

【11】證書號數：I927137

【45】公告日：中華民國 115 (2026) 年 06 月 01 日

【51】Int. Cl. : A61K38/16 (2006.01) A61K36/074 (2006.01)
 A61P31/12 (2006.01) A61P31/14 (2006.01)
 C07K14/37 (2006.01)

發明

全 7 頁

【54】名稱：預防冠狀病毒感染之免疫調節蛋白

【21】申請案號：111130282 【22】申請日：中華民國 111 (2022) 年 08 月 11 日

【11】公開編號：202327639 【43】公開日期：中華民國 112 (2023) 年 07 月 16 日

【30】優先權：2022/01/12 美國 63/266,712

【72】發明人：林東毅 (TW) LIN, TUNG-YI；蔡明翰 (TW) TSAI, MING-HAN

【71】申請人：磨法生物科技股份有限公司 MYCOMAGIC BIOTECHNOLOGY CO., LTD

新北市深坑區北深路三段 270 巷 12 號 8 樓之 1

【74】代理人：陳長文

【56】參考文獻：

TW 202137991A1

期刊 Nakarin Suwannarach et al. "Natural Bioactive Compounds from Fungi as Potential Candidates for Protease Inhibitors and Immunomodulators to Apply for Coronaviruses" *Molecules*, vol. 25, no. 8, MDPI, 14 April 2020, pages 1-21

審查人員：劉芷綺

【57】申請專利範圍

1. 一種靈芝免疫調節蛋白之用途，其係用於製備誘導血管緊張素轉化酶 2 (ACE2) 之胞吞作用及降解之醫藥品，其中該靈芝免疫調節蛋白包含 SEQ ID NO: 3 之胺基酸序列。
2. 如請求項 1 之用途，其中該靈芝免疫調節蛋白係衍生自小孢子靈芝。
3. 如請求項 1 之用途，其中該靈芝免疫調節蛋白包含 SEQ ID NO: 4 之胺基酸序列。
4. 如請求項 1 之用途，其中該醫藥品預防、抑制、減少及/或消除個體之 CoV 感染及/或 CoV 感染可能性。
5. 如請求項 4 之用途，其中該 CoV 為 α -CoV、 β -CoV、 γ -CoV 及 δ -CoV2。
6. 如請求項 1 之用途，其中該 ACE2 之降解係經由活化包括蛋白酶體及溶酶體之蛋白降解系統誘導。
7. 如請求項 4 之用途，其中該個體接種疫苗。
8. 如請求項 7 之用途，其中該個體接種 COVID-19 冠狀病毒 mRNA 疫苗、COVID-19 冠狀病毒棘蛋白疫苗，或 COVID-19 冠狀病毒病毒載體疫苗。
9. 如請求項 4 之用途，其中該個體正在用或已經用針對 CoV 之治療劑治療。
10. 如請求項 1 之用途，其中該醫藥品係在一或多種其他針對 CoV 之治療劑之投與之前或之後或同時投與。
11. 如請求項 1 之用途，其中該醫藥品係與一或多種其他針對 CoV 之治療劑同時、依序或分開投與。
12. 如請求項 1 之用途，其中該醫藥品係經口、非經腸、局部或藉由吸入投與。

(2)

13. 如請求項 1 之用途，其中該醫藥品係藉由吸入器投與至呼吸道。

圖式簡單說明

圖 1 A 至 D. GMI 不抑制 HEK293T / ACE2 細胞之細胞生存力，但抑制 SARS - CoV - 2 假病毒感染。 (A)用各種濃度之 GMI (0-1.2 μ M)處理 HEK293T/ACE2 細胞 24-72 小時。使用 MTT 分析法評估 HEK293T/ACE2 細胞之生存力。(B)用 GMI 及 SARS-CoV-2 假病毒處理 HEK293T/ACE2 細胞之方案。(C-D)用各種濃度之 GMI (0-0.6 μ M)共同處理 HEK293T/ACE2 細胞，且用 SARS-CoV-2 假病毒感染 48 小時。藉由螢光顯微術 (C)觀測到感染細胞為 GFP 陽性的，且藉由流式細胞術 (D)量化各樣品中 GFP 陽性細胞之百分比。各 GMI 處理組由對照 (未處理)組 (D)歸一化。資料代表三個以上之獨立實驗，且呈現為平均 SD；誤差槓指示 SD。注意到顯著差異 (***) $P < 0.001$ 。

圖 2 A 至 D. GMI 與 SARS - CoV - 2 - S 之 S2 域相互作用以干擾 ACE2 與 SARS - CoV - 2 - S 之間的相互作用。 (A)活體外經 GMI (0.3 μ M)處理之 SARS-CoV-2 假病毒感染實驗的構想設計。(B-C)用 GMI 預處理 SARS-CoV-2 假病毒 10 分鐘，且藉由濃縮造粒以自病毒上清液中移除多餘的 GMI。因此，將病毒再懸浮於新鮮培養基中，隨後添加至 HEK293T/ACE2 細胞中持續另外 48 小時。藉由螢光顯微術 (B)觀測到感染細胞為 GFP 陽性的，且藉由流式細胞術 (C)量化各樣品中 GFP 陽性細胞之百分比。資料代表三個獨立實驗且呈現為平均 SD；誤差槓指示 SD。注意到顯著差異 (EXP 比 CTL, * $P < 0.05$)。(D)上面小圖：SARS-CoV-2-S 之不同構築體。下面小圖：用 SARS-CoV-2-S 之不同的突變構築體轉形且與 GMI (0.3 μ M)孵育 1 小時的 HEK293T/ACE2 細胞之代表性免疫墨點。

圖 3 A 至 F. GMI 在 HEK293T / ACE2 細胞中誘導 ACE2 之胞吞作用及降解。 (A)用各種濃度之 GMI (0-0.6 μ M)處理 HEK293T/ACE2 細胞 3、24 及 48 小時。(B)顯示在 293T-ACE2 細胞中，在存在或不存在 GMI (0.3 μ M)之情形下，在環己醯亞胺(CHX；100 μ g/ml)孵育 0-24 小時後，ACE2 下調取決於時間進程。ACE2 之條帶強度的量化代表藉由 ImageJ 之三個非依賴性測定。各樣品中之相對 ACE2 含量係藉由密度測定法隨時間變化來進行量化。(C-D)用 DMSO (媒劑對照)或 MG132 (10 μ M；C)/巴弗洛黴素(Bafilomycin) A1 (BafA1；20 μ M；D)預處理 HEK293T/ACE2 細胞 30 分鐘，隨後與 GMI (0.6 μ M)一起孵育 3 及 24 小時。(E-F)用 DMSO (媒劑對照)或 dynasore (200 μ M；E)/M β CD (20 mM；F)預處理 HEK293T/ACE2 細胞 30 分鐘，隨後與 GMI (0.6 μ M)一起孵育 3 及 24 小時。藉由西方墨點法測定 ACE2 蛋白之表現。將微管蛋白用作內部對照。資料呈現為平均值 \pm SD；誤差槓指示 SD。顯示出顯著差異(*與對照組相比 $P < 0.05$)。

圖 4 A 至 E. 不連續的 GMI 暴露保留對 SARS - CoV - 2 假病毒感染之抑制作用。 (A)用各種濃度之 GMI (0-1.2 μ M)處理 HEK293T/ACE2 細胞 48 小時，隨後歷時 24-48 小時移除 GMI 以分析 HEK293T/ACE2 細胞的細胞生存力。使用 MTT 分析評估細胞生存力。(B)用 GMI (0.6 μ M)處理 HEK293T/ACE2 細胞 48 小時。隨後自細胞中移除 GMI 以在另外 24 小時及 48 小時期間分析 ACE2 含量。藉由西方墨點法測定 ACE2 蛋白之表現。將微管蛋白用作內部對照。藉由 ImageJ 量化 ACE2 條帶之強度。資料呈現為平均值 \pm SD；誤差槓指示 SD。顯示出顯著差異 (***)與對照(CTL)組相比 $P < 0.001$ ；#與 GMI 處理 48 小時相比 $P < 0.05$)。(C)顯示用於抑制 SARS-CoV-2 假病毒感染之連續及不連續 GMI 處理的構想設計。用 GMI (0.3 μ M)預處理 HEK293T/ACE2 細胞 48 小時，隨後在連續 GMI 處理或不處理下用 SARS-CoV-2 假病毒感染細胞 48 小時。藉由螢光顯微術 (E)觀測到感染細胞為 GFP 陽性的，且藉由流式細胞術 (D)量化各樣品中 GFP 陽性細胞之百分比。資料呈現為平均值 \pm SD；誤差槓指示 SD。顯示出顯著差異 (***)與對照(CTL)組相比 $P < 0.001$ ；#與各不連續 GMI 處理組相比 $P < 0.05$)。

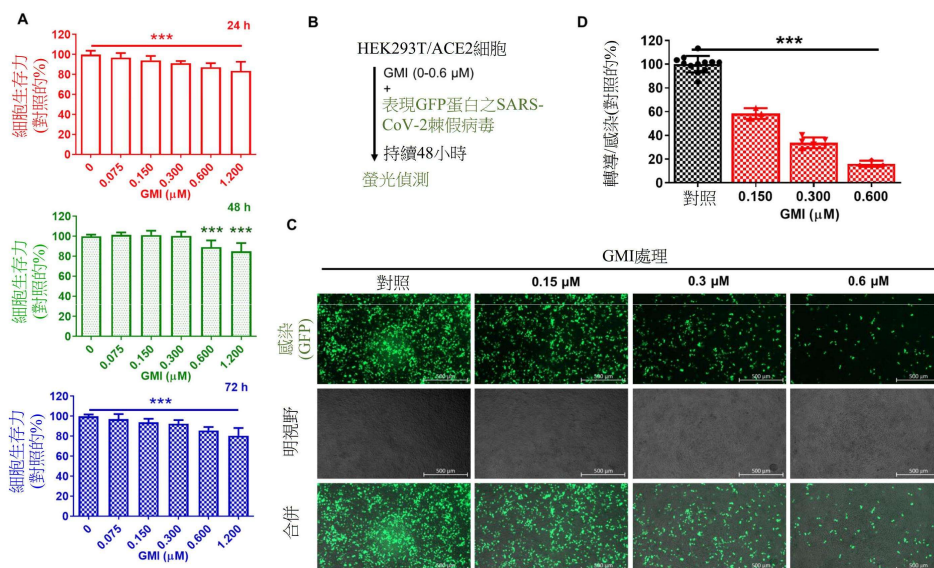
(3)

圖 5 A 至 F. GMI 誘導肺 WI38-2RA 細胞中之 ACE2 的胞吞作用及降解。 (A) 用各種濃度之 GMI (0-1.2 μM) 處理 WI38-2RA 細胞 48 及 72 小時。使用 MTT 分析評估 WI38-2RA 細胞之生存力。各 GMI 處理組由對照組歸一化。 (B) 用 GMI (0-0.6 μM) 處理 WI38-2RA 細胞 3 及 24 小時。 (C-F) 用 DMSO (媒劑對照) 或 MG132 (10 μM ; C) / 巴弗洛黴素 A1 (BafA1 ; 20 μM ; D) / dynasore (200 μM ; E) / M β CD (20 mM ; F) 預處理 WI38-2RA 細胞 30 分鐘，隨後與 GMI (0.6 μM) 一起孵育 24 小時。藉由西方墨點法測定 ACE2 蛋白之表現。將微管蛋白用作內部對照。資料代表三個以上之獨立實驗，且呈現為平均 SD；誤差槓指示 SD。注意到顯著差異 (* $P < 0.001$)。

圖 6. 用 SARS-CoV-2 假病毒感染 HEK293T / ACE2 細胞。 用 SARS-CoV-2 假病毒感染 HEK293T/ACE2 或 HEK293T 細胞 48 小時。藉由螢光顯微術觀測到感染細胞為 GFP 陽性。

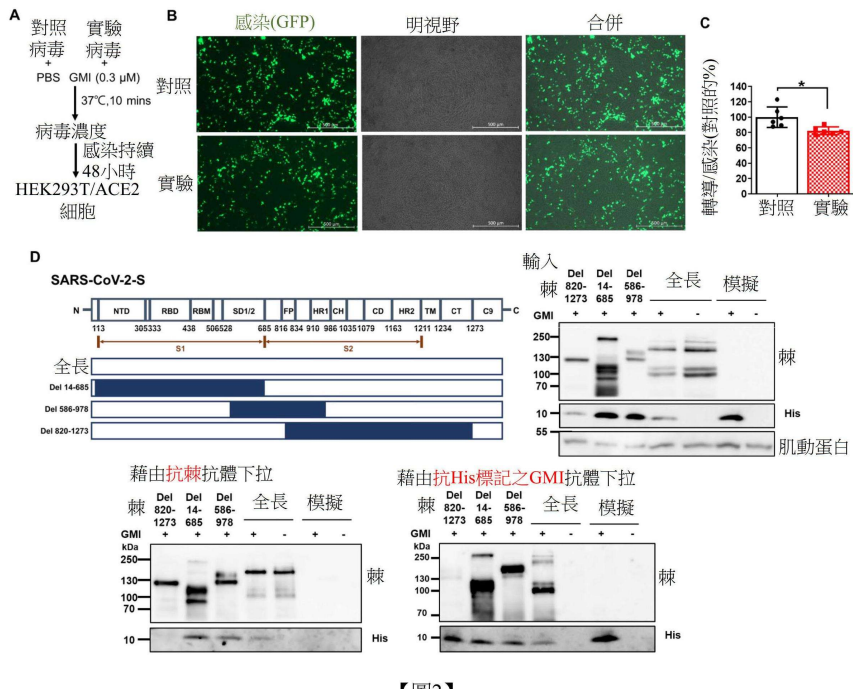
圖 7 A 及 B. GMI 輕微阻斷 SARS-CoV-2-S 與 ACE2 之相互作用。 (A) 將 ACE2 蛋白與 GMI (0、0.6 及 1.2 μM) 一起預孵育 1 小時。孵育後，將溶液添加至棘蛋白塗層孔中持續 2.5 小時，以偵測 ACE2 與棘之間的相互作用。 (B) 將 GMI (0、0.6 及 1.2 μM) 添加至棘蛋白塗層孔中持續 1 小時。孵育後，將 ACE2 蛋白添加至孔中持續 2.5 小時以偵測 ACE2 與棘之間的相互作用。資料呈現為平均值 \pm SD；誤差槓指示 SD。顯示顯著差異 (* 與未處理(對照)組相比 $P < 0.05$)。

圖 8. GMI 不抑制 VSV-G 感染。 用 0.3 μM 之 PBS (CTL) 或 GMI 共同處理 HEK293T 細胞，且用攜帶由 CMV 啟動子驅動之 GFP 基因的 VSV-G 假病毒感染 48 小時。使用螢光顯微術觀測到感染細胞為 GFP 陽性。右側小圖：條形圖顯示藉由流式細胞術量化的各樣品中之 GFP 陽性細胞的百分比。

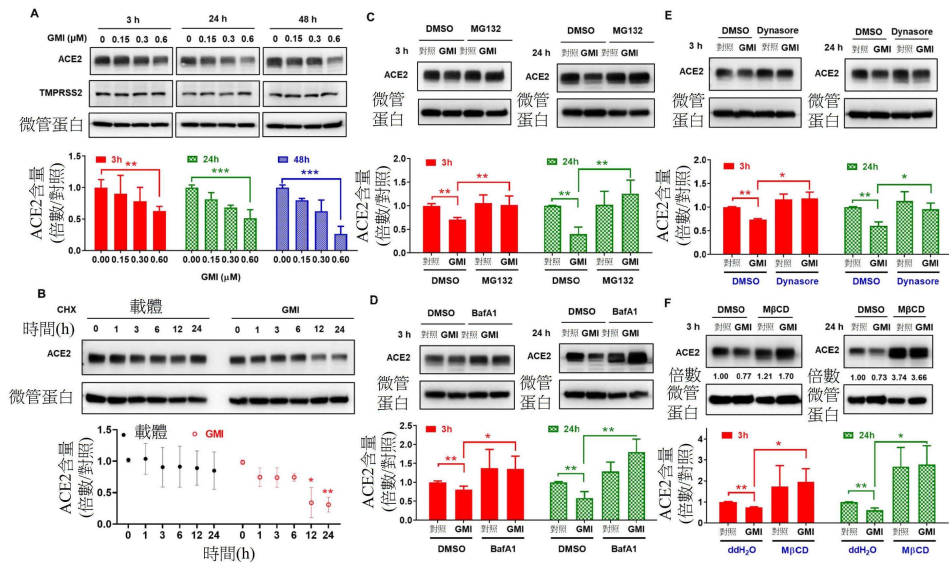


【圖1】

(4)

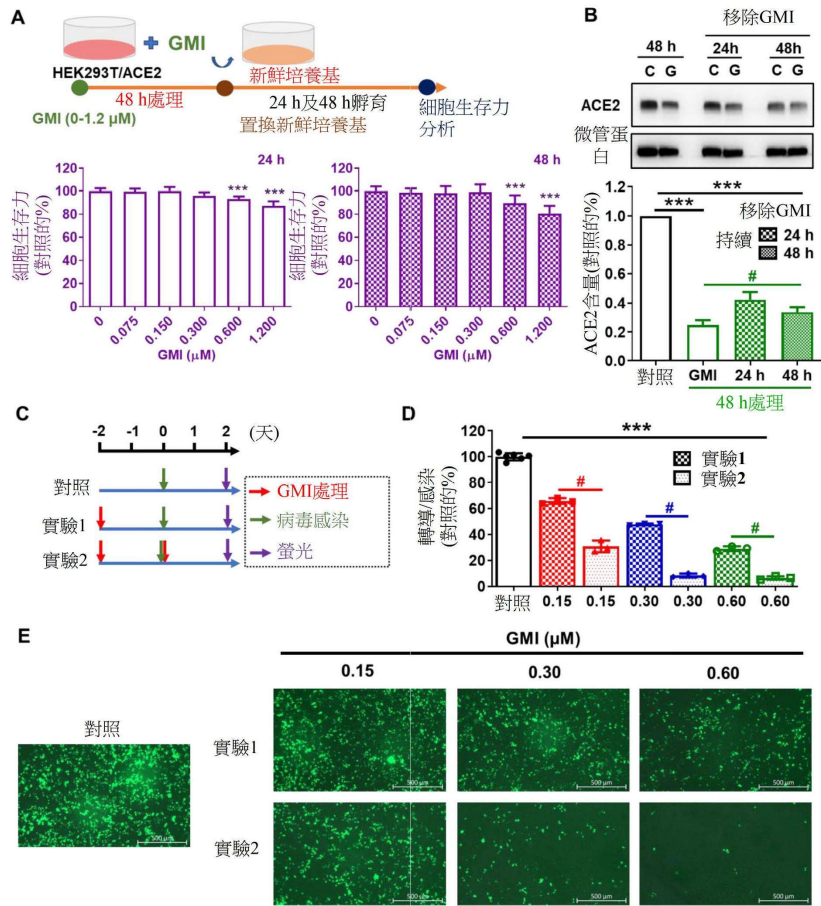


【圖2】

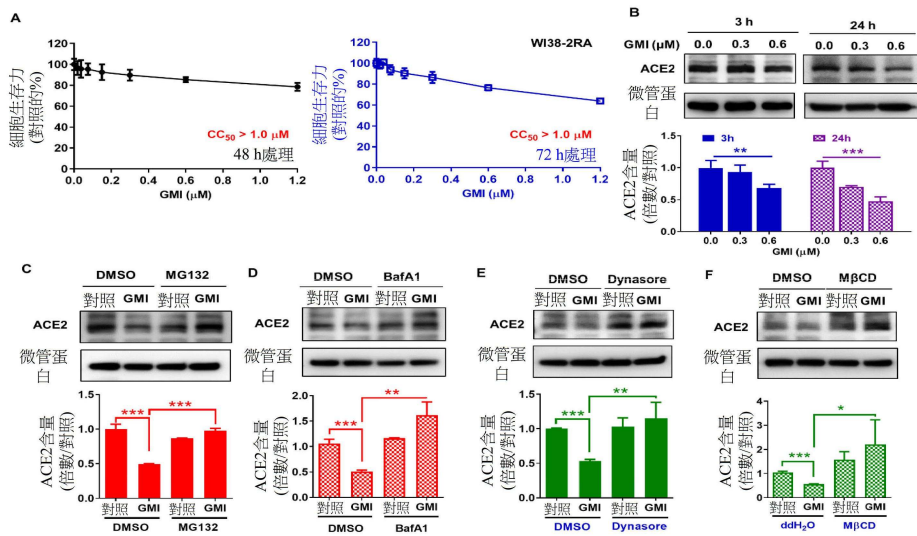


【圖3】

(5)



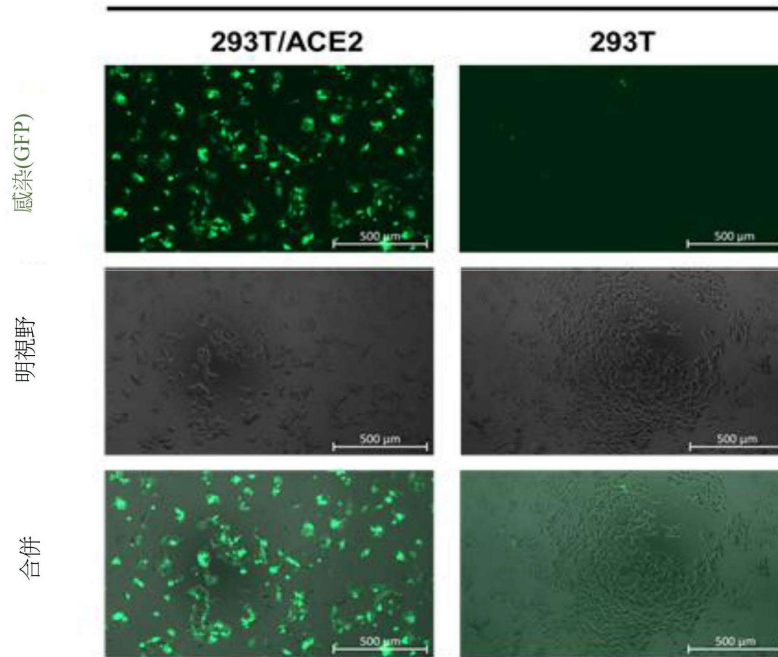
【圖4】



【圖5】

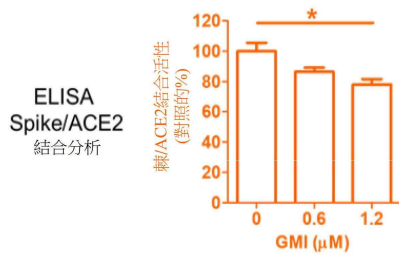
(6)

SARS-CoV-2假病毒感染

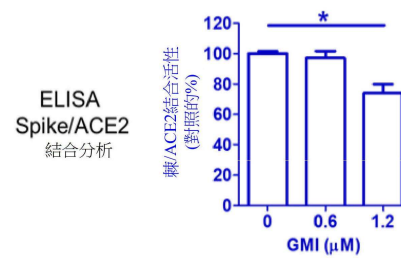


【圖6】

A

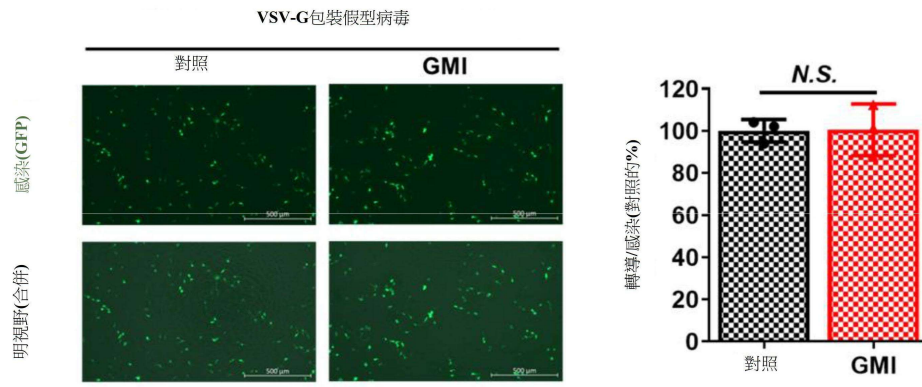


B



【圖7】

(7)



【圖8】