



(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 I714942 B

(45)公告日：中華民國 110 (2021) 年 01 月 01 日

(21)申請案號：108101255

(22)申請日：中華民國 106 (2017) 年 10 月 05 日

(51)Int. Cl. : A61K31/366 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

A61P31/12 (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：陳彥旭 CHEN, YEN HSU (TW)；林俊祐 LIN, CHUN YU (TW)；海丁 帕拉斯凱維 HELDIN, PARASKEVI (SE)

(74)代理人：蔡清福；蔡駁理

(56)參考文獻：

CN 102272134A

M. Mazzei, E. Nieddu, M. Miele et al., "Activity of Mannich bases of 7-hydroxycoumarin against Flaviviridae," Bioorganic and Medicinal Chemistry, vol. 16, no. 5, pp. 2591-2605, 2008.

Nagy, Nadine, et al. "4-methylumbelliferone treatment and hyaluronan inhibition as a therapeutic strategy in inflammation, autoimmunity, and cancer." Frontiers in immunology 6 (2015): 123.

Canard, Bruno. "Antiviral research and development against dengue virus." Available Accessed 9 (2012).[https://www.who.int/tdr/research/ntd/dengue/dengue\\_full\\_length\\_report.pdf](https://www.who.int/tdr/research/ntd/dengue/dengue_full_length_report.pdf)

審查人員：林佳慧

申請專利範圍項數：6 項 圖式數：5 共 23 頁

(54)名稱

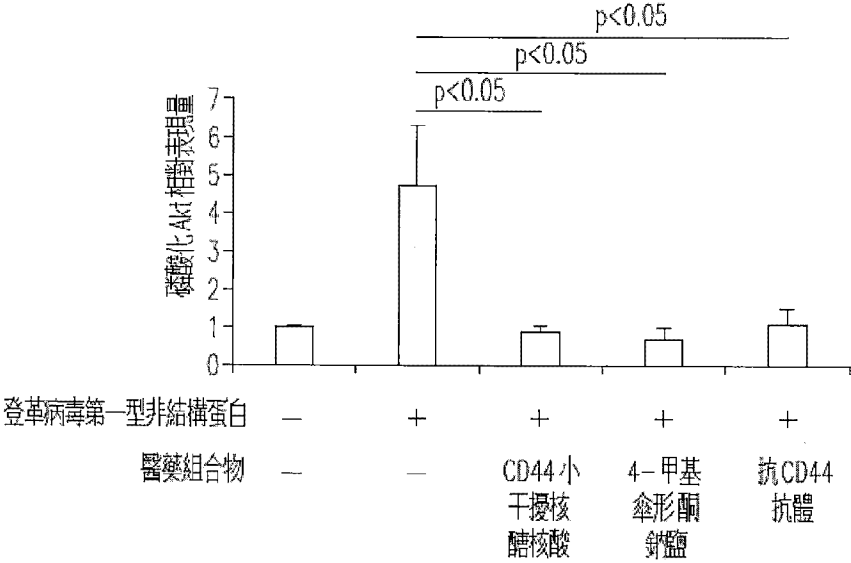
用於預防或治療罹患登革熱所引起之發炎反應的醫藥組合物及其用途

(57)摘要

本發明揭露用於預防或治療罹患登革熱所引起之發炎反應的醫藥組合物及其用途，其中該醫藥組合物包含 4-甲基傘形酮鈉鹽(4-methyl umbelliferone sodium salt)以及阻斷登革熱患者血管內皮細胞表面 CD44 抗原之抗 CD44 抗體中至少任何一者。當登革熱病患血清中的玻尿酸以酵素連結免疫吸附試驗測量為高於或等於 70ng/mL 時，表明該患者被判斷為在該患者的患病歷程中將出現警示徵象。

The present invention discloses a pharmaceutical composition for preventing or treating inflammation induced by dengue fever and its use, wherein the pharmaceutical composition includes at least one of the 4-methyl umbelliferone sodium salt, and the anti-CD44 antibody for blocking the CD44 antigen on the vascular endothelial cells of a dengue patient. When the level of serum hyaluronan in the dengue patient is higher than or equal to 70 ng/ml by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), it indicates that warning signs will be developed in the whole illness course of the patient.

指定代表圖：



第 5 圖

I714942

## 發明摘要

※ 申請案號：

※ 申請日：

※IPC 分類：

## 【發明名稱】(中文/英文)

用於預防或治療罹患登革熱所引起之發炎反應的醫藥組合物及其用途

Pharmaceutical Composition for Preventing or Treating Inflammation Induced by Dengue Fever and Its Use

## 【中文】

本發明揭露用於預防或治療罹患登革熱所引起之發炎反應的醫藥組合物及其用途，其中該醫藥組合物包含4-甲基傘形酮鈉鹽（4-methyl umbelliferone sodium salt）以及阻斷登革熱患者血管內皮細胞表面CD44抗原之抗CD44抗體中至少任何一者。當登革熱病患血清中的玻尿酸以酵素連結免疫吸附試驗測量為高於或等於70 ng/mL時，表明該患者被判斷為在該患者的患病歷程中將出現警示徵象。

## 【英文】

The present invention discloses a pharmaceutical composition for preventing or treating inflammation induced by dengue fever and its use, wherein the pharmaceutical composition includes at least one of the 4-methyl umbelliferone sodium salt, and the anti-CD44 antibody for blocking the CD44 antigen on the vascular endothelial cells of a dengue patient. When the level of serum hyaluronan in the dengue patient is higher than or equal to 70 ng/ml by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), it indicates that warning signs will be developed in the whole illness course of the patient.

**【代表圖】**

**【本案指定代表圖】：**第（ 5 ）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】(中文/英文)

用於預防或治療罹患登革熱所引起之發炎反應的醫藥組合物及其用途

Pharmaceutical Composition for Preventing or Treating Inflammation Induced by Dengue Fever and Its Use

## 【技術領域】

【0001】 本發明關於一種醫藥組合物及其用途，尤其本發明關於一種用於預防或治療罹患登革熱所引起之發炎反應的醫藥組合物及其用途。

## 【先前技術】

【0002】 黃病毒科(Flaviviridae)是單股線型RNA病毒，以人類或其他哺乳動物作為天然宿主，透過節肢動物(例如蟬和蚊子)傳播。黃病毒科被分類為4個屬、超過100種病毒，包括黃病毒屬(*Flavivirus*)、瘟疫病毒屬(*Pestivirus*)、肝炎病毒屬(*Hepacivirus*)及趨肝性病毒屬(*Pegivirus*)。其中，黃病毒屬包括為人所熟知的黃熱病毒(yellow fever virus)、日本腦炎病毒(Japanese encephalitis virus, JEV)、登革熱病毒(dengue virus)、西尼羅河病毒(West Nile virus)及茲卡病毒(Zika virus)；瘟疫病毒屬包括牛科病毒性腹瀉病毒(bovine viral diarrhea virus)；肝炎病毒屬被分類為14個種，簡稱為肝炎病毒A、B、C…至N，其中肝炎病毒C即為世人熟知的C型肝炎病毒(hepatitis C virus)；以及趨肝性病毒被分類為11個種，簡稱為趨肝性病毒A、B、C…至K。

【0003】 其中，登革熱是由登革病毒所引起的急性傳染病，好發於亞熱帶及熱帶國家，藉由埃及斑蚊(*Aedes aegypti*)及白線斑蚊(*Aedes albopictus*)蚊子傳播給人類。登革熱依據不同的血清型病毒，分為I、II、

III、IV四種型別，而每一型別都具有感染致病的能力。

【0004】 典型登革熱的潛伏期約為3至8天（最長達14天）。病患發病前一天至發病後5天的這段期間稱為「可感染期」或稱為「病毒血症期」。由於登革病毒存在於病患血液中，如果該病患在可感染期被埃及斑蚊或白線斑蚊叮咬，則這隻蚊子將感染登革病毒。登革病毒在蚊子體內經過8至12天的增殖並再叮咬其他人時，將把其體內的登革病毒傳染給另一人。

【0005】 有些患者感染登革熱時的症狀輕微，甚至不會出現生病症狀。典型登革熱症狀則為高於38°C的突發性發燒、頭痛、後眼窩痛、肌肉痛、關節痛、出疹、嗜睡、躁動不安、肝臟腫大、血管通透性增加、血漿滲漏、出血、嚴重致命性出血等現象。更甚者，若是病患前後兩次感染不同血清型的登革病毒時，尤其是第一次感染第I型血清型登革病毒、續發感染第II型或第III型血清型登革病毒的病患，或者是第一次感染第III型血清型登革病毒、續發感染第II型血清型登革病毒的病患，則其演變成登革出血熱（dengue hemorrhagic fever, DHF）及登革休克症候群（dengue shock syndrome, DSS）的機率大增，導致更嚴重的臨床症狀，例如休克或嚴重併發症。若無及時治療，死亡率高達20%以上。

【0006】 目前並沒有特效藥物可以治療登革熱。在登革熱的預防上，法國賽諾菲巴斯德（Sanofi Pasteur）藥廠開發全球首支登革熱疫苗（四價活性減毒疫苗），適用於9至45歲的年齡層，但對第II型血清型登革熱病毒產生的保護力不佳。此外，葛蘭素史克（GlaxoSmith-Kline, GSK）藥廠也開發去活化疫苗TDEN-PIV，正在進行第二期臨床試驗。

【0007】 世界衛生組織（WHO）在2009年版登革熱病例分類中，依照有無「警示徵象」將登革熱病患分為A、B及C三群，而非單純地依照傳統分類區分為登革熱與登革出血熱病患。警示徵象是指登革熱病患出現例

如腹部疼痛及壓痛、持續性嘔吐、臨床上體液蓄積（腹水、胸水等）、黏膜出血、嗜睡/躁動不安、肝臟腫大超出肋骨下緣2公分及血比容值增加伴隨血小板急速下降）與潛在疾病因素及特定社經狀況（如糖尿病、腎衰竭、慢性溶血疾病、肥胖、懷孕婦女、嬰兒、老人、獨居或偏遠地區居民））。

【0008】 其中，A群病患無「警示徵象」與潛在疾病因素及特定社經狀況；B群病患具有「警示徵象」或有潛在疾病因素及特定社經狀況；而C群病患具有嚴重血漿滲漏導致休克、嚴重血漿滲漏導致體液蓄積及呼吸窘迫、嚴重出血、嚴重器官損傷（如肝臟功能損傷、中樞神經系統受損、心臟衰竭、腎功能損傷、心肌病變、腦病變、腦炎等）。

【0009】 在處置原則上，A群病患是安排居家追蹤，B群病患則需安排住院，而C群病患則需緊急治療或轉送到設備完善或治療經驗豐富的醫院。

【0010】 WTO 2009年登革熱病例分類方式，主要希望能提供適當的檢傷分類（triage）引導臨床處置，以幫助探討疾病機轉，同時也可對未來發展的介入措施進行評估（如靜脈輸液、新的抗病毒藥物及疫苗等）。

【0011】 本案申請人鑑於習知技術中的不足，經過悉心試驗與研究，並一本鍥而不捨的精神，終構思出本案，能夠克服先前技術的不足，以下為本案的簡要說明。

### 【發明內容】

【0012】 為了幫助醫師在確診為罹患黃病毒屬病毒感染之疾病的病患的病程早期即能對該病患後續病情進行預估，以採取適當的處置或治療，本發明研發出創新、進步的技術。

【0013】 本發明揭露一種用於判斷個體是否將出現警示徵象的方法，其中該個體已確診受黃病毒屬病毒感染而罹患疾病，該方法包括步驟：

(a)提供個體的血清；(b)測量血清中的玻尿酸的濃度；以及(c)當濃度高於或等於70 ng/mL時，該個體被判斷為在該個體的患病歷程中將出現警示徵象。

【0014】 在一個具體實施例中，該個體為人，且該個體受黃病毒屬病毒感染期間在病程早期。在一個具體實施例中，黃病毒屬病毒包括導致該個體罹患黃熱病的黃熱病毒、導致該個體罹患日本腦炎的日本腦炎病毒、導致該個體罹患登革熱的登革熱病毒、導致該個體罹患西尼羅熱的西尼羅病毒及導致該個體罹患茲卡病毒感染症的茲卡病毒。

【0015】 在一個具體實施例中，罹患登革熱的個體的患病歷程中出現的警示徵象包括腹部疼痛及壓痛、持續性嘔吐、臨床上體液蓄積、黏膜出血、嗜睡、躁動不安、肝臟腫大超出肋骨下緣2公分以及血比容增加伴隨血小板急速下降。

【0016】 在一個具體實施例中，步驟(b)更包括：(b1)加入該血清於塗佈蛋白多醣（aggrecan）的微量盤的孔洞中，使可能存在於該血清中的玻尿酸耦合該蛋白多醣；(b2)加入生物素化的蛋白多醣於該孔洞中，使該生物素化的蛋白多醣耦合玻尿酸；(b3)加入耦接鏈霉親和素的酵素於該孔洞中，使該耦接鏈霉親和素的酵素耦合該生物素化的蛋白多醣；(b4)加入一受質，以與該耦接鏈霉親和素的酵素產生一化學冷光反應；以及(b5)測量450 nm波長下的吸光值。

【0017】 本發明並揭露一種醫藥組合物，用於阻斷個體血清中的玻尿酸或其作用以預防發炎反應，其中該個體已確診受黃病毒屬病毒感染而罹患疾病，該醫藥組合物包括：濃度介於0.05 mM至5 mM之間且抑制玻尿酸的4-甲基傘形酮鈉鹽（4-methyl umbelliferone sodium salt）、或濃度介於1 nM至100 nM之間的CD44小干擾核糖核酸（CD44 siRNA）、或濃度介於5 µg/ml至500 µg/ml之間的抗CD44抗體（anti-CD44 antibody）。

【0018】 在一個具體實施例中，當個體血清中的玻尿酸以酵素連結免疫吸附法測量為高於或等於70 ng/mL時，表明該個體被判斷為在該個體的患病歷程中將出現警示徵象。在一個具體實施例中，該醫藥組合物更包括醫藥上可接受的載劑、賦形劑、稀釋劑或輔劑。

【0019】 本發明並揭露將4-甲基傘形酮鈉鹽（4-methyl umbelliferone sodium salt）、或CD44小干擾核糖核酸（CD44 siRNA）或抗CD44抗體（anti-CD44 antibody）製備成醫藥組合物的用途，該醫藥組合物用於受黃病毒屬（*Flavivirus*）病毒感染而罹患疾病之個體。該黃病毒屬病毒及與黃病毒屬病毒關聯的疾病如前所述。

【0020】 本發明並揭露一種醫藥組合物，用於阻斷個體血清中的玻尿酸以預防發炎反應，其中該個體已確診受登革熱病毒感染而罹患登革熱，該醫藥組合物包括下列成分中至少任何一者：濃度介於0.05 mM至5 mM之間且抑制玻尿酸的4-甲基傘形酮鈉鹽，以及濃度介於5 µg/ml至500 µg/ml之間且用以阻斷該個體的血管內皮細胞表面的抗CD44抗體。據此，本發明並揭露一種將4-甲基傘形酮鈉鹽及抗CD44抗體至少其中一者製備用於治療受登革熱病毒感染而罹患登革熱之個體的醫藥組合物的用途。

【0021】 本發明並揭露一種醫藥組合物，用於阻斷個體血清中的玻尿酸以預防發炎反應，其中該個體已確診受登革熱病毒感染而罹患登革熱，該醫藥組合物包括：濃度介於1 nM至100 nM之間且抑制該個體之血管內皮細胞之Akt磷酸化的CD44 siRNA，其中CD44 siRNA係選自由SEQ ID NOs. 1、2、3及4所組成的群組至少其中之一。據此，本發明並揭露一種將CD44 siRNA製備用於治療受登革熱病毒感染而罹患登革熱之個體的醫藥組合物的用途。

【圖式簡單說明】

【0022】 本發明的上述目的及優點在參閱以下詳細說明及附隨圖式之後對那些所屬技術領域中具有通常知識者將變得更立即地顯而易見。

【0023】 第1圖為本發明中登革熱病患在病程早期的血清玻尿酸濃度值的操作者操作特性（ROC）曲線示意圖。

【0024】 第2圖為本發明中登革熱病患在整個登革熱病程期間出現警示徵象的示意圖。

【0025】 第3圖為本發明中登革熱病患在登革熱病程期間最低血小板數值低於50,000/ $\mu$ l的示意圖。

【0026】 第4圖為本發明中登革熱病患在登革熱病程期間出現血比容上升達20%以上的血液濃縮現象的示意圖。

【0027】 第5圖為人類血管內皮細胞受登革病毒第一型非結構蛋白或本發明醫藥組合物處理之Akt磷酸化程度之示意圖。

#### 【實施方式】

【0028】 本案所提出的發明將可由以下的實施例說明而得到充分瞭解，使得所屬技術領域中具有通常知識者可以據以完成，然而本案的實施並非可由下列實施例而被限制其實施型態，所屬技術領域中具有通常知識者仍可依據除既揭露的實施例的精神推演出其他實施例，該等實施例皆當屬於本發明的範圍。

【0029】 定義：

【0030】 本文用語「黃病毒屬」的病毒包括但不限於黃熱病毒、日本腦炎病毒、登革熱病毒、西尼羅河病毒及茲卡病毒。

【0031】 本文用語「登革熱病患」依據臨床表現或檢驗結果，分類為「登革熱」、「登革熱重症」、「登革出血熱」、「登革休克症候群」等。

【0032】 本文用語「登革熱重症」定義為符合以下一或多項：嚴重血

漿滲漏導致休克、嚴重血漿滲漏導致體液蓄積及呼吸窘迫、嚴重出血評估）、嚴重器官損傷、肝臟麩胺酸草乙酸轉胺酶（GOT）或丙酮酸轉胺酶（GPT） $\geq 1,000$  IU/L、中樞神經系統意識受損、心臟衰竭或其他。

【0033】 本文用語「警示徵象」是依據WHO於2009年版登革熱病例分類，定義為登革熱病患出現腹部疼痛及壓痛、持續性嘔吐、臨床上體液蓄積（腹水、胸水等）、黏膜出血、嗜睡/躁動不安、肝臟腫大超出肋骨下緣2公分以及血比容增加伴隨血小板急速下降。

【0034】 本文用語「黃熱病」是指個體感染黃熱病毒所罹患的疾病，其症狀包括發燒、肝功能異常、猝發性冷顫、頭痛、背痛、全身肌肉痛、食慾不振、噁心、嘔吐等。部分黃熱病病患在數小時至一天的緩解後進入中毒期，出現發燒、黃疸、蛋白尿及出血徵候，甚至出現肝臟或腎臟衰竭因而導致無尿。

【0035】 本文用語「日本腦炎」是指個體感染日本腦炎病毒所罹患的疾病，其症狀包括發燒、腹瀉、頭痛或嘔吐；症狀輕微者的臨床表現為無菌性腦膜炎或不明原因發燒，嚴重者則出現意識狀態改變、全身無力、高燒、局部神經障礙、運動障礙、帕金森氏症候群、神智不清、甚至昏迷或死亡。

【0036】 本文用語「西尼羅熱」是指個體感染西尼羅病毒所罹患的急性傳染病，其症狀包括發燒、頭痛、疲倦、關節疼痛、肌肉酸痛、紅疹、淋巴腺腫大、腸胃道症狀，嚴重者會有腦膜炎、腦炎及急性無力性麻痺症候群等症狀。

【0037】 本文用語「茲卡病毒感染症」是指個體感染茲卡病毒所罹患的急性傳染病，其潛伏期約3至7天（最長可達12天），典型症狀為發燒合併紅疹、關節疼痛或結膜炎（紅眼）、頭痛、肌肉痠痛及後眼窩痛等，甚至出

現神經系統（如急性多發性神經炎（Guillain-Barré syndrome，GBS）或免疫系統（如特異性血小板低下性紫斑症（idiopathic thrombocytopenic purpura，ITP）併發症。婦女於懷孕期間感染茲卡病毒則可能產下小頭畸形（microcephaly）等神經異常新生兒。

【0038】 本發明的具體實施例是以感染登革病毒而確診罹患登革熱的病患為樣本，透過測量病患的血清玻尿酸濃度並經統計分析來定義該濃度高於或等於70 ng/mL，作為判斷該病患的患病歷程中將出現警示徵象的指標。由於同屬於黃病毒屬的黃熱病毒、日本腦炎病毒、西尼羅病毒及茲卡病毒所引起的疾病亦使病患產生與登革熱類似的症狀，本發明的技術也適用於罹患黃熱病、日本腦炎、西尼羅熱、茲卡病毒感染症的病患上。

【0039】 實施例1：

【0040】 實驗方法：

【0041】 為了判斷感染黃病毒屬病毒並確診罹患黃病毒屬病毒之疾病的病患是否將出現警示徵象，以Hyaluronan DuoSet® ELISA呈色系統（DY3614-05，R&D Systems, Inc.，美國）測量病患血清中的玻尿酸濃度。所屬技術領域中具有通常知識者可參閱Hyaluronan DuoSet® ELISA呈色系統操作手冊加以實施，或者以其相同的實驗方法自行製備材料及試劑來進行試驗。

【0042】 首先製備用於酵素連結免疫吸附法（ELISA）的微量盤。以PBS緩衝液（137 mM NaCl、2.7 mM KCl、8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>，pH 7.2-7.4，通過0.2 μm孔徑濾膜過濾）將玻尿酸捕捉試劑（重組人類蛋白多醣（aggrecan））稀釋至作用濃度，經稀釋的玻尿酸捕捉試劑不含有載體蛋白質。立即將經稀釋的玻尿酸捕捉試劑（100 μl/孔洞）覆蓋96孔微量盤。密封微量盤並於室溫隔夜培養。

【0043】 抽吸每個孔洞並以清洗緩衝液（於PBS緩衝液中0.05% Tween® 20，pH 7.2-7.4）清洗孔洞，重複抽吸並清洗步驟2次，共清洗3次。詳而言之，使用噴射洗滌瓶、配施器或自動清洗器，以清洗緩衝液（400  $\mu$ l）填注每個孔洞來清洗孔洞。在每個步驟完全的移除液體。在最後一次清洗之後，以抽吸或者以倒置微量盤並在乾淨紙巾上吸乾的方式移除任何殘留的清洗緩衝液。加入300  $\mu$ l的試劑稀釋劑（於PBS緩衝液中5% Tween 20，pH 7.2-7.4，通過0.2  $\mu$ m孔徑濾膜過濾）至每個孔洞來阻隔微量盤，於室溫培養至少1小時。重複抽吸/清洗步驟，使微量盤適於後續樣品添加及ELISA實驗。

【0044】 將100  $\mu$ l在試劑稀釋劑（或者適當稀釋劑）中的樣本或玻尿酸標準品加入孔洞，以黏貼長條片覆蓋並於室溫培養2小時。重複抽吸/清洗步驟。將100  $\mu$ l稀釋於試劑稀釋劑中的生物素化的玻尿酸偵測試劑（即，生物素化的重組人類蛋白多醣（aggrecan））加入每個孔洞，以新的黏貼長條片覆蓋並於室溫培養2小時。重複抽吸/清洗步驟。加入100  $\mu$ l作用稀釋度的鏈霉親和素-辣根過氧化物酶（streptavidin-HRP）至每個孔洞。覆蓋微量盤並於室溫培養20分鐘。避免將微量盤置於直接光照下。重複抽吸/清洗步驟。將100  $\mu$ l受質溶液（呈色試劑A（ $H_2O_2$ ）：呈色試劑B（四甲基聯苯胺）=1：1（v/v）的混合物）加入每個孔洞，於室溫培養20分鐘。避免將微量盤置於直接光照下。將50  $\mu$ l終止溶液（2 N  $H_2SO_4$ ）加入每個孔洞，輕拍微量盤以確定充分混合。立即使用設定為450 nm波長的微量盤讀取儀來測定每個孔洞的吸光值。

【0045】 其中，玻尿酸標準品的六點標準曲線建議是以試劑稀釋劑進行3倍連續稀釋。因此，玻尿酸標準品的濃度由高到低為90、30、10、3.33、1.11及0.370 ng/ml。以玻尿酸標準品濃度及其平均吸光值繪製標準曲線。

【0046】 實驗結果：

【0047】 請參閱第1圖，其為本發明中登革熱病患在病程早期的血清玻尿酸濃度值的操作者操作特性（receiver operating characteristic，ROC）曲線示意圖。當每一登革熱病患（ $n = 108$ ）的血清檢體測量完成後，依據其是否出現警示徵象，以ROC曲線推估最佳的判斷是否將出現警示徵象的臨界值。如第1圖的結果顯示，曲線下面積（Area under curve，AUC）為0.681（95%信賴區間 = 0.58-0.78， $p$ 值為0.002），最佳臨界值為70.06 ng/ml，敏感性為0.758，1-特異性為0.548。因此，後續分析以血清玻尿酸濃度高於或等於70 ng/ml作為登革熱病患在整個病程中出現警示徵象的臨界值。

【0048】 請參閱表1，其為108位從病程早期追蹤至痊癒的登革熱病患的血清檢體的單變項因子分析。在確診為罹患登革熱且在發燒期（病程早期）就醫的病患（ $n = 108$ ）中檢驗其血清檢體的玻尿酸濃度，並追蹤其病程進展至登革熱痊癒。若登革熱病患在病程早期（發燒期）血清玻尿酸濃度高於或等於70 ng/ml，則最終在整個病程中「出現警示徵象」的機會較此數值低於70 ng/ml的病患高出3.78倍（ $p = 0.003$ ，95%信賴區間 = 1.65 - 8.66）。表1的單變項因子分析結果也顯示，年齡大於或等於65歲、二次以上感染登革病毒、發燒期血清玻尿酸濃度高於或等於70 ng/ml是預測登革熱病患屬於出現警示徵象組的預測因子。進一步地，以多變項分析校正病患的年齡以及是否為第二次登革病毒感染（二次感染）等重要的預測因子，結果仍顯示：登革熱病患在病程早期（發燒期）血清玻尿酸濃度高於或等於70 ng/ml是預測登革熱病患「最終在整個病程中出現警示徵象與否」的獨立預測因子（請參閱表2）。因此，醫師可在確診為登革熱病患的病程早期，基於血清玻尿酸濃度是否高於或等於70 ng/ml來判斷該登革熱病患最終在整個病程出現警示徵象，進而對該病患後續病情進行預估，以採取適當的處置或治療。

表1、108位從病程早期追蹤至痊癒的登革熱病患的血清檢體的單變項因子分析

| 變數                   | 病患數目(%)            |                    | 勝算比<br>(95%信賴區間) | p值    |
|----------------------|--------------------|--------------------|------------------|-------|
|                      | 警示徵象陽<br>性(n = 66) | 警示徵象陰<br>性(n = 42) |                  |       |
| 人口特徵                 |                    |                    |                  |       |
| 性別, 女性               | 35 (53.0)          | 19 (45.2)          | 1.37 (0.63-2.97) | 0.554 |
| 年紀≥65歲               | 34 (51.5)          | 10 (23.8)          | 3.40 (1.44-8.02) | 0.008 |
| 二次感染                 | 43 (65.2)          | 17 (40.5)          | 2.75 (1.24-6.10) | 0.020 |
| 併發症                  |                    |                    |                  |       |
| 糖尿病                  | 16 (24.2)          | 7 (16.7)           | 1.60 (0.60-4.30) | 0.486 |
| 實驗室數據                |                    |                    |                  |       |
| 血小板減少症(第一次採樣)        | 26 (39.4)          | 11 (26.2)          | 1.83 (0.79-4.27) | 0.230 |
| 血清玻尿酸(發燒期) ≥70 ng/ml | 50 (75.8)          | 19 (45.2)          | 3.78 (1.65-8.66) | 0.003 |

表2、108位從病程早期追蹤至痊癒的登革熱病患的血清檢體的多變項分析

| 變數                   | 調整後勝算比(95%信賴區間)  | p值    |
|----------------------|------------------|-------|
| 年紀≥65歲               | 2.01 (0.78-5.21) | 0.151 |
| 二次感染                 | 2.00 (0.84-4.76) | 0.118 |
| 血清玻尿酸(發燒期) ≥70 ng/ml | 2.80 (1.15-6.80) | 0.023 |

【0049】 請參閱第2圖至第4圖，其分別為本發明中登革熱病患(1)在整個登革熱病程期間出現警示徵象、(2)最低血小板低於50,000/ $\mu$ l及(3)出現血比容上升達20%以上的血液濃縮現象的示意圖。將108位登革熱病患依照其病程早期（發燒期）血清玻尿酸濃度低至高分成四組，依序為最低四分之一、中低四分之一、中高四分之一、最高四分之一。由第2圖至第4圖可

知，血清玻尿酸濃度越高的組別，其在整個登革熱病程期間出現警示徵象、最低血小板低於50,000/ $\mu$ l及出現血比容上升達20%以上的血液濃縮現象的機會均高於血清玻尿酸濃度較低的組別。

**【0050】 實施例2：**

**【0051】** 基於登革熱病患血清玻尿酸濃度高於或等於70 ng/ml而判斷該病患的患病歷程中將出現警示徵象，本實施例揭露一種醫藥組合物，用於阻斷登革熱病患血清玻尿酸以預防發炎反應，該醫藥組合物包括：濃度介於0.05 mM至5 mM之間的4-甲基傘形酮鈉鹽（4-methyl umbelliferone sodium salt）。醫藥組合物並可包括醫藥上可接受的載劑、賦形劑、稀釋劑或輔劑。請參閱第5圖，其為人類血管內皮細胞受登革病毒第一型非結構蛋白或本發明醫藥組合物處理之Akt磷酸化之示意圖。在第5圖中，如以登革病毒第一型非結構蛋白（non-structural protein 1）3  $\mu$ g/ml（Enzo Life Sciences, Inc., 型號：ENZ-PRT105-0100）處理人類血管內皮細胞（已經在直徑60 mm的培養皿中培養 $4 \times 10^5$ 細胞），則會誘發該細胞明顯的Akt磷酸化現象（Akt phosphorylation），顯見登革病毒造成人類血管內皮細胞發炎反應的效果。此外，以4-甲基傘形酮鈉鹽治療人類血管內皮細胞12小時後，再以登革病毒第一型非結構蛋白處理該細胞。之後，抽取該細胞的蛋白質並進行十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺凝膠電泳（SDS-PAGE），將蛋白質依分子量大小分離。接著，將凝膠上的蛋白質轉移至偏聚二氟乙烯（PVDF）膜，以西方墨點法及以磷酸化Akt抗體偵測PVDF膜上的磷酸化Akt訊號。結果顯示，介於0.05 mM至5 mM之間的4-甲基傘形酮鈉鹽可有效抑制登革熱病患血管內皮細胞的Akt磷酸化現象，顯見4-甲基傘形酮鈉鹽可以抑制登革病毒造成的人類血管內皮細胞發炎反應（請參閱第5圖）。

**【0052】 實施例3：**

【0053】 哺乳類細胞表面的CD44抗原為在許多生物功能（例如發炎反應）上扮演重要角色的表面醣蛋白質，且玻尿酸為與CD44抗原結合的主要分子。因此，當登革熱病患血清玻尿酸濃度過高時，大量的玻尿酸將與CD44結合而影響CD44的生物功能。本實驗例以CD44小干擾核糖核酸（CD44 siRNA）抑制登革熱病患血管內皮細胞的CD44表現，進而阻斷玻尿酸與CD44的結合。本實驗例採用所屬技術領域熟知的小干擾RNA抑制細胞蛋白表現的實驗方法及材料，所使用的CD44 siRNA為人工合成的SEQ ID NO. 1（5'-GAAUAUAACCUGCCGCUUU-3'）、SEQ ID NO. 2（5'-CAAGUGGACUCAACGGAGA-3'）、SEQ ID NO. 3（5'-CGAAGAAGGUGUGGGCAGA-3'）及SEQ ID NO. 4（5'-GAUCAACAGUGGCAAUGGA-3'）。再者，亦可將前述SEQ ID NOs. 1~4中的2、3或4種siRNA進行合併而用於抑制登革熱病患血管內皮細胞（已經在直徑60 mm的培養皿中培養 $4 \times 10^5$ 細胞）的CD44表現。首先，參照siLentFect™ Lipid Reagent（Bio-Rad）的操作手冊，將CD44小干擾核糖核酸與siLentFect™ Lipid Reagent混合，轉染入人類血管內皮細胞24小時後，再以登革病毒第一型非結構蛋白3  $\mu\text{g/ml}$ （Enzo Life Sciences, Inc., 型號：ENZ-PRT105-0100）處理該細胞。之後，抽取該細胞的蛋白質並進行十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺凝膠電泳（SDS-PAGE），將蛋白質依分子量大小分離。接著，將凝膠上的蛋白質轉移至偏聚二氟乙烯（PVDF）膜，以西方墨點法及以磷酸化Akt抗體偵測PVDF膜上的磷酸化Akt訊號。結果顯示，介於1 nM至100 nM之間的CD44 siRNA（SEQ ID NOs. 1~4）可有效抑制登革熱病患血管內皮細胞的Akt磷酸化現象，顯見CD44小干擾核糖核酸可以抑制登革病毒造成的人類血管內皮細胞發炎反應（請參閱第5圖）。因此，本案的CD44 siRNA（SEQ ID NOs. 1~4）可作為治療登革熱病患之發炎反應的醫藥組合

物。

**【0054】 實施例4：**

**【0055】** 本實驗例以5  $\mu\text{g/ml}$ 至500  $\mu\text{g/ml}$ 的抗CD44抗體（anti-CD44 antibody, Invitrogen, 型號：MA4400）阻斷登革熱病患血管內皮細胞表面的CD44抗原。首先以抗CD44抗體治療人類血管內皮細胞（已經在直徑60 mm的培養皿中培養 $4 \times 10^5$ 細胞）12小時後，再以登革病毒第一型非結構蛋白3  $\mu\text{g/ml}$ （Enzo Life Sciences, Inc., 型號：ENZ-PRT105-0100）處理該細胞。之後，抽取該細胞的蛋白質並進行十二烷基硫酸鈉聚丙稀醯胺凝膠電泳（SDS-PAGE），將蛋白質依分子量大小分離。接著，將凝膠上的蛋白質轉移至偏聚二氟乙烯(PVDF)膜，以西方墨點法及以磷酸化Akt抗體偵測PVDF膜上的磷酸化Akt訊號。結果顯示，介於5  $\mu\text{g/ml}$ 至500  $\mu\text{g/ml}$ 之間的抗CD44抗體可有效抑制登革熱病患血管內皮細胞的Akt磷酸化現象，顯見抗CD44抗體可以抑制登革病毒造成的人類血管內皮細胞發炎反應（請參閱第5圖）。因此，本案的抗CD44抗體可作為治療登革熱病患之發炎反應的醫藥組合物。

**【0056】** 本發明實屬難能的創新發明，深具產業價值，援依法提出申請。此外，本發明可以由本領域技術人員做任何修改，但不脫離如所附申請專利範圍所要保護的範圍。

**【符號說明】**

**【0057】** 無

【序列表】

<110> 高雄醫學大學  
<120> 用於預防或治療罹患登革熱所引起之發炎反應的用途  
<160> 4

<210> 1  
<211> 19  
<212> RNA  
<213> 人工序列

<220>  
<221> CD44 siRNA 1

<300>

<400> 1  
GAAUAUAACC UGCCGCUUU 19

<210> 2  
<211> 19  
<212> RNA  
<213> 人工序列

<220>  
<221> CD44 siRNA 2

<300>

<400> 1  
CAAGUGGACU CAACGGAGA 19

<210> 3  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<221> CD44 siRNA 3

<300>

<400> 1  
CGAAGAAGGU GUGGGCAGA 19

<210> 4

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> CD44 siRNA 4

<300>

<400> 1

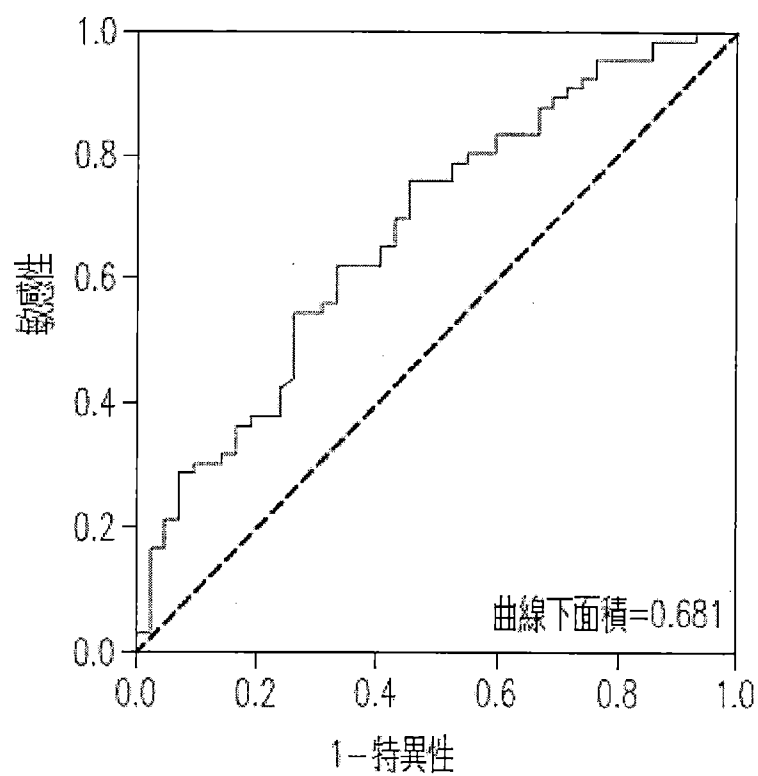
GAUCAACAGU GGCAAUGGA

19

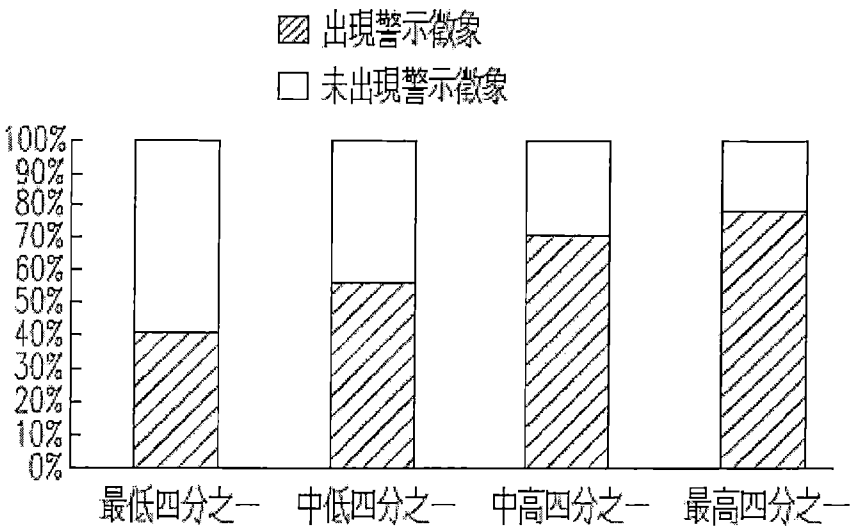
## 申請專利範圍

- 1.一種將 4-甲基傘形酮鈉鹽（4-methyl umbelliferone sodium salt）製備用於治療受登革熱病毒感染而罹患登革熱之個體的醫藥組合物的用途，其中該醫藥組合物用於阻斷該個體血清中的玻尿酸以預防發炎反應。
- 2.如申請專利範圍第 1 項所述的用途，其中當該個體血清中的玻尿酸以酵素連結免疫吸附試驗測量為高於或等於 70 ng/mL 時，表明該個體被判斷為在該個體的患病歷程中將出現警示徵象。
- 3.如申請專利範圍第 2 項所述的用途，其中該酵素連結免疫吸附試驗包括：
  - (1)加入該血清於塗佈蛋白多醣（aggrecan）的微量盤的孔洞中，使可能存在於該血清中的玻尿酸耦合該蛋白多醣；
  - (2)加入生物素化的蛋白多醣於該孔洞中，使該生物素化的蛋白多醣耦合玻尿酸；
  - (3)加入耦接鏈霉親和素的酵素於該孔洞中，使該耦接鏈霉親和素的酵素耦合該生物素化的蛋白多醣；
  - (4)加入一受質，以與該耦接鏈霉親和素的酵素產生一化學冷光反應；以及
  - (5)測量 450 nm 波長下的吸光值。
- 4.如申請專利範圍第 2 項所述的用途，其中該警示徵象包括腹部疼痛及壓痛、持續性嘔吐、臨床上體液蓄積、黏膜出血、嗜睡、躁動不安、肝臟腫大超出肋骨下緣 2 公分以及血比容增加伴隨血小板急速下降。
- 5.如申請專利範圍第 1 項所述的用途，其中該醫藥組合物更包括一醫藥上可接受的載劑、賦形劑、稀釋劑或輔劑。
- 6.如申請專利範圍第 1 項所述的用途，其中該 4-甲基傘形酮鈉鹽的濃度介於 0.05 mM 至 5 mM 之間。

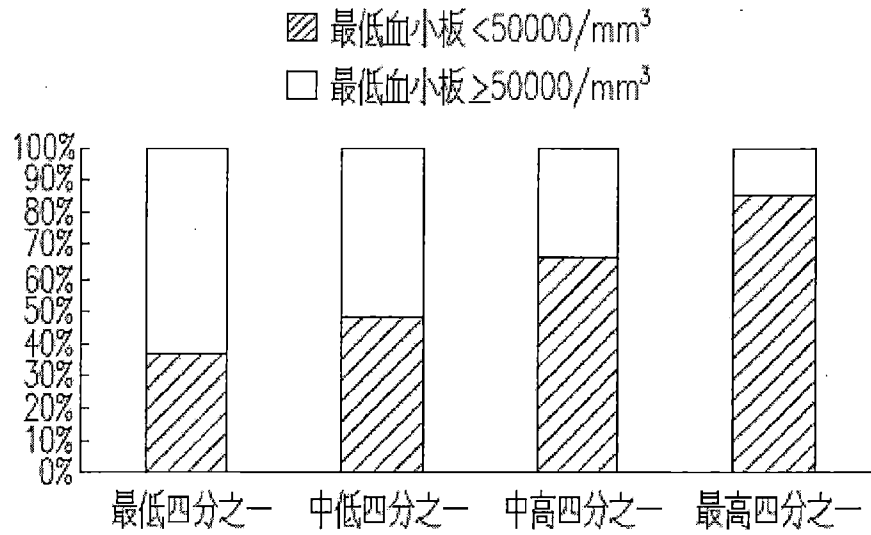
# 圖式



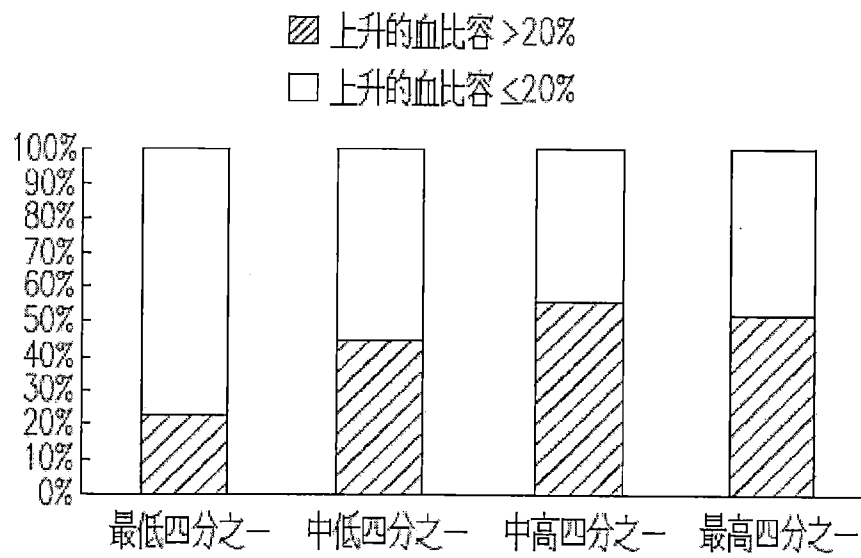
第 1 圖



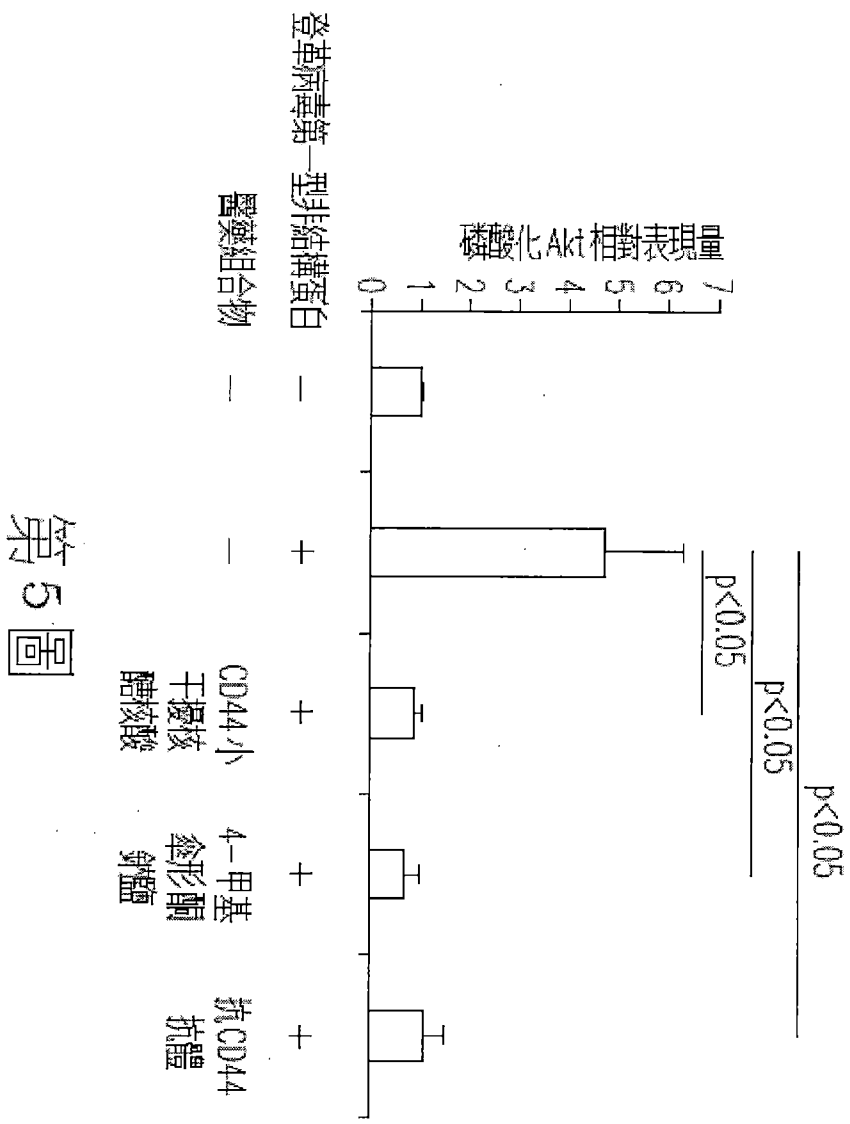
第 2 圖



第 3 圖



第 4 圖



第5圖