種酪梨萃取物，特別係關於其用於製備預防黃熱病毒科(Flaviviridae family)病毒之保健食品的用途。

【先前技術】

【0002】 黃熱病毒科(Flaviviridae family)病毒之感染防治為各國公共衛生的重要課題之一。黃熱病毒科的病毒主要發現於節肢動物(arthropods)中，而感染對象主要為哺乳類動物，其遺傳物質為單股的RNA，長度約為9.6~12.3kb，具有病毒封套(viral envelope)之結構。

【0003】 黃熱病毒科(Flaviviridae family)包括多種病毒，例如，登革病毒(Dengue virus)、黃熱病毒(Yellow fever virus)、西尼羅河病毒(West Nile virus)、日本腦炎病毒(Japanese encephalitis virus)、C型肝炎病毒(Hepatitis C virus)或牛科病毒性腹瀉病毒(Bovine viral diarrhea virus)等。黃熱病毒科之病毒會使遭受感染之個體產生腦炎、腦脊髓炎、出血性疾病

(hemorrhagic diseases)或其他全身性感染之疾病。

【0004】 其中屬於黃熱病毒屬(Flaviviridae Genus)之登革病毒(Dengue virus, DENV)，主要由3個結構蛋白、鞘蛋白C(capsid protein C)、膜蛋白M(membrane protein M)、封套蛋白E(envelope protein E)以及7個非結構蛋白(nonstructural protein，簡稱NS)所構成。目前研究已知，部份非結構蛋白在登革病毒感染的機制中扮演重要角色，對於病毒感染所引起的症狀，例如，登革熱(dengue fever)、登革休克症候群(dengue shock syndrome)及登革出血熱(dengue hemorrhagic fever)亦有密切關聯。

【0005】 再者，依其抗原性的不同，登革病毒可分為四種，血清型，分別為DENV-1、DENV-2、DENV-3及DENV-4，皆具有感染致病的能力。登革病毒主要藉由蚊子作為媒介傳染給人類，登革病毒感染造成之疾病主要好發於熱帶、亞熱帶等有埃及斑蚊(*Aedes aegypti*)及白線斑蚊(*Aedes albopictus*)分布之國家。但隨著各國之間的交流及往返趨於頻繁，自1980年代後，登革熱亦開始有向各國蔓延之趨勢，逐漸成為全球性之公共衛生問題。

【0006】 然而，目前並沒有特定用以治療登革熱之藥物，而疫苗的研發可能是控制登革病毒感染的最好方法。近年來，許多研究嘗試研發可同時對四種血清型登革病毒產生免疫之疫苗，但在臨床上仍遭遇了許多困難，像是無法產生具有長期免疫效果之疫苗等。因此，如何有效地預防登革病毒的感染為相當重要的公共衛生議題。

【發明內容】

【0007】 本發明一實施例係提供一種酪梨 (*Persea americana*) 萃取物用於製備預防黃熱病毒科 (Flaviviridae family) 病毒感染的保健食品之用途。

【0008】 本發明一實施例係提供一種酪梨 (*Persea americana*) 萃取物用於製備預防黃熱病毒科 (Flaviviridae family) 病毒感染的食品添加物之用途。

【0009】 本發明又一實施例係提供一種 avocadenol B 用於製備治療或預防黃熱病毒科 (Flaviviridae family) 病毒感染的藥物之用途。

【0010】 本發明再一實施例係提供一種 (2*R*,4*R*)-1,2,4-三羥基十七碳-16-炔 ((2*R*,4*R*)-1,2,4-trihydroxyheptadec-16-yne) 用於製備治療或預防黃熱病毒科 (Flaviviridae family) 病毒感染的藥物之用途。

【0011】 本發明更一實施例係提供一種抑制黃熱病毒科 (Flaviviridae family) 病毒複製活性或病毒性發炎反應之保健食品，包括有效量之酪梨 (*Persea americana*) 萃取物為活性成分以及醫藥學上可接受之載劑。

【圖式簡單說明】**【0012】**

第1A~1C圖係根據本揭露一些實施例中，以西方墨點法偵測在不同濃度的酪梨萃取物、avoB及THHY處理下，經登

革病毒感染Huh-7細胞中登革病毒的蛋白質含量；

第2A~2C圖係根據本揭露一些實施例中，以RT-qPCR偵測在不同濃度的酪梨萃取物、avoB以及THHY處理下，經登革病毒感染的Huh-7細胞中登革病毒的相對RNA量之柱狀圖(* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$)；

第3A~3B圖係根據本揭露一些實施例中，以RT-qPCR偵測在不同濃度的酪梨萃取物、avoB以及THHY處理下，經DENV-1、DENV-2、DENV-3及DENV-4血清型之登革病毒感染的Huh-7細胞中登革病毒的相對RNA量之柱狀圖(* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$)；

第4A~4B、5A~5B及6A~6B圖係根據本揭露一些實施例中，以RT-qPCR偵測在不同濃度的酪梨萃取物、avoB以及THHY處理下，經登革病毒感染的Huh-7細胞中IFN- α 2及IFN- α 17之相對RNA量之柱狀圖；

第7A~7D及8~9圖係根據本揭露一些實施例中，以RT-qPCR偵測在不同濃度的酪梨萃取物、avoB以及THHY處理下，經登革病毒感染的Huh-7細胞中OAS-1、OAS-2、OAS-3及PKR之相對RNA量之柱狀圖；

第10A~10C、11A~11C及12A~12C圖係根據本揭露一些實施例中，以RT-qPCR偵測在不同濃度的酪梨萃取物、avoB以及THHY處理下，經登革病毒感染的Huh-7細胞中TNF- α 、IL-1 β 及IL-6之相對RNA量之柱狀圖(* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$)；

第13A~13C圖係根據本揭露一些實施例中，在不同濃

度之酪梨萃取物、avoB以及THHY處理下，Huh-7細胞存活率之折線圖。

【實施方式】

【0013】 以下公開許多不同的實施方法或是例子來實行本發明之不同特徵，以下描述具體的元件及其排列的例子以闡述本發明。當然這些僅是例子且不該以此限定本發明的範圍。

【0014】 本案發明人發現酪梨(*Persea americana*)萃取物具有抑制登革病毒複製活性及病毒性發炎反應之效果，且亦具有誘導受登革病毒感染之細胞產生干擾素(interferon, IFN)之能力。特別地，酪梨萃取物包含avocadenol B或(2*R*,4*R*)-1,2,4-三羥基十七碳-16-炔作為主要之活性成分。

【0015】 本揭露所述之「酪梨萃取物」是指萃取自酪梨(*Persea americana*)植物體之萃取物。酪梨原產於中美洲及墨西哥，屬於被子植物門的樟科(*Lauraceae*)，其含有多種維生素、礦物質以及有益的植化素，富含生物活性及抗氧化功能且不具膽固醇，被金氏世界紀錄列為最營養的水果。應注意的是，本揭露使用之酪梨可源自任何產地或為經改良之品種。

【0016】 本揭露之酪梨萃取物係選用酪梨果實，經切片烘乾後，以有機溶劑進行萃取。烘乾溫度可為20°C至80°C、40°C至60°C，例如可為50°C。而上述有機溶劑可為C₁至C₁₂醇類，例如，甲醇、乙醇、丙醇、異丙醇、丁醇、2-丁醇、戊醇、己醇、庚醇、辛醇、壬醇、癸醇、十一醇、十二醇或其組合，但不限於此。有機溶劑亦可為芳香烴類，例如，苯、甲苯或二甲

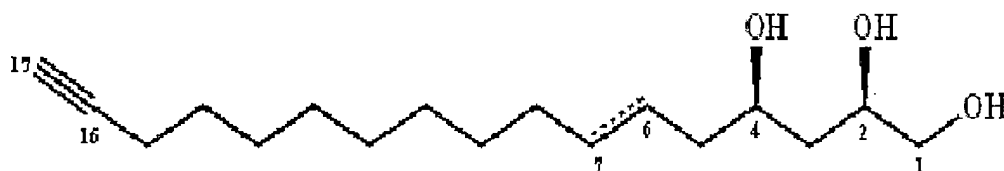
苯，但不限於此。在一實施例中，是採用甲醇作為萃取溶液，甲醇的濃度可為80%至100%，例如可為99.5%。

【0017】 萃取的溫度及時間可視使用的溶劑特性等條件決定，沒有特別限定。萃取溫度可為5°C至50°C或10°C至30°C，例如可為25°C。再者，可重複多次上述萃取步驟以獲得純度較高的萃取物，例如，可重複進行3次萃取。

【0018】 接著，上述萃取步驟得到之酪梨萃取物可再經純化步驟，以更進一步的提升其純度。純化步驟可為管柱層析(column chromatography)、薄層層析(thin layer chromatography)、氣相層析(gas chromatography)、高效液相層析(high performance liquid chromatography)、離子交換層析(ion exchange chromatography)或其組合，例如，可使用以二氧化矽填充之管柱層析。

【0019】 經上述萃取及純化步驟，以核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)分析及比對，可獲得avocadenol B(如下式(I)所示， Δ^6)以及(2*R*,4*R*)-1,2,4-三羥基十七碳-16-炔(如下式(I)所示)。

【0020】



【0021】 avocadenol B，化學簡式為C₁₇H₃₀O₃，全名為(2*R*,4*R*,6*E*)-1,2,4-三羥基十七碳-6-烯-16-炔

((2*R*,4*R*,6*E*)-1,2,4-trihydroxyheptadec-6-en-16-yne)。已有研究證實 avocadenol B 具有抗分枝桿菌 (antimycobacterial) 的活性 (Y.-C. Lu et al. Secondary metabolites from the unripe of *Persea americana* and their antimycobacterial activities. Food Chemistry 135(2012)2904-0929)。

【0022】 (2*R*,4*R*)-1,2,4- 三 羥 基 十 七 碳 -16- 炔 ((2*R*,4*R*)-1,2,4-trihydroxyheptadec-16-yne)，化學簡式為 $C_{17}H_{32}O_3$ ，尚無研究指出與其相關之生物活性。

【0023】發明人將上述酪梨萃取物及由該酪梨萃取物純化取得之 avocadenol B 及 (2*R*,4*R*)-1,2,4-三羥基十七碳-16-炔進行細胞試驗。發現酪梨萃取物、avocadenol B 及 (2*R*,4*R*)-1,2,4-三羥基十七碳-16-炔皆具有抑制黃熱病毒科 (Flaviviridae family) 病毒之功效。

【0024】值得注意的是，至今從未有文獻指出酪梨萃取物、avocadenol B 或 (2*R*,4*R*)-1,2,4-三羥基十七碳-16-炔與黃熱病毒科 (Flaviviridae family) 病毒之感染的預防或治療有相關性。

【0025】承上述，本揭露所述之「黃熱病毒科」病毒可包括登革病毒 (Dengue virus)、黃熱病毒 (Yellow fever virus)、西尼羅河病毒 (West Nile virus)、日本腦炎病毒 (Japanese encephalitis virus) 或 C 型肝炎病毒 (Hepatitis C virus) 等，可包含所有屬於黃熱病毒科之病毒。

【0026】在一些實施例中，酪梨萃取物、avocadenol B 及 (2*R*,4*R*)-1,2,4-三羥基十七碳-16-炔可抑制登革病毒之蛋白質

及RNA生成，即，抑制病毒之複製活性。在一些實施例中，酪梨萃取物、avocadenol B及(2*R*,4*R*)-1,2,4-三羥基十七碳-16-炔可抑制登革病毒所誘導之發炎反應。又，在一些實施例中，酪梨萃取物、avocadenol B及(2*R*,4*R*)-1,2,4-三羥基十七碳-16-炔可誘導受到登革病毒感染之細胞產生干擾素(interferon, IFN)。

【0027】 因此，本揭露亦提供一種將上述酪梨萃取物、avocadenol B或(2*R*,4*R*)-1,2,4-三羥基十七碳-16-炔用於製備預防黃熱病毒科病毒感染的保健食品或食物添加物之用途。再者，本揭露亦提供一種將酪梨萃取物、avocadenol B或(2*R*,4*R*)-1,2,4-三羥基十七碳-16-炔用於製備治療或預防黃熱病毒科病毒(例如：登革病毒)之感染的藥物之用途。除此之外，亦可將其用於製備膳食增補劑、營養產品或醫學食品等用途。

【0028】 在一實施例中，上述用於製備預防黃熱病毒科病毒感染的保健食品、食物添加物或藥物可更包括醫藥學上可接受之載劑(carrier)或鹽類。醫藥學上可接受之載劑或鹽類可佔保健食品、食物添加物或藥物之0.5~99 wt%，較佳為5~95 wt%。

【0029】 而上述醫藥學上可接受之載劑可包括一般在食品或藥物的製造上可使用之添加劑、賦形劑、防腐劑、矯味劑等。例如，澱粉、玉米澱粉、乳糖、糊精、環糊精、甲基纖維素、羧甲基纖維素、羧甲基纖維素鈉、明膠、樹膠(gum)、洋菜膠、古阿樹膠(guar)、果膠、阿拉伯膠、西黃耆膠(tragacanth)、鹿角膠(carrageenan)、或類似之添加劑。再者，醫藥學上可接受之載劑亦可為溶劑、分散媒(dispersion medium)、套膜(coating)、抗菌或抗真菌試劑等。

【0030】再者，醫藥學上可接受之鹽類可為無機陽離子，例如，鹼金屬鹽類，如鈉、鉀或胺鹽，鹼土金族鹽類，如鎂、鈣鹽，含二價或四價陽離子之鹽類，如鋅、鋁或銻鹽。此外，醫藥學上可接受之鹽類亦可為有機鹽類，如二環己胺鹽類、甲基-D-葡萄糖胺，胺基酸鹽類，如精胺酸、離胺酸、組織胺酸或麩胺酸鹽等。

【0031】前述藥物可根據投予路徑適當設計劑型，例如可為錠劑、膠囊劑、膜衣錠劑、散劑、顆粒劑、糖漿、懸浮劑 (suspensions)、乳劑 (emulsions)、注射劑、栓劑或貼劑等。投予路徑可為，例如口服、皮下注射、腹腔內注射、靜脈內注射、肌肉注射、肛門投予、吸入性投藥或局部投藥等。藥物的使用劑量可依醫師或執事人員根據患者體重、年齡、患部症狀、生理狀況、投藥路徑等條件，適當調配。

【0032】此外，本揭露所述之「有效量」是指具有可以抑制病毒活性、殺死病毒、減少病毒數目、或者完全消滅病毒之劑量。此有效量通常是根據病患體表面積，病患的重量以及病患情況的不同來供應給病患。如此技術人士所知，有效劑量亦會隨著以下條件的不同而變化，包括：藥物的投予路徑，藥物之劑型或是否併用其他治療法等。

【0033】綜上所述，本案發明人發現酪梨萃取物具有抑制黃熱病毒科 (Flaviviridae family) 病毒之功效。特別地，酪梨萃取物可抑制登革病毒之複製活性及病毒性發炎反應，且亦可誘導受登革病毒感染之細胞產生干擾素 (interferon, IFN) 以對抗病毒。再者，發明人亦發現酪梨萃取物包含 avocadenol B 或

(2*R*,4*R*)-1,2,4-三羥基十七碳-16-炔作為抑制登革病毒活性之主要成分。

【0034】 以下進一步以實施例及比較例具體說明本發明，然其並非用以限定本揭露之內容。

實施例

【0035】 酪梨的萃取及純化

【0036】 可參照 Y.-C. Lu et al. Secondary metabolites from the unripe of *Persea americana* and their antimycobacterial activities. Food Chemistry 135(2012)2904-0929 之方法，將未成熟之酪梨果實(約 11.9kg)切片後，置於 50°C 之烘箱乾燥以取得乾燥之酪梨樣本(約 2.3kg，佔原重量之 19.3%)。在室溫下，利用濃度大於 99.5% 甲醇萃取乾燥的酪梨樣本，並且重複萃取步驟三次。接著，加入乙酸乙酯(ethyl acetate, EtOAc)水溶液(EtOAc:H₂O 為 1:1)使甲醇萃取物分離為可溶於乙酸乙酯之部分(EtOAc-soluble fraction)及可溶於水之部分(H₂O-soluble fraction)。得到可溶於乙酸乙酯之部分約為 280g，而可溶於水之部分約為 283g，其中可溶於乙酸乙酯之部分即為用於後續實驗中的酪梨萃取物。

【0037】 接著，將一部分可溶於乙酸乙酯的部分(約 100g)加入填充二氧化矽膠體之管柱(70~230, Merck)進行層析及純化。利用濃度梯度之洗提液(elution)正己烷-乙酸乙酯(*n*-hexane-EtOAc)洗提後，得到 12 個分畫(fraction)(A-1~A-12)。接著將 10.5g 之 A-12 分離液利用正己烷重新結晶

化，以獲取結晶(A-12-C)以及母液(A-12-M)。

【0038】 接著，將10g的A-12-M以填充二氧化矽膠體之管柱(230~400mesh, Merck)進行層析，利用濃度梯度之洗提液正己烷-乙酸乙酯洗提後，得到7個分畫(A-12-M-1~A-12-M-7)。

【0039】 再者，將7.3g之A-12-M-4以RP-C₁₈管柱(spherical C₁₈ 100A reversed-phase silica gel(RP-18), 20~40μM, Silicycle)進行層析，並且利用丙酮-水(1:1)進行洗提，洗提後得到25.2mg之avocadenol B以及113mg之(2R,4R)-1,2,4-三羥基十七碳-16-炔((2R,4R)-1,2,4-trihydroxyheptadec-16-yne)。為方便說明，接續的敘述中將分別以avoB及THHY簡稱avocadenol B以及(2R,4R)-1,2,4-三羥基十七碳-16-炔。

偵測Huh-7細胞中生成之病毒蛋白質

【0040】 使用登革病毒株16681(DENV-2血清型)感染人類肝癌細胞株之Huh-7細胞，其中Huh-7細胞培養於24孔盤，Huh-7細胞的密度為 5×10^4 cells/well，而病毒感染的MOI(multiplicity of infection)為0.2。接著分別以不同濃度之酪梨萃取物、avoB以及THHY處理Huh-7細胞，培養3天。應注意的是，除特別說明外，下述實驗中登革病毒感染Huh-7細胞的實驗條件皆與此相同。接著，將上述細胞溶解於RIPA lysis buffer中，並將細胞溶解液(cell lysate)離心以收集Huh-7細胞之總蛋白質(total protein)。

【0041】 接著，利用西方墨點法(western blot)偵測Huh-7細胞中登革病毒之蛋白質生成量。以登革病毒之病毒蛋白NS2B

作為標靶，利用其專一性抗體 (rabbit polyclonal anti-NS2B antibody, GeneTex, CA, USA) 進行偵測，並以細胞中表現量穩定之 GAPDH 作為內部對照組 (internal control)。再者，使用 ECL 偵測套組 (PerkinElmer, CT) 進行訊號偵測。

【0042】 第 1A~1C 圖分別顯示以西方墨點法偵測在不同濃度的酪梨萃取物、avoB 以及 THHY 處理下，經登革病毒感染的 Huh-7 細胞中登革病毒的蛋白質含量，圖中對照組為 0.1% DMSO。第 1A~1C 圖顯示，當酪梨萃取物、avoB 以及 THHY 處理 Huh-7 細胞濃度增加時，Huh-7 細胞中登革病毒的蛋白質生成量下降。酪梨萃取物、avoB 以及 THHY 皆抑制了登革病毒的蛋白質生成，且抑制效果有顯著性及濃度依賴性。由此可知，酪梨萃取物、avoB 以及 THHY 具有抑制登革病毒製造蛋白質之功效。

偵測 Huh-7 細胞中生成之病毒 RNA

【0043】 此外，發明人亦偵測 Huh-7 細胞中病毒之 RNA 生成量，以進一步確認上述蛋白質部分之實驗結果。分別使用登革病毒株 16681 (DENV-2 血清型) 或四種不同血清型之登革病毒株 DENV-1、DENV-2、DENV-3 及 DENV-4 (DENV-1~DENV-4 病毒株是從疾病管制署取得之生物材料，DENV-1 的編號為 8700828A；DENV-2 的編號為 454009A；DENV-3 的編號為 8700829A；DENV-4 的編號為 S9201818) 感染人類肝癌細胞株之 Huh-7 細胞。接著，使用 Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) 純化 Huh-7 細胞之總細胞 RNA (total cellular RNA)。

【0044】 接著，以即時反轉錄即時定量聚合酶連鎖反應

(real-time quantitative reverse transcription PCR)偵測經登革病毒感染的Huh-7細胞中的病毒RNA生成量。即時反轉錄即時定量聚合酶連鎖反應在反應體積為10 μ l的條件下進行，其中反應溶液含有200ng cDNA、5 μ l Power SYBER Green PCR Master及0.4 μ M的引子對 (primer pair)。而PCR反應的溫度條件設定為：在95 $^{\circ}$ C反應10分鐘 \rightarrow [95 $^{\circ}$ C反應15秒 \rightarrow 60 $^{\circ}$ C反應1分鐘]循環40次 \rightarrow 95 $^{\circ}$ C反應15秒 \rightarrow 60 $^{\circ}$ C反應1分鐘 \rightarrow 95 $^{\circ}$ C反應15秒。其中，使用的引子對對於登革病毒之病毒蛋白NS2具有專一辨識性，實驗中使用序列辨識號1及2所示之引子對以偵測登革病毒之RNA。此外，實驗中使用序列辨識號3及4所示之引子對偵測寄主細胞之GAPDH(作為對照組)。

【0045】 第2A~2C圖分別顯示以RT-qPCR偵測在不同濃度的酪梨萃取物、avoB以及THHY處理下，經16681登革病毒感染的Huh-7細胞中登革病毒的相對RNA量(relative RNA)之柱狀圖，圖中對照組為0.1% DMSO，再者，圖中的數據皆為經GAPDH標準化(normalization)之量化結果。

【0046】 第2A~2C圖顯示，當處理Huh-7細胞之酪梨萃取物、avoB以及THHY的濃度增加時，Huh-7細胞中登革病毒的RNA顯著地減少(t-test, $p < 0.05$; $p < 0.01$)。此外，利用內插法計算可得酪梨萃取物、avoB以及THHY抑制登革病毒RNA生成之半效應濃度(effective concentration 50, EC₅₀)分別為36 \pm 3.4 μ g/ml、7.6 \pm 1.3 μ M以及2.9 \pm 2.6 μ M。

【0047】 此外，第3A~3B圖顯示以RT-qPCR偵測在不同濃度的酪梨萃取物、avoB以及THHY處理下，經四種不同血清型

(DENV-1、DENV-2、DENV-3及DENV-4)登革病毒感染之Huh-7細胞中登革病毒的相對RNA量之柱狀圖，圖中數據皆為經GAPDH標準化(normalization)之量化結果。

【0048】 如第3A圖所示，當處理Huh-7細胞之酪梨萃取物的濃度增加時，Huh-7細胞中登革病毒的RNA顯著地減少(t-test, $p < 0.05$; $p < 0.01$)，且在四種血清型的登革病毒中情形皆相同(DENV-1~DENV-4)。易言之，酪梨萃取物能夠有效抑制DENV-1、DENV-2、DENV-3及DENV-4型之登革病毒的RNA合成。另外，利用內插法計算可得酪梨萃取物抑制DENV-1、DENV-2、DENV-3及DENV-4登革病毒RNA生成之半效應濃度分別為 $65 \pm 5.1 \mu\text{g/ml}$ 、 $42 \pm 6.1 \mu\text{g/ml}$ 、 $33 \pm 4.8 \mu\text{g/ml}$ 以及 $74 \pm 3.4 \mu\text{g/ml}$ 。

【0049】 再者，如第3B圖所示，當avoB以及THHY處理Huh-7細胞的濃度增加時，Huh-7細胞中登革病毒的RNA顯著地減少(t-test, $p < 0.05$; $p < 0.01$)，且在四種血清型的登革病毒中皆相同(DENV-1~DENV-4)。由圖可知，avoB以及THHY亦能夠有效地抑制DENV-1、DENV-2、DENV-3及DENV-4型之登革病毒的RNA合成。另外，利用內插法計算可得avoB抑制DENV-1、DENV-2、DENV-3及DENV-4登革病毒RNA生成之半效應濃度分別為 $14.4 \pm 2.1 \mu\text{M}$ 、 $8.4 \pm 1.8 \mu\text{M}$ 、 $13.4 \pm 2.2 \mu\text{M}$ 以及 $15.2 \pm 4.1 \mu\text{M}$ 。而THHY抑制DENV-1、DENV-2、DENV-3及DENV-4登革病毒RNA生成之半效應濃度則分別為 $16.3 \pm 3.4 \mu\text{M}$ 、 $3.4 \pm 1.1 \mu\text{M}$ 、 $13.7 \pm 4.1 \mu\text{M}$ 以及 $14.7 \pm 2.3 \mu\text{M}$ 。

偵測 Huh-7 細胞中生成之干擾素

【0050】 干擾素(interferon ,IFN)為細胞受到病毒感染後所分泌之細胞因子，干擾素藉由與周圍未感染的細胞上的相關受體作用，促使未感染的細胞合成抗病毒蛋白以防制感染擴大，因而具有抗病毒之作用。然而，許多病毒具有對抗干擾素的能力，例如，登革病毒可破壞宿主細胞內干擾素生成之訊號傳遞路徑。

【0051】 承上述，發明人進行接續實驗以探討酪梨萃取物、avoB以及THHY是否會影響經登革病毒感染之細胞內的干擾素訊號傳遞路徑。

【0052】 實驗方法同樣以前述之即時反轉錄即時定量聚合酶連鎖反應(real-time quantitative reverse transcription PCR)進行，而偵測的目標則改為宿主細胞中干擾素基因之RNA。在此使用對干擾素基因(*IFN- α 2*及*IFN- α 17*)具有識別專一性的引子對，詳細而言，使用序列辨識號5及6所示之引子對以偵測*IFN- α 2*之RNA，而使用序列辨識號7及8所示之引子對以偵測*IFN- α 17*之RNA。

【0053】 第4A~4B、5A~5B及6A~6B圖分別顯示以RT-qPCR偵測在不同濃度的酪梨萃取物、avoB以及THHY處理下，經16681登革病毒感染的Huh-7細胞中*IFN- α 2*及*IFN- α 17*之相對RNA量之柱狀圖，圖中對照組為0.1% DMSO，再者，圖中的數據皆為經GAPDH標準化(normalization)之量化結果。

【0054】 如第4A~4B、5A~5B及6A~6B圖所示，當處理Huh-7細胞之酪梨萃取物、avoB以及THHY的濃度增加時，Huh-7細胞

中IFN- α 2及IFN- α 17之RNA生成量皆明顯地增加。由上述結果可知，酪梨萃取物、avoB以及THHY皆能誘導受登革病毒感染之細胞產生干擾素以對抗登革病毒。

【0055】此外，發明人亦針對干擾素之下游訊息傳遞分子OAS-1、OAS-2、OAS-3及PKR進行相關偵測，更進一步地確認酪梨萃取物、avoB以及THHY對於感染細胞的干擾素訊號傳遞路徑之影響。再者，使用序列辨識號9及10所示之引子對偵測OAS-1之RNA；使用序列辨識號11及12所示之引子對偵測OAS-2之RNA；使用序列辨識號13及14所示之引子對偵測OAS-3之RNA；及使用序列辨識號15及16所示之引子對偵測PKR之RNA。

【0056】第7A~7D圖顯示以RT-qPCR偵測在不同濃度的酪梨萃取物、avoB以及THHY處理下，經16681登革病毒感染的Huh-7細胞中OAS-1、OAS-2、OAS-3及PKR之相對RNA量之柱狀圖，圖中對照組為0.1% DMSO，再者，圖中的數據皆為經GAPDH標準化(normalization)之量化結果。相似地，第8~9圖顯示經16681登革病毒感染的Huh-7細胞中OAS-1、OAS-2及OAS-3之相對RNA量之柱狀圖。

【0057】如第7A~7D及8~9圖所示，當處理Huh-7細胞之酪梨萃取物、avoB以及THHY的濃度增加時，Huh-7細胞中OAS-1、OAS-2、OAS-3及PKR之RNA生成量皆明顯地增加。由此可知，酪梨萃取物、avoB以及THHY不僅能誘導受登革病毒感染之細胞產生干擾素，它們亦促使干擾素之下游訊息傳遞分子進行合成。因此，酪梨萃取物、avoB以及THHY抑制登革病

毒的機制的確與干擾素密切相關。再者，可進一步地推斷酪梨萃取物、avoB以及THHY抑制登革病毒的機制，可能是藉由恢復或增強抗病毒之干擾素的生成而達成。

偵測Huh-7細胞中病毒誘導之發炎反應

【0058】 此外，發明人亦進行下述實驗，以測試酪梨萃取物、avoB以及THHY對於病毒感染所引起之發炎反應(inflammatory response)的影響。

【0059】 實驗方法亦以前述之即時反轉錄即時定量聚合酶連鎖反應進行，而偵測的目標則為宿主細胞中與發炎反應相關之因子或細胞激素之RNA。在此使用對腫瘤壞死因子- α (TNF- α)、白細胞介素-1 β (IL-1 β)、細胞激素-6(IL-6)具有識別專一性的引子對。詳細而言，使用序列辨識號17及18所示之引子對偵測TNF- α 之RNA；使用序列辨識號19及20所示之引子對偵測IL-1 β 之RNA；及使用序列辨識號21及22所示之引子對偵測IL-6之RNA。

【0060】 第10A~10C、11A~11C及12A~12C圖分別顯示以RT-qPCR偵測在不同濃度的酪梨萃取物、avoB以及THHY處理下，經16681登革病毒感染的Huh-7細胞中TNF- α 、IL-1 β 及IL-6之相對RNA量之柱狀圖，圖中對照組為0.1% DMSO，再者，圖中的數據皆為經GAPDH標準化(normalization)之量化結果。

【0061】 如第10A~10C、11A~11C及12A~12C圖所示，當處理Huh-7細胞之酪梨萃取物、avoB以及THHY的濃度增加時，Huh-7細胞中TNF- α 、IL-1 β 及IL-6之RNA生成量皆顯著地減少

(t-test, $p < 0.05$; $p < 0.01$)。由此可知，酪梨萃取物、avoB以及THHY能夠有效地抑制登革病毒感染所造成之發炎反應。此外，利用內插法計算可得酪梨萃取物抑制TNF- α 、IL-1 β 及IL-6 RNA生成之半效應濃度分別為 $56.7 \pm 2.1 \mu\text{g/ml}$ 、 $67.4 \pm 4.9 \mu\text{g/ml}$ 以及 $80.6 \pm 1.1 \mu\text{g/ml}$ 。而avoB抑制TNF- α 、IL-1 β 及IL-6 RNA生成之半效應濃度分別為 $11.7 \pm 3.4 \mu\text{M}$ 、 $8.7 \pm 3.1 \mu\text{M}$ 以及 $22.4 \pm 5.7 \mu\text{M}$ 。THHY抑制TNF- α 、IL-1 β 及IL-6 RNA生成之半效應濃度則分別為 $7.8 \pm 2.7 \mu\text{M}$ 、 $4.1 \pm 1.4 \mu\text{M}$ 以及 $48.6 \pm 4.2 \mu\text{M}$ 。

細胞毒性分析

【0062】 此外，發明人亦進行以下實驗，以測試酪梨萃取物、avoB以及THHY的濃度對於Huh-7細胞存活率(cell viability)的影響。

【0063】 分別以不同濃度之酪梨萃取物、avoB以及THHY處理Huh-7細胞，細胞經3天培養後，以細胞毒性測試套組(MTS assay kit, CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell proliferation assay system, Promega, WI, USA)測定酪梨萃取物、avoB以及THHY對於Huh-7細胞存活率之影響(細胞毒性)。根據套組所附之操作手冊進行實驗，使用550 BioRad plate-reader(Bio-Rad, Hertfordshire, UK)，測定波長490 nm下的吸光值。

【0064】 實驗結果經換算後，可得到不同濃度之酪梨萃取物、avoB以及THHY相對於Huh-7細胞存活率，結果如第13A~13C圖所示，圖中對照組為0.1% DMSO，且圖中數據為三次重複實驗所得之結果。應注意的是，對Huh-7細胞而言，酪

梨萃取物、avoB以及THHY之 CC_{50} (cytotoxic concentration 50)分別為 $960\pm 5.8 \mu\text{g/ml}$ 、 $103\pm 6.2 \mu\text{M}$ 以及 $142\pm 4.7 \mu\text{M}$ 。

【0065】 前述實驗中處理Huh-7細胞的酪梨萃取物、avoB以及THHY之最高濃度分別不超過 $80\mu\text{g/ml}$ 、 $20\mu\text{M}$ 以及 $20\mu\text{M}$ ，皆遠小於酪梨萃取物、avoB以及THHY之 CC_{50} 。由此可知，前述處理Huh-7細胞的酪梨萃取物、avoB及THHY濃度對於Huh-7細胞是沒有毒性的。

【0066】 綜上所述，酪梨萃取物、avocadenol B以及(2*R*,4*R*)-1,2,4-三羥基十七碳-16-炔可有效地抑制登革病毒的RNA及蛋白質之生成，具有抑制登革病毒之複製活性的功效。再者，酪梨萃取物、avocadenol B以及(2*R*,4*R*)-1,2,4-三羥基十七碳-16-炔可誘導受登革病毒感染之細胞產生干擾素以對抗病毒。此外，它們亦可有效地抑制登革病毒所誘導之發炎反應。

【0067】 值得注意的是，酪梨萃取物、avoB以及THHY抑制登革病毒的機制，很可能是藉由恢復或增強經病毒感染的細胞中用以對抗病毒之干擾素而達成。

【0068】 雖然本發明已以數個較佳實施例揭露如上，然其並非用以限定本發明，任何所屬技術領域中具有通常知識者，在不脫離本發明之精神和範圍內，當可作任意之更動與潤飾，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為準。

【符號說明】

【0069】 無。

【序列表】

<110> 高雄醫學大學

<120> 酪梨萃取物、avocadenol B 及 (2R,4R)-1,2,4-三羥基十七碳-16-炔的用途，以及包含酪梨萃取物之保健食品

<160> 22

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

● <220>

<221> primer_bind

<400> 1

aaggtgagaa gcaatgcagc 20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

● <220>

<221> primer_bind

<400> 2

ccactcaggg agttctctct 20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

● <220>

<221> primer_bind

<400> 3
gtcttcacca ccatggagaa 20

<210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> primer_bind

<400> 4
atggcatgga ctgtggatcat 20

<210> 5
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> primer_bind

<400> 5
gcaagtcaag ctgctctgtg 20

<210> 6
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> primer_bind

<400> 6
gatggtttca gccttttgga 20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> primer_bind

<400> 7

aggagtttga tggcaaccag 20

● <210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> primer_bind

<400> 8

catcagggga gtctcttcca 20

● <210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> primer_bind

<400> 9

caagcttaag agcctcatcc 20

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> primer_bind

<400> 10

tgggctgtgt tgaaatgtgt

20

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> primer_bind

<400> 11

acagctgaaa gccttttgga

20

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> primer_bind

<400> 12

gcattaaagg caggaagcac

20

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> primer_bind

<400> 13

cactgacatc ccagacgatg

20

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

● <223> primer_bind

<400> 14

gatcaggctc ttcagcttgg

20

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

● <223> primer_bind

<400> 15

atgatggaaa gcgaacaagg

20

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

● <223> primer_bind

<400> 16

gagatgatgc catcccgtag

20

<210> 17

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> primer_bind

<400> 17

cctgtgagga ggacgaac

18

<210> 18

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> primer_bind

<400> 18

aagtggtagt cttggtgc

18

<210> 19

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> primer_bind

<400> 19

ggagaatgac ctgagcac

18

<210> 20

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> primer_bind

<400> 20

gaccagacat caccaagc

18

<210> 21

● <211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> primer_bind

<400> 21

tcagaattgc cattgcaca

19

<210> 22

● <211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> primer_bind

<400> 22

gtcggaggct taattacaca tg

22

106年9月22日
修正
補充

申請專利範圍

公告本

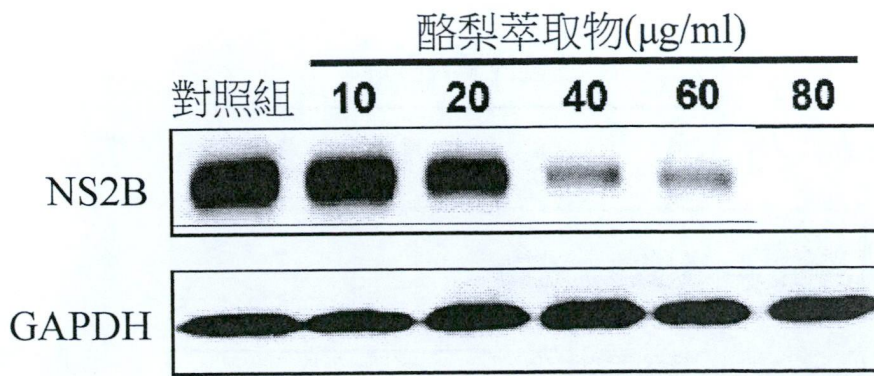
1. 一種酪梨萃取物 (*Persea americana*) 用於製備預防或治療黃熱病毒科 (Flaviviridae family) 病毒感染的藥物之用途，其中該酪梨萃取物為 (2R,4R)-1,2,4-三羥基十七碳-16-炔 ((2R,4R)-1,2,4-trihydroxy heptadec-16-yne)。
2. 如申請專利範圍第 1 項所述之用途，其中該黃熱病毒科 (Flaviviridae family) 病毒包括：登革病毒 (Dengue virus)、黃熱病毒 (Yellow fever virus)、西尼羅河病毒 (West Nile virus)、日本腦炎病毒 (Japanese encephalitis virus) 或 C 型肝炎病毒 (Hepatitis C virus)。
3. 如申請專利範圍第 1~2 項任一項所述之用途，其中該酪梨萃取物具有抑制登革病毒 (Dengue virus) 之蛋白質及 RNA 生成的能力。
4. 如申請專利範圍第 1~2 項任一項所述之用途，其中該酪梨萃取物具有抑制登革病毒 (Dengue virus) 所誘導之發炎反應的能力。
5. 如申請專利範圍第 1~2 項任一項所述之用途，其中該酪梨萃取物具有誘導受到登革病毒 (Dengue virus) 感染之細胞產生干擾素的能力。
6. 一種酪梨萃取物 (*Persea americana*) 用於製備抑制黃熱

病毒科(Flaviviridae family)病毒複製活性或病毒性發炎反應之藥物的用途，其中該酪梨萃取物為(2*R*,4*R*)-1,2,4-三羥基十七碳-16-炔((2*R*,4*R*)-1,2,4-trihydroxy heptadec-16-yne)。

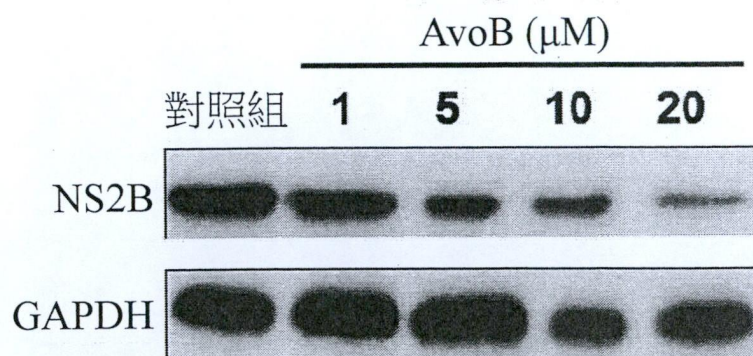
7. 如申請專利範圍第6項所述之用途，其中該黃熱病毒科(Flaviviridae family)病毒包括：登革病毒(Dengue virus)、黃熱病毒(Yellow fever virus)、西尼羅河病毒(West Nile virus)、日本腦炎病毒(Japanese encephalitis virus)或C型肝炎病毒(Hepatitis C virus)。

圖式

公告本

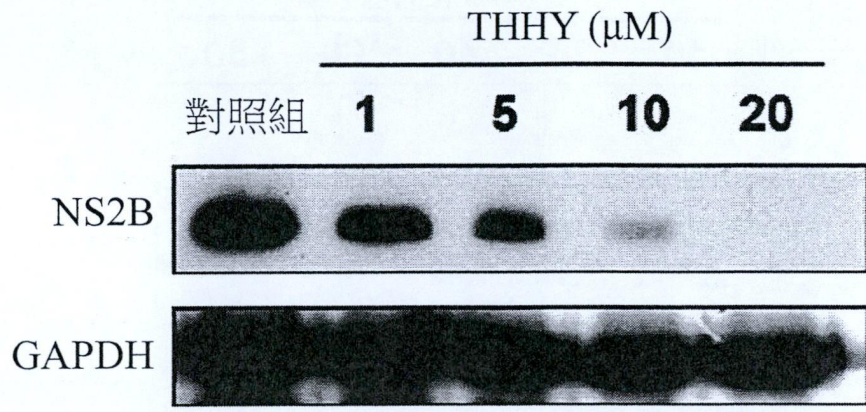


第 1A 圖

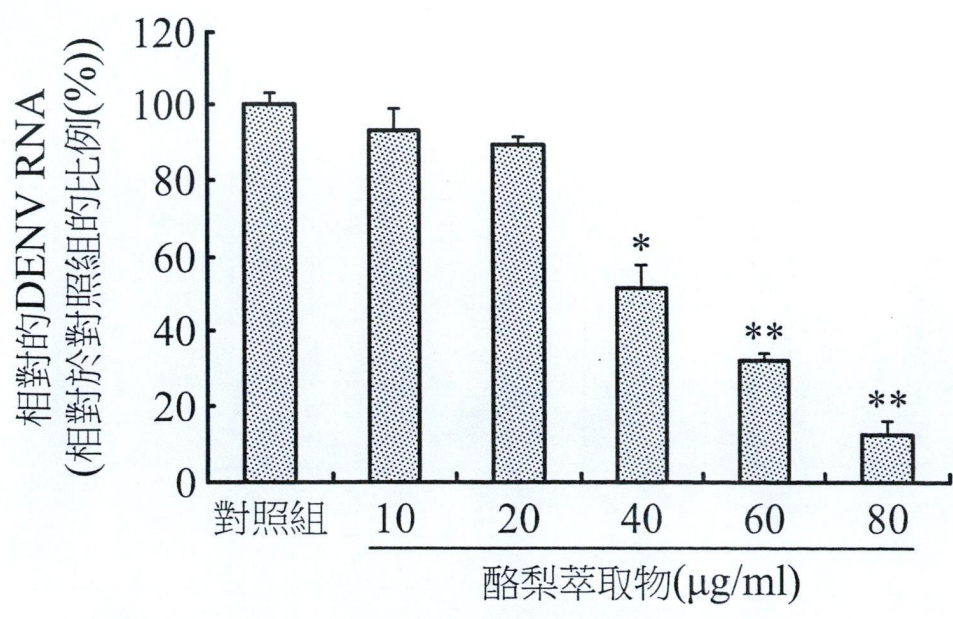


第 1B 圖

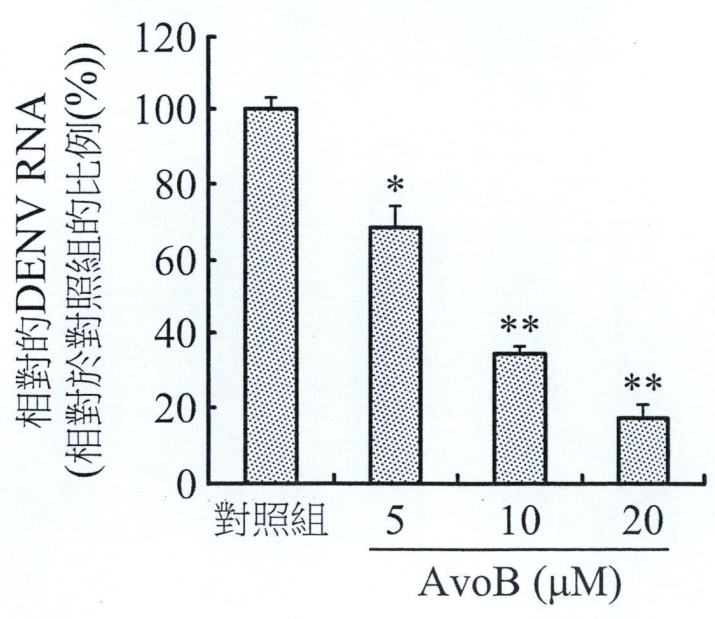
本書公



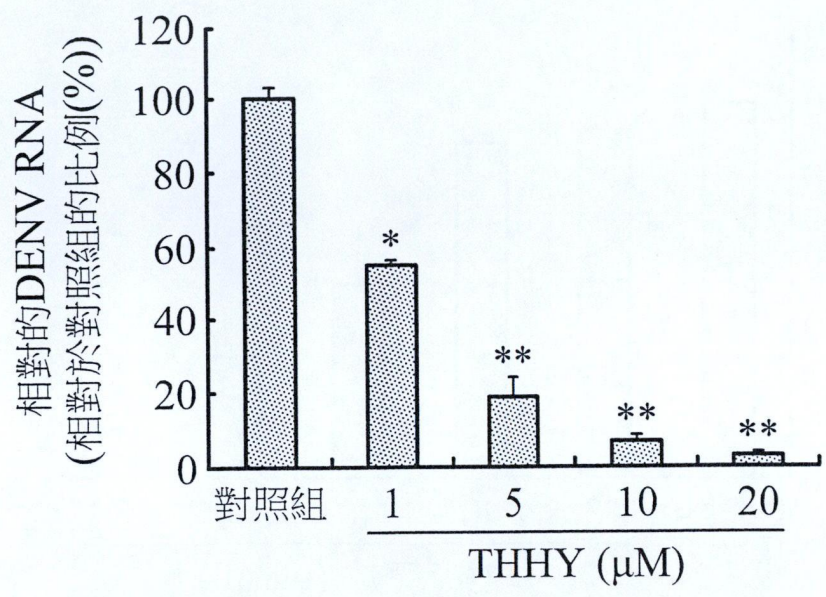
第 1C 圖



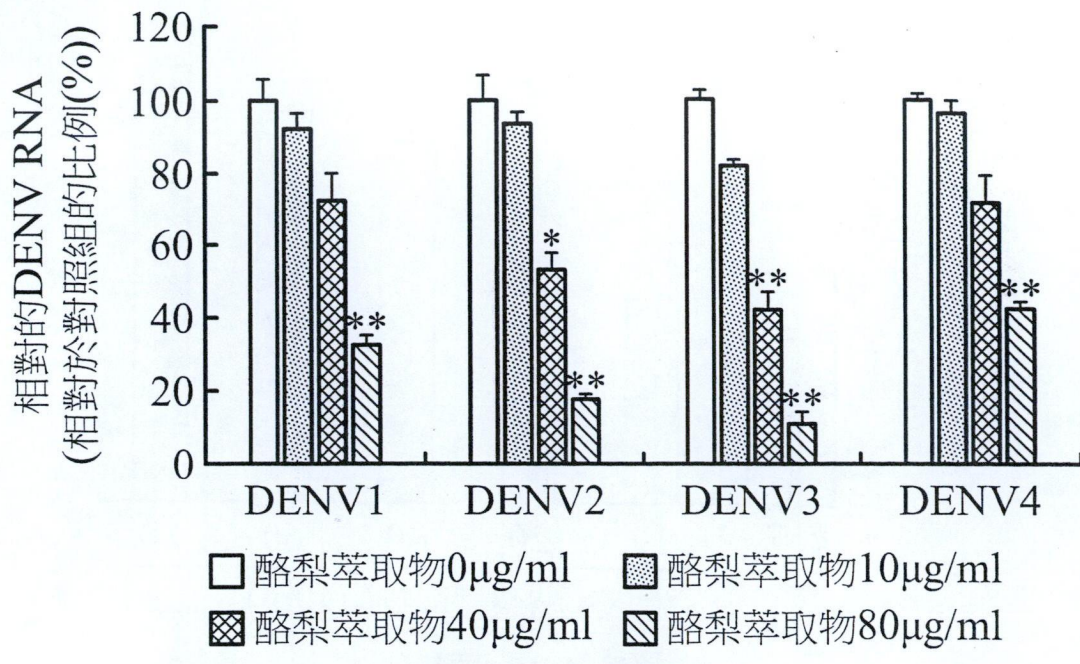
第 2A 圖



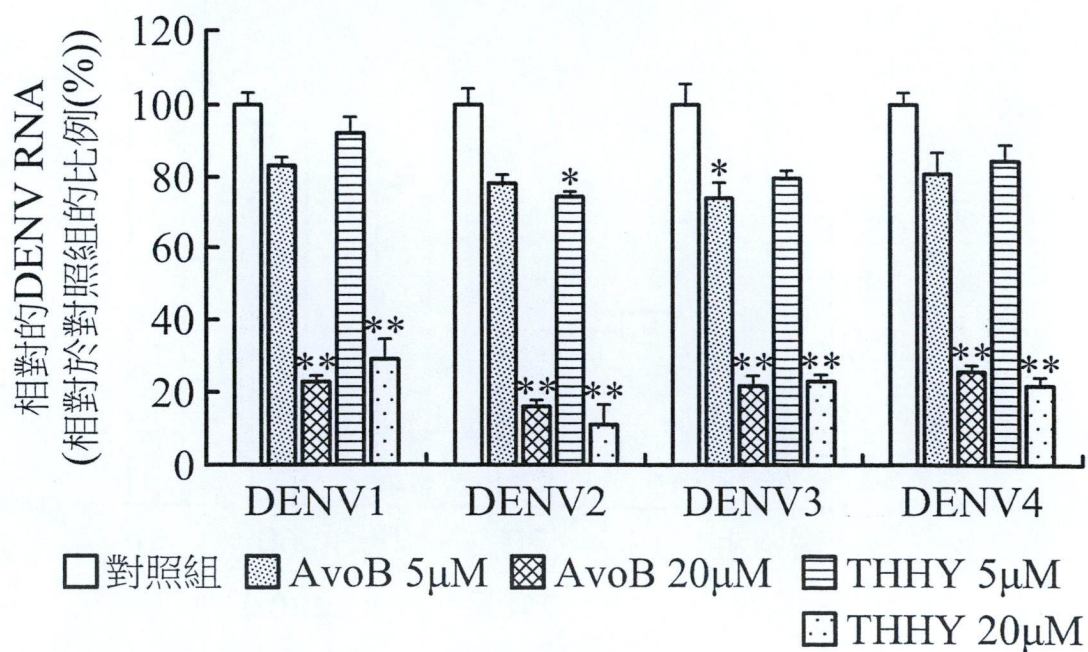
第 2B 圖



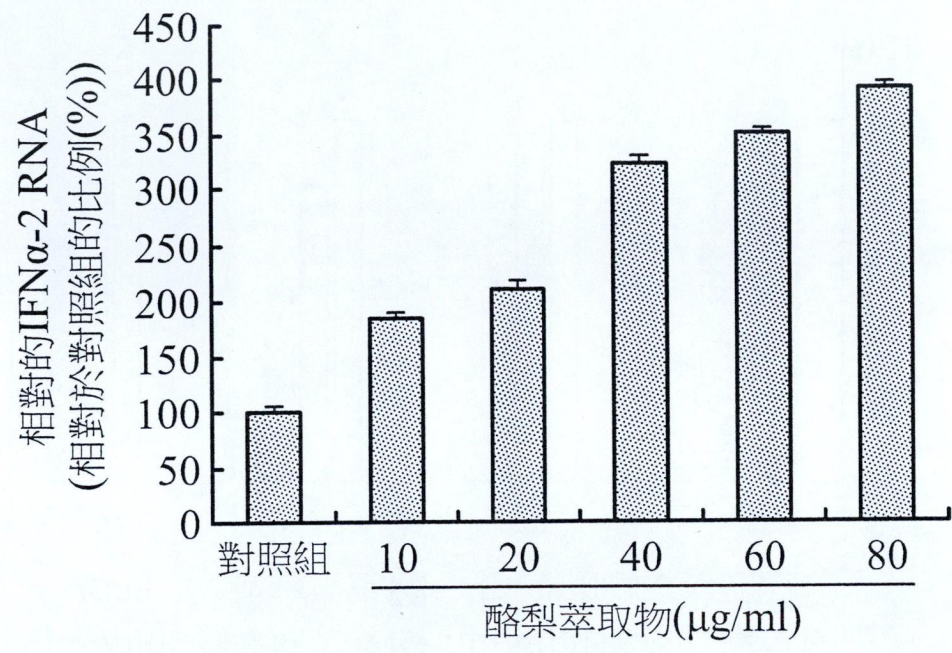
第 2C 圖



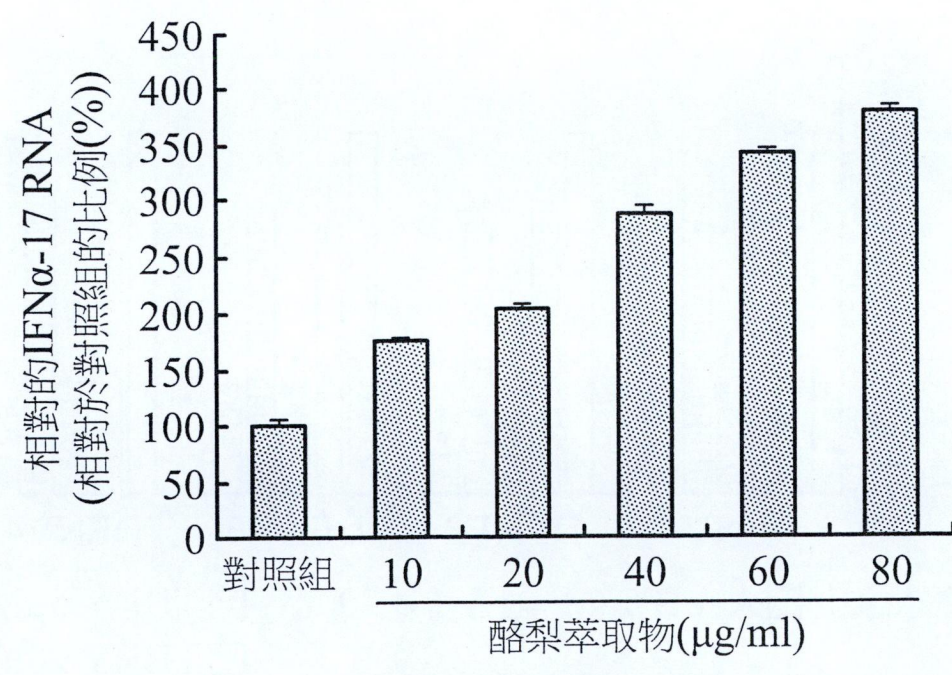
第 3A 圖



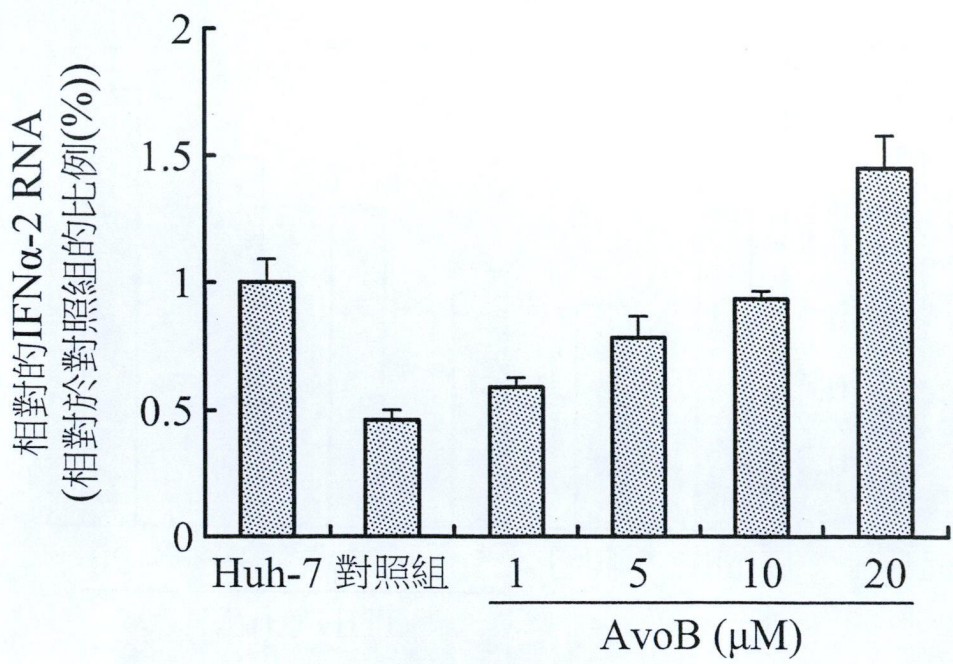
第 3B 圖



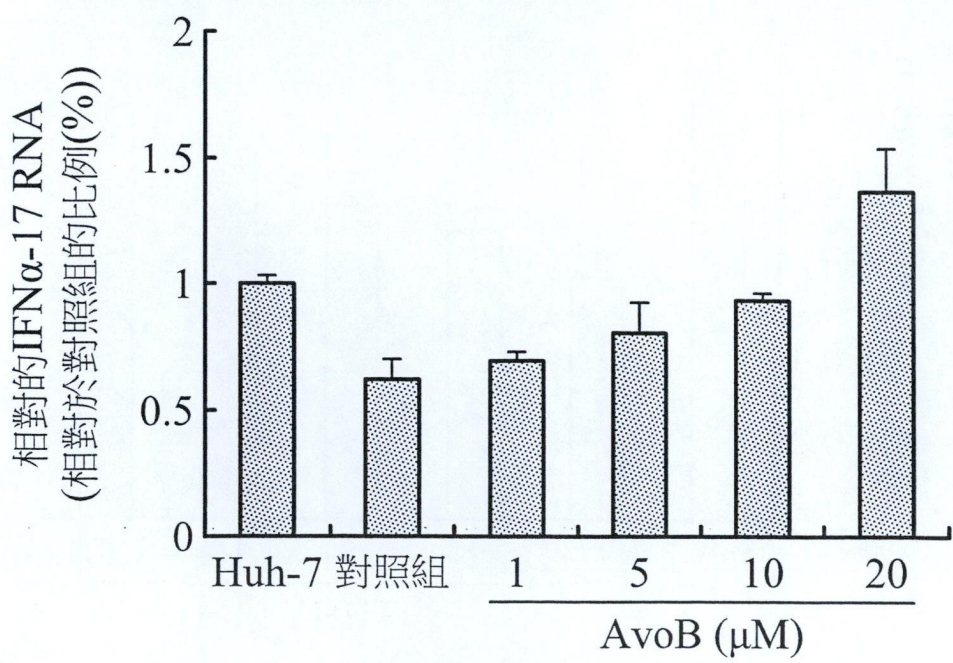
第 4A 圖



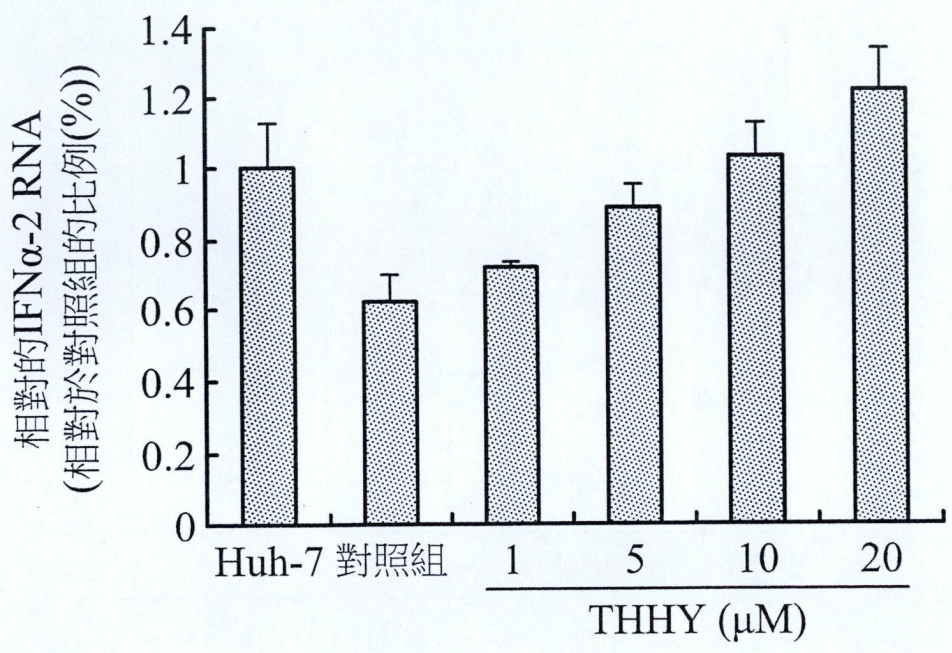
第 4B 圖



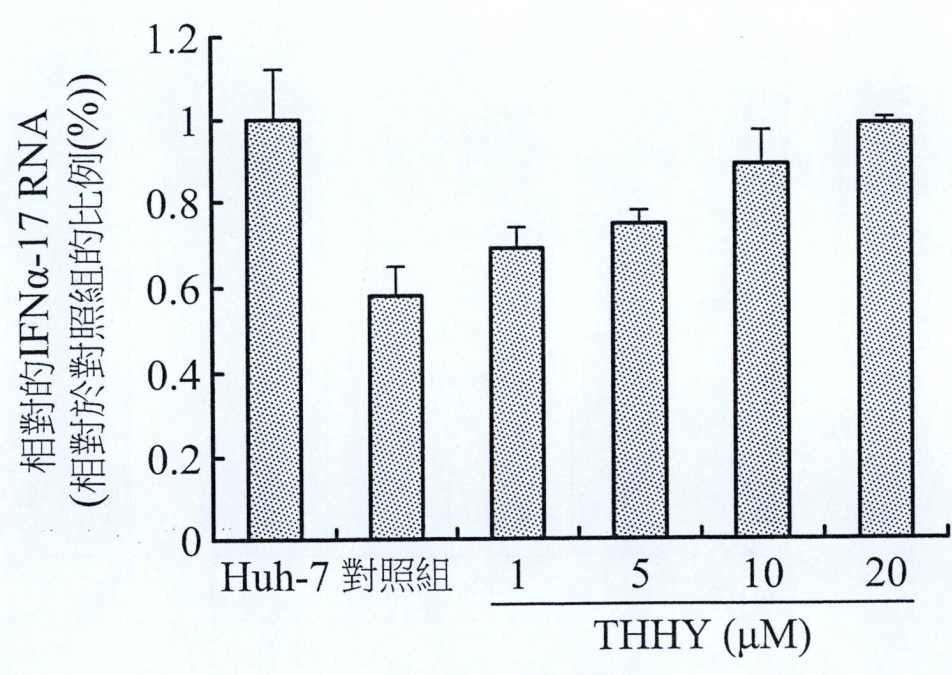
第 5A 圖



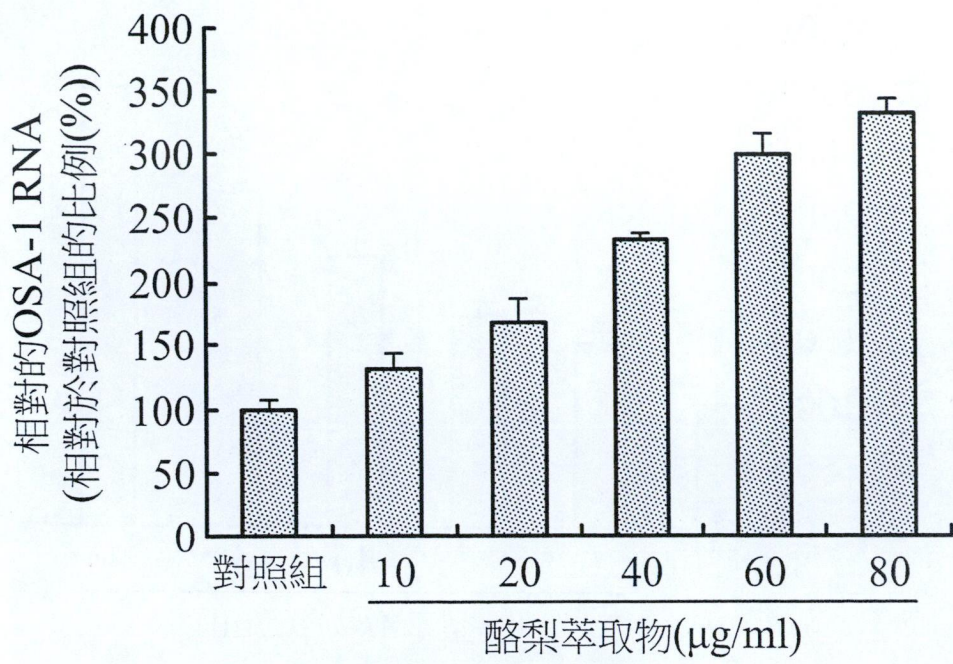
第 5B 圖



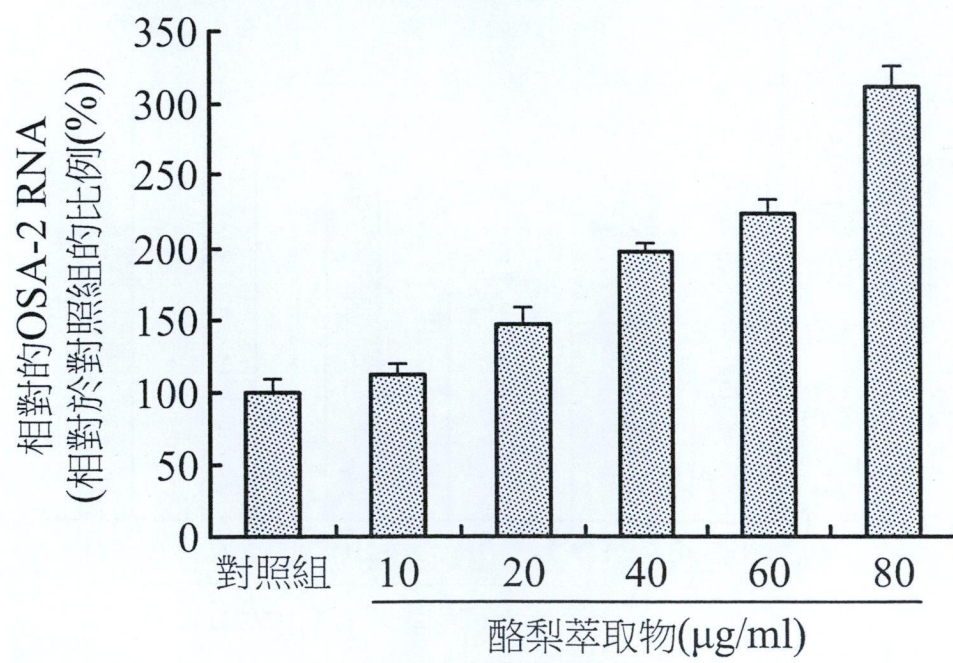
第 6A 圖



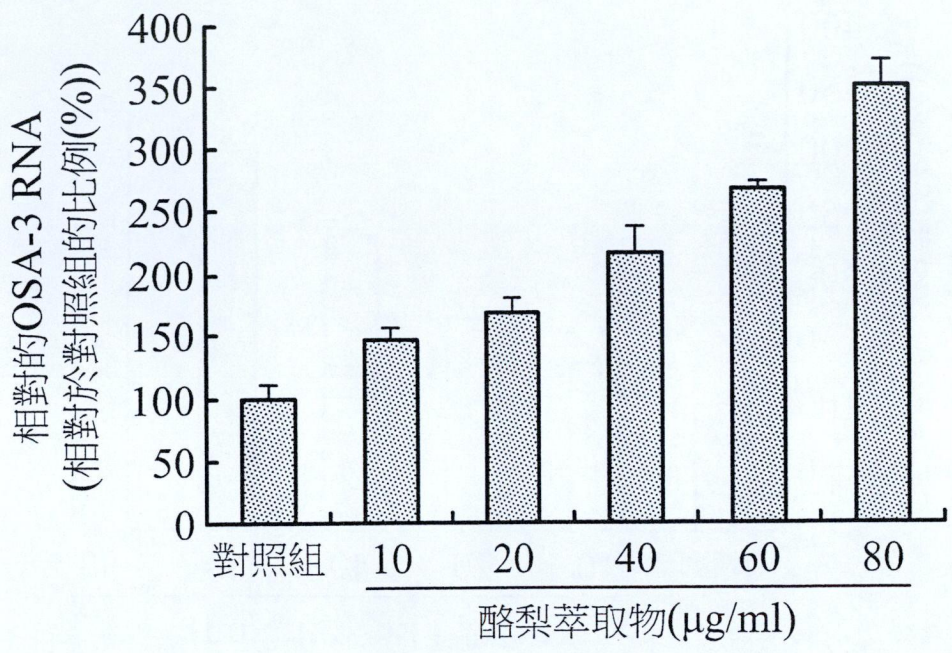
第 6B 圖



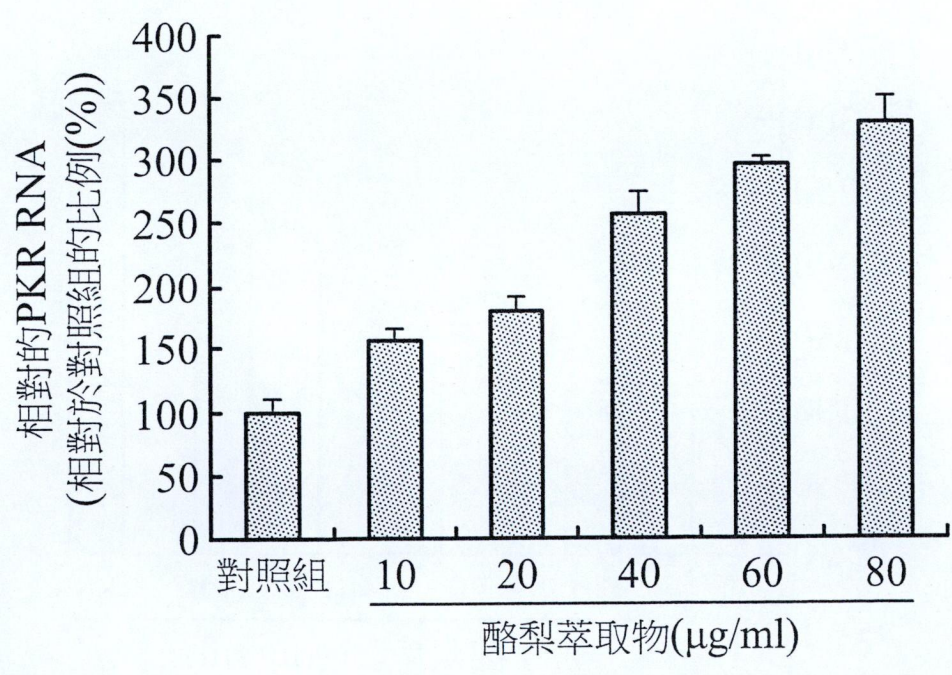
第 7A 圖



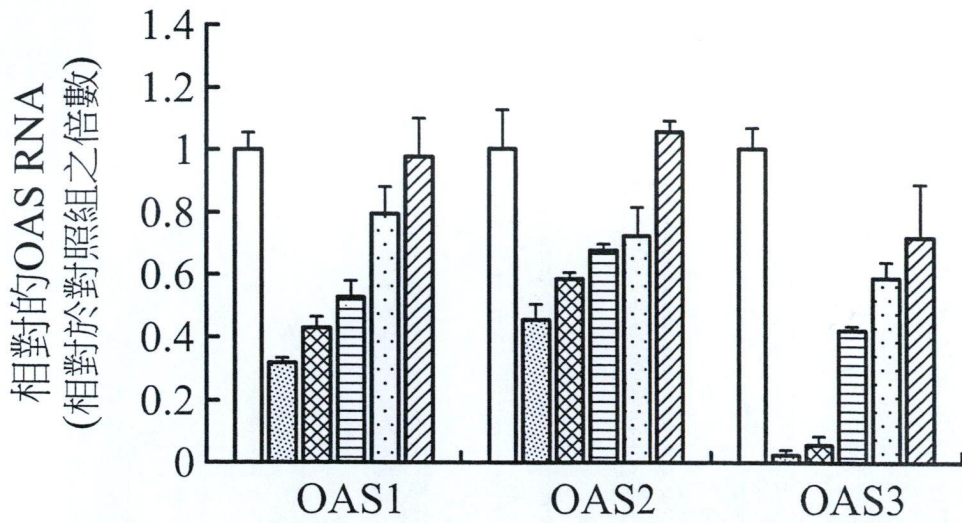
第 7B 圖



第7C圖

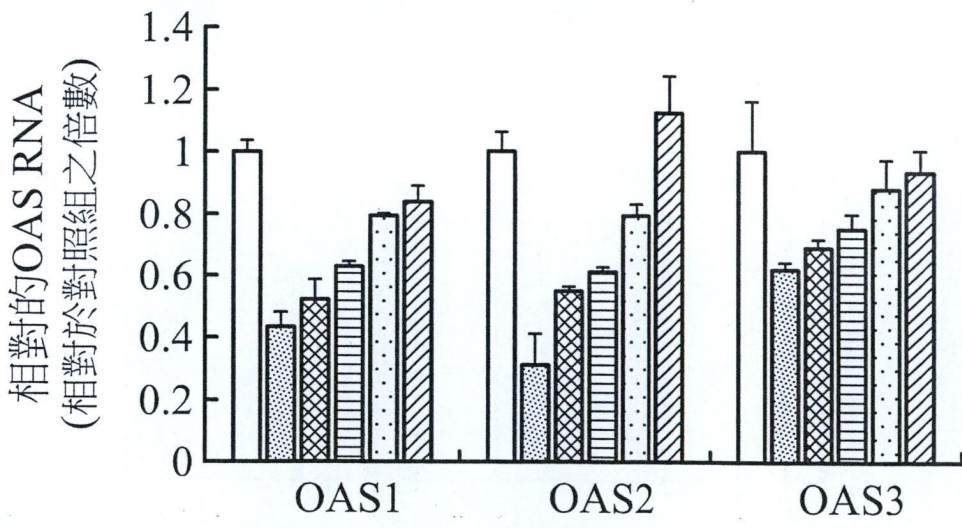


第7D圖



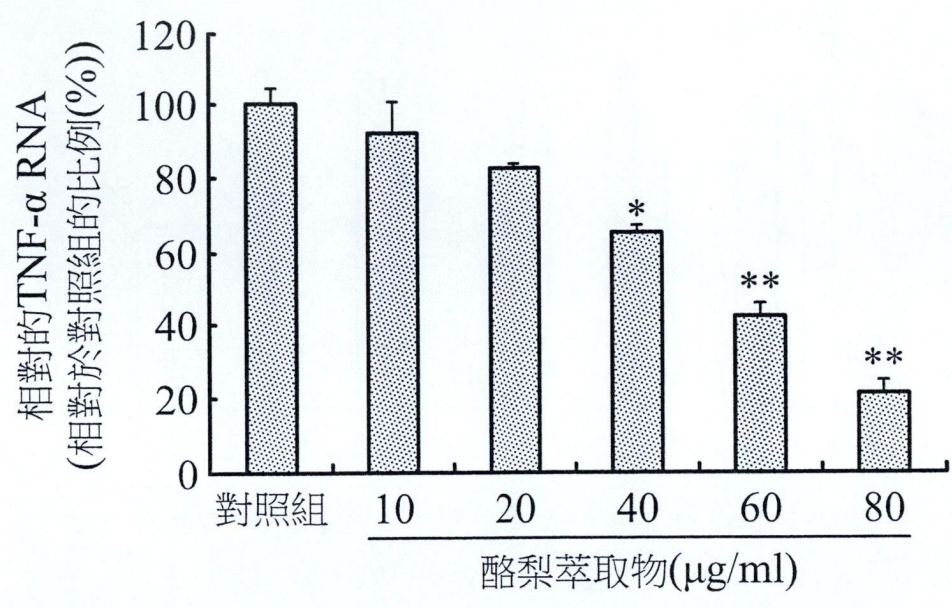
□ AvoB 0μM ▨ DENV+AvoB 0μM ▩ DENV+AvoB 1μM
 ▪ DENV+AvoB 5μM ▫ DENV+AvoB 10μM
 ▬ DENV+AvoB 20μM

第 8 圖

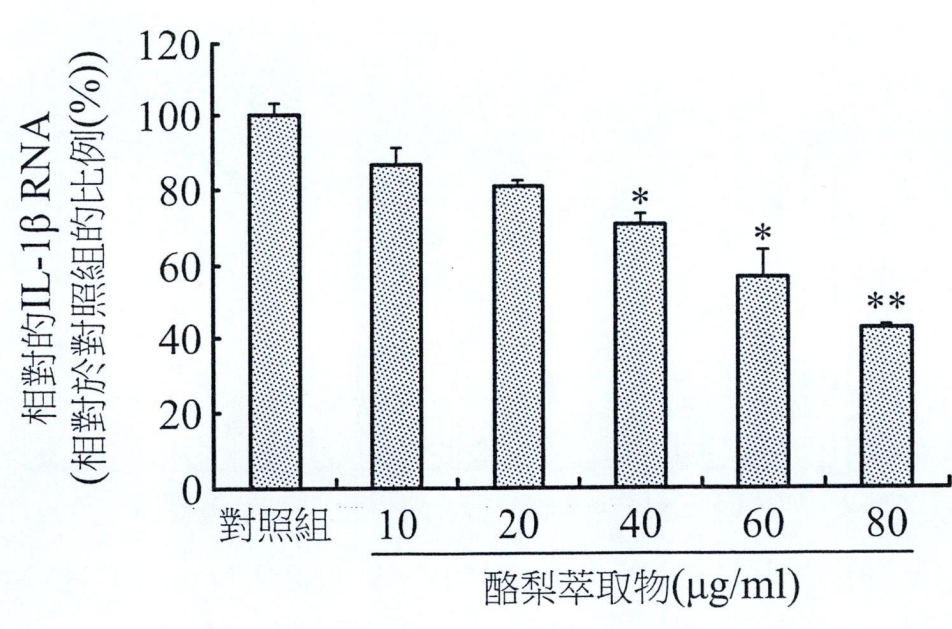


□ THHY 0μM ▨ DENV+THHY 0μM ▩ DENV+THHY 1μM
 ▪ DENV+THHY 5μM ▫ DENV+THHY 10μM
 ▬ DENV+THHY 20μM

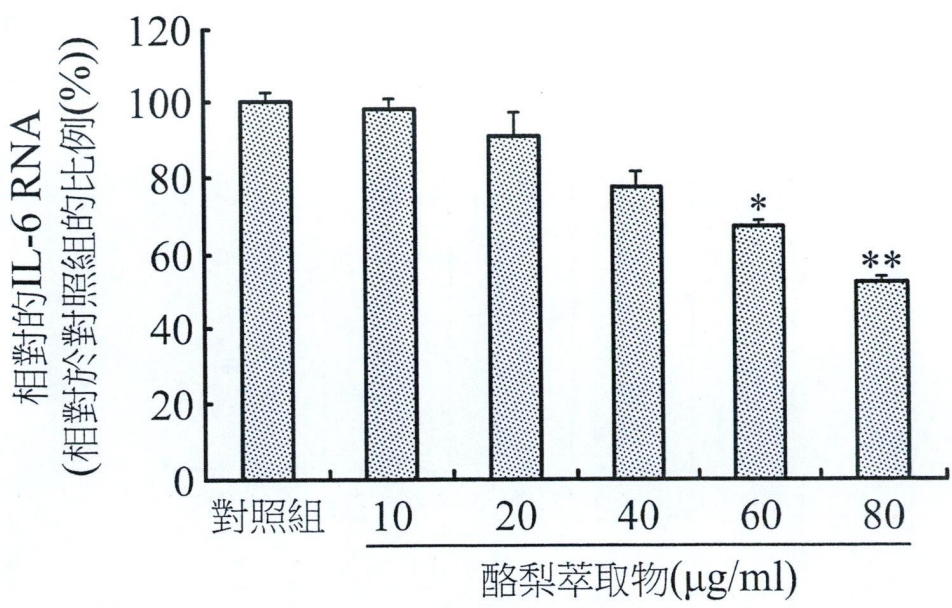
第 9 圖



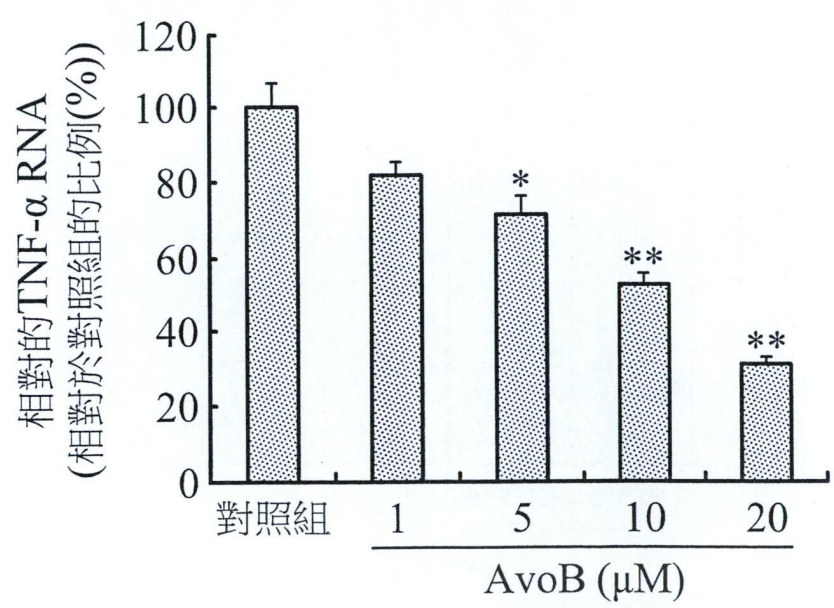
第 10A 圖



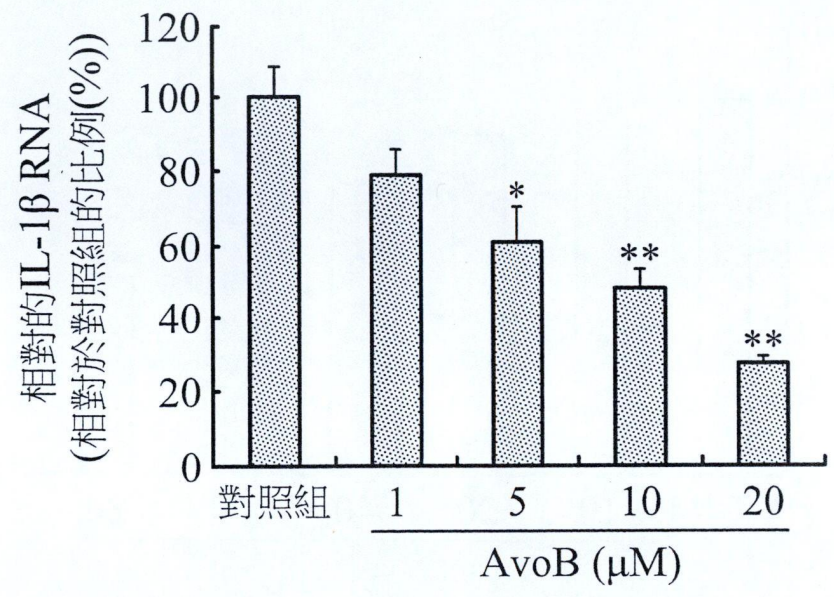
第 10B 圖



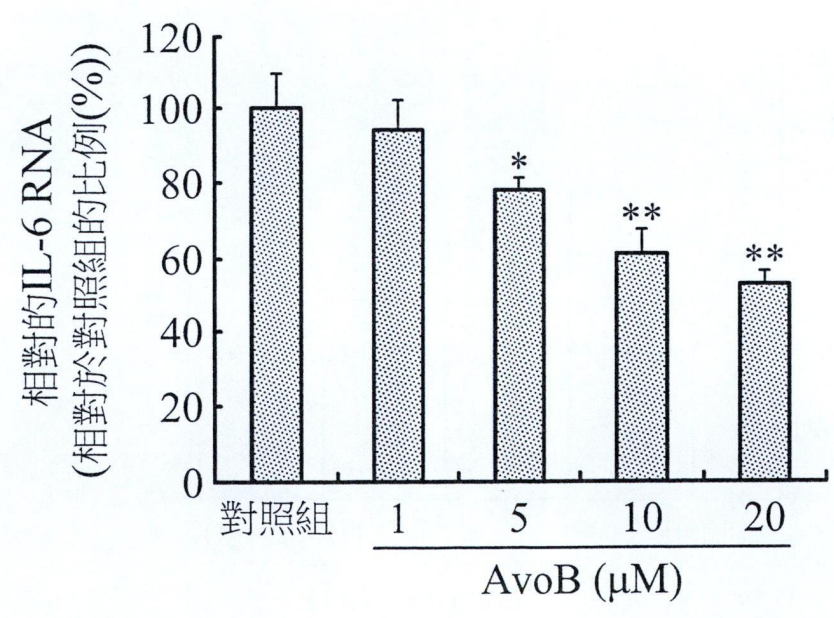
第 10C 圖



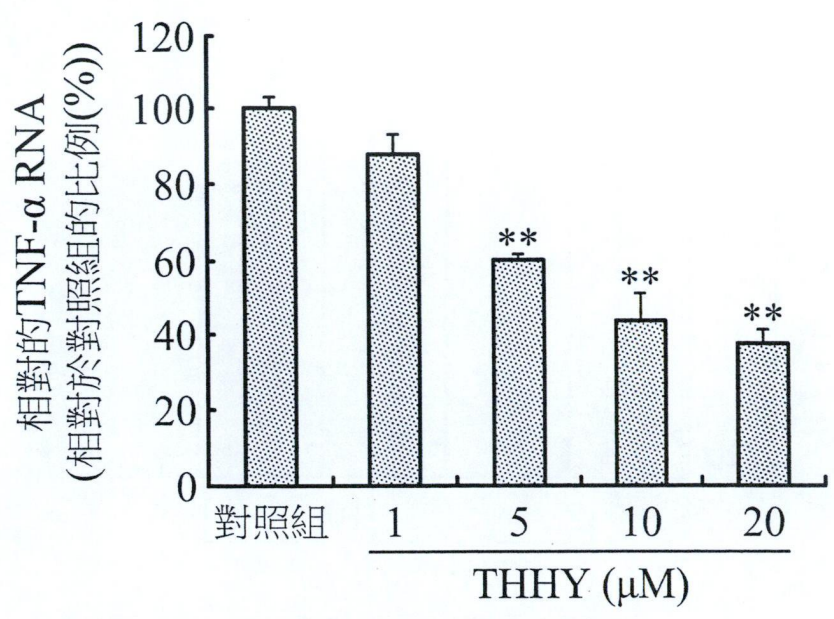
第 11A 圖



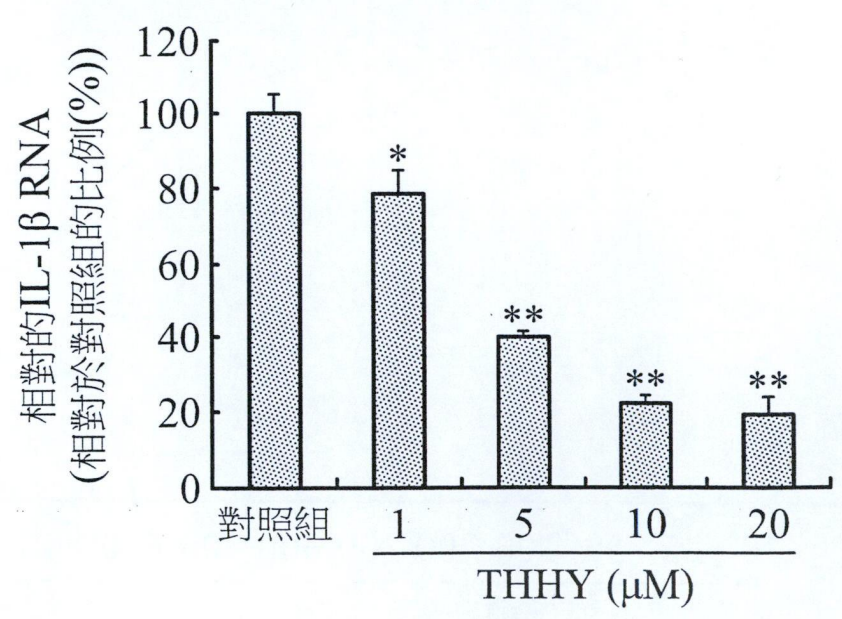
第 11B 圖



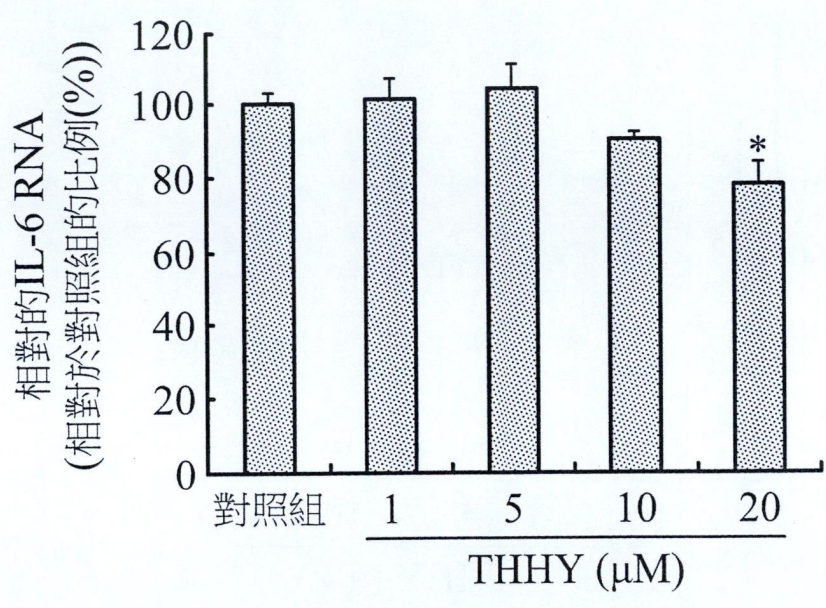
第 11C 圖



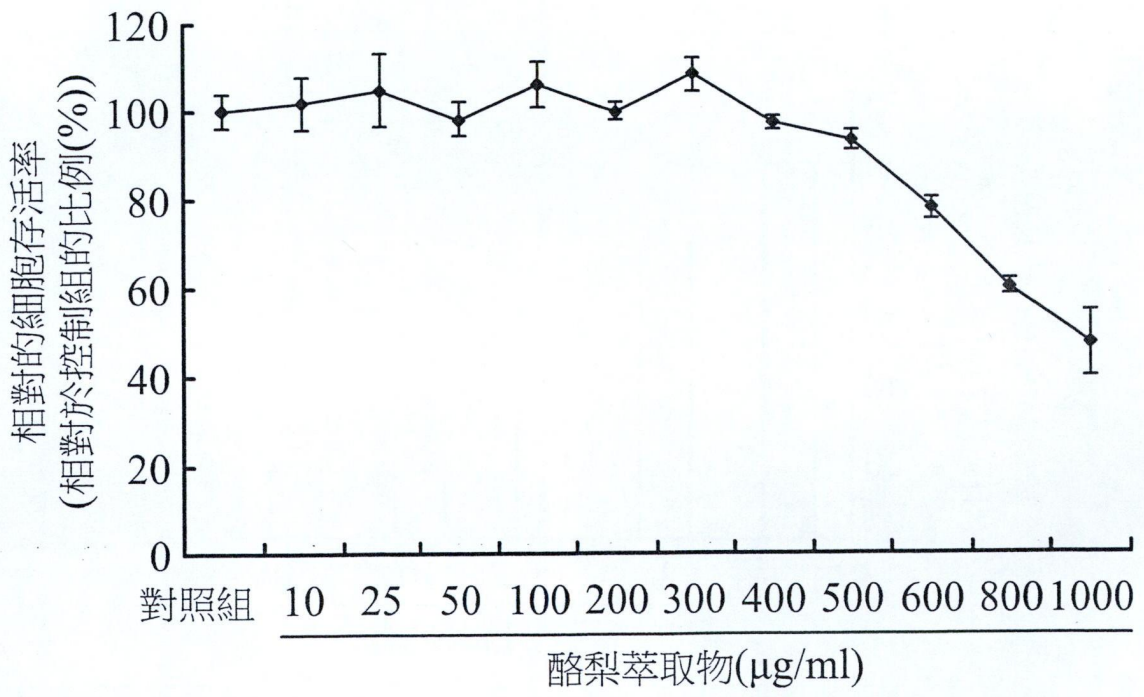
第 12A 圖



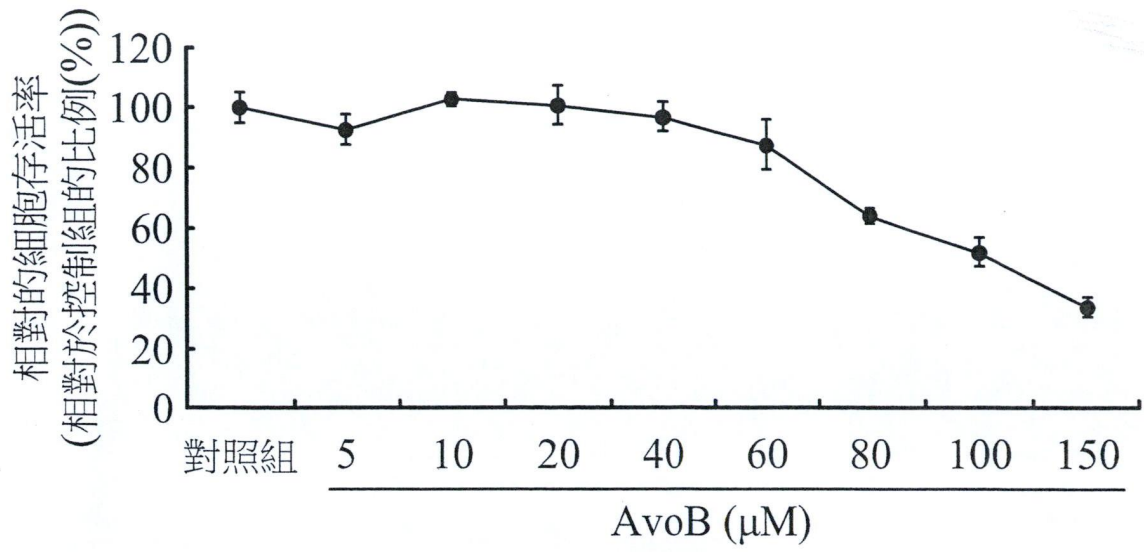
第 12B 圖



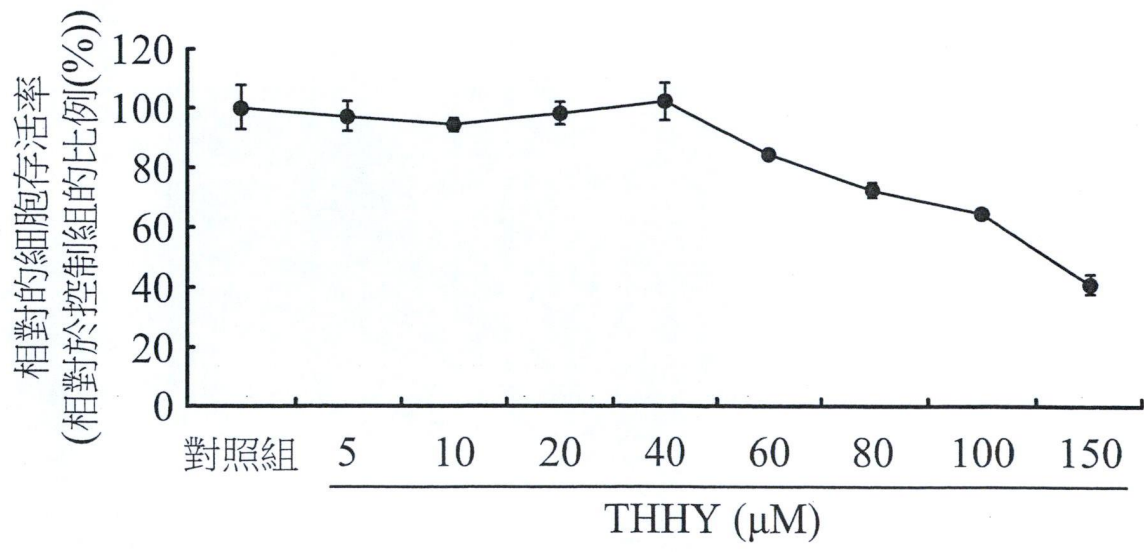
第 12C 圖



第 13A 圖



第 13B 圖



第 13C 圖