

發明專利說明書

※申請案號：093122453

※IPC分類：

一、發明名稱：

以雙順反子DNA雙效表現載體來鑑別出可抑制IRES-依賴型轉譯活性的化合物的方法及其用途

USE OF BISCISTRONIC DNA CONSTRUCTS FOR IDENTIFYING COMPOUNDS THAT INHIBIT IRES-DEPENDENT TRANSLATION

二、中文發明摘要：

本發明係關於以雙順反子DNA雙效表現載體來鑑別出可抑制一腸病毒或腦心肌炎病毒之IRES-依賴型轉譯活性但卻不會影響感染宿主細胞之CAP-依賴型轉譯活性的化合物的方法及其用途。依據本發明方法所鑑別出來的化合物係可用來製備可治療腸病毒或腦心肌炎病毒感染之藥物。

三、英文發明摘要：

The present invention relates to use of bicistronic DNA constructs for identifying compounds that inhibits IRES-dependent translation activity of an infectious enterovirus (EV) or encephalomyocarditis virus (EMCV) without affecting CAP-dependent translation activity of a host subject. The compounds thus identified are useful in preparation of a medicament for treating EV or EMCV infection.

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第5圖

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

[0001] 本發明係關於以雙順反子DNA雙效表現載體(bicistronic DNA constructs)來鑑別出可抑制腸病毒(enterovirus, EV)或腦心肌炎病毒(encephalomyocarditis virus, EMCV)之IRES-依賴型轉譯活性但卻不會影響感染宿主細胞之CAP-依賴型轉譯活性的化合物的方法及其用途。依據本發明方法所鑑別出來的化合物係可用來製備可治療腸病毒或腦心肌炎病毒感染之藥物。

【先前技術】

[0002] 諸如腦脊髓灰白質炎病毒、腸病毒或腦心肌炎病毒之類的小RNA病毒(Picornaviruses)，係以一種靠近啟始AUG密碼子之核糖體進入位置有關的獨特機制而能於所感染之宿主細胞的細胞質內進行複製(Pelletier et al., (1988)Nature 334, 320-325)。最近的研究報告指出，腦脊髓灰白質炎病毒RNA欲與核糖體結合以進行病毒基因的轉譯時，需要一段位於腦脊髓灰白質炎病毒5'末轉譯區(5' -untranslation area, 5' UTR)介於320到631個核苷間的序列(Pelletier et al., supra)。此段序列被稱為核糖體起降場(ribosome landing pad, RLP)，或是俗稱的核糖體內部進入位置(internal ribosome entry site, IRES)。諸如A型、B型及C型肝炎病毒之類與小RNA病毒相關的病毒，同樣也使用核糖體內部進入位置來啟始轉譯活性(Kohara et al., (1992)J Virol 66, 1476-1483 and Glass et al., (1993)Virology 193, 842-852)。此外，還有研究報告指出IRES序列在老鼠小RNA病毒，即Theiler's鼠腦心肌炎病毒(Theiler's murine encephalomyelitis virus, TEMV)，的致病力上扮演相當重要的角色(Snarnow, P. (2003)J

Virol 77, 2801-2806)。舉例來說，若對TEMV之GDVII株上的IRES序列進行突變，可明顯降低該病毒株對老鼠的致病力(Pilipenko, (2001)EMBO J. 20, 6899-6908)。綜上所述，該等發現暗示只要抑制IRES-依賴型轉譯活性，即可有效抑制感染病毒的致病性進而達到治療病毒感染的目的。

[0003] 本申請案發明人發現可以諸如腸病毒或腦心肌炎病毒之雙順反子DNA雙效表現載體作為一種篩選工具，來鑑別出可抑制這類病毒感染的化合物。所鑑別出來的化合物將可用來製備可治療腸病毒或腦心肌炎病毒感染的藥物。

【發明內容】

[0004] 本發明係關於以雙順反子DNA雙效表現載體來鑑別出可抑制一腸病毒或腦心肌炎病毒之IRES-依賴型轉譯活性但卻不會影響感染宿主細胞之CAP-依賴型轉譯活性的化合物的方法及其用途。依據本發明方法所鑑別出來的化合物係可用來製備可治療腸病毒或腦心肌炎病毒感染的藥物。

[0005] 本發明之一態樣為一種以腸病毒或腦心肌炎病毒之雙順反子DNA雙效表現載體來鑑別出可抑制腸病毒或腦心肌炎病毒之IRES-依賴型轉譯活性但卻不會影響感染宿主細胞之CAP-依賴型轉譯活性的候選化合物的方法。所述方法至少包含(1)讓一候選化合物與一內含腸病毒或腦心肌炎病毒之IRES序列的雙順反子DNA雙效表現載體的系統(細胞系統或細胞萃出物系統)接觸的步驟，其中該雙順反子DNA雙效表現載體包含以下列順序排列之序列：一第一報導基因，其係以CAP-依賴型轉譯啟始的序列；及一第二報導基因，其係以IRES-依賴型轉譯啟始的序列；及(2)決定該系統中第一及第二報導基因表現量或其蛋白質活性的步驟，若該第一報導基因的表現量或其蛋白質活性於候選化合物加入後不受影響，但該第二報導基因的表現量或其蛋白質活性卻明顯下降時，即表示該候選化合物係可抑制一IRES-依賴型轉譯活性，但卻不會影響CAP-依賴型轉譯活性。

[0006] 本發明之另一態樣為一種藥學組合物，其包含一藥學上可接受的載體及一治療有效量之一種依據本發明上述方法所鑑別出來的化合物。當該化合物被施用到一亟需治療的個體上時，係可抑制一感染病毒之IRES-依賴型轉譯活性但卻不會影響該被感染的宿主個體細胞之CAP-依賴型轉譯活性。該藥學組合物係可用來治療腸病毒或腦心肌炎病毒感染。

[0007] 本發明範疇還包括一種治療腸病毒或腦心肌炎病毒感染的方法。該方法包含對一亟需治療的個體施用一種藥學組合物，其包含一藥學上可接受的載體及一治療有效量之一種依據本發明方法所鑑別出來的化合物。當該化合物被施用到一亟需治療的個體上時，係可抑制一感染病毒之IRES-依賴型轉譯活性，但卻不會影響該被感染的宿主個體細胞之CAP-依賴型轉譯活性。該藥學組合物係可用來治療腸病毒或腦心肌炎病毒感染。

[0008] 此外，本發明特徵還包括一種包裝產品，其包含一容器；一有效量之可抑制腸病毒或腦心肌炎病毒之IRES-依賴型轉譯活性但卻不會影響被感染宿主細胞之CAP-依賴型轉譯活性的化合物；及一附隨於該容器內的說明，用來指示使用者如何使用該化合物來治療腸病毒或腦心肌炎病毒感染。

[0009] 本發明還提供一種轉錄調控系統，其至少包含(a)一內含腸病毒或腦心肌炎病毒之IRES序列的雙順反子DNA雙效表現載體，其中該雙順反子DNA雙效表現載體包含以下列順序排列之序列：一第一報導基因，其係以CAP-依賴型轉譯啟始的序列；及一第二報導基因，其係以IRES-依賴型轉譯啟始的序列；及(b)一有效量的金剛烷胺；其中該有效量的金剛烷胺係可抑制IRES-依賴型轉譯活性但卻不會影響CAP-依賴型轉譯活性。

[0010] 本發明還提供一種藉由依據本發明揭示方法所製備而成的轉錄調控系統來進行轉錄調控的方法，其中該系統包含：(a)一內含腸病毒或腦心肌炎病毒之IRES序列的雙順反子DNA雙效表現載體，其中該雙順反子DNA雙效表現載體包含以下列順序排列之序列：一第一報導基因，其係以CAP-依賴型轉譯啟始的序列；及一第二報導基因，其係以IRES-依賴型轉譯啟始的序列；及(b)一有效量的金剛烷胺；該方法包含以下步驟：(1)選擇一適當量的金剛烷胺；及(2)讓該所選擇之適當量的金剛烷胺與一轉染了該內含腸病毒或腦心肌炎病毒之IRES序列的雙順反子DNA雙效表現載體的宿主細胞接觸；其中該所選擇之適當量的金剛烷胺係可抑制該轉染之雙順反子DNA雙效表現載體的IRES-依賴型轉譯活性，但卻不會影響該宿主細胞的CAP-依賴型轉譯活性。

[0011] 參照下述詳細說明、實施例及附圖將可更了解本發明所述目的、特徵及優點，惟該等實施例之目的係在闡述本發明精神，本發明範疇並不僅限於該等敘述及實施例中。需知，前述一般性敘述及後續的詳細說明均係例舉，其係為了進一步闡述申請專利範圍所主張之本發明內容。

【實施方式】

- [0012] 本發明係基於發現腸病毒或腦心肌炎病毒之雙順反子DNA雙效表現載體可用來鑑別出可抑制腸病毒或腦心肌炎病毒之IRES-依賴型轉譯活性但卻不會影響感染宿主細胞之CAP-依賴型轉譯活性的化合物而發展出來的。
- [0013] 為鑑別出可抑制一個體內感染之腸病毒或腦心肌炎病毒的基因表現量或其蛋白質活性的化合物，讓一候選化合物與一內含腸病毒或腦心肌炎病毒之IRES序列的雙順反子DNA雙效表現載體的系統(細胞系統或細胞萃出物系統)接觸，其中該雙順反子DNA雙效表現載體包含以下列順序排列之序列：一第一報導基因，其係CAP-依賴型轉譯啟始的序列；及一第二報導基因，其係IRES-依賴型轉譯啟始的序列。之後，決定該系統中第一及第二報導基因表現量或其蛋白質活性，若該第一報導基因的表現量或其蛋白質活性於候選化合物加入後不受影響但該第二報導基因的表現量或其蛋白質活性卻明顯下降時，即表示該候選化合物係可抑制一IRES-依賴型轉譯活性但卻不會影響CAP-依賴型轉譯活性。
- [0014] 本發明之雙順反子DNA雙效表現載體的製備方法已屬習知。舉例來說，以pTriEx-4質體(購自Novagene)為模板來建構欲求的雙順反子DNA雙效表現載體，該質體含有CMV、T7及P10三種啟動子，所建構的雙順反子DNA雙效表現載體具有以下列順序排列之DNA序列：可編碼出第一報導基因的序列，在其3'端具有一終止密碼子；一可編碼出IRES的序列，這類IRES序列係選自腸病毒、鼻病毒、腦心肌炎病毒、心臟病毒(cardiovirus)、口瘡病毒(aphthovirus)、A型、B型及C型肝炎病毒或其他來自小RNA病毒科之病毒的IRES序列；及一可編碼出第二報導基因的序列。
- [0015] 可於細胞系統或細胞萃出物系統中來研究CAP-依賴型及IRES-依賴型轉譯活性。在細胞系統中，可以習知的方法將前述的雙順反子DNA雙效表現載體轉染到細胞上。之後，測試候選化合物對以CAP-依賴型及IRES-依賴型方式轉譯出之蛋白質量的影響。如果，一化合物係可抑制IRES-依賴型轉譯活性但卻不會影響CAP-依賴型轉譯活性，即表示該候選化合物係一種潛在可用來治療病毒感染的化合物。在細胞萃出物系統中，可藉由活體外轉錄方式由前述的雙順反子DNA中轉錄出可編碼產生報導蛋白質的雙順反子RNA，並於含有所有轉譯過程所需因子(即，核糖體、tRNAs、氨基酸、鹽類及各種其他因子)的系統中轉譯出該等報導蛋白質。這類系統一般會包含由諸如HeLa細胞或大腸桿菌細胞之類的細胞來源中所製備出來的細胞混合物。
- [0016] 適合作為本發明方法中報導蛋白質的蛋白質包括下列(但不限於)： β -半乳糖苷酶(β -gal)；螢光蛋白(fluorescence proteins)酶； β -葡萄糖酸酶(β -glucuronidase, GUS)；氫黴素乙醯基轉移酶(CAT)；及諸如一分泌型人類胎盤鹼性磷酸酶(SEAP)之類的分泌型胚胎鹼性磷酸酶；諸如荷爾蒙及細胞素之類可藉由免疫分析法分析的蛋白質；諸如腺苷去氨酶、氨基葡糖磷酸轉移酶(neo基因之產物)、二氫葉酸還原酶、潮黴素-B-磷酸轉移酶、胞嘧啶激酶(可與HAT基質一同使用，HAT基質係為一種內含6-羥基嘌呤(hypoxanthine)、氨基蝶呤(aminopterin)及胸苷(thymidine)的基質)、黃嘌呤-鳥嘌呤磷酸核糖基轉移酶(XGPRT)之類對某一生長基質具有專一性的蛋白質；對細胞不利的蛋白質，例如，會將一無毒受質轉變成對細胞有毒的蛋白質，例如胞嘧啶激酶(當與內含溴去氧尿苷之基質一同使用時)及6-羧基尿核糖-5'-磷酸去羧酶(當與5-氟乳清酸一同使用時)；及諸如蓖麻蛋白(ricin)、霍亂毒素(cholera toxin)、肉毒桿菌毒素(botulism toxin)、蠍神經毒素(scorpion neurotoxin)、或白喉毒素(diphtheria toxin)之類有毒的蛋白質。測量這些蛋白質量的方法亦屬習知。
- [0017] 可使用習知組合資料庫所揭示的眾多方法來獲得候選化合物。這類資料庫包括胜肽資料庫、類肽資料庫(即，具有胜肽功能但卻具有一新的、非胜肽骨架且可對抗酵素降解作用之物質的資料庫)、空間可及之平行固相或液相資料庫、由解旋繞或親和性管柱層析篩選而得的合成資料庫、及該「一珠-一化合物(one-bead one-compound)」資料庫，參見Zuckermann et al. (1994) J Med Chem 37, 2678-2685； and Lam (1997) Anticancer Drug Des 12, 145。
- [0018] 分子資料庫合成方法的例子已屬習知，參見DeWitt et al. (1993) PNAS USA 90, 6909； Erb et al. (1994) PNAS USA 91, 11422； Zuckermann et al. (1994) J Med Chem 37, 2678； Cho et al. (1993) Science 261, 1303； Carrell et al. (1994) Angew Chem Int Ed Engl 33, 2059； Carell et al. (1994) Angew Chem Int Ed Engl 33, 2061； and Gallop et al. (1994) J Med Chem 37, 1233。製備單株及多株抗體及其片段的方法亦屬習知。參見，例如Harlow and Lane, (1988) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York。「抗體」一詞包括完整部分及其之片斷，例如，能結合至HM74、LGR6、GPR88或GPR49蛋白質上的Fab、F(ab')₂及Fv部分。

- [0019] 化合物資料庫可以如下不同形式存在，如溶液形式(Houghten(1992)Biotechniques 13, 412-421)、珠(bead)形式(Lam(1991)Nature 354, 82-84)、晶片形式(Fodor(1993)Nature 364, 555-556)、細菌形式(U. S. Patent No. 5, 223, 409)、孢子形式(U. S. Patent No. 5, 223, 409)、質體形式(Cull et al. (1992)PNAS USA 89, 1865-1869)、或噬菌體形式(Scott and Smith(1990)Science 249, 386-390; Devlin(1990)Science 249, 404-406; Cwirla et al. (1990)PNAS USA 87, 6378-6382; Felici(1991)J Mol Biol 222, 301-310; and U. S. Patent No. 5, 223, 409)。
- [0020] 經由本發明方法所鑑別出來的一種特定化合物為金剛烷胺(amantadine)。金剛烷胺係1960年代所開發出來的藥物，被用來治療A型流感病毒及帕金森氏症。參見Aoki and Sitar, (1988)Clin Pharm 14, 35-51。雖然目前仍不清楚可造成本發明效果的確切機制為何，然一般相信係肇因於金剛烷胺可與IRES之特定RNA構型結合或與可媒介IRES-依賴型轉錄活性的因子(如PTB、La等蛋白質)專一性結合，進而抑制後續轉譯過程之故。1-氨基三環癸烷(1-Aminoadamantane，即，金剛烷胺氫氯酸鹽)，目前以Symmetrel[®](E. I. Du Pont de Nemours and Company, Wilmington, Del)的商品名稱於市面上販售。此外，亦可以習知的方法來製備金剛烷胺，例如，揭示於美國專利第3, 310, 469號中的方法。本發明範疇也涵蓋金剛烷胺衍生物。舉例來說，已知金剛烷胺的第1個位置係可被-CH(CH₃)NH₂來取代(美國專利第5, 599, 998號)，此取代所得的產物目前也以Rimantadine[®]的商品名稱於市面上販售，其係被應用來治療及預防A型流感病毒的感染。
- [0021] 一旦由本發明方法鑑別出一有效化合物後，該化合物即可被配方成一可單獨施用或與其他治療性藥劑一同施用的藥學組合物。其他的治療性藥劑包括(但不限於)諸如干擾素或三唑核苷(ribavirin)之類的抗病毒藥劑。
- [0022] 因此，本發明更提供一種藉由施用一藥學組合物至一個體身上來治療腸病毒或腦心肌炎病毒感染的方法，該組合物包含一藥學上可接受的載體及一依據上述方法所鑑別出來的化合物，亦即，金剛烷胺。「治療」一詞在此定義為施用一藥學組合物至一上述患有腸病毒或腦心肌炎病毒感染之個體上，以治癒、減輕、解除、補救、防止或緩解該感染、該感染之症狀、該感染所致之疾病狀態或朝向該感染發展之前兆。「一治療有效量」係指一能於個體身上產生欲求治療效果(即，在前述治療一詞中定義)的組合物用量。這些組合物可於活體內(一般係施用於一哺乳動物身上，較佳係為人類)或活體外施用。當用於活體內時，可經由許多種方式將之施用於一哺乳動物身上，包括以各種劑量形式之非經腸胃道、靜脈注射、皮下注射、肌肉注射、經結腸、經直腸、經陰道、經鼻、經口、穿皮膜式、表面塗抹、經眼、腹膜內、或手術植入物等方式來施用。金剛烷胺較佳是配方成經口施用的藥劑，因其係為患者最容易接受及使用的方式。
- [0023] 習知技藝人士應能了解施用方式係視所欲治療的個體對象及所選用的特定組合物種類而定。習知技藝人士應知道如何定出可達成欲求治療效果之有效劑量範圍。一般來說，會先從低劑量開始施用，然後逐步調高劑量直到達到最佳欲求效果為止。本發明的施用劑量視施用途徑，配方特性，個體疾病性質，個體體型、體重、表面積、年齡及性別，是否併用其他藥物，及醫師的判斷而定。適當的劑量介於約0.01-10毫克/公斤體重間。視所篩選到的化合物種類及施用途徑的有效程度，適用劑量範圍將有所不同，較佳係介於約0.1-1毫克/公斤體重間。
- [0024] 可藉由許多習知的方法來製備口服配方，該等口服配方包括膠囊、可嚼式藥錠、腸衣藥錠、糖漿、乳化液、懸浮液，或可供以溶液或懸浮液方式施用的固體。適當的藥學上可接受的載體包括(但不限於)水，生理食鹽水，葡萄糖，醇類，阿拉伯膠，植物油，苯甲醇，聚乙二醇，明膠，諸如乳糖、澱粉糖類或澱粉之類的碳水化合物，硬脂酸鎂、滑石粉、矽酸、單脂肪酸甘油酯及二單脂肪酸甘油酯，羥甲基纖維素，聚乙烯吡咯酮等類似物。此外，如果需要的話，該藥學組合物還可包括微量的無毒輔劑，例如濕潤劑、潤滑劑、防腐劑、酸鹼緩衝劑、安定劑、乳化劑、調整滲透壓之鹽類、著色劑、風味劑和/或芳香性物及不會與活性化合物反應或破壞其作用的其他物質。必要的話，也可使用能提供吸收的配方(例如，脂肪微胞)。
- [0025] 關於非經腸胃道之施用方式，特別適合的是可供注射的無菌溶液(油溶液或水溶液)，以及懸浮液、乳化液或包括栓劑的植入物。也可使用霧化器(Nebulizers)及吸入性氣霧配方(inhalation aerosols)。或是方便使用的計量安瓿(ampules)。也可將化合物冷凍乾燥並在使用時重新懸浮成可供注射的溶液。

- [0026] 其他非經腸胃道之施用方式，例如表面塗用及包含一與該表面塗用相容之載體且黏性大於水的非噴霧型黏稠狀半固體或個體型式物品。這類適當配方包括(但不限於)穿皮式貼布、溶液、懸浮液、乳液、乳霜、軟膏、粉末、擦劑、油膏、氣霧配方等，必要的話，可經無菌處理或與諸如防腐劑、安定劑、濕潤劑、潤滑劑、緩衝劑或可調整滲透壓的鹽類之類的輔劑混合。
- [0027] 同樣適於表面施用的還包括噴灑式氣霧配方，其中該鑑別出來的化合物，例如，金剛烷胺，較佳是與一固態或液態的惰性載物一同封裝在一可擠壓的瓶子或與加壓的可揮發性氣體(即，推進氣體)一同混合。這些例舉式配方可應用於皮膚或黏膜或身體內部諸如口、眼、腸、肺、直腸、鼻、陰道、靜脈、動脈、心臟、肌肉、腹膜、真皮內、皮下等處。非經腸胃道施用的製備較佳係無菌狀態或經殺菌處理。
- [0028] 美國專利第4,895,727號中揭示一種在皮膚及黏膜內誘發一儲存槽效應以提高藥劑之滲透及滯留，並降低穿皮膜流量的方法。美國專利第4,557,934號中揭示一種供表面塗用的藥學組合物，其包含一藥學活性藥劑及一種可提高滲透的物質，即，1-十二烷基偶氮環庚-2-酮。此組合物可提供所選定藥學活性藥劑以非常高傳送速率穿越表皮及角質。
- [0029] 可以適當的油性或水溶性基底來製備一內含金剛烷胺的栓劑。此油溶性類基底包括可可奶油及具類似性質的脂肪；水溶性基底則包括聚乙二醇。
- [0030] 也可藉由習知技術來製備包含所鑑別化合物(例如，金剛烷胺)的其他藥物，此外也可使用其他常用的載體或稀釋劑。這些載體或稀釋劑的例子包括(但不限於)明膠；諸如蔗糖或乳糖之類的天然糖類、卵磷脂；果膠；澱粉(例如玉米澱粉)；藻酸；滑石；矽酸(例如，膠態矽酸)；葡萄糖；纖維素，纖維素衍生物例如纖維素羥基團被低碳數脂肪性醇類和/或低飽和氧基醇類(例如甲基羥丙基纖維素、甲基纖維素、苯二甲酸纖維素)加以部分醚化的纖維素醚類，例如硬脂酸甲酯及硬脂酸甘油酯之類的硬脂酸酯； C_{12-22} 脂肪酸鎂鹽或鈣鹽，特別是飽和脂肪酸(例如，硬脂酸鈣、月桂酸鈣、油酸鎂、棕櫚酸鈣及硬脂酸鎂等)；乳化劑；油及脂肪，特別是植物性來源者(例如，花生油、菜油、橄欖油、芝麻油、棉花仔油、玉米油、小麥胚芽油、向日葵仔油)；飽和性脂肪酸($C_{12}H_{24}O_2$ 至 $C_{18}H_{36}O_2$ 及其混合物)之單-、二-及三酸甘油酯，例如，單硬脂酸甘油酯、二硬脂酸甘油酯、三硬脂酸甘油酯、三月桂酸甘油酯)；藥學可相容的單-或多元醇及聚二醇類，如甘油、甘露醇、山梨醇、五赤蘚醇、乙醇、二乙二醇、三乙二醇、乙二醇、丙二醇、二丙二醇、聚乙二醇400及其他聚乙二醇類，以及這類醇類及聚乙二醇類的衍生物；飽和及不飽和脂肪酸(C_{2-22} ，特別是 C_{10-18})與單羥基脂肪性醇類(C_{2-20} 烷醇)或多元醇類(如二醇、三醇、二乙二醇、五赤蘚醇、甘露醇、山梨醇、乙醇、丁醇、十八烷醇等)反應後所生成的酯類，如硬脂酸甘油酯、棕櫚酸甘油酯、二硬脂酸二酯、二月桂酸二酯、二乙酸二酯、單乙酸甘油酯、三乙酸甘油酯、油酸甘油酯、硬脂酸乙二酯；這類多元醇的酯類在特定例子中可以被加以醚化；苯甲酸苯甲酯；二噁烷；甲酸甘油酯；四氫呋喃； C_{1-12} 醇類之聚二醇醚；二甲基乙醯胺；乳醯胺；乳酸酯(例如，乳酸乙酯)；碳酸乙酯；矽酮(特別是中等黏度的二甲基聚矽氧烷)。
- [0031] 也可使用會使配方崩解的物質作為輔劑，例如交鏈的聚乙烯吡咯酮、羧化鈉甲基澱粉、羧化鈉甲基纖維素或微晶型纖維素。同樣的，也可使用習知的鍍膜劑(如，聚丙烯酸酯、纖維素醚類等)。
- [0032] 至於溶液形式的製備物，可以水及生理可相容的有機溶劑來製備，如乙醇、1,2-丙二醇、聚二醇類(如，二乙二醇、三乙二醇及丙二醇及其衍生物)、二甲亞砷、脂肪性醇類(如，硬脂酸醇、鯨蠟醇、月桂醇及油醇)、三酸甘油酯(如，油酸甘油酯、硬脂酸甘油酯、棕櫚酸甘油酯及乙酸甘油酯)、部分酯化的甘油(如，單硬脂酸甘油酯、二硬脂酸甘油酯、單棕櫚酸甘油酯)、石蠟等類似物。
- [0033] 至於注射液或懸浮液，可使用無毒且非經腸胃道之可相容的稀釋劑或溶劑來製備，如水、1,3-丁二醇、1,2-丙二醇、二醇與水之混合物、林格氏溶液(Ringer's solution)、氯化鈉等張溶液或包括合成的單甘油酯或二甘油酯在內的硬化油類或諸如油酸之類的脂肪酸。
- [0034] 也可使用習知常用的乳化劑或溶液輔劑來製作配方及製備。可使用的乳化劑或溶液輔劑的範例如下：聚乙烯吡咯酮、山梨烷脂肪酸酯類(如山梨烷三油酸酯)、磷脂(如卵磷脂)、合金歡膠(acacia)、西黃耆膠(tragacath)、聚環氧乙烷化之山梨烷單油酸酯及其他乙氧基化的山梨烷脂肪酸酯、聚環氧乙烷化之油脂、聚環氧乙烷化之油酸三甘油酯、亞油酸化之油酸三甘油酯或脂肪醇之聚環氧乙烷縮聚物。在本文中，「聚環氧乙烷化」一詞意指所指化合物含有聚環氧乙烷長鏈，其聚合度一般介於2到40，特別是介於約10到20間。

- [0035] 這類聚環氧乙烷物質可藉由讓內含羥基的化合物(如，單-或二甘油酯或內含油酸殘基的不飽和化合物)與環氧乙烷(如，每1莫耳的甘油酯加入40莫耳環氧乙烷)反應製備而得。油酸三甘油酯的例子包括橄欖油、花生油、菜子油、芝麻油、棉花籽油及玉米油。參見 Fiedler, Lexicon der Hilfsstoffe für Pharmazie, Kosmetik und Angrenzende Gebiete, Lexicon of Adjuvants for Pharmacy, Cosmetics and Related Areas pp. 191-195(1971)。
- [0036] 此外，配方中也可添加防腐劑、安定劑、緩衝劑(如，磷酸氫鈣)、凝膠態氫氧化鋁、風味改良劑、抗氧化物、及錯化物生成劑(如，四乙酸乙二胺)等等。在一可使活性化合物安定的特定例子中，其酸鹼值係被調整到介於3到7之間，較佳係介於弱酸範圍(pH 5)。
- [0037] 也可使用一抗氧化物，例如雙亞硫酸鈉、抗壞血酸、五倍子酸、五倍子酸烷基酯(如，五倍子酸甲酯及五倍子酸乙酯)、羥基茴香丁酯、正二氫瓜拉那酸(nordihydroguararetic acid)、生育酚及其協同效應物(可藉錯化作用結合金屬離子的物質，如卵磷脂、抗壞血酸、磷酸)。添加協同效應物可大幅提高生育酚的抗氧化效果。至於防腐劑，可使用例如，抗壞血酸、對-羥基苯甲酸酯(如，甲酯或乙酯類的低碳數烷基酯)、苯甲酸、苯甲酸鈉、三氯異丁醇、苯酚、間苯酚、氯苯鎊、及氟馬林衍生物。
- [0038] 以下將藉由所揭示之非限制性的實施例闡述本發明方法及內容。在閱讀過這些實例後，習知技藝人士將能輕易推知本發明實施例更進一步的變化。
- [0039] 腦心肌炎病毒的雙順反子DNA雙效表現載體(pGS-EMCV)係藉由在pTriEx-4質體(購自 Novagene)中插入兩個報導蛋白子基因序列(即，順反子序列)所建構而成的，該兩報導基因分別為 β -半乳糖苷酶(β -gal)及分泌型人類胎盤鹼性磷酸酶(SEAP)，使一細胞UTR序列位於第一順反子序列(即， β -gal)的上游，且一EMCV-IRES序列則係位於該第一順反子序列的下游，介於第一順反子序列(即， β -gal)及第二順反子序列(即，SEAP)間。依類似的方式分別建構出pGS-EV71及pGS-HCV，但其中分別以EV71-IRES序列及HCV-IRES序列來取代EMCV-IRES序列。第1圖分別示出EV71、EMCV及HCV之雙順反子DNA雙效表現載體中DNA序列的排列。
- [0040] 轉染
- [0041] 使用源自非洲綠猴的腎臟細胞(即，COS-1細胞)作為接受實施例1所製備之雙順反子DNA雙效表現載體轉染的細胞。此轉染方法已屬習知。簡言之，依下列步驟製備轉染原液，1)溶液A：將1 μ g實施例1所製備之雙順反子DNA雙效表現載體溶於不含血清的生長基中，並調整其最終體積成為50 μ l；2)溶液B：混合2 μ l的lipofectAMINE 2000(購自Invitrogen)與50 μ l不含血清的生長基；3)混合溶液A與溶液B。將COS-1細胞(0.5-2 x 10⁵/孔，每盤24孔)培育在500 μ l不含血清的生長基中約20分鐘，之後加入102 μ l依上述方式製備的轉染原液，繼續培育該COS-1細胞12小時(37°C, 5% CO₂)。之後，將上層培養基吸掉，換上含有胎牛血清及抗生素等的生長基，繼續培育12小時，才用於以下化合物篩選試驗中。
- [0042] 化合物篩選試驗
- [0043] 依前述實施方式來獲取適當的候選化合物，並將該候選化合物溶於PBS溶液中，分別配製成濃度為10 mg/ml的化合物原液，使用時依個別使用狀況將該等化合物原液稀釋後用於篩選試驗中。
- [0044] 簡言之，將各種濃度的化合物原液稀釋液加到依前述步驟轉染的轉染細胞中，與該轉染細胞一同培育12小時，之後，將細胞溶解並測試其中所轉譯出的報導蛋白質質量或活性(即， β -gal和SEAP活性)，以決定所測試的該候選化合物，其是否抑制IRES-依賴型轉譯活性(即，SEAP蛋白質質量或活性)而不抑制CAP-依賴型轉譯活性(即， β -gal蛋白質質量或活性)。如果SEAP蛋白質質量或活性受到抑制而 β -gal蛋白質質量或活性則幾乎維持不變，就表示該測試的候選化合物係可抑制感染病毒的IRES-依賴型轉譯活性但卻不會影響宿主細胞的CAP-依賴型轉譯活性。因此，所篩選出來的化合物將是潛在可用來治療後選化合物腸病毒或腦心肌炎病毒感染的化合物。
- [0045] 報導蛋白質活性分析
- [0046] 報導蛋白質，即 β -gal和SEAP，係分別以市售的檢驗套組，並依據所附操作手冊來測量其活性，即BD Great Escape SEAP檢驗套組(Cat. No. K2041-1，購自Clontech)及Luminescent β -gal檢驗套組(Cat. No. K2048-1，購自Clontech)。
- [0047] 金剛烷胺抑制IRES-依賴型轉譯活性

[0048] 依前述製備候選化合物的方法挑選了數種化合物進行測試，包括金剛烷胺(0.1 mg/ml)、INF- α (10個單位)及滋利特(stavudine, 商品名Zerit®)(0.05 mg/ml)。依前述步驟，將所挑選出來的該等候選化合物施加於轉染了實施例1之雙順反子DNA雙效表現載體的細胞，並分別測定轉譯出的 β -gal和SEAP活性，結果示於第2圖。由第2圖可清楚看到在所挑選的3種候選化合物中，只有金剛烷胺表現出選擇性抑制IRES-依賴型轉譯活性但卻不會影響CAP-依賴型轉譯活性的能力，此初步篩選結果顯示，金剛烷胺是一種潛在可用於治療腸病毒感染及腦心肌炎病毒感染的化合物，進一步分析如下。

[0049] 依前述操作步驟測試不同濃度之金剛烷胺對轉染了實施例1之雙順反子DNA雙效表現載體的細胞轉譯活性的影響，並分別測定轉譯出的 β -gal和SEAP活性，以決定其最佳抑制濃度，結果分別示於第3及4圖。由第3及4圖可知，無論是轉染了pGS-EV71或pGS-EMCV DNA的細胞，濃度範圍介於0.01 mg/ml至0.25 mg/ml的金剛烷胺，對此兩種細胞所轉譯出的 β -gal活性並沒有明顯的抑制效果(很少或幾乎沒有)(第3A、4A圖)；相反的，金剛烷胺對轉染了pGS-EV71或pGS-EMCV DNA的細胞所轉譯出的SEAP活性則有明顯抑制效果(第3B、4B圖)。特別是，當金剛烷胺劑量為0.25 mg/ml時，其可抑制約80%的IRES-依賴型轉譯活性但卻幾乎不會影響CAP-依賴型轉譯活性(第3及4圖)。將此實驗數據加以常規化處理後(normalized)，可看到金剛烷胺對SEAP活性的抑制作用係呈現劑量相關的關係，亦即，隨著金剛烷胺劑量上升，其抑制SEAP的程度也更明顯(第3C、4C圖)。計算後可知，金剛烷胺抑制腸病毒感染及腦心肌炎病毒IRES-依賴型轉譯活性的IC₅₀值分別約為0.055 mg/ml及0.045 mg/ml。此外，金剛烷胺對腸病毒全細胞抗病毒活性(whole cell antiviral activity)的IC₅₀值約為8.82 mg/ml；同時，發明人還發現金剛烷胺對轉染了包含C型肝炎病毒之IRES序列的雙順反子DNA雙效表現載體的細胞並沒有作用(結果未示出)。綜上所述，可知金剛烷胺係潛在可用來治療腸病毒或腦心肌炎病毒感染的化合物，但其卻無法用來治療C型肝炎病毒感染。

[0050] 以金剛烷胺及內含腸病毒或腦心肌炎病毒之IRES序列的雙順反子DNA雙效表現載體作為一種轉錄調控系統

[0051] 習知的轉錄調控系統基本上由三大類分子組合而成：(1)一種DNA啟動子(promoter)，如lac啟動子與TRE-CMVmin啟動子；(2)一種蛋白質轉錄活化因子或轉錄抑制因子(transcription activators or repressors)，如tTA轉錄活化子與lacI抑制子；(3)一種調控子，其係可控制蛋白質轉錄因子與該啟動子間結合活性的小分子，如IPTG或四環黴素。基於本發明前述發現，發明人發現可利用所發現之金剛烷胺獨特的性質及內含腸病毒或腦心肌炎病毒之IRES序列的雙順反子DNA雙效表現載體，提供一種較前技而言更簡單的轉錄調控系統。第5圖示出金剛烷胺對腸病毒-IRES或腦心肌炎病毒-IRES所媒介之基因表現的調控。由第5圖結果可觀察到，金剛烷胺對腸病毒-IRES或腦心肌炎病毒-IRES所媒介之基因表現，均呈現劑量相關的關係。因此，配合此系統，任一習知技藝人士可挑選一特定劑量的金剛烷胺，將其施用到轉染了內含腸病毒-IRES或腦心肌炎病毒-IRES之雙順反子DNA雙效表現載體的細胞中，來達到抑制與IRES相連基因表現量至一欲求程度。舉例來說，當所使用的系統係包含腸病毒-IRES序列時，只要使用0.01mg/ml之金剛烷胺，即可達成抑制20%基因表現的效果；若要達成抑制80%基因表現的效果，所使用的金剛烷胺濃度就必須提高到約0.25mg/ml。類似的，當所使用的系統係包含腦心肌炎病毒-IRES序列時，金剛烷胺用量為0.05 mg/ml時，可達成20%的抑制效果；若要達成抑制80%基因表現的效果，所使用的金剛烷胺濃度就必須提高到約0.25mg/ml。

[0052] 雖然本發明已參照圖示及實施例詳細說明如上，但習知技藝人士應能了解在不悖離本發明精神範疇下，可對所揭示的發明內容及實施例作各種變化及改良，該等變化及改良應仍視為以下附隨之本發明申請專利範圍所涵蓋的範圍。

【圖式簡單說明】

[0053] 第1圖說明本發明實施例1之EV71、EMCV及HCV之雙順反子DNA雙效表現載體中DNA序列的排列方式；第2圖說明3種候選化合物對轉染了包含EV71之IRES序列之雙順反子DNA雙效表現載體細胞所轉譯出的 β -gal(第2A圖)和SEAP(第2B圖)活性的影響，第2C圖則示出經常規化處理後之SEAP活性的數據，所使用的候選化合物分別為：金剛烷胺(0.1 mg/ml)、INF- α (10個單位)、及滋利特(stavudine)(0.05 mg/ml)；第3圖說明金剛烷胺對轉染了包含EV71之IRES序列之雙順反子DNA雙效表現載體細胞所轉譯出的 β -gal(第3A圖)和SEAP(第3B圖)活性的影響；第3C圖則示出經常規化處理後之SEAP活性的數據；及第4圖說明金剛烷胺對轉染了包含EMCV之IRES序列的雙順反子DNA雙效表現載體細胞所轉譯出的 β -gal(第4A圖)和SEAP(第4B圖)活性的影響；第4C圖則示出經常規化處理後之SEAP活性的數據；第5圖

說明一種由金剛烷胺與包含EV71-IRES或EMCV-IRES之雙順反子DNA雙效表現載體所組成的轉錄調控系統中，所使用的金剛烷胺劑量與基因表現抑制量間的關係。

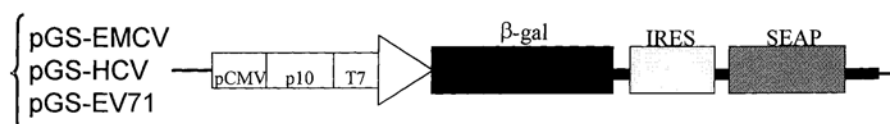
【主要元件符號說明】

七、申請專利範圍：

1. 一種可治療一個體之腸病毒感染的組合物，其係包含一藥學上可接受的載體及一治療有效量的金剛烷胺，該金剛烷胺係可降低該感染病毒之IRES-依賴型轉譯活性但卻不會影響該個體體內的CAP-依賴型轉譯活性。
2. 如申請專利範圍第1項所述之組合物，其中該治療有效量的金剛烷胺的量係介於約0.01毫克/公斤至約1毫克/公斤間。
3. 如申請專利範圍第2項所述之組合物，其中該用以治療腸病毒之治療有效量的金剛烷胺的量係為約0.25毫克/公斤。
4. 如申請專利範圍第1項所述之組合物，其中該組合物係可經由口、腸、非經腸胃道、表面、穿皮膜式、皮下注射或氣霧等途徑來施用。
5. 如申請專利範圍第1項所述之組合物，其中該個體是人類或動物。
6. 一種包裝產品，至少包含：一容器；一治療有效量的金剛烷胺，其係可抑制一腸病毒感染之IRES-依賴型轉譯活性但卻不會影響CAP-依賴型轉譯活性；及一容器上的標示，其指明施用該金剛烷胺係可治療腸病毒感染。
7. 如申請專利範圍第6項所述之包裝產品，其中該治療有效量的金剛烷胺的量係介於約0.01毫克/公斤至約1毫克/公斤間。
8. 如申請專利範圍第7項所述之包裝產品，其中該金剛烷胺的量係約為0.25毫克/公斤。
9. 一種轉錄調控系統，其至少包含：(1)一內含腸病毒之IRES序列的雙順反子DNA雙效表現載體，其中該雙順反子DNA雙效表現載體包含以下列順序排列之序列：一第一報導基因，其係以CAP-依賴型轉譯啟始的序列；及一第二報導基因，其係以IRES-依賴型轉譯啟始的序列；及(2)一有效量的金剛烷胺；其中該有效量的金剛烷胺係可抑制IRES-依賴型轉譯活性但卻不會影響CAP-依賴型轉譯活性。
10. 如申請專利範圍第9項所述之轉錄調控系統，其中該有效量的金剛烷胺的量係介於約0.01毫克/公斤至約1毫克/公斤間。
11. 如申請專利範圍第10項所述之轉錄調控系統，其中該有效量的金剛烷胺的量係約為0.25毫克/公斤。
12. 一種藉由使用如申請專利範圍第9項所述系統進行轉錄調控的方法，其至少包含下列步驟：(1)選擇一適當量的金剛烷胺；及(2)讓該所選擇之適當量的金剛烷胺與一轉染了該內含腸病毒之IRES序列的雙順反子DNA雙效表現載體的宿主細胞接觸；其中該所選擇之適當量的金剛烷胺係可抑制該轉染之雙順反子DNA雙效表現載體的IRES-依賴型轉譯活性，但卻不會影響該宿主細胞的CAP-依賴型轉譯活性。
13. 如申請專利範圍第12項所述之方法，其中該金剛烷胺的量係介於約0.01毫克/公斤至約1毫克/公斤間。
14. 如申請專利範圍第13項所述之轉錄調控系統，其中該金剛烷胺的量係約為0.25毫克/公斤。

八、圖式：

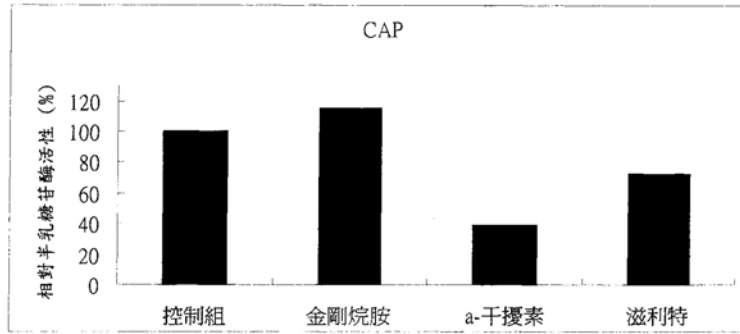
第 1 圖



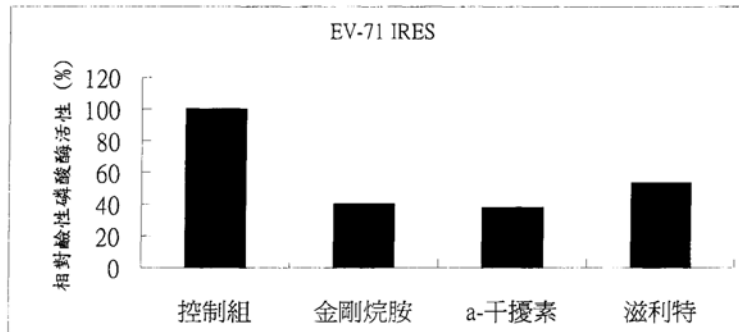
第1圖

第 2 圖

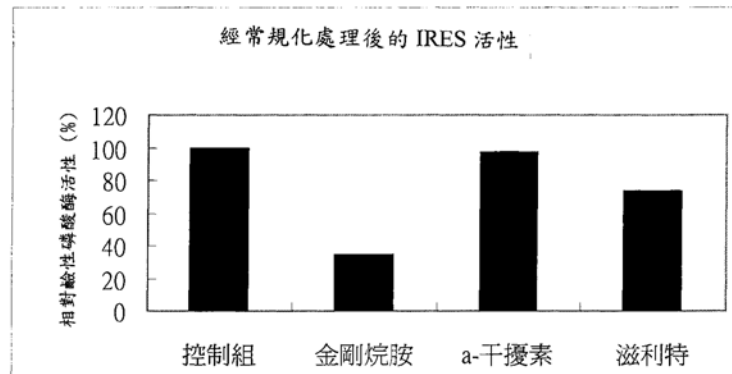
A



B

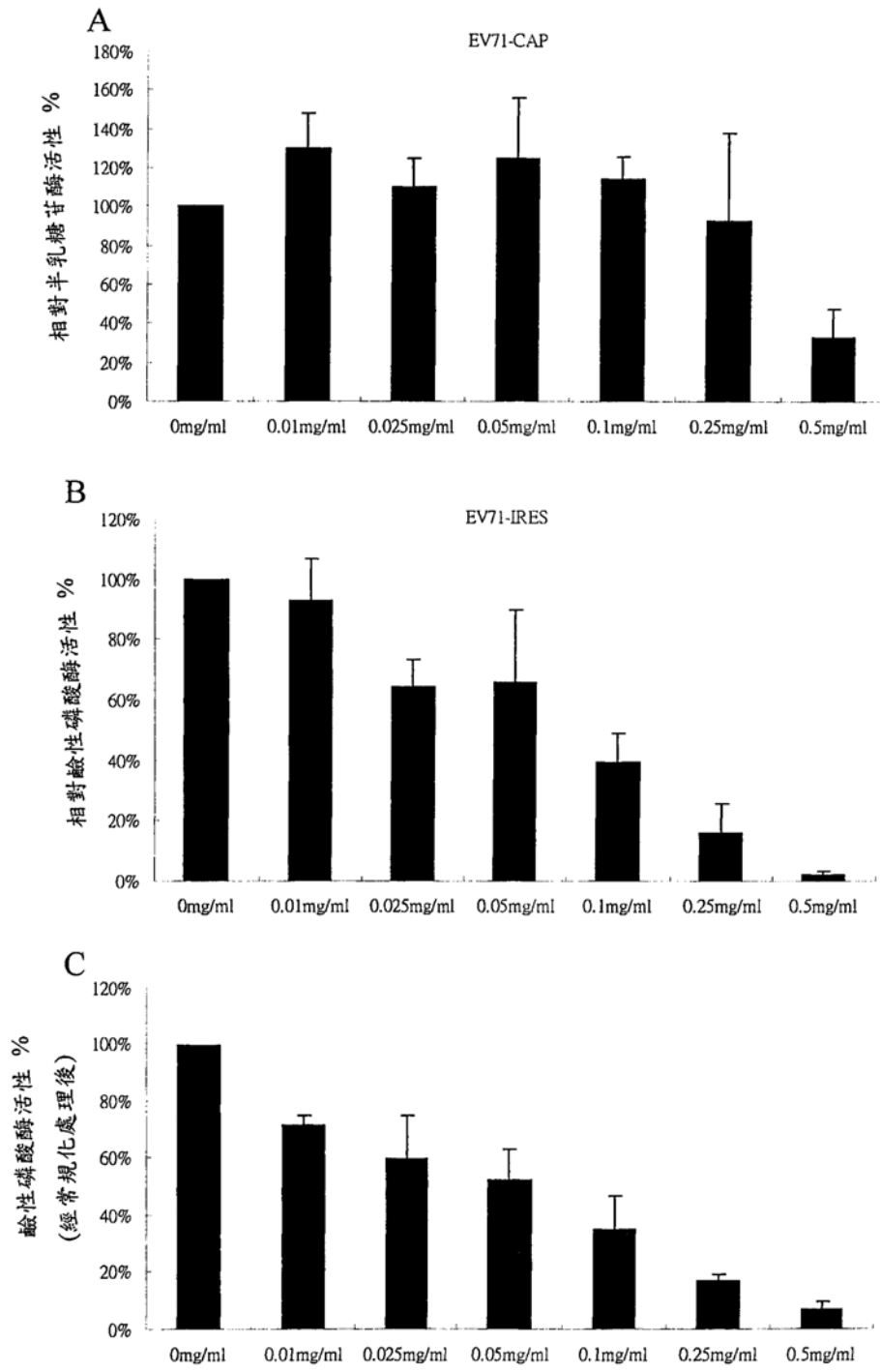


C



第2圖

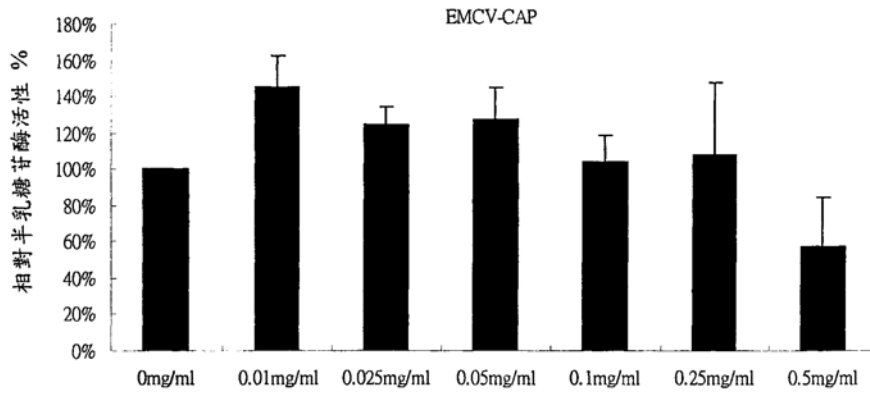
第3圖



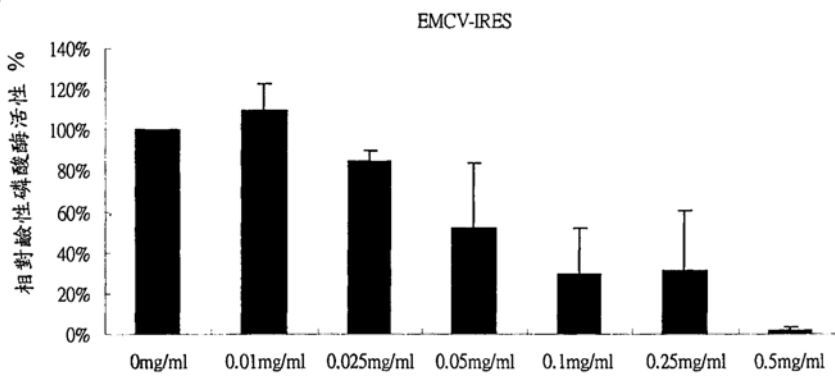
第3圖

第 4 圖

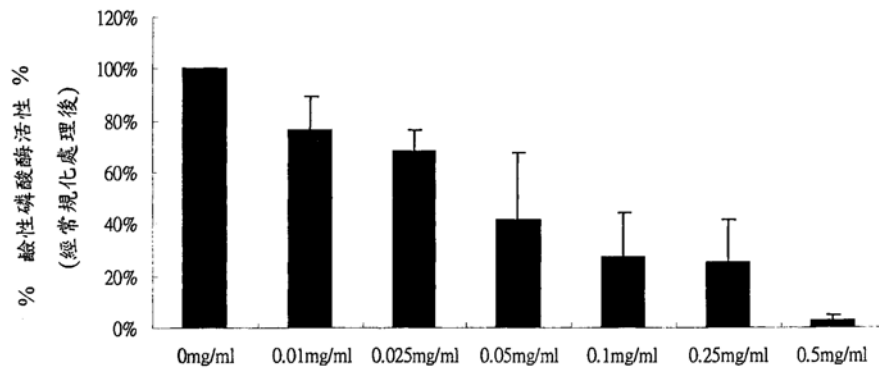
A



B

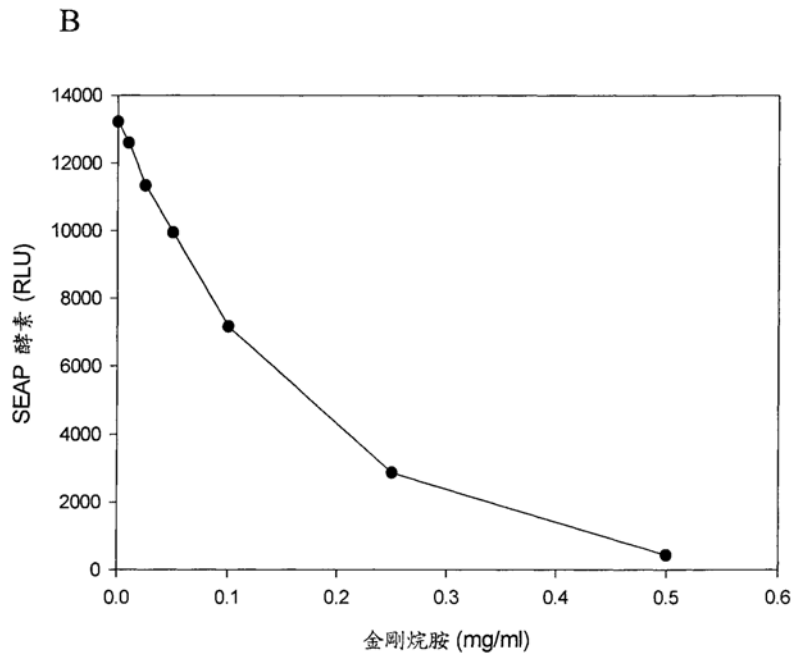
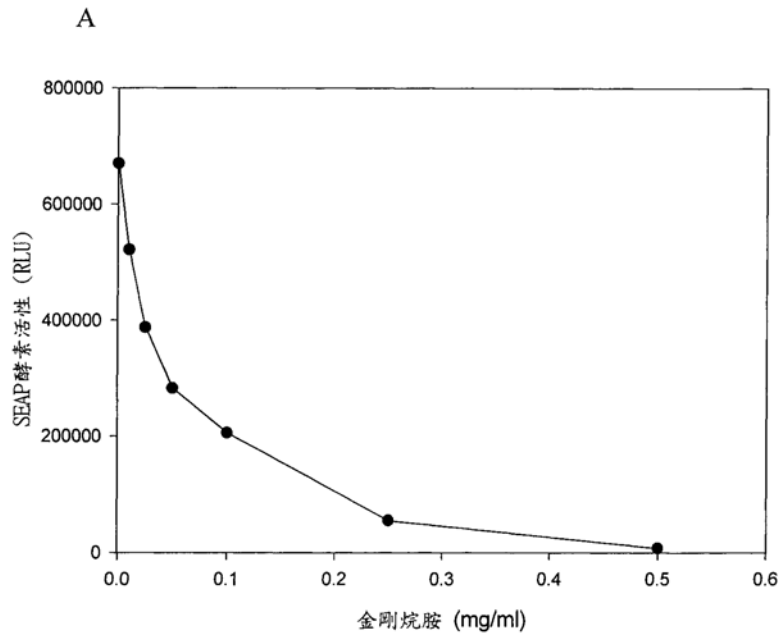


C



第4圖

第 5 圖



第5圖