



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公開本 (11) 公開編號：TW 201946641 A

(43) 公開日：中華民國 108 (2019) 年 12 月 16 日

(21) 申請案號：108110939

(22) 申請日：中華民國 108 (2019) 年 03 月 28 日

(51) Int. Cl. : *A61K36/074 (2006.01)**A61K38/16 (2006.01)**A61K9/00 (2006.01)**A61P25/28 (2006.01)**C07K14/375 (2006.01)*

(30) 優先權：2018/04/03 美國 15/944,126

(71) 申請人：蘑法生物科技股份有限公司 (中華民國) MYCOMAGIC BIOTECHNOLOGY CO., LTD (TW)

新北市深坑區北深路三段 270 巷 12 號 8 樓之 1

(72) 發明人：招名威 CHAO, MING WEI (TW)

(74) 代理人：陳長文

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：12 項 圖式數：5 共 28 頁

(54) 名稱

免疫調節蛋白在減少由細顆粒物質所導致的損傷中的新用途

(57) 摘要

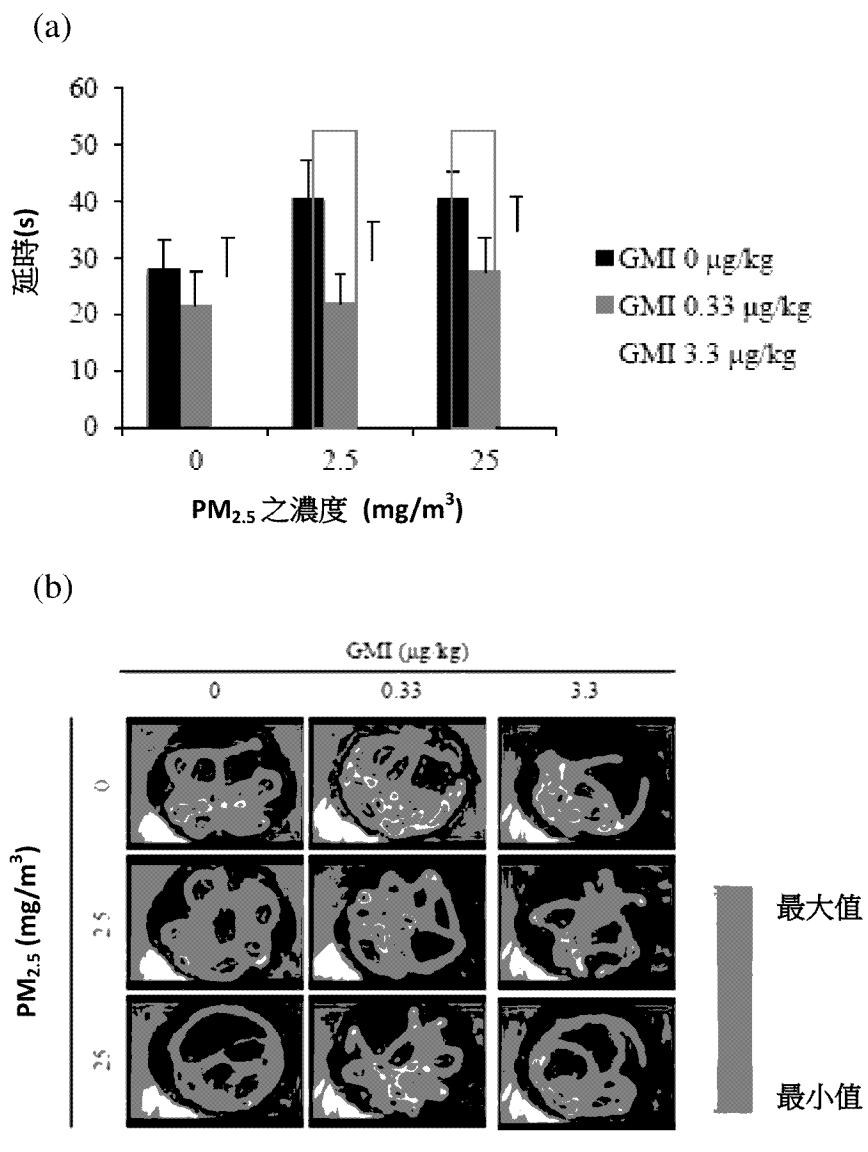
本發明涉及來源於靈芝(Ganoderma)的免疫調節蛋白或其重組體或組合物在減少由細顆粒物質所導致的對胚胎和子代的損傷中的新用途。因此，本發明表明投與到妊娠動物的所述靈芝免疫調節蛋白可以預防胚胎和子代的神經損傷並且降低所述胚胎和子代的病症的風險。

The present invention relates to a new use of an immunomodulatory protein derived from Ganoderma or a recombinant or a composition thereof in reducing damage caused by fine particulate matter on embryos and offspring. Accordingly, the present invention suggests that the Ganoderma immunomodulatory protein administrated to pregnant animals can prevent neurological damages and reduce risk of disorders in embryos and offspring.

指定代表圖：

201946641

TW 201946641 A



【發明說明書】

【中文發明名稱】

免疫調節蛋白在減少由細顆粒物質所導致的損傷中的新用途

【英文發明名稱】

NEW USE OF AN IMMUNOMODULATORY PROTEIN IN
REDUCING DAMAGE CAUSED BY FINE PARTICULATE MATTER

【技術領域】

【0001】 本發明涉及來源於靈芝(*Ganoderma*)的免疫調節蛋白或其重組體或組合物在減少由細顆粒物質所導致的對胚胎和子代的損傷中的新用途。具體地說，免疫調節蛋白來源於小孢靈芝(*Ganoderma microsporum*)。

【先前技術】

【0002】 空氣污染也已經變為普遍關注點。單組分空氣污染即直徑小於 $2.5\text{ }\mu\text{m}$ 的細顆粒物質具有作為核心的碳並且吸附有機物、重金屬和其它物質。細顆粒物質可以通過呼吸到達支氣管，並且通過血流進入身體中以通過血液循環影響全身。當空氣污染物進入孕婦身體中時，她的孩子也會受到影響。已經報導先天性心臟病、流產、早產和低出生體重可能由於在懷孕期間暴露於細懸浮粒子而造成。所述一代中樞神經系統也可能受在懷孕期間暴露於細氣溶膠的影響。

【0003】 已經報導靈芝(Lingzhi)物種的多種治療作用，如免疫調節、抗腫瘤、肝保護、抗氧化和膽固醇降低作用。US 20100009915提供用於遏制癌細胞增殖的方法和用於遏制腫瘤細胞運動的方法，其包括向腫瘤細胞提供真菌免疫調節蛋白LZ-8的純化多肽。US 7,601,808揭示從具

有免疫調節劑功效的小孢靈芝中克隆的免疫調節蛋白。但這些參考文獻與來自靈芝的免疫調節蛋白在減少細顆粒物質對人類的損傷方面不相關。TW 201717978揭示有效劑量的靈芝提取物用於抑制或減少PM_{2.5}導致的毒性的用途。然而，這份參考文獻沒有說明來自靈芝的免疫調節蛋白。

【發明內容】

【0004】 本發明發現來自靈芝的免疫調節蛋白可以越過胎盤屏障並且減少由細顆粒物質所導致的對胚胎和子代的損傷，這表明投與到妊娠動物的靈芝免疫調節蛋白可以預防胚胎和子代的神經損傷並且降低胚胎和子代的病症的風險。

【0005】 本發明提供用於減少對胚胎或子代的神經損傷或降低胚胎或子代罹患神經疾病的風險的方法，其包括向暴露於顆粒物質中的妊娠個體投與有效量的來源於靈芝的免疫調節蛋白或其重組體或組合物。

【0006】 本發明還提供用於增強胚胎或子代認知的方法，其包括向暴露於顆粒物質的妊娠個體投與有效量的來源於靈芝的免疫調節蛋白或其重組體或組合物。

【0007】 神經損傷的實施例為認知損傷。認知的某些實施例包含記憶功能、長期記憶、短期記憶、工作記憶和空間認知。神經疾病的某些實施例包含神經退行性疾病、精神分裂症或自閉症。

【0008】 靈芝的免疫調節蛋白或其重組體的某些實施例包含選自由以下組成的群組的胺基酸序列：(1) -Leu-Ala-Trp-Asn-Val-Lys-(LAWNWK；SEQ ID NO：1)、(2) -Asp-Leu-Gly-Val-Arg-Pro-Ser-Tyr-Ala-Val- (DLGVRPSYAV；SEQ ID NO：2)、(3) 胺基酸序列：MSDTALIFTLAWNWKQLAFDYTPNWGRGRPSSFIDTVTFPTVLTDKA

YTYR VVVSGKDLGVRPSYAVESDGSQKINFLEYNSGYGIADNTIQV
 YVIDPDTGNNFIVAQWN (SEQ ID NO : 3) 和 (4) 氨基酸序列
 EAEEAFMSDTALIFTLAWNVKQLAFDYTPNWGRGRPSSFIDTVTFPT
 VLTDKAYTYR VVVSGKDLGVRPSYAVESDGSQKINFLEYNSGYGIAD
 TNTIQVYVIDPDTGNNFIVAQWNYLEQKLISEEDLNSAVDH HHHHHH
 (SEQ ID NO : 4)。

【0009】 免疫調節蛋白的有效量的某些實施例為約0.01 mg/kg到約5 mg/kg。

【圖式簡單說明】

【0010】 圖1 (a)和(b)顯示GMI可以增強子代的長期記憶。(a)接受大劑量PM_{2.5}的妊娠大鼠的子代耗費較長時間探索平臺，而接受GMI的那些妊娠大鼠的子代花費較少時間。(b)熱點顯示接受PM_{2.5}的妊娠大鼠的子代在箱子周圍游泳，然而接受GMI的妊娠大鼠的子代具有較高的在具有平臺的象限處游泳的頻率。

【0011】 圖2顯示GMI可以增強子代的工作記憶。

【0012】 圖3顯示GMI可以增強子代的長期記憶。

【0013】 圖4顯示GMI可以增強子代的空間認知。

【0014】 圖5 (a)到(d)顯示GMI可以有效地保護記憶形成並且減少PM_{2.5}對神經突的損傷。高爾基體染色(Golgi staining)用於觀察腦部神經細胞以檢測樹突狀分支的複雜度來探索神經元突觸的形態和整合信號的能力。根據肖爾分析(Sholl analysis)結果，相比僅接受PM_{2.5}的那些妊娠大鼠的子代的神經突，接受PM_{2.5}和GMI的妊娠大鼠的子代的神經突對於海馬體CA1區域(a)和對於海馬體CA3區域(c)具有較大數量的分支尖端，並

且對於海馬體CA1區域(b)和對於海馬體CA3區域(d)具有較長長度。

【實施方式】

【0015】 本發明出乎意料地發現來自靈芝的免疫調節蛋白可以越過胎盤屏障並且減少由細顆粒物質所導致的對胚胎和子代的損傷，這表明向妊娠動物投與靈芝免疫調節蛋白可以預防胚胎和子代的神經損傷並且降低胚胎和子代的病症的風險。

【0016】 除非另外定義，否則本文所所有用的所有技術和科學術語均具有與本發明所屬領域的普通技術人員通常所瞭解的含義相同的含義。雖然可以在本發明的實踐或測試中使用與本文所描述的方法和材料類似或同等的任何方法和材料，但現在描述優選的方法和材料。本文所提及的所有公開均通過引用併入本文中。

【0017】 在本申請中，除非另外確切地陳述，否則單數的使用包含複數，冠詞「一個/種(a/an)」意指「至少一個/種」並且「或」的使用意指「和/或」。

【0018】 在本申請中，單詞「包括(comprise)」或變體如「包括(comprises/comprising)」指示在指定方法、結構或組成中包含任何所敘述的整數或整數群組，但不排除任何其它整數或整數群組。

【0019】 如本文所使用的術語「胎盤屏障」指由胎盤組織構成並且限制在母親與胎兒之間交換的物質的種類和量的半透膜。

【0020】 如本文所使用的術語「神經元」包含神經元和其一或多個部分(例如神經元細胞體、軸突或樹突)。術語「神經元」表示神經系統細胞，其包含中央細胞體(body/soma)和兩種類型的延伸或突出：樹突，一般來說大部分神經元信號通過其傳輸到細胞體；和軸突，一般來說大部分

神經元信號通過其從細胞體傳輸到效應細胞，如靶神經元或肌肉。

【0021】 如本文所使用的術語「神經突」涵蓋所有所述的自神經元向外生長的細胞過程(包含軸突和樹突)。

【0022】 如本文所使用的術語「神經突生長」指自神經元向外生長的細胞過程，或指包括自神經元向外的生長的細胞。

【0023】 如本文所使用的「神經病症」意指存在於中樞神經系統或周圍神經系統中的神經元的任何生理功能障礙或死亡或由神經膠質細胞功能障礙導致。所述病症的非限制性清單包括多發性硬化症、坐骨神經缺陷、腦或脊髓損傷、癡呆、額顳葉癡呆(frontotemporal lobe dementia)、阿爾茨海默氏病(Alzheimer's disease)、帕金森氏病(Parkinson's disease)、亨廷頓氏病(Huntington's disease)、朊病毒病、神經元病以及運動神經元病症。「神經元病」的特徵在於運動神經元或感覺神經元的神經元細胞死亡，並且因此神經元病可以再分為運動和感覺神經元病症。

【0024】 如本文所使用的「促進(promote)」或「增加(increase)」、或「促進(promoting)」或「增加(increasing)」在本文中可互換使用。這些術語指與未治療細胞(組織或個體)相比而言治療細胞(組織或個體)中的經測量參數的增加。還可以在治療前後比較相同細胞或組織或個體。在一些實施例中，與未治療細胞相比，治療細胞的增加為至少約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、1倍、2倍、3倍、4倍或多。

【0025】 如本文所使用的術語「抑制(inhibit)」、「預防(prevent)」或「減少(reduce)」或「抑制(inhibiting)」、「預防(preventing)」或「減少(reducing)」在本文中可互換使用。這些術語指與未治療細胞(組織或個

體)相比而言治療細胞(組織或個體)中的經測量參數的減少。還可以在治療前後之間比較相同細胞或組織或個體。在一些實施例中，與未治療細胞相比，治療細胞的減少為至少約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或被完全抑制。

【0026】如本文所使用的「治療(treatment/treating)」或「緩解」可互換使用。這些術語指用於獲得包含但不限於治療益處和/或預防益處的有益或所需結果的方法。治療益處涉及所治療的潛在病症的根除或緩解。此外，在根除或緩解與潛在病症相關的一或多種生理症狀以使得在患者中觀察到改善的情況下實現治療益處，但患者可能仍然患有所述潛在病症。「治療」還可以指存活期相較於不接受治療時的預期存活期而言延長。需要治療的那些患者包含已經患有病況或病症的那些患者，以及易患上所述病況或病症的那些患者，或將預防所述病況或病症的那些患者。

【0027】如本文所使用的「有效量」意指足以治療患有疾病的個體或足以減輕與所述疾病相關的症狀或併發症的量。

【0028】如本文所使用的「個體」指人類或非人類動物。

【0029】在一個方面中，本發明提供用於減少對胚胎或子代的神經損傷或降低胚胎或子代罹患神經疾病的風險的方法，其包括向暴露於顆粒物質中的妊娠個體投與有效量的來源於靈芝的免疫調節蛋白或其重組體或組合物。

【0030】在另一個方面中，本發明提供用於增強胚胎或子代認知的方法，其包括向暴露於顆粒物質的妊娠個體投與有效量的來源於靈芝的免疫調節蛋白或其重組體或組合物。

【0031】在一個實施例中，本發明的方法可以預防對胚胎或子代的

神經損傷或胚胎或子代的神經疾病。

【0032】 在一個實施例中，神經損傷為認知損傷。認知包含但不限於記憶功能、長期記憶、短期記憶、工作記憶和空間認知。

【0033】 在一個實施例中，神經疾病為神經退行性疾病、精神分裂症或自閉症。可以根據本發明預防的神經退行性疾病的實例包含肌萎縮性側索硬化(ALS)、三叉神經痛、舌咽神經痛、貝耳氏麻痹(Bell's palsy)、重症肌無力、肌肉萎縮症、進行性肌肉萎縮、原發性側索硬化(PLS)、假延髓性麻痹、進行性延髓性麻痹、脊髓性肌萎縮、進行性延髓性麻痹、遺傳性肌肉萎縮、椎間盤綜合征(例如突出盤、破裂盤和脫垂盤綜合征)、頸椎病、神經叢病症、胸廓出口損壞綜合征、周圍神經病、紫質症、輕度認知障礙、阿爾茨海默氏病、亨廷頓氏病、帕金森氏病、帕金森疊加綜合征(例如多發性系統萎縮症、進行性核上麻痹和皮質基底核退化症)、癡呆、額顳葉型癡呆(frontotemporal dementia)、脫髓鞘疾病(例如吉蘭-巴雷綜合征(Guillain-Barre syndrome)和多發性硬化症)、恰克-馬裡-杜斯氏症(Charcot-Marie-Tooth disease，CMT；又稱為遺傳運動和感覺神經病(HMSN)、遺傳感覺運動神經病(HSMN)和腓骨肌肉萎縮)、朧病毒病(例如克雅氏病(Creutzfeldt-Jakob disease)、吉斯特曼-施特勞斯綜合征(Gerstmann-Straussler-Scheinker syndrome，GSS)、致死性家族性失眠症(FFI)和牛海綿狀腦病(BSE，通常稱為瘋牛病))、皮克氏疾病(Pick's disease)、癲癇症和AIDS癡呆複合症(又稱為HIV癡呆、HIV腦病和HIV相關癡呆)。

【0034】 在一個實施例中，免疫調節蛋白或其重組體來源於赤芝(*Ganoderma lucidum*)、赤芝(*Ganoderma lucidum*)、松杉靈芝

(*Ganoderma tsugae*)、小孢靈芝或紫芝(*Ganoderma sinensis*)。

【0035】 在一個實施例中，靈芝的免疫調節蛋白或其重組體包括選自由以下組成的群組的胺基酸序列：(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) 胺基酸序列：MSDTALIFTLAWNWKQLAFDYTPNWGRGRPSSFIDTVTFPTVLTDKA YTYRVVVSGKDLGVRPSYAVESDGSQKINFLEYNSGYGIADTNTIQV YVIDPDTGNNFIVAQWN (SEQ ID NO：3) 和 (4) 胺基酸序列 EAEAEFMSDTALIFTLAWNWKQLAFDYTPNWGRGRPSSFIDTVTFPT VLTDKAYTYRVVVSGKDLGVRPSYAVESDGSQKINFLEYNSGYGIAD TNTIQVYVIDPDTGNNFIVAQWNYLEQKLISEEDLNSAVDHHHHHH (SEQ ID NO：4)。

【0036】 在一個實施例中，免疫調節蛋白的有效量在約0.01 mg/kg 到約5 mg/kg範圍內。在一些實施例中，有效量在約0.01 mg/kg到約4 mg/kg、約0.01 mg/kg到約4.5 mg/kg、約0.01 mg/kg到約4 mg/kg、約0.01 mg/kg到約3.5 mg/kg、約0.01 mg/kg到約3 mg/kg、約0.01 mg/kg到約2.5 mg/kg、約0.01 mg/kg到約2 mg/kg、約0.01 mg/kg到約1.5 mg/kg、約0.01 mg/kg到約1 mg/kg、約0.01 mg/kg到約0.5 mg/kg、約0.05 mg/kg到約5 mg/kg、約0.05 mg/kg到約4.5 mg/kg、約0.05 mg/kg到約4 mg/kg、約0.05 mg/kg到約3.5 mg/kg、約0.05 mg/kg到約3 mg/kg、約0.05 mg/kg到約2.5 mg/kg、約0.05 mg/kg到約2 mg/kg、約0.05 mg/kg到約1.5 mg/kg、約0.05 mg/kg到約1 mg/kg、約0.05 mg/kg到約0.5 mg/kg、約0.1 mg/kg到約5 mg/kg、約

0.1 mg/kg 到約 4.5 mg/kg、約 0.1 mg/kg 到約 4 mg/kg、約 0.1 mg/kg 到約 3.5 mg/kg、約 0.1 mg/kg 到約 3 mg/kg、約 0.1 mg/kg 到約 2.5 mg/kg、約 0.1 mg/kg 到約 2 mg/kg、約 0.1 mg/kg 到約 1.5 mg/kg、約 0.1 mg/kg 到約 1 mg/kg、約 0.1 mg/kg 到約 0.5 mg/kg、約 0.5 mg/kg 到約 5 mg/kg、約 1 mg/kg 到 約 5 mg/kg、約 1.5 mg/kg 到 約 5 mg/kg、約 2 mg/kg 到 約 5 mg/kg、約 2.5 mg/kg 到 約 5 mg/kg、約 3 mg/kg 到 約 5 mg/kg、約 3.5 mg/kg 到約 5 mg/kg 或約 4 mg/kg 到約 5 mg/kg範圍內。

【0037】本發明的免疫調節蛋白或其重組物可以單獨地或於醫藥組合物中投與到患者，在所述醫藥組合物中其與合適的載劑和賦形劑混合。本發明的免疫調節蛋白、其重組物或組合物可以非經腸投與，如通過靜脈內注射或輸注、腹膜內注射、皮下注射或肌肉內注射進行。免疫調節蛋白、其重組物或組合物可以通過適當地與載劑和賦形劑一起進行配製以形成片劑、丸劑、膠囊、液體、凝膠、糖漿、漿液、懸浮液等等來經口或經直腸投與。免疫調節蛋白、其重組物或組合物可以局部投與，如通過皮膚貼片進行。免疫調節蛋白、其重組物或組合物可以配製成局部乳膏、皮膚或粘膜貼片、適合於局部施用到皮膚或粘膜表面的液體或凝膠。免疫調節蛋白、其重組物或組合物可以通過吸入器來投與到呼吸道以用於局部或全身性癌症治療。

【0038】適合於根據本發明進行使用的免疫調節蛋白、其重組物或組合物的劑量可以由所屬領域的技術人員基於本文中的揭示內容來確定。藥劑應含有有效劑量的(取決於活性劑的投與途徑和藥物動力學)適用於特別的配製物投與途徑(即口服、非經腸、局部或通過吸入)的合適的醫藥載劑和賦形劑。通過混合、溶解、粒化、糖衣藥丸製造、乳化、囊封、包覆

或冷凍乾燥方法來將免疫調節蛋白或其重組物混合到醫藥組合物中。用於非經腸投與的醫藥組合物包含呈水溶性形式的本發明多肽的水溶液。另外，本發明多肽的懸浮液可以製備為油性注射懸浮液。合適的親脂性溶劑或媒劑包含脂肪油，如芝麻油；或合成脂肪酸酯，如油酸乙酯或三酸甘油酯；或脂質體。水性注射懸浮液可以含有增加懸浮液粘度的物質，如羧甲基纖維素鈉、山梨糖醇或葡聚糖。懸浮液可以任選地含有穩定劑或增加複合物或組合的溶解度以容許溶液更加濃縮的試劑。

【0039】 在另一個實施例中，免疫調節蛋白或其重組物可以與神經突生長劑組合以用於促進神經突生長或治療和/或預防神經病症方面的組合療法。免疫調節蛋白或其重組體也可以與神經突生長劑組合作為醫藥組合物。也就是說，本發明提供包括免疫調節蛋白或其重組體和額外的神經突生長劑的醫藥組合物，並且所述組合物可以促進神經突生長或治療及/或預防神經病症。在一個實施例中，神經突生長劑為煙醯胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)類似物；含有5-醯基-2-氨基-1,3-硒唑的神經營養因子類似物；含有依布硒啉(ebselen)的神經營養因子；含有至少一種選自由咖啡酸和其衍生物組成的群組的化合物的神經突生長劑；含有至少一種選自由迷迭香和含有鼠尾草酸的鼠尾草組成的群組的植物提取物的神經突生長劑；含有溶血磷脂醯乙醇胺的細胞死亡遏制物質；含有細胞器鹼化劑的神經突生長組合物，如莫能菌素(monensin)或刀豆素A；含有聚烷氧基類黃酮的神經突生長劑，如川陳皮素或桔皮素；含有葡萄糖胺聚糖衍生物的神經突生長活化劑；含有乳胞素衍生物的神經突生長劑；含有小分子雜環酮或硫酯化合物的神經突生長劑；含有神經節苷脂衍生物以及N-醯基-N-脫脂-神經節苷脂、N'-醯基-N'-脫脂-神經節苷脂和N,N'-二-或聚-醯基-N,N'-二脫脂-神

經節昔脂的神經突生長劑；包括含有GlcUA(2S)-GalNAc(4S) (B單元)雙糖的硫酸軟骨素/硫酸皮膚素雜合鏈的神經突生長劑；含有具有等分GlcNAc的糖鏈、具有於其結構中的前述糖鏈的複合碳水化合物、前述糖鏈的衍生物等的神經突生長誘導劑；含有作為活性成分的低分子量合成化合物的神經突生長誘導劑；Tctex-1相關多肽；TAJ多肽；或神經細胞粘著分子。

【0040】 在不進一步詳細描述的情況下，相信所屬領域的技術人員可以基於前述描述最大程度地利用本發明。因此，以下實例解釋為僅為說明性的並且不以任何方式限制本發明的範圍。

實例

材料和方法

【0041】 粒子物質和GMI

【0042】 將粒子物質(PM)添加到0.01% Tween 80中並且進行超聲波處理(60 Hz)以使得PM的粒度小於 $2.5\text{ }\mu\text{m}$ ($\text{PM}_{2.5}$)。

【0043】 包括胺基酸序列SEQ ID NO: 4 (「GMI」)的小孢靈芝的免疫調節蛋白用於實驗中。

【0044】 實驗動物

【0045】 將用於實例中的史-道二氏妊娠大鼠(Spragus-Dawley pregnant rat)容納於溫度控制在18-25°C下並且濕度為30%到70%的實驗室動物設施中。對於 $\text{PM}_{2.5}$ 投與，在妊娠之後第3、6、9、12、15和18天通過氣管內滴注將在0 mg/m³、2.5 mg/m³和25 mg/m³濃度下的 $\text{PM}_{2.5}$ 投與到大鼠。對於GMI投與，在實驗中將在0 μg/kg、0.33 μg/kg和3.3 μg/kg濃度下的GMI經口投與到大鼠以用於預防來自 $\text{PM}_{2.5}$ 的損傷。

【0046】莫裡斯水迷宮(Morris Water Maze, MWM)測試

【0047】莫裡斯水迷宮(MWM)為依賴於遠端提示以從開放游泳領域周邊附近的開始位置進行導航來定位水下逃脫平臺的齧齒動物空間學習測試。如在修改情況下的D'霍格, R (D'Hooge, R); 德迪恩, PP (De Deyn, PP) (2001年8月),「莫裡斯水迷宮在學習和記憶研究中的應用 (Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory)」。腦研究(Brain Research). 腦研究評論(Brain Research Reviews) 36 (1): 60-90中所描述執行水迷宮方法。

【0048】水迷宮箱(160 cm×70 cm×40 cm)由含有患者可以游泳到其上的平臺的小池組成。平臺位置取決於呈現于池壁上的四個大的抽象視覺提示(每個分開90度)中的一個。隨後，在視覺提示中的每個下使動物落到水迷宮中，一天一次，持續5天，以便基於每個提示學習平臺位置。觸發刺激的任務的時間間隔為開始時間間隔，或在使動物落在水迷宮中時；和強化時間間隔，或在平臺上發現動物並且其在平臺上休息時。

【0049】工作記憶測試

【0050】用MWM執行測試持續六天。水迷宮箱為MWM測試中所提及的水迷宮箱。平臺位置每日變化。一天一次訓練大鼠以探索平臺一分鐘。在發現平臺之後，使大鼠停留在平臺上20秒。在測試中，大鼠探索平臺60秒並且記錄大鼠探索平臺所耗費的總時間。

【0051】新物體和位置識別測試(NOR和NOL)

【0052】新物體識別記憶測試評估在延遲之後識別環境中的新物體的能力。訓練裝置為透明普列克斯玻璃箱(Plexiglas box) (100 cm×100 cm×50 cm)。將大鼠在無應激的情況下放置在箱中10分鐘以用於馴化。將

兩個具有相同形狀和顏色的物體放置在箱中。在連續兩天內，將大鼠放置在箱中並且使其探索兩個相同物體5分鐘，並且記錄探索兩個物體所耗費的總時間和頻率。在第三天，將在箱右側的物體變成具有與在箱左側的物體的形狀和顏色不同的形狀和顏色的物體，並且接著將大鼠放置在箱中5分鐘。記錄探索兩個物體所耗費的總時間和頻率。

【0053】 在第四天和第五天，將不同于上文所提及的那些物體的兩個相同物體放置在箱中。接著將大鼠放置在箱中5分鐘，並且記錄探索兩個物體所耗費的總時間和頻率。在第六天，將在箱右側的物體變成具有與在箱左側的物體的形狀和顏色不同的形狀和顏色的物體，並且接著將大鼠放置在箱中5分鐘。記錄探索兩個物體所耗費的總時間和頻率。

【0054】 通過篝火程序(Bonfire Program)進行的神經元形態分析

【0055】 篝火程序為分析樹突和軸突形態的半自動化方法，其是基於可用開源形態學分析工具而建立的。篝火程序需要使用兩個開源分析工具，即NeuronJ插件到ImageJ和NeuronStudio。在ImageJ中跟蹤神經元，並且NeuronStudio用於定義神經突之間的連通性。

【0056】 高爾基體染色

【0057】 在暗處在室溫下將腦組織浸入呈1:1比率的FD快速高爾基體染色試劑盒的A溶液和B溶液的混合物中。在2到3周之後，在4°C下將所得腦組織轉移到C溶液中持續48小時。將切片(80 μm)安放到塗布有含0.3%明膠的dH₂O的載玻片上。在短暫乾燥之後，將載玻片浸漬於40%蔗糖中3次並且在暗處風乾72小時。將載玻片浸入D溶液和E溶液的混合物中，隨後轉移到顯影液中。接著，將載玻片通過50%、75%、95%和100%梯度乙醇脫水，浸入二甲苯中，並且接著使用DPX封固劑(mounting

medium)蓋上蓋玻片。

【0058】微RNA圖譜分析

【0059】分離獲自18天妊娠雌性大鼠的胎兒大鼠的皮層與海馬體，並分別放置在TRIzol中。使用大鼠神經發育和疾病miRNA PCR陣列測量腦部的神經發育相關疾病和神經疾病。提取組織的RNA並執行反轉錄反應。通過QPCR獲得miRNA值。

實例1 GMI改善由 PM_{2.5}所導致的腦部發育遲緩

【0060】通過MWM測試測定接受PM_{2.5}或GMI的妊娠大鼠的子代的長期記憶。如圖1(a)中所示，接受大劑量PM_{2.5}的妊娠大鼠的子代耗費較長時間去探索平臺，而接受GMI的那些妊娠大鼠的子代花費較少時間。圖1(b)中的熱點顯示接受PM_{2.5}的妊娠大鼠的子代在箱子周圍游泳，然而接受GMI的妊娠大鼠的子代具有較高的在具有平臺的象限處游泳的頻率。結果顯示GMI可以增強子代的長期記憶。

【0061】通過MWM測試測定接受PM_{2.5}或GMI的妊娠大鼠的子代的工作記憶。圖2顯示接受GMI的妊娠大鼠的子代比接受大劑量PM_{2.5}的那些妊娠大鼠的子代耗費更少的時間去找到平臺。結果顯示GMI可以增強子代的工作記憶。

【0062】通過NOR和NOL測定接受PM_{2.5}或GMI的妊娠大鼠的子代的記憶容量。如圖3中所示，接受GMI的妊娠大鼠的子代比接受PM_{2.5}的妊娠大鼠的子代耗費更多的時間去觸摸新物體。結果顯示GMI可以增強子代的長期記憶。圖4顯示接受GMI的妊娠大鼠的子代比接受PM_{2.5}的妊娠大鼠的子代耗費更多的時間觸摸位置改變的物體。結果顯示GMI可以增強子代的空間認知。

實例 2 神經元形態分析

【0063】 簣火程序用於分析海馬體神經元的分支行為和樹突延伸長度。如圖5中所示，相比僅接受PM_{2.5}的那些妊娠大鼠的子代的神經突，接受PM_{2.5}和GMI的妊娠大鼠的子代的神經突具有更大數量的分支尖端(圖5(a)對於海馬體CA1區域和圖5(c)對於海馬體CA3區域)和其長度(圖5(b)對於海馬體CA1區域和圖5(d)對於海馬體CA3區域)。結果顯示GMI可以有效地保護記憶形成並且減少PM_{2.5}對神經突的損傷。

實例 3 GMI 降低罹患神經疾病的風險

【0064】 相較於對照組，根據微RNA圖譜分析調整以下獲自接受PM_{2.5}的18天妊娠雌性大鼠的胎兒大鼠的皮層和海馬體的基因。經調整基因的潛在疾病包含精神分裂症、朊病毒病、自閉症和阿爾茨海默病。對於獲自接受PM_{2.5}和GMI的18天妊娠雌性大鼠的胎兒大鼠，回收經調整基因，因此罹患神經疾病的風險降低。

海馬體基因				
rno-miR-433-3p ↓		rno-miR-433-3p ↓		阿爾茨海默病
		rno-miR-382-5p ↓		
rno-miR-33-5p ↓	rno-miR-409a-3p ↓			精神分裂症
rno-miR-431 ↓		rno-miR-539-5p ↓		自閉症
rno-miR-212-3p ↓				

皮層基因				
rno-miR-9a-3p ↓	rno-miR-9a-3p ↓	rno-miR-9a-3p ↓		rno-miR-9a-3p ↓
rno-miR-489-3p ↓	rno-miR-489-3p ↓	rno-miR-489-3p ↓		精神分裂症
rno-miR-33-5p ↑	rno-miR-30d-5p ↓	rno-miR-33-5p ↑		
	rno-miR-346 ↓	rno-miR-150-5p ↓		
rno-miR-339-5p ↓	rno-miR-339-5p ↓	rno-miR-339-5p ↓		
	rno-miR-191a-5p ↓	rno-miR-139-5p ↓		
		rno-miR-431 ↓		
		rno-miR-598-3p ↓		
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 ↓	阿爾茨海默病
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 ↓	

【序列表】

<110> 蘑法生物科技股份有限公司

<120> 免疫調節蛋白在減少由細顆粒物質所導致的損傷中的新用途

<140> 108110939

<141> 2019-03-28

<160> 4

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1

<211> 6

<212> PRT

<213> 小孢子靈芝

<400> 1

Leu Ala Trp Asn Val Lys

1 5

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> 小孢子靈芝

<400> 2

Asp Leu Gly Val Arg Pro Ser Tyr Ala Val

1 5 10

<210> 3

<211> 111

<212> PRT

<213> 小孢子靈芝

<400> 3

Met Ser Asp Thr Ala Leu Ile Phe Thr Leu Ala Trp Asn Val Lys Gln

1 5 10 15

Leu Ala Phe Asp Tyr Thr Pro Asn Trp Gly Arg Gly Arg Pro Ser Ser

20 25 30

201946641

Phe Ile Asp Thr Val Thr Phe Pro Thr Val Leu Thr Asp Lys Ala Tyr
35 40 45

Thr Tyr Arg Val Val Val Ser Gly Lys Asp Leu Gly Val Arg Pro Ser
50 55 60

Tyr Ala Val Glu Ser Asp Gly Ser Gln Lys Ile Asn Phe Leu Glu Tyr
65 70 75 80

Asn Ser Gly Tyr Gly Ile Ala Asp Thr Asn Thr Ile Gln Val Tyr Val
85 90 95

Ile Asp Pro Asp Thr Gly Asn Asn Phe Ile Val Ala Gln Trp Asn
100 105 110

<210> 4

<211> 140

<212> PRT

<213> 小孢子靈芝

<400> 4

Glu Ala Glu Ala Glu Phe Met Ser Asp Thr Ala Leu Ile Phe Thr Leu
1 5 10 15

Ala Trp Asn Val Lys Gln Leu Ala Phe Asp Tyr Thr Pro Asn Trp Gly
20 25 30

Arg Gly Arg Pro Ser Ser Phe Ile Asp Thr Val Thr Phe Pro Thr Val
35 40 45

Leu Thr Asp Lys Ala Tyr Thr Tyr Arg Val Val Val Ser Gly Lys Asp
50 55 60

Leu Gly Val Arg Pro Ser Tyr Ala Val Glu Ser Asp Gly Ser Gln Lys
65 70 75 80

Ile Asn Phe Leu Glu Tyr Asn Ser Gly Tyr Gly Ile Ala Asp Thr Asn
85 90 95

201946641

Thr Ile Gln Val Tyr Val Ile Asp Pro Asp Thr Gly Asn Asn Phe Ile
100 105 110

Val Ala Gln Trp Asn Tyr Leu Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp
115 120 125

Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His
130 135 140



201946641

【發明摘要】

【中文發明名稱】

免疫調節蛋白在減少由細顆粒物質所導致的損傷中的新用途

【英文發明名稱】

NEW USE OF AN IMMUNOMODULATORY PROTEIN IN
REDUCING DAMAGE CAUSED BY FINE PARTICULATE MATTER

【中文】

本發明涉及來源於靈芝(*Ganoderma*)的免疫調節蛋白或其重組體或組合物在減少由細顆粒物質所導致的對胚胎和子代的損傷中的新用途。因此，本發明表明投與到妊娠動物的所述靈芝免疫調節蛋白可以預防胚胎和子代的神經損傷並且降低所述胚胎和子代的病症的風險。

【英文】

The present invention relates to a new use of an immunomodulatory protein derived from *Ganoderma* or a recombinant or a composition thereof in reducing damage caused by fine particulate matter on embryos and offspring. Accordingly, the present invention suggests that the *Ganoderma* immunomodulatory protein administrated to pregnant animals can prevent neurological damages and reduce risk of disorders in embryos and offspring.

【指定代表圖】

圖1

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明申請專利範圍】

【第1項】

一種用來源於靈芝(*Ganoderma*)的免疫調節蛋白或其重組體或組合物的用途，其用於製備減少對胚胎或子代的神經損傷或降低所述胚胎或子代罹患神經疾病的風險或增強胚胎或子代認知的藥劑，其中該藥劑係投與至暴露於顆粒物質的妊娠個體。

【第2項】

如請求項1之用途，其預防胚胎或子代的神經損傷或神經疾病。

【第3項】

如請求項1之用途，其中所述神經損傷為認知損傷。

【第4項】

如請求項1之用途，其中所述認知為記憶功能、長期記憶、短期記憶、工作記憶或空間認知。

【第5項】

如請求項1之用途，其中所述神經疾病為神經退行性疾病、精神分裂症或自閉症。

【第6項】

如請求項5之用途，其中所述神經退行性疾病為輕度認知障礙、阿爾茨海默氏病(Alzheimer's disease)、亨廷頓氏病(Huntington's disease)、帕金森氏病(Parkinson's disease)、癡呆、額顳葉型癡呆、脫髓鞘疾病或朊病毒病。

【第7項】

如請求項1之用途，其中所述靈芝的免疫調節蛋白或其重組體包括選自由以下組成的群組的胺基酸序列：

- (1) -Leu-Ala-Trp-Asn-Val-Lys- (LAWNWK ; SEQ ID NO:1) 、
(2) -Asp-Leu-Gly-Val-Arg-Pro-Ser-Tyr-Ala-Val- (DLGVRPSYAV ; SEQ ID NO : 2) 、
(3)MSDTALIFTLAWNWKQLAFDYTPNWGRGRPSSFIDTVTFPTVLTDKA
YTYRVVVSGKDLGVRPSYAVESDGSQKINFLEYNSGYGIADTNTIQVYVIDPD
TGNNFIVAQWN (SEQ ID NO : 3)和
(4)EAEAEFMSDTALIFTLAWNWKQLAFDYTPNWGRGRPSSFIDTVTFPT
VLTDKAYTYRVVVSGKDLGVRPSYAVESDGSQKINFLEYNSGYGIADTNTIQV
YVIDPDTGNNFIVAQWNYLEQKLISEEDLNSAVDHBBBBH (SEQ ID NO :
4) 。

【第8項】

如請求項1之用途，其中所述靈芝的免疫調節蛋白或其重組體包括胺基酸序列SEQ ID NO: 4 。

【第9項】

如請求項1之用途，其中所述免疫調節蛋白係經口投與。

【第10項】

如請求項1之用途，其中所述免疫調節蛋白的有效量在約0.01 mg/kg到約5 mg/kg範圍內。

【第11項】

如請求項1之用途，其中所述免疫調節蛋白的有效量在約0.1 mg/kg到約3 mg/kg範圍內。

【第12項】

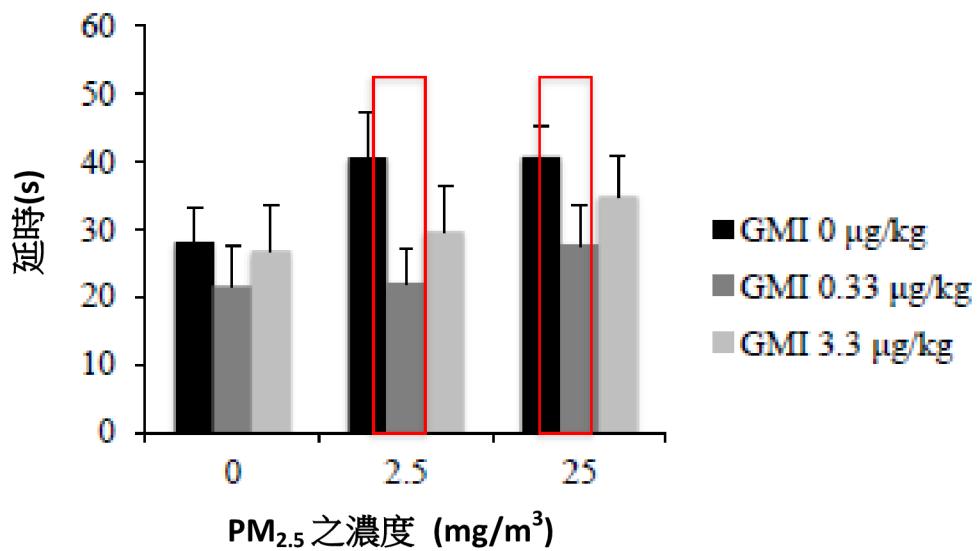
如請求項1之用途，其中所述免疫調節蛋白來源於小孢靈芝(*Ganoderma*

201946641

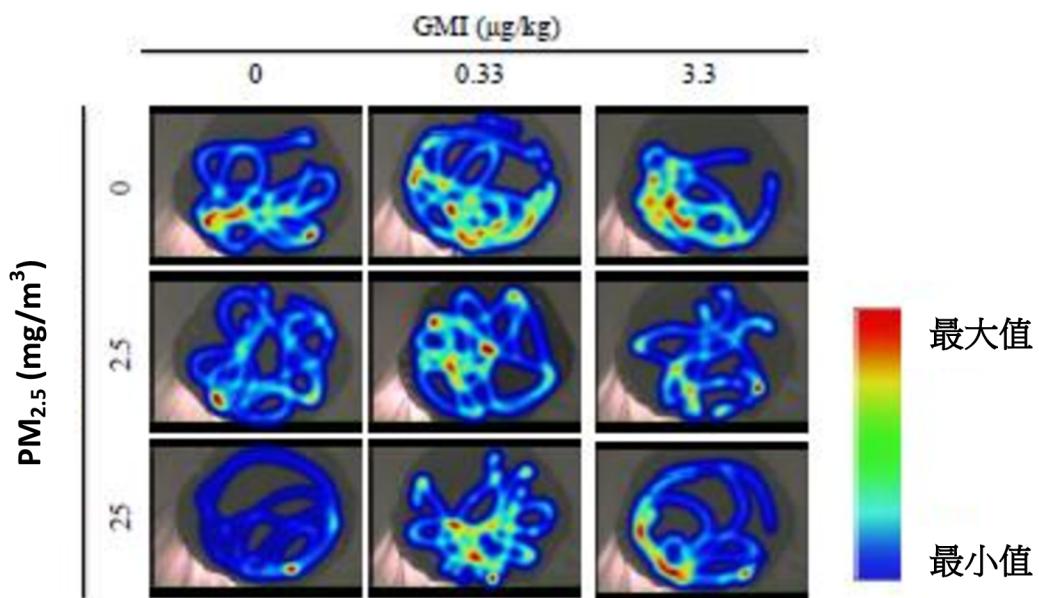
microsporum)。

【發明圖式】

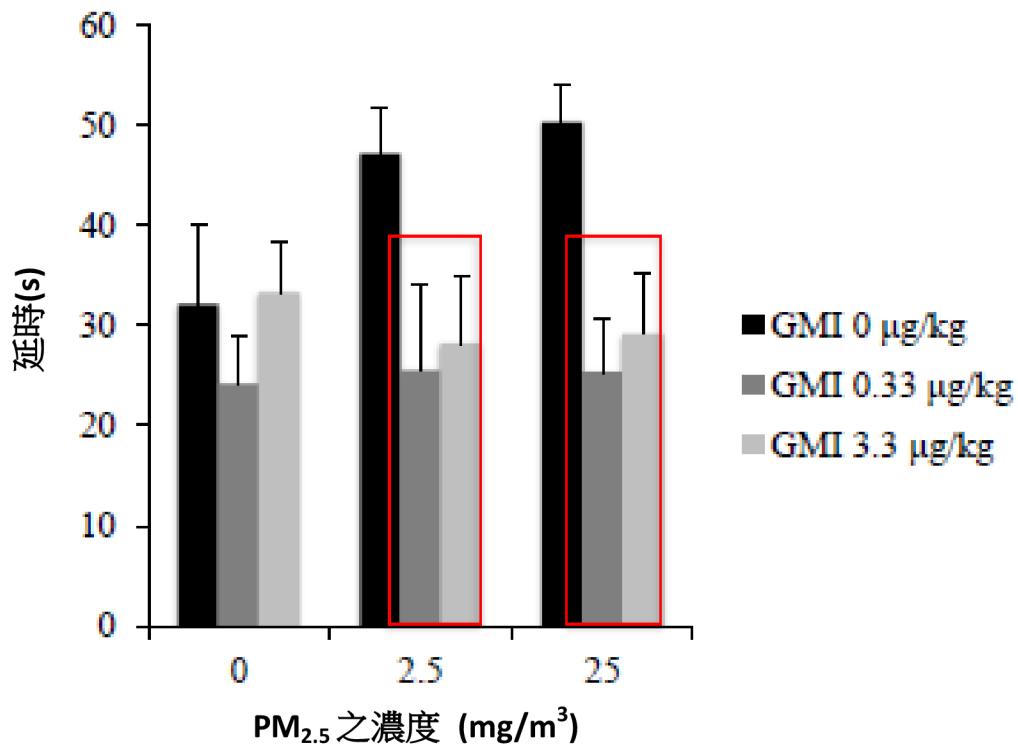
(a)



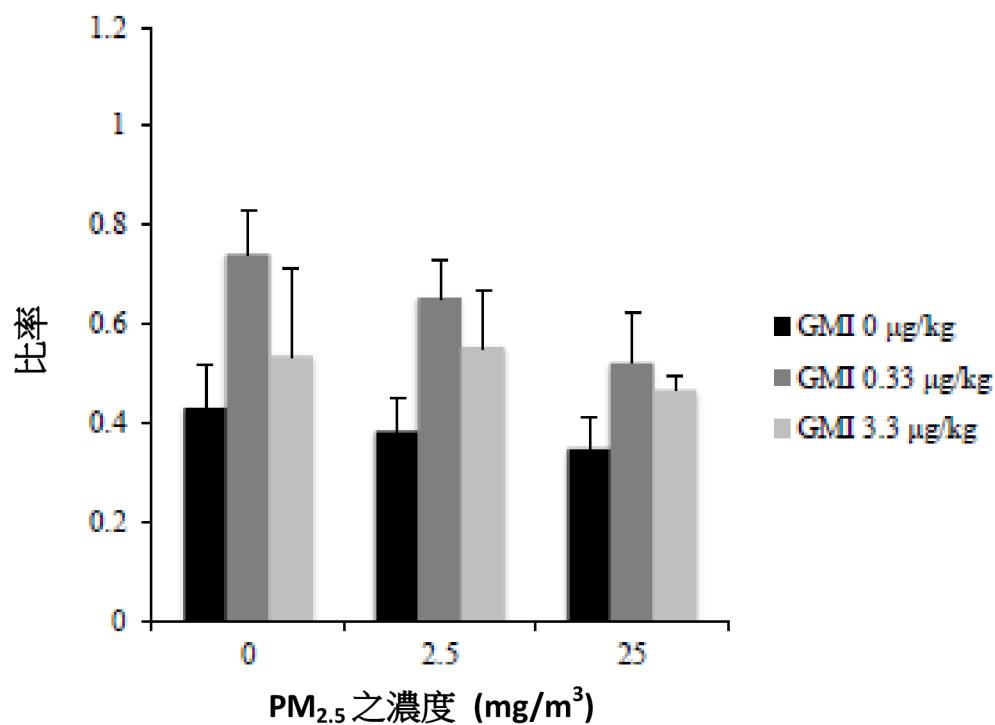
(b)



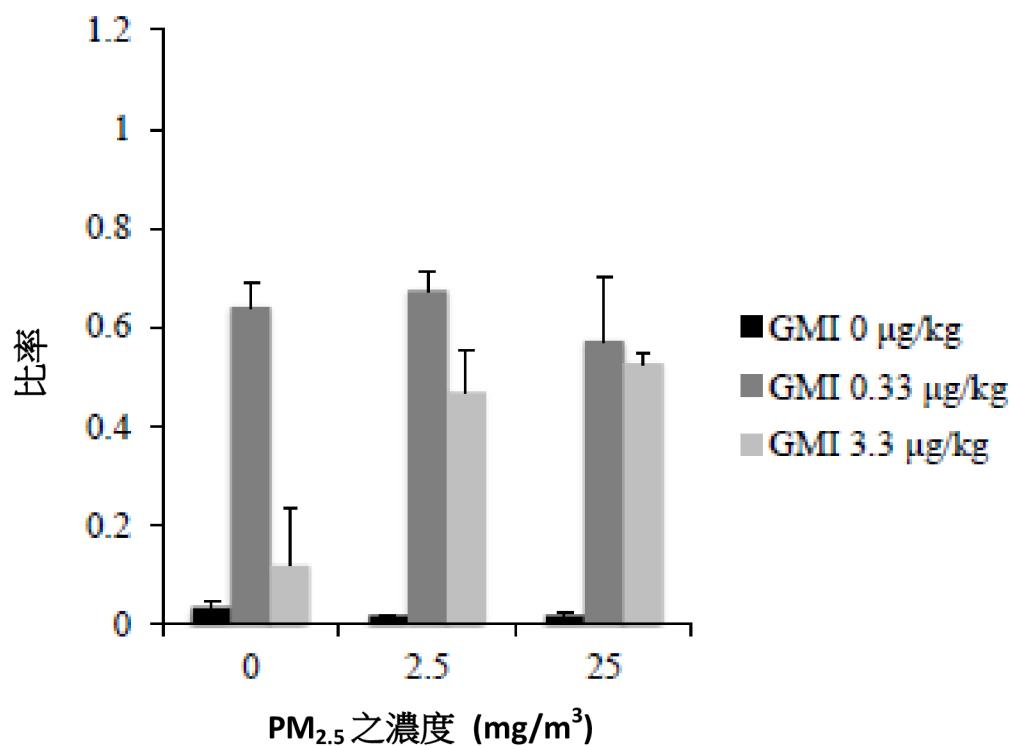
【圖 1】



【圖 2】

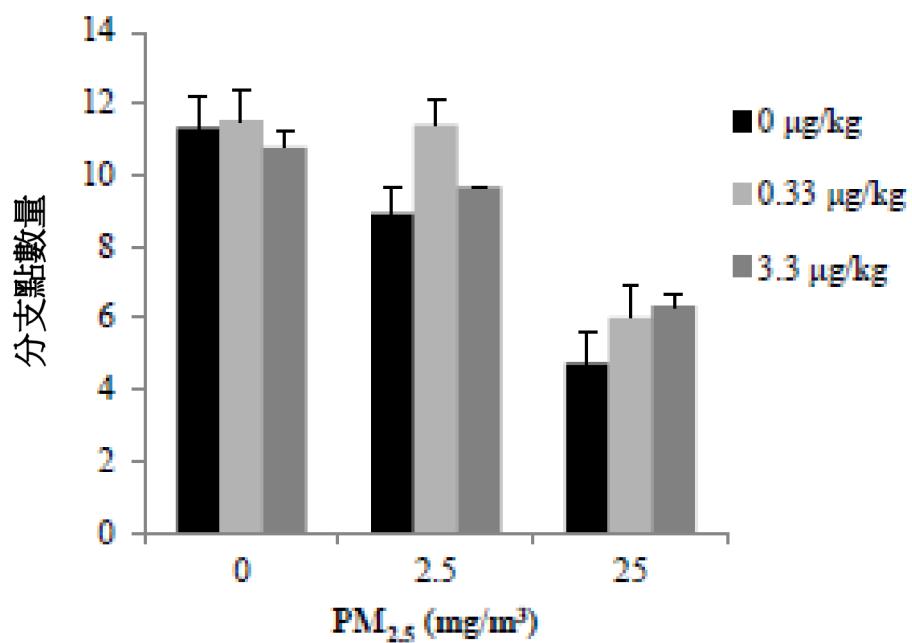


【圖 3】

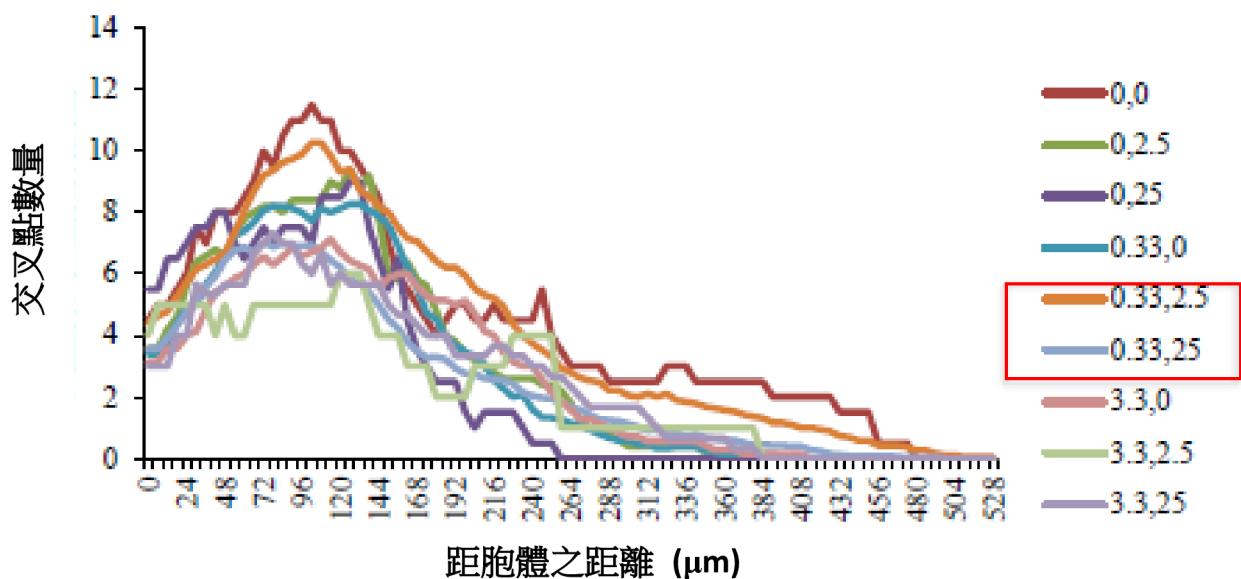


(圖 4)

(a)

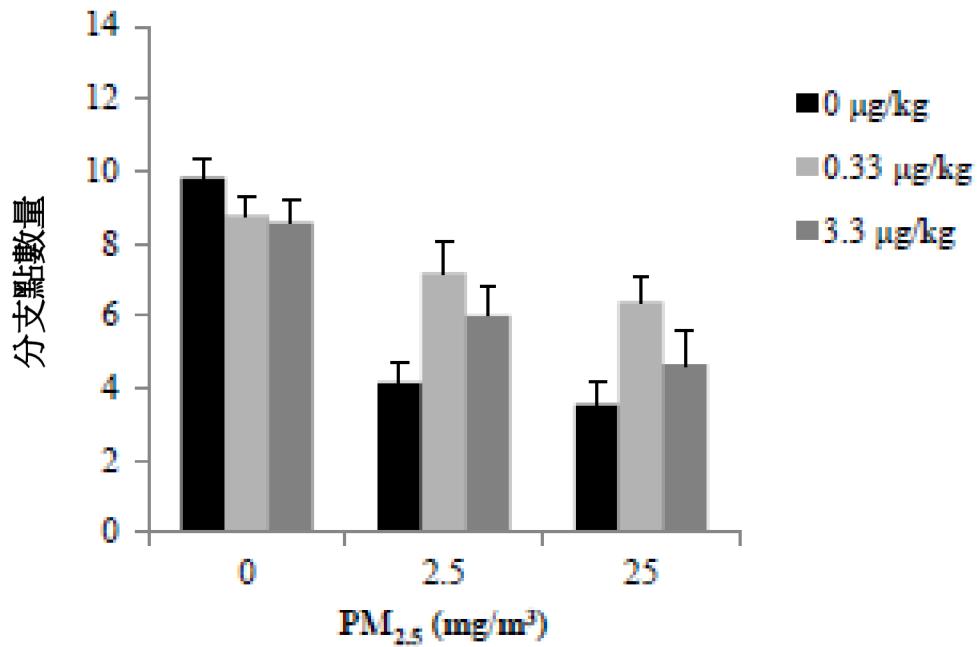


(b)

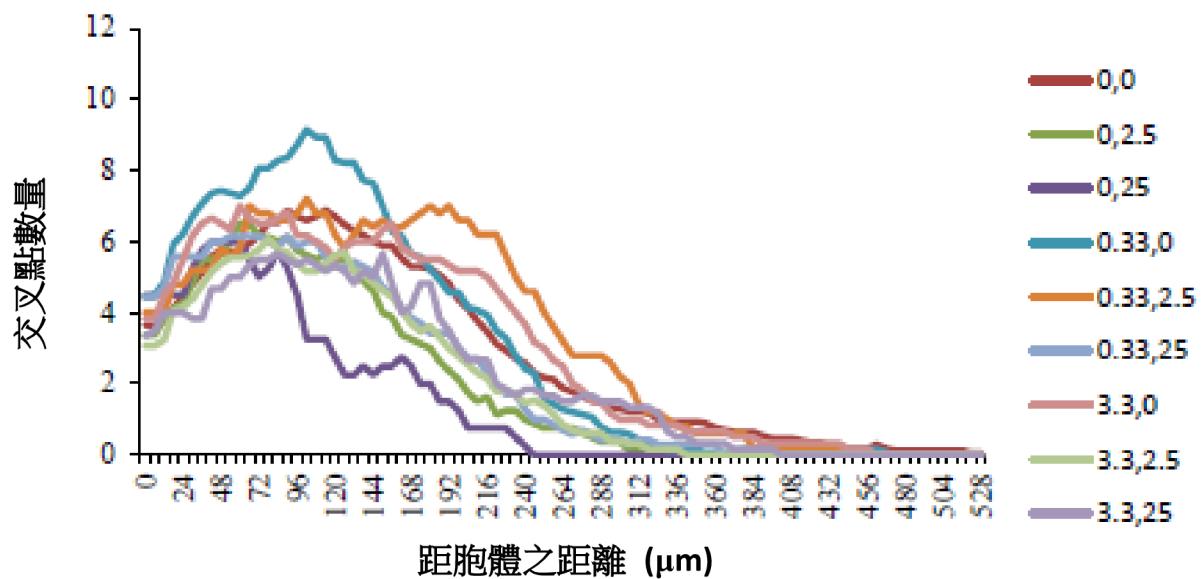


【圖 5】

(c)



(d)



【圖 5】(續)