



# (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110354251 B

(45) 授权公告日 2024. 04. 02

(21) 申请号 201910265461.4

A61K 38/16 (2006.01)

(22) 申请日 2019.04.03

A61P 25/00 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

A61P 25/28 (2006.01)

申请公布号 CN 110354251 A

A61P 25/18 (2006.01)

(43) 申请公布日 2019.10.22

### (56) 对比文件

(30) 优先权数据

TW 201625286 A, 2016.07.16

15/944,126 2018.04.03 US

US 2017080048 A1, 2017.03.23

US 2011318429 A1, 2011.12.29

(73) 专利权人 磨法生物科技股份有限公司

US 2008038288 A1, 2008.02.14

地址 中国台湾新北市深坑区北深路三段

CN 103463618 A, 2013.12.25

270巷12号8楼之1

CN 1523994 A, 2004.08.25

CN 103536901 A, 2014.01.29

(72) 发明人 招名威

CN 106806390 A, 2017.06.09

(74) 专利代理机构 北京律盟知识产权代理有限公司

TW 201717978 A, 2017.06.01

责任公司 11287

审查员 戴露丹

专利代理师 沈锦华

(51) Int. Cl.

权利要求书1页 说明书8页

A61K 38/08 (2019.01)

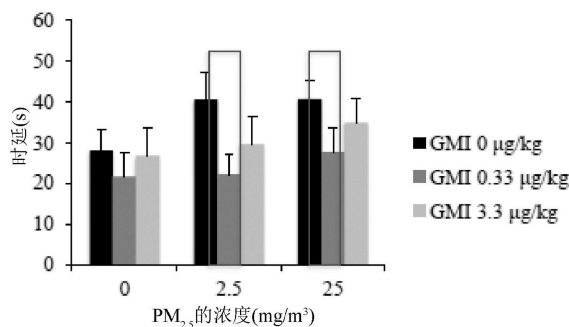
序列表2页 附图5页

### (54) 发明名称

免疫调节蛋白在减少由细颗粒物所导致的损伤中的新用途

### (57) 摘要

本发明涉及来源于灵芝 (Ganoderma) 的免疫调节蛋白或其重组体或组合物在减少由细颗粒物所导致的对胚胎和子代的损伤中的新用途。因此,本发明表明投与到妊娠动物的所述灵芝免疫调节蛋白可以预防胚胎和子代的神经损伤并且降低所述胚胎和子代的病症的风险。



1. 一种来源于灵芝 (Ganoderma) 的免疫调节蛋白或其重组体或包含所述免疫调节蛋白的组合物的用途, 其用于制备预防暴露于PM2.5的妊娠个体中子代的海马体神经元的神经突损伤或增强暴露于PM2.5的妊娠个体中子代长期记忆、工作记忆或空间认知的药剂, 其中所述灵芝的免疫调节蛋白或其重组体的氨基酸序列为SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4。

2. 根据权利要求1所述的用途, 其中所述神经突损伤为认知损伤。

3. 根据权利要求1所述的用途, 其中经口投与所述免疫调节蛋白。

4. 根据权利要求1所述的用途, 其中所述免疫调节蛋白来源于小孢灵芝 (Ganodermamicrosporum)。

## 免疫调节蛋白在减少由细颗粒物所导致的损伤中的新用途

### 技术领域

[0001] 本发明涉及来源于灵芝 (*Ganoderma*) 的免疫调节蛋白或其重组体或组合物在减少由细颗粒物所导致的对胚胎和子代的损伤中的新用途。具体地说,免疫调节蛋白来源于小孢灵芝 (*Ganoderma microsporum*)。

### 背景技术

[0002] 空气污染也已经变为普遍关注点。单组分空气污染即直径小于 $2.5\mu\text{m}$ 的细颗粒物具有作为核心的碳并且吸附有机物、重金属和其它物质。细颗粒物可以通过呼吸到达支气管,并且通过血流进入身体中以通过血液循环影响全身。当空气污染物进入孕妇身体中时,她的孩子也会受到影响。已经报导先天性心脏病、流产、早产和低出生体重可能由在怀孕期间暴露于细悬浮粒子而造成。所述一代中枢神经系统也可能受在怀孕期间暴露于细气溶胶的影响。

[0003] 已经报导灵芝 (*Lingzhi*) 物种的多种治疗作用,如免疫调节、抗肿瘤、肝保护、抗氧化和胆固醇降低作用。US 2010009915提供用于遏制癌细胞增殖的方法和用于遏制肿瘤细胞运动的方法,其包括向肿瘤细胞提供真菌免疫调节蛋白LZ-8的纯化多肽。US7,601,808揭示从具有免疫调节剂功效的小孢灵芝中克隆的免疫调节蛋白。但这些参考文献与来自灵芝的免疫调节蛋白在减少细颗粒物对人类的损伤方面不相关。TW201717978揭示有效剂量的灵芝提取物用于抑制或减少PM2.5导致的毒性的用途。然而,这份参考文献没有说明来自灵芝的免疫调节蛋白。

### 发明内容

[0004] 本发明发现来自灵芝的免疫调节蛋白可以越过胎盘屏障并且减少由细颗粒物所导致的对胚胎和子代的损伤,这表明投与到妊娠动物的灵芝免疫调节蛋白可以预防胚胎和子代的神经损伤并且降低胚胎和子代的病症的风险。

[0005] 本发明提供用于减少对胚胎或子代的神经损伤或降低胚胎或子代罹患神经疾病的风险的方法,其包括向暴露于颗粒物中的妊娠个体投与有效量的来源于灵芝的免疫调节蛋白或其重组体或组合物。

[0006] 本发明还提供用于增强胚胎或子代认知的方法,其包括向暴露于颗粒物的妊娠个体投与有效量的来源于灵芝的免疫调节蛋白或其重组体或组合物。

[0007] 神经损伤的实施例为认知损伤。认知的某些实施例包含记忆功能、长期记忆、短期记忆、工作记忆和空间认知。神经疾病的某些实施例包含神经退行性疾病、精神分裂症或自闭症。

[0008] 灵芝的免疫调节蛋白或其重组体的某些实施例包含选自由以下组成的群组的氨基酸序列: (1) -Leu-Ala-Trp-Asn-Val-Lys- (LAWNVK;SEQ ID NO:1)、(2) -Asp-Leu-Gly-Val-Arg-Pro-Ser-Tyr-Ala-Val- (DLGVRPSYAV;SEQ ID NO:2)、(3) 氨基酸序列:MSDTALIFTLAWNVKQLAFDYTPNWGRGRPSSFIDTVTFPTVLTDKAYTYRVVVSQKDLGVRPSYAVESDGSQKINFLEYNISGYG

IADTNTIQVYVIDPDTGNNFIVAQWN (SEQ ID NO:3) 和 (4) 氨基酸序列EAEAEFMSDTALIFTLAWN VKQLAFDYTPNWGRGRPSSFIDTVTFPTVLTDKAYTYRVVVS GKDLGVRPSYAVESDGSQKINFLEYN SGIADTNTIQVYVIDPDTGNNFIVAQWNYLEQKLISEEDLNSAVDHHHHHH (SEQ ID NO:4)。

[0009] 免疫调节蛋白的有效量的某些实施例为约0.01mg/kg到约5mg/kg。

### 附图说明

[0010] 图1 (a) 和 (b) 显示GMI可以增强子代的长期记忆。(a) 接受大剂量PM<sub>2.5</sub>的妊娠大鼠的子代耗费较长时间探索平台,而接受GMI的那些妊娠大鼠的子代花费较少时间。(b) 热点显示接受PM<sub>2.5</sub>的妊娠大鼠的子代在箱子周围游泳,然而接受GMI的妊娠大鼠的子代具有较高的在具有平台的象限处游泳的频率。

[0011] 图2显示GMI可以增强子代的工作记忆。

[0012] 图3显示GMI可以增强子代的长期记忆。

[0013] 图4显示GMI可以增强子代的空间认知。

[0014] 图5 (a) 到 (d) 显示GMI可以有效地保护记忆形成并且减少PM<sub>2.5</sub>对神经突的损伤。高尔基体染色 (Golgi staining) 用于观察脑部神经细胞以检测树突状分支的复杂度来探索神经元突触的形态和整合信号的能力。根据肖尔分析 (Sholl analysis) 结果,相比仅接受PM<sub>2.5</sub>的那些妊娠大鼠的子代的神经突,接受PM<sub>2.5</sub>和GMI的妊娠大鼠的子代的神经突对于海马体CA1区域 (a) 和对于海马体CA3区域 (c) 具有较大数量的分支尖端,并且对于海马体CA1区域 (b) 和对于海马体CA3区域 (d) 具有较长长度。

### 具体实施方式

[0015] 本发明出乎意料地发现来自灵芝的免疫调节蛋白可以越过胎盘屏障并且减少由细颗粒物所导致的对胚胎和子代的损伤,这表明向妊娠动物投与灵芝免疫调节蛋白可以预防胚胎和子代的神经损伤并且降低胚胎和子代的病症的风险。

[0016] 除非另外定义,否则本文所所用的所有技术和科学术语均具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所了解的含义相同的含义。虽然可以在本发明的实践或测试中使用与本文所描述的方法和材料类似或同等的任何方法和材料,但现在描述优选的方法和材料。本文所提及的所有公开均通过引用并入本文中。

[0017] 在本申请中,除非另外确切地陈述,否则单数的使用包含复数,冠词“一个/种 (a/an)”意指“至少一个/种”并且“或”的使用意指“和/或”。

[0018] 在本申请中,单词“包括 (comprise)”或变体如“包括 (comprises/comprising)”指示在指定方法、结构或组成中包含任何所叙述的整数或整数群组,但不排除任何其它整数或整数群组。

[0019] 如本文所使用的术语“胎盘屏障”指由胎盘组织构成并且限制在母亲与胎儿之间交换的物质的种类和量的半透膜。

[0020] 如本文所使用的术语“神经元”包含神经元和其一或多个部分 (例如神经元细胞体、轴突或树突)。术语“神经元”表示神经系统细胞,其包含中央细胞体 (body/soma) 和两种类型的延伸或突出:树突,一般来说大部分神经元信号通过其传输到细胞体;和轴突,一般来说大部分神经元信号通过其从细胞体传输到效应细胞,如靶神经元或肌肉。

[0021] 如本文所使用的术语“神经突”涵盖所有所述的自神经元向外生长的细胞过程(包含轴突和树突)。

[0022] 如本文所使用的术语“神经突生长”指自神经元向外生长的细胞过程,或指包括自神经元向外的生长的细胞。

[0023] 如本文所使用的“神经病症”意指存在于中枢神经系统或周围神经系统中的神经元的任何生理功能障碍或死亡或由神经胶质细胞功能障碍导致。所述病症的非限制性清单包括多发性硬化症、坐骨神经缺陷、脑或脊髓损伤、痴呆、额颞叶痴呆(frontotemporal lobe dementia)、阿尔茨海默氏病(Alzheimer's disease)、帕金森氏病(Parkinson's disease)、亨廷顿氏病(Huntington's disease)、朊病毒病、神经元病以及运动神经元病症。“神经元病”的特征在于运动神经元或感觉神经元的神经元细胞死亡,并且因此神经元病可以再分为运动和感觉神经元病症。

[0024] 如本文所使用的“促进(promote)”或“增加(increase)”、或“促进(promoting)”或“增加(increasing)”在本文中可互换使用。这些术语指与未治疗细胞(组织或个体)相比而言治疗细胞(组织或个体)中的经测量参数的增加。还可以在治疗前后比较相同细胞或组织或个体。在一些实施例中,与未治疗细胞相比,治疗细胞的增加为至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、1倍、2倍、3倍、4倍或更多。

[0025] 如本文所使用的术语“抑制(inhibit)”、“预防(prevent)”或“减少(reduce)”或“抑制(inhibiting)”、“预防(preventing)”或“减少(reducing)”在本文中可互换使用。这些术语指与未治疗细胞(组织或个体)相比而言治疗细胞(组织或个体)中的经测量参数的减少。还可以在治疗前后之间比较相同细胞或组织或个体。在一些实施例中,与未治疗细胞相比,治疗细胞的减少为至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或被完全抑制。

[0026] 如本文所使用的“治疗(treatment/treating)”或“缓解”可互换使用。这些术语指用于获得包含但不限于治疗益处和/或预防益处的有益或所需结果的方法。治疗益处涉及所治疗的潜在病症的根除或缓解。此外,在根除或缓解与潜在病症相关的一或多种生理症状以使得在患者中观察到改善的情况下实现治疗益处,但患者可能仍然患有所述潜在病症。“治疗”还可以指存活期相较于不接受治疗时的预期存活期而言延长。需要治疗的那些患者包含已经患有病况或病症的那些患者,以及易患上所述病况或病症的那些患者,或将预防所述病况或病症的那些患者。

[0027] 如本文所使用的“有效量”意指足以治疗患有疾病的个体或足以减轻与所述疾病相关的症状或并发症的量。

[0028] 如本文所使用的“个体”指人类或非人类动物。

[0029] 在一个方面中,本发明提供用于减少对胚胎或子代的神经损伤或降低胚胎或子代罹患神经疾病的风险的方法,其包括向暴露于颗粒物中的妊娠个体投与有效量的来源于灵芝的免疫调节蛋白或其重组体或组合物。

[0030] 在另一个方面中,本发明提供用于增强胚胎或子代认知的方法,其包括向暴露于颗粒物的妊娠个体投与有效量的来源于灵芝的免疫调节蛋白或其重组体或组合物。

[0031] 在一个实施例中,本发明的方法可以预防对胚胎或子代的神经损伤或胚胎或子代的神经疾病。

[0032] 在一个实施例中,神经损伤为认知损伤。认知包含但不限于记忆功能、长期记忆、短期记忆、工作记忆和空间认知。

[0033] 在一个实施例中,神经疾病为神经退行性疾病、精神分裂症或自闭症。可以根据本发明预防的神经退行性疾病的实例包含肌萎缩性侧索硬化(ALS)、三叉神经痛、舌咽神经痛、贝耳氏麻痹(Bell's palsy)、重症肌无力、肌肉萎缩症、进行性肌肉萎缩、原发性侧索硬化(PLS)、假延髓性麻痹、进行性延髓性麻痹、脊髓性肌萎缩、进行性延髓性麻痹、遗传性肌肉萎缩、椎间盘综合征(例如突出盘、破裂盘和脱垂盘综合征)、颈椎病、神经丛病症、胸廓出口损坏综合征、周围神经病、紫质症、轻度认知障碍、阿尔茨海默氏病、亨廷顿氏病、帕金森氏病、帕金森叠加综合征(例如多发性系统萎缩症、进行性核上麻痹和皮质基底核退化症)、痴呆、额颞叶型痴呆(frontotemporal dementia)、脱髓鞘疾病(例如吉兰-巴雷综合征(Guillain-Barre syndrome)和多发性硬化症)、恰克-马里-杜斯氏症(Charcot-Marie-Tooth disease, CMT; 又称为遗传运动和感觉神经病(HMSN)、遗传感觉运动神经病(HSMN)和腓骨肌肉萎缩)、朊病毒病(例如克雅氏病(Creutzfeldt-Jakob disease)、吉斯特曼-施特劳斯综合征(Gerstmann-Straussler-Scheinker syndrome, GSS)、致死性家族性失眠症(FFI)和牛海绵状脑病(BSE, 通常称为疯牛病))、皮克氏疾病(Pick's disease)、癫痫症和AIDS痴呆复合症(又称为HIV痴呆、HIV脑病和HIV相关痴呆)。

[0034] 在一个实施例中,免疫调节蛋白或其重组体来源于赤芝(*Ganoderma lucidum*)、赤芝(*Ganoderma lucidum*)、松杉灵芝(*Ganoderma tsugae*)、小孢灵芝或紫芝(*Ganoderma sinensis*)。

[0035] 在一个实施例中,灵芝的免疫调节蛋白或其重组体包括选自以下组成的群组的氨基酸序列:(1) -Leu-Ala-Trp-Asn-Val-Lys- (LAWNVK; SEQ ID NO:1)、(2) -Asp-Leu-Gly-Val-Arg-Pro-Ser-Tyr-Ala-Val- (DLGVRPSYAV; SEQ ID NO:2)、(3) 氨基酸序列:MSDTALIFTLAWNVKQLAFDYTPNWGRGRPSSFIDVTFTPTVLTDKAYTYRVVVSQKDLGVRPSYAVESDGSQKINFLEYNISGYGIADTNTIQVYVIDPDTGNNFIVAQWN (SEQ ID NO:3) 和(4) 氨基酸序列EAEAEFMSDTALIFTLAWNVKQLAFDYTPNWGRGRPSSFIDVTFTPTVLTDKAYTYRVVVSQKDLGVRPSYAVESDGSQKINFLEYNISGYGIADTNTIQVYVIDPDTGNNFIVAQWNYLEQKLISEEDLNSAVDHHHHHH (SEQ ID NO:4)。

[0036] 在一个实施例中,免疫调节蛋白的有效量在约0.01mg/kg到约5mg/kg范围内。在一些实施例中,有效量在约0.01mg/kg到约4mg/kg、约0.01mg/kg到约4.5mg/kg、约0.01mg/kg到约4mg/kg、约0.01mg/kg到约3.5mg/kg、约0.01mg/kg到约3mg/kg、约0.01mg/kg到约2.5mg/kg、约0.01mg/kg到约2mg/kg、约0.01mg/kg到约1.5mg/kg、约0.01mg/kg到约1mg/kg、约0.01mg/kg到约0.5mg/kg、约0.05mg/kg到约5mg/kg、约0.05mg/kg到约4.5mg/kg、约0.05mg/kg到约4.5mg/kg、约0.05mg/kg到约4mg/kg、约0.05mg/kg到约3.5mg/kg、约0.05mg/kg到约3mg/kg、约0.05mg/kg到约2.5mg/kg、约0.05mg/kg到约2mg/kg、约0.05mg/kg到约1.5mg/kg、约0.05mg/kg到约1mg/kg、约0.05mg/kg到约0.5mg/kg、约0.1mg/kg到约5mg/kg、约0.1mg/kg到约4.5mg/kg、约0.1mg/kg到约4mg/kg、约0.1mg/kg到约3.5mg/kg、约0.1mg/kg到约3mg/kg、约0.1mg/kg到约2.5mg/kg、约0.1mg/kg到约2mg/kg、约0.1mg/kg到约1.5mg/kg、约0.1mg/kg到约1mg/kg、约0.1mg/kg到约0.5mg/kg、约0.5mg/kg到约5mg/kg、约1mg/kg到约5mg/kg、约1.5mg/kg到约5mg/kg、约2mg/kg到约5mg/kg、约2.5mg/kg到约5mg/kg、约3mg/kg到约5mg/kg、约3.5mg/kg到约5mg/kg或约4mg/kg到约5mg/kg范围内。

[0037] 本发明的免疫调节蛋白或其重组物可以单独地或于医药组合物中投与到患者,在所述医药组合物中其与合适的载剂和赋形剂混合。本发明的免疫调节蛋白、其重组物或组合物可以非经肠投与,如通过静脉内注射或输注、腹膜内注射、皮下注射或肌肉内注射进行。免疫调节蛋白、其重组物或组合物可以通过适当地与载剂和赋形剂一起进行配制以形成片剂、丸剂、胶囊、液体、凝胶、糖浆、浆液、悬浮液等等来经口或经直肠投与。免疫调节蛋白、其重组物或组合物可以局部投与,如通过皮肤贴片进行。免疫调节蛋白、其重组物或组合物可以配制成局部乳膏、皮肤或粘膜贴片、适合于局部施用到皮肤或粘膜表面的液体或凝胶。免疫调节蛋白、其重组物或组合物可以通过吸入器来投与到呼吸道以用于局部或全身性癌症治疗。

[0038] 适合于根据本发明进行使用的免疫调节蛋白、其重组物或组合物的剂量可以由所属领域的技术人员基于本文中的揭示内容来确定。药剂应含有有效剂量的(取决于活性剂的投与途径和药物动力学)适用于特别的配制物投与途径(即口服、非经肠、局部或通过吸入)的合适的医药载剂和赋形剂。通过混合、溶解、粒化、糖衣药丸制造、乳化、囊封、包覆或冷冻干燥方法来将免疫调节蛋白或其重组物混合到医药组合物中。用于非经肠投与的医药组合物包含呈水溶性形式的本发明多肽的水溶液。另外,本发明多肽的悬浮液可以制备为油性注射悬浮液。合适的亲脂性溶剂或媒剂包含脂肪油,如芝麻油;或合成脂肪酸酯,如油酸乙酯或三酸甘油酯;或脂质体。水性注射悬浮液可以含有增加悬浮液粘度的物质,如羧甲基纤维素钠、山梨糖醇或葡聚糖。悬浮液可以任选地含有稳定剂或增加复合物或组合的溶解度以容许溶液更加浓缩的试剂。

[0039] 在另一个实施例中,免疫调节蛋白或其重组物可以与神经突生长剂组合以用于促进神经突生长或治疗和/或预防神经病症方面的组合疗法。免疫调节蛋白或其重组体也可以与神经突生长剂组合作为医药组合物。也就是说,本发明提供包括免疫调节蛋白或其重组体和额外的神经突生长剂的医药组合物,并且所述组合物可以促进神经突生长或治疗及/或预防神经病症。在一个实施例中,神经突生长剂为烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)类似物;含有5-酰基-2-氨基-1,3-硒唑的神经营养因子类似物;含有依布硒啉(ebselen)的神经营养因子;含有至少一种选自由咖啡酸和其衍生物组成的群组的化合物的神经突生长剂;含有至少一种选自由迷迭香和含有鼠尾草酸的鼠尾草组成的群组的植物提取物的神经突生长剂;含有溶血磷脂酰乙醇胺的细胞死亡遏制物质;含有细胞器碱化剂的神经突生长组合物,如莫能菌素(monensin)或刀豆素A;含有聚烷氧基类黄酮的神经突生长剂,如川陈皮素或桔皮素;含有葡萄糖胺聚糖衍生物的神经突生长活化剂;含有乳胞素衍生物的神经突生长剂;含有小分子杂环酮或硫酯化合物的神经突生长剂;含有神经节苷脂衍生物以及N-酰基-N-脱脂-神经节苷脂、N'-酰基-N'-脱脂-神经节苷脂和N,N'-二-或聚-酰基-N,N'-二脱脂-神经节苷脂的神经突生长剂;包括含有G1cUA(2S)-GalNAc(4S)(B单元)双糖的硫酸软骨素/硫酸皮肤素杂合链的神经突生长剂;含有具有等分G1cNAc的糖链、具有于其结构中的前述糖链的复合碳水化合物、前述糖链的衍生物等的神经突生长诱导剂;含有作为活性成分的低分子量合成化合物的神经突生长诱导剂;Tctex-1相关多肽;TAJ多肽;或神经细胞粘着分子。

[0040] 在不进一步详细描述的情况下,相信所属领域的技术人员可以基于前述描述最大程度地利用本发明。因此,以下实例解释为仅为说明性的并且不以任何方式限制本发明的

范围。

[0041] 实例

[0042] 材料和方法

[0043] 粒子物质和GMI

[0044] 将粒子物质 (PM) 添加到0.01% Tween 80中并且进行超声波处理 (60Hz) 以使得PM的粒度小于 $2.5\mu\text{m}$  ( $\text{PM}_{2.5}$ )。

[0045] 包括氨基酸序列SEQ ID NO:4 (“GMI”) 的小孢灵芝的免疫调节蛋白用于实验中。

[0046] 实验动物

[0047] 将用于实例中的史-道二氏妊娠大鼠 (Spragus-Dawley pregnant rat) 容纳于温度控制在 $18-25^{\circ}\text{C}$ 下并且湿度为30%到70%的实验室动物设施中。对于 $\text{PM}_{2.5}$ 投与, 在妊娠之后第3、6、9、12、15和18天通过气管内滴注将在 $0\text{mg}/\text{m}^3$ 、 $2.5\text{mg}/\text{m}^3$ 和 $25\text{mg}/\text{m}^3$ 浓度下的 $\text{PM}_{2.5}$ 投与到大鼠。对于GMI投与, 在实验中将在 $0\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $0.33\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 $3.3\mu\text{g}/\text{kg}$ 浓度下的GMI经口投与到大鼠以用于预防来自 $\text{PM}_{2.5}$ 的损伤。

[0048] 莫里斯水迷宫 (Morris Water Maze, MWM) 测试

[0049] 莫里斯水迷宫 (MWM) 为依赖于远端提示以从开放游泳领域周边附近的开始位置进行导航来定位水下逃脱平台的啮齿动物空间学习测试。如在修改情况下的D'霍格, R (D'Hooge, R); 德迪恩, PP (De Deyn, PP) (2001年8月), “莫里斯水迷宫在学习和记忆研究中的应用 (Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory)”. 脑研究 (Brain Research). 脑研究评论 (Brain Research Reviews) 36(1):60-90中所描述执行水迷宫方法。

[0050] 水迷宫箱 ( $160\text{cm} \times 70\text{cm} \times 40\text{cm}$ ) 由含有患者可以游泳到其上的平台的小池组成。平台位置取决于呈现于池壁上的四个大的抽象视觉提示 (每个分开 $90^{\circ}$ ) 中的一个。随后, 在视觉提示中的每个下使动物落到水迷宫中, 一天一次, 持续5天, 以便基于每个提示学习平台位置。触发刺激的任务的时间间隔为开始时间间隔, 或在使动物落在水迷宫中时; 和强化时间间隔, 或在平台上发现动物并且其在平台上休息时。

[0051] 工作记忆测试

[0052] 用MWM执行测试持续六天。水迷宫箱为MWM测试中所提及的水迷宫箱。平台位置每日变化。一天一次训练大鼠以探索平台一分钟。在发现平台之后, 使大鼠停留在平台上20秒。在测试中, 大鼠探索平台60秒并且记录大鼠探索平台所耗费的总时间。

[0053] 新物体和位置识别测试 (NOR和NOL)

[0054] 新物体识别记忆测试评估在延迟之后识别环境中的新物体的能力。训练装置为透明普列克斯玻璃箱 (Plexiglas box) ( $100\text{cm} \times 100\text{cm} \times 50\text{cm}$ )。将大鼠在无应激的情况下放置在箱中10分钟以用于驯化。将两个具有相同形状和颜色的物体放置在箱中。在连续两天内, 将大鼠放置在箱中并且使其探索两个相同物体5分钟, 并且记录探索两个物体所耗费的总时间和频率。在第三天, 将在箱右侧的物体变成具有与在箱左侧的物体的形状和颜色不同的形状和颜色的物体, 并且接着将大鼠放置在箱中5分钟。记录探索两个物体所耗费的总时间和频率。

[0055] 在第四天和第五天, 将不同于上文所提及的那些物体的两个相同物体放置在箱中。接着将大鼠放置在箱中5分钟, 并且记录探索两个物体所耗费的总时间和频率。在第六



天,将在箱右侧的物体变成具有与在箱左侧的物体的形状和颜色不同的形状和颜色的物体,并且接着将大鼠放置在箱中5分钟。记录探索两个物体所耗费的总时间和频率。

[0056] 通过篝火程序(Bonfire Program)进行的神经元形态分析

[0057] 篝火程序为分析树突和轴突形态的半自动化方法,其是基于可用开源形态学分析工具而建立的。篝火程序需要使用两个开源分析工具,即NeuronJ插件到ImageJ和NeuronStudio。在ImageJ中跟踪神经元,并且NeuronStudio用于定义神经突之间的连通性。

[0058] 高尔基体染色

[0059] 在暗处在室温下将脑组织浸入呈1:1比率的FD快速高尔基体染色试剂盒的A溶液和B溶液的混合物中。在2到3周之后,在4℃下将所得脑组织转移到C溶液中持续48小时。将切片(80μm)安放到涂布有含0.3%明胶的dH<sub>2</sub>O的载玻片上。在短暂干燥之后,将载玻片浸渍于40%蔗糖中3次并且在暗处风干72小时。将载玻片浸入D溶液和E溶液的混合物中,随后转移到显影液中。接着,将载玻片通过50%、75%、95%和100%梯度乙醇脱水,浸入二甲苯中,并且接着使用DPX封固剂(mounting medium)盖上盖玻片。

[0060] 微RNA图谱分析

[0061] 分离获自18天妊娠雌性大鼠的胎儿大鼠的皮层与海马体,并分别放置在TRIzol中。使用大鼠神经发育和疾病miRNA PCR阵列测量脑部的神经发育相关疾病和神经疾病。提取组织的RNA并执行反转录反应。通过QPCR获得miRNA值。

[0062] 实例1 GMI改善由PM<sub>2.5</sub>所导致的脑部发育迟缓

[0063] 通过MWM测试测定接受PM<sub>2.5</sub>或GMI的妊娠大鼠的子代的长期记忆。如图1(a)中所示,接受大剂量PM<sub>2.5</sub>的妊娠大鼠的子代耗费较长时间去探索平台,而接受GMI的那些妊娠大鼠的子代花费较少时间。图1(b)中的热点显示接受PM<sub>2.5</sub>的妊娠大鼠的子代在箱子周围游泳,然而接受GMI的妊娠大鼠的子代具有较高的在具有平台的象限处游泳的频率。结果显示GMI可以增强子代的长期记忆。

[0064] 通过MWM测试测定接受PM<sub>2.5</sub>或GMI的妊娠大鼠的子代的工作记忆。图2显示接受GMI的妊娠大鼠的子代比接受大剂量PM<sub>2.5</sub>的那些妊娠大鼠的子代耗费更少的时间去找到平台。结果显示GMI可以增强子代的工作记忆。

[0065] 通过NOR和NOL测定接受PM<sub>2.5</sub>或GMI的妊娠大鼠的子代的记忆容量。如图3中所示,接受GMI的妊娠大鼠的子代比接受PM<sub>2.5</sub>的妊娠大鼠的子代耗费更多的时间去触摸新物体。结果显示GMI可以增强子代的长期记忆。图4显示接受GMI的妊娠大鼠的子代比接受PM<sub>2.5</sub>的妊娠大鼠的子代耗费更多的时间触摸位置改变的物体。结果显示GMI可以增强子代的空间认知。

[0066] 实例2 神经元形态分析

[0067] 篝火程序用于分析海马体神经元的分支行为和树突延伸长度。如图5中所示,相比仅接受PM<sub>2.5</sub>的那些妊娠大鼠的子代的神经突,接受PM<sub>2.5</sub>和GMI的妊娠大鼠的子代的神经突具有更大数量的分支尖端(图5(a)对于海马体CA1区域和图5(c)对于海马体CA3区域)和其长度(图5(b)对于海马体CA1区域和图5(d)对于海马体CA3区域)。结果显示GMI可以有效地保护记忆形成并且减少PM<sub>2.5</sub>对神经突的损伤。

[0068] 实例3 GMI降低罹患神经疾病的风险

[0069] 相较于对照组,根据微RNA图谱分析调整以下获自接受PM<sub>2.5</sub>的18天妊娠雌性大鼠

的胎儿大鼠的皮层和海马体的基因。经调整基因的潜在疾病包含精神分裂症、朊病毒病、自闭症和阿尔茨海默病。对于获自接受PM<sub>2.5</sub>和GMI的18天妊娠雌性大鼠的胎儿大鼠,回收经调整基因,因此罹患神经疾病的风险降低。

海马体基因				
[0070]	rno-miR-433-3p↓		rno-miR-433-3p↓	阿尔茨海默病
			rno-miR-382-5p↓	
	rno-miR-33-5p↓	rno-miR-409a-3p↓		精神分裂症
	rno-miR-431↓		rno-miR-539-5p↓	自闭症
	rno-miR-212-3p↓			

皮层基因					
[0071]	rno-miR-9a-3p↓	rno-miR-9a-3p↓	rno-miR-9a-3p↓	rno-miR-9a-3p↓	精神分裂症
	rno-miR-489-3p↓	rno-miR-489-3p↓	rno-miR-489-3p↓		
	rno-miR-33-5p↑	rno-miR-30d-5p↓	rno-miR-33-5p↑		
		rno-miR-346↓	rno-miR-150-5p↓		朊病毒病
	rno-miR-339-5p↓	rno-miR-339-5p↓	rno-miR-339-5p↓		
		rno-miR-191a-5p↓	rno-miR-139-5p↓		自闭症
			rno-miR-431↓		
			rno-miR-598-3p↓		阿尔茨海默病
	rno-miR-433-3p↓	rno-miR-433-3p↓	rno-miR-433-3p↓		
	rno-miR-151-3p↓	rno-miR-151-3p↓	rno-miR-151-3p↓		
	rno-miR-107-3p↓	rno-miR-107-3p↓	rno-miR-107-3p↓	rno-miR-132-3p↓	
	rno-miR-181a-5p↓	rno-miR-181a-5p↓	rno-miR-181a-5p↓	rno-let-7e-5p↓	
	rno-miR-7b-5p↓	rno-miR-139-5p↓	rno-let-7b-5p↓	rno-miR-30d-5p↓	
	rno-miR-346↓		rno-miR-346↓	rno-miR-298-5p↓	
	rno-miR-485-5p↓		rno-miR-485-5p↓	rno-miR-24-3p↓	
rno-miR-488-3p↑		rno-miR-382-5p↓	rno-miR-28-5p↓		

[0001] 序列表  
 [0002] <110> 磨法生物科技股份有限公司  
 [0003] 招名威  
 [0004] <120> 免疫调节蛋白在减少由细颗粒物物质所导致的损伤中的新用途  
 [0005] <130> M52295/US7278  
 [0006] <140> US 15/944,126  
 [0007] <141> 2018-04-03  
 [0008] <160> 4  
 [0009] <170> PatentIn version 3.5  
 [0010] <210> 1  
 [0011] <211> 6  
 [0012] <212> PRT  
 [0013] <213> 小孢灵芝  
 [0014] <400> 1  
 [0015] Leu Ala Trp Asn Val Lys  
 [0016] 1 5  
 [0017] <210> 2  
 [0018] <211> 10  
 [0019] <212> PRT  
 [0020] <213> 小孢灵芝  
 [0021] <400> 2  
 [0022] Asp Leu Gly Val Arg Pro Ser Tyr Ala Val  
 [0023] 1 5 10  
 [0024] <210> 3  
 [0025] <211> 111  
 [0026] <212> PRT  
 [0027] <213> 小孢灵芝  
 [0028] <400> 3  
 [0029] Met Ser Asp Thr Ala Leu Ile Phe Thr Leu Ala Trp Asn Val Lys Gln  
 [0030] 1 5 10 15  
 [0031] Leu Ala Phe Asp Tyr Thr Pro Asn Trp Gly Arg Gly Arg Pro Ser Ser  
 [0032] 20 25 30  
 [0033] Phe Ile Asp Thr Val Thr Phe Pro Thr Val Leu Thr Asp Lys Ala Tyr  
 [0034] 35 40 45  
 [0035] Thr Tyr Arg Val Val Val Ser Gly Lys Asp Leu Gly Val Arg Pro Ser  
 [0036] 50 55 60  
 [0037] Tyr Ala Val Glu Ser Asp Gly Ser Gln Lys Ile Asn Phe Leu Glu Tyr  
 [0038] 65 70 75 80

[0039]	Asn Ser Gly Tyr Gly Ile Ala Asp Thr Asn Thr Ile Gln Val Tyr Val
[0040]	85 90 95
[0041]	Ile Asp Pro Asp Thr Gly Asn Asn Phe Ile Val Ala Gln Trp Asn
[0042]	100 105 110
[0043]	<210> 4
[0044]	<211> 140
[0045]	<212> PRT
[0046]	<213> 小孢灵芝
[0047]	<400> 4
[0048]	Glu Ala Glu Ala Glu Phe Met Ser Asp Thr Ala Leu Ile Phe Thr Leu
[0049]	1 5 10 15
[0050]	Ala Trp Asn Val Lys Gln Leu Ala Phe Asp Tyr Thr Pro Asn Trp Gly
[0051]	20 25 30
[0052]	Arg Gly Arg Pro Ser Ser Phe Ile Asp Thr Val Thr Phe Pro Thr Val
[0053]	35 40 45
[0054]	Leu Thr Asp Lys Ala Tyr Thr Tyr Arg Val Val Val Ser Gly Lys Asp
[0055]	50 55 60
[0056]	Leu Gly Val Arg Pro Ser Tyr Ala Val Glu Ser Asp Gly Ser Gln Lys
[0057]	65 70 75 80
[0058]	Ile Asn Phe Leu Glu Tyr Asn Ser Gly Tyr Gly Ile Ala Asp Thr Asn
[0059]	85 90 95
[0060]	Thr Ile Gln Val Tyr Val Ile Asp Pro Asp Thr Gly Asn Asn Phe Ile
[0061]	100 105 110
[0062]	Val Ala Gln Trp Asn Tyr Leu Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp
[0063]	115 120 125
[0064]	Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His
[0065]	130 135 140

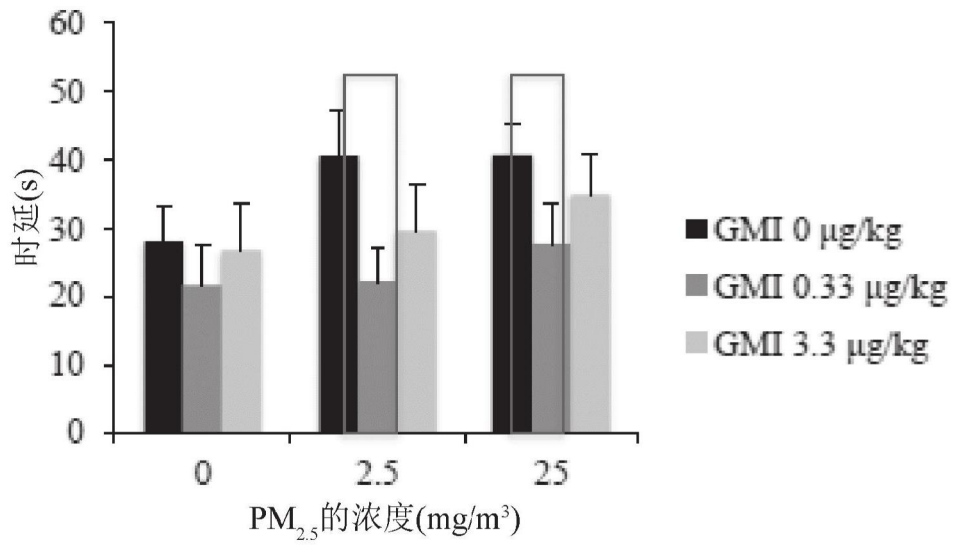


图1(a)

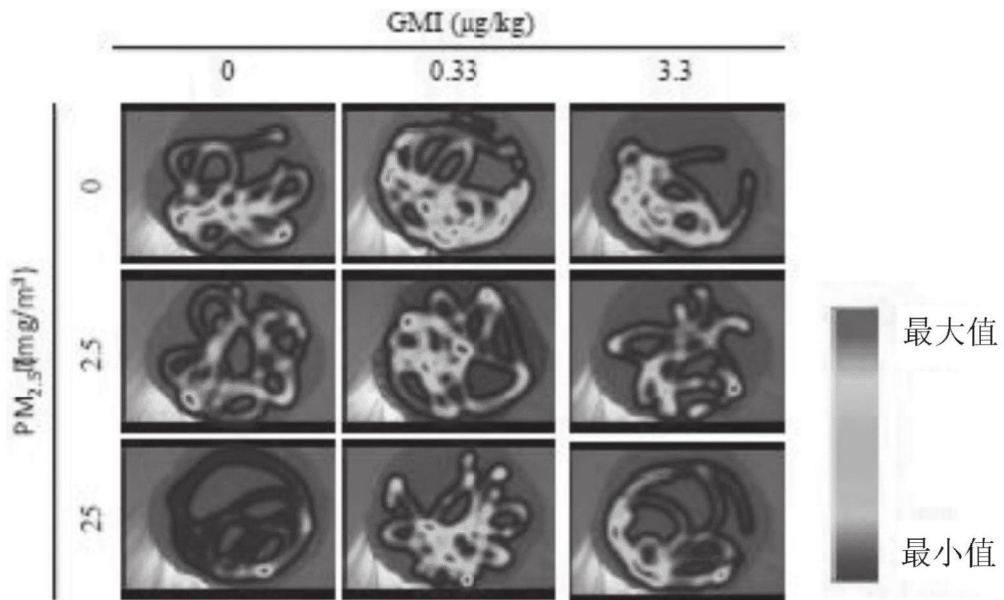


图1(b)

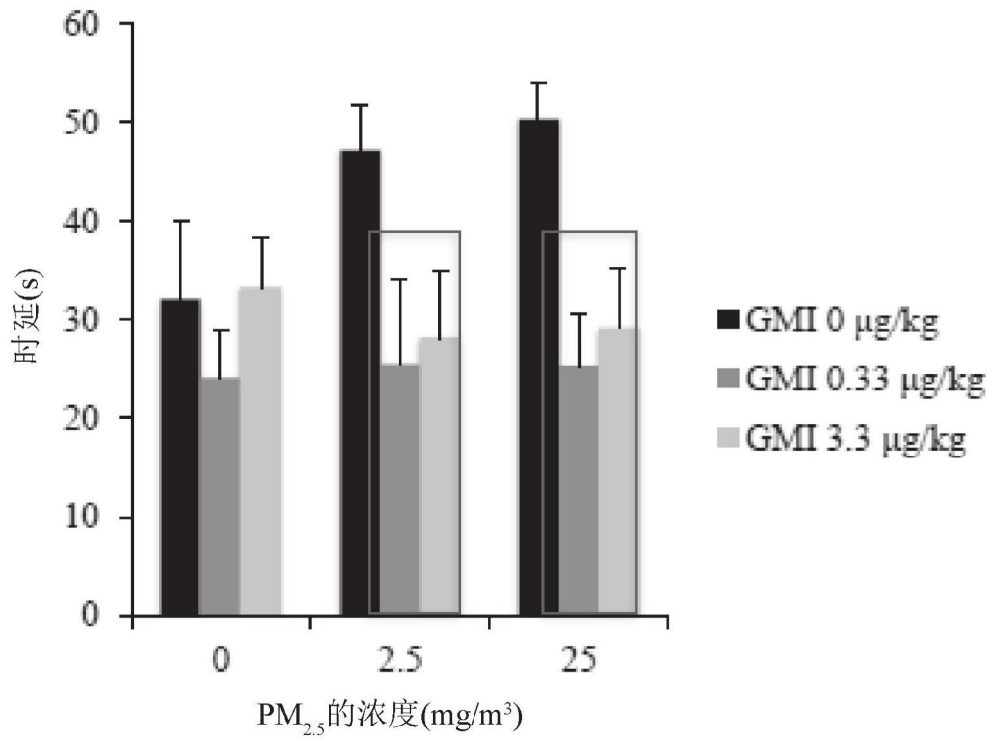


图2

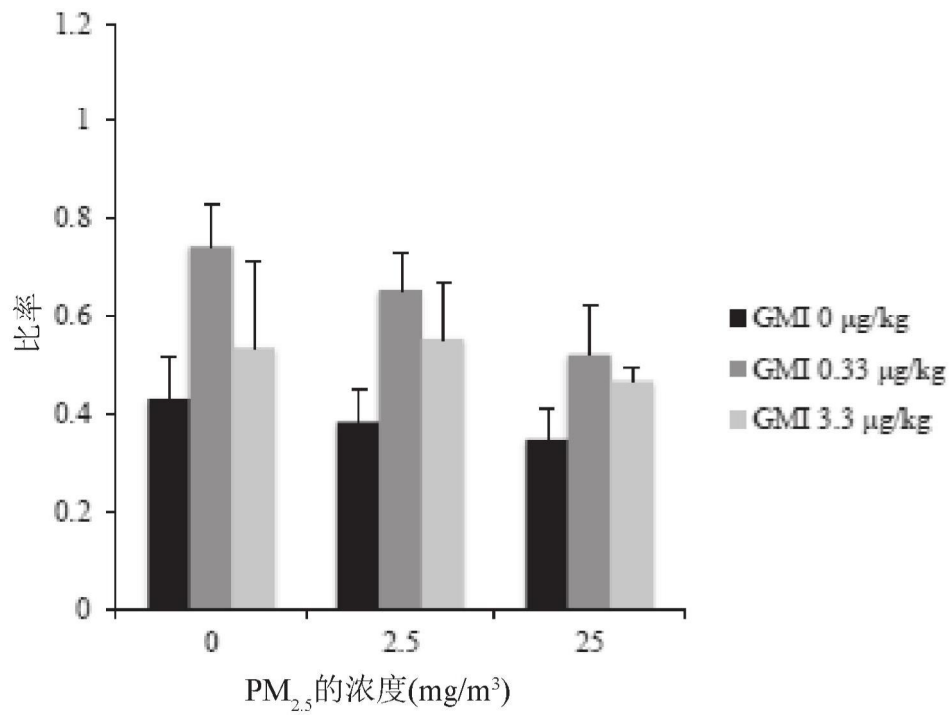


图3

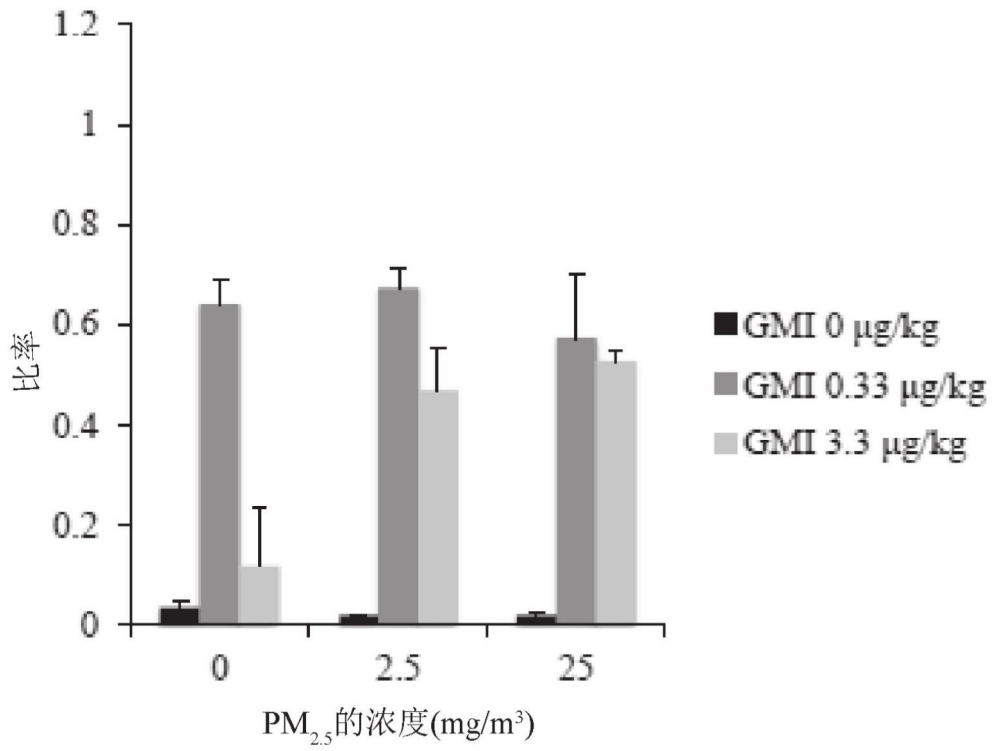


图4

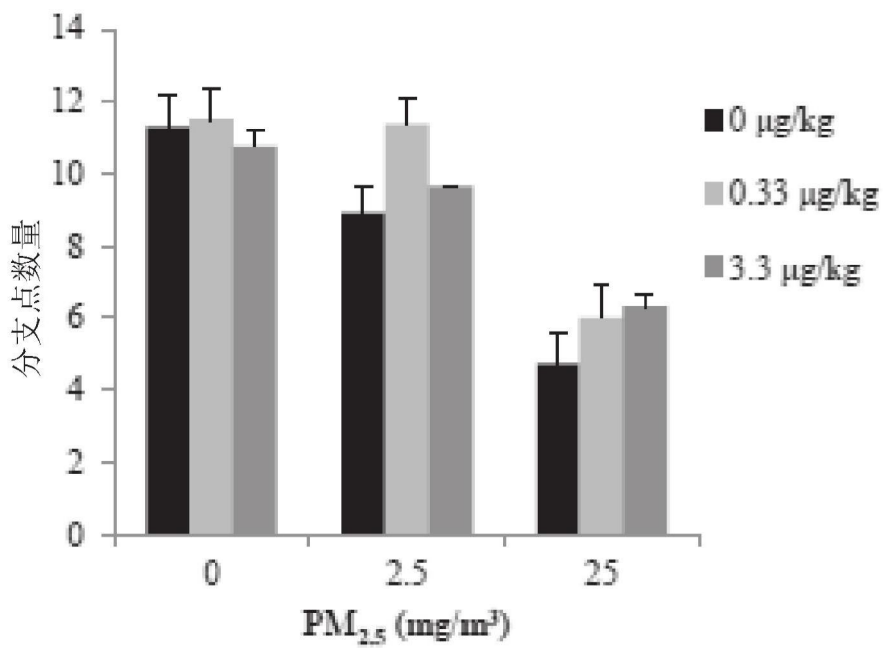


图5(a)

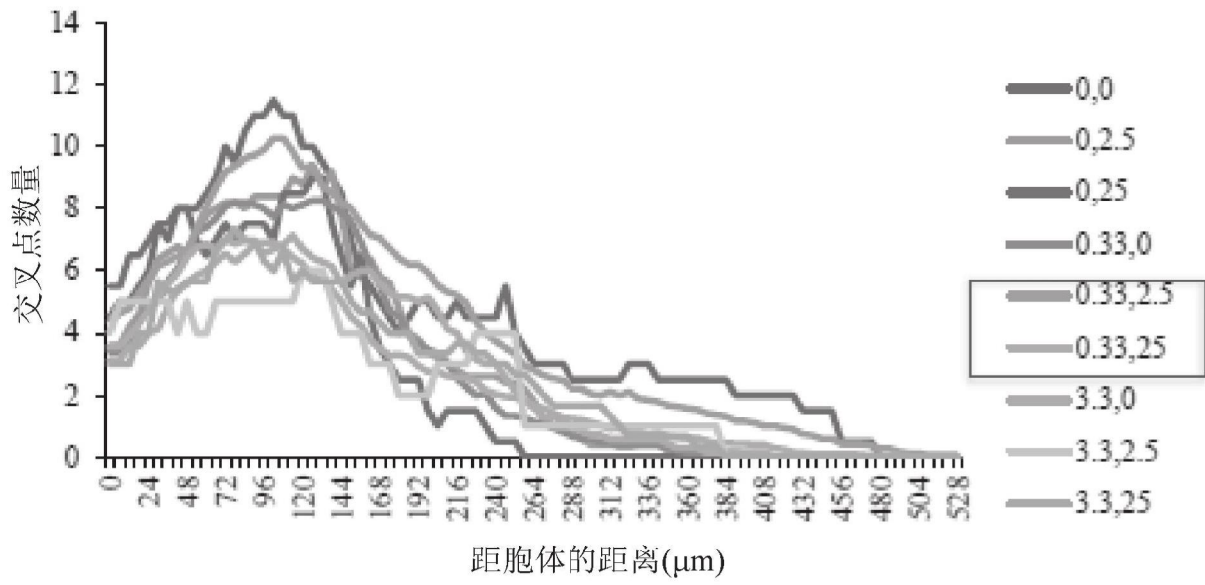


图5(b)

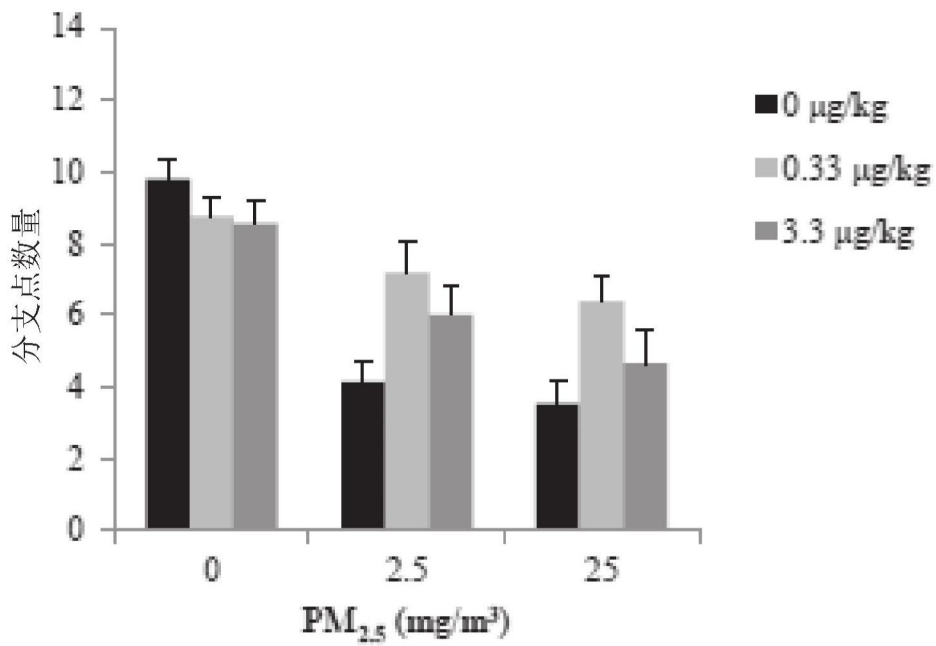


图5(c)



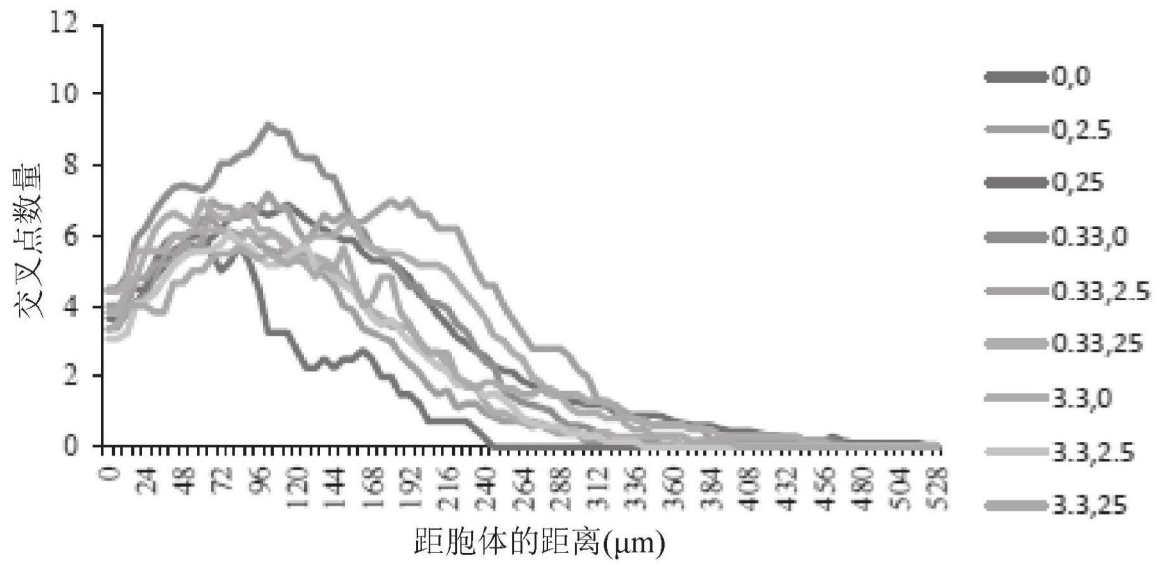


图5 (d)