

【19】中華民國**【12】專利公報 (B)**

【11】證書號數：I859701

【45】公告日：中華民國 113 (2024) 年 10 月 21 日

【51】Int. Cl. : **A61K38/08 (2019.01)** **A61K38/16 (2006.01)**
 A61K36/074 (2006.01) **A61P31/14 (2006.01)**

發明

全 21 頁

【54】名稱：用於減緩及/或治療冠狀病毒疾病之免疫調節蛋白

【21】申請案號：112101453 【22】申請日：中華民國 112 (2023) 年 01 月 12 日

【11】公開編號：202333765 【43】公開日期：中華民國 112 (2023) 年 09 月 01 日

【30】優先權：2022/01/12 美國 63/266,716

【72】發明人：林東毅(TW) LIN, TUNG-YI；葉心(TW) YEH, HSIN；林志虎(TW) LIN, ZHI-HU

【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；朱淑尹；黃裕煦

【56】參考文獻：

網路文獻 Miqdam M. Obaid AL-jumailil, Fahad K. Y. Al-dulaimi, Mohammed A. Ajeel The Role of Ganoderma lucidum Uptake on Some Hematological and Immunological Response in Patients with Coronavirus (COVID-19) Sys Rev Pharm 2020;11(8):537-541
<https://www.sysrevpharm.org/articles/the-role-of-ganoderma-lucidum-uptake-on-some-hematological-and-immunological-response-in-patients-with-coronavirus-covid.pdf>

網路文獻 Ke-Di Shao, Pei-Wen Mao, Qi-Zhang Li, Liu-Ding-Ji Li, Yu-liang Wang and Xuan-Wei Zhou Characterization of a novel fungal immunomodulatory protein, FIP-SJ75 shuffled from Ganoderma lucidum, Flammulina velutipes and Volvariella volvacea FOOD AND AGRICULTURAL IMMUNOLOGY 2019, VOL. 30, NO. 1, 1253-1270 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6423674/>

審查人員：張榮興

【57】申請專利範圍

1. 一種靈芝(*Ganoderma*)免疫調節蛋白、其重組體或其片段之用途，其用於製備緩解及/或治療有需要個體之冠狀病毒疾病的醫藥品，其中：該靈芝免疫調節蛋白或其重組體包含 SEQ ID NO：3 之胺基酸序列；且該靈芝免疫調節蛋白之片段包含選自由 SEQ ID NO：1 至 2 組成之群的胺基酸序列。
2. 如請求項 1 之用途，其中該靈芝免疫調節蛋白、其重組體或其片段係以 1µg/kg 至 100µg/kg 之劑量投與。
3. 如請求項 2 之用途，其中該靈芝免疫調節蛋白、其重組體或其片段係以 2.0µg/kg 至 10µg/kg 之劑量投與。
4. 如請求項 1 之用途，其中該醫藥品抑制該個體中經冠狀病毒誘導之發炎。

(2)

5. 如請求項 4 之用途，其中該抑制冠狀病毒誘導之發炎包含降低血液 NO 含量及/或血液及/或肺中選自由以下組成之群的至少一種細胞介素之含量：IL-6、TNF- α 及 IL-12。
6. 如請求項 4 之用途，其中該醫藥品抑制巨噬細胞中經冠狀病毒包膜蛋白或棘蛋白誘導之發炎及/或減少肺細胞中之膠原蛋白。
7. 如請求項 1 之用途，其中該靈芝免疫調節蛋白、其重組體或其片段係衍生自小孢靈芝 (*Ganoderma microsporum*)。
8. 如請求項 1 之用途，其中該靈芝免疫調節蛋白之重組體包含 SEQ ID NO：4 之胺基酸序列。
9. 如請求項 1 之用途，其中該冠狀病毒疾病係由選自 α -冠狀病毒、 β -冠狀病毒、 γ -冠狀病毒及 δ -冠狀病毒之至少一種冠狀病毒引起。
10. 如請求項 1 之用途，其中該個體為嚴重 COVID-19 個體。
11. 如請求項 1 之用途，其中該醫藥品進一步包含一或多種針對冠狀病毒之另外治療劑或與一或多種針對冠狀病毒之另外治療劑併用。
12. 如請求項 11 之用途，其中該一或多種另外治療劑係在投與該靈芝免疫調節蛋白、其重組體或其片段之前或之後投與或與該靈芝免疫調節蛋白、其重組體或其片段一起共投與。
13. 如請求項 1 之用途，其中該醫藥品縮短因 Covid-19 住院之個體的復原時間，減少呼吸道感染及/或降低死亡率。
14. 如請求項 1 之用途，其中該醫藥品抑制冠狀病毒相關細胞介素風暴及纖維化。
15. 如請求項 1 之用途，其中該靈芝免疫調節蛋白、其重組體或其片段係經口或藉由經鼻噴霧投與。
16. 如請求項 15 之用途，其中該靈芝免疫調節蛋白、其重組體或其片段係藉由吸入器投與至呼吸道以用於局部或全身性治療該冠狀病毒疾病。
17. 如請求項 15 之用途，其中該靈芝免疫調節蛋白、其重組體或其片段係呈大小為 1 μ m 至 10 μ m 之氣霧劑形式。

圖式簡單說明

在參考圖式中說明例示性實施例。本文中所揭示之實施例及圖式意欲視為說明性而非限制性的。

圖 1A 及圖 1B 展示 GMI 對巨噬細胞 Raw264.7 (**圖 1A**)及 MH-S 細胞(**圖 1B**)之存活率的影響。值表示平均值 \pm SD。與對照組相比，展示非顯著差異 (*N.S.*)。

圖 2A 及圖 2B 展示 SARS-CoV-2 次單位對刺激巨噬細胞之發炎反應的作用。**圖 2A** 展示在用 SARS-CoV-2-E 或 S (1 μ g/mL)治療 24 h 之後藉由 Griess 分析測定的巨噬細胞中之 NO 產生。**圖 2B** 展示在用 SARS-CoV-2-E 及 S (1 μ g/mL)治療 24 h 之後藉由 ELISA 測定的巨噬細胞之 IL-6 分泌。LPS (脂多醣；100 ng/mL)為陽性對照。針對對照(僅 LPS 治療)組標準化各 E 或 S 治療組。資料代表三個獨立實驗且呈現為平均值 \pm SD；誤差槓指示 SD。展示顯著差異(與對照/CTL 組相比，* $P < 0.05$ 且*** $P < 0.001$)。與對照組相比，展示非顯著差異(*N.S.*)。

圖 3A 至圖 3D 展示 SARS-CoV-2 次單位對刺激巨噬細胞之發炎反應的作用。**圖 3A 至圖 3D** 分別展示在用 SARS-CoV-2-E 及 S (1 μ g/mL)治療 24 h 之後藉由 ELISA 測定的巨噬細胞中之 TNF- α (**圖 3A**)、IL-12 (**圖 3B**)、IL-1 β (**圖 3C**)及 IFN- γ (**圖 3D**)之產生。LPS (脂多醣；100 ng/mL)為陽性對照。針對對照(僅 LPS 治療)組標準化各 E 或 S 治療組。資料代表三個獨立實驗且呈現為平均值 \pm SD；誤差槓指示 SD。展示顯著差異(與對照/PBS 組相比，*** $P < 0.001$)。

(3)

圖 4A 至圖 4D 展示 GMI 對抑制巨噬細胞之 SARS-CoV-2-E 誘導之發炎的作用。**圖 4A** 展示藉由 Griess 分析測定，在存在或不存在 GMI (0.6 μ M) 之情況下用 SARS-CoV-2-E 或 S (1 μ g/mL) 刺激 24 h 的巨噬細胞中之 NO 產生。**圖 4B 至圖 4D** 分別展示藉由 ELISA 測定，在存在或不存在 GMI (0.6 μ M) 之情況下用 SARS-CoV-2-E 或 S (1 μ g/mL) 刺激 24 h 的巨噬細胞中之 IL-6 (**圖 4B**)、TNF- α (**圖 4C**) 及 IL-12 (**圖 4D**) 之產生。LPS (脂多醣; 100 ng/mL) 為陽性對照。針對對照(僅 LPS 治療)組標準化各 GMI 治療組。資料代表三個獨立實驗且呈現為平均值 \pm SD; 誤差槓指示 SD。展示顯著差異(與對照組相比, *** $P < 0.001$)。

圖 5A 至圖 5D 展示 GMI 對以濃度依賴性方式抑制巨噬細胞之 SARS-CoV-2-E 誘導之發炎的作用。**圖 5A** 展示藉由 Griess 分析測定，在存在或不存在 GMI (0-1.2 μ M) 之情況下用 SARS-CoV-2-E 或 S (1 μ g/mL) 刺激 24 h 的巨噬細胞中之 NO 產生。**圖 5B 至圖 5D** 分別展示藉由 ELISA 測定，在存在或不存在 GMI (0-1.2 μ M) 之情況下用 SARS-CoV-2-E 或 S (1 μ g/mL) 刺激 24 h 的巨噬細胞中之 IL-6 (**圖 5B**)、TNF- α (**圖 5C**) 及 IL-12 (**圖 5D**) 之產生。LPS (脂多醣; 100 ng/mL) 為陽性對照。針對對照(僅 LPS 治療)組標準化各 GMI 治療組。資料代表三個獨立實驗且呈現為平均值 \pm SD; 誤差槓指示 SD。展示顯著差異(與對照組相比, * $P < 0.05$ 且 *** $P < 0.001$)。

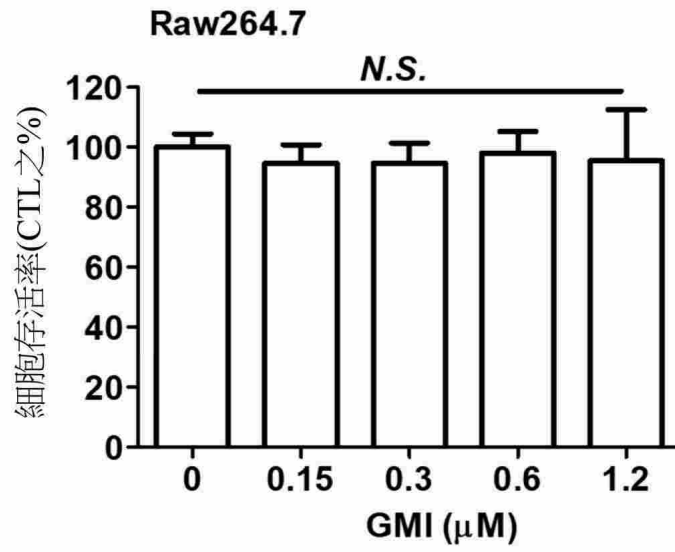
圖 6A 及圖 6B 展示 GMI 對抑制巨噬細胞中之 SARS-CoV-2-E 誘導之 iNOS 及 COX-2 的作用。**圖 6A 及圖 6B** 分別展示藉由西方墨點法(Western blot) (其中肌動蛋白用作內部對照)測定，用 GMI (0.6 μ M) 治療 3 h，隨後用 SARS-CoV-2-E (1 μ g/mL) 刺激另外 24 h 的巨噬細胞中之 iNOS (**圖 6A**) 蛋白質及 COX-2 蛋白質(**圖 6B**) 之表現。

圖 7A 至圖 7C 展示 GMI 對人類巨噬細胞之存活率及人類巨噬細胞中之 IL-6 產生的影響。**圖 7A** 展示藉由 MTT 分析測定，用 GMI (0-1.2 μ M) 治療 24 h 的 PMA 誘導之 THP-1 細胞之存活率。**圖 7B** 展示藉由 MTT 分析測定，用 GMI (0-1.2 μ M) 及 SARS-CoV-2-E (1 μ g/mL) 治療 24 h 的 PMA 誘導之 THP-1 細胞之存活率。**圖 7C** 展示藉由 ELISA 測定，用 GMI (0-1.2 μ M) 及 SARS-CoV-2-E (1 μ g/mL) 治療 24 h 的 PMA 誘導之 THP-1 細胞之 IL-6 產生。資料代表三個獨立實驗且呈現為平均值 \pm SD; 誤差指示 SD。展示顯著差異(與對照組相比, ** $P < 0.01$)。

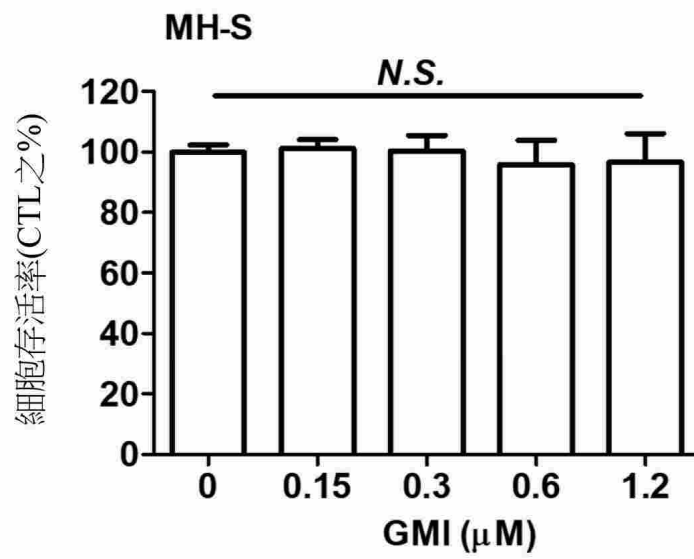
圖 8 展示 GMI 對肺成纖維細胞 WI38-2RA 及 MRC-5 細胞中之膠原蛋白表現的影響。將肺成纖維細胞 WI38-2RA 及 MRC-5 細胞用 GMI (0-0.6 μ M) 處理 48 h。藉由西方墨點法測定膠原蛋白 I (COLA1) 表現。

圖 9A 至圖 9C 展示 GMI 對活體內 IL-6 產生之影響。**圖 9A** 展示在存在或不存在 SARS-CoV-2-E (20 μ g/mL) 之情況下藉由吸入方法接受 GMI (100 μ g/mL) 之小鼠的流程。**圖 9B 及圖 9C** 分別展示在暴露於 GMI 及/或 SARS-CoV-2-E 持續 6 h 或 24 h 之後肺組織(**圖 9B**) 及血清(**圖 9C**) 中之 IL-6 產生。資料代表三個獨立實驗且呈現為平均值 \pm SD; 誤差槓指示 SD。展示顯著差異(與對照組相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 且 *** $P < 0.001$, 且與 SARS-CoV-2 個別治療組相比, # $P < 0.05$ 及 ### $P < 0.001$)。

(4)

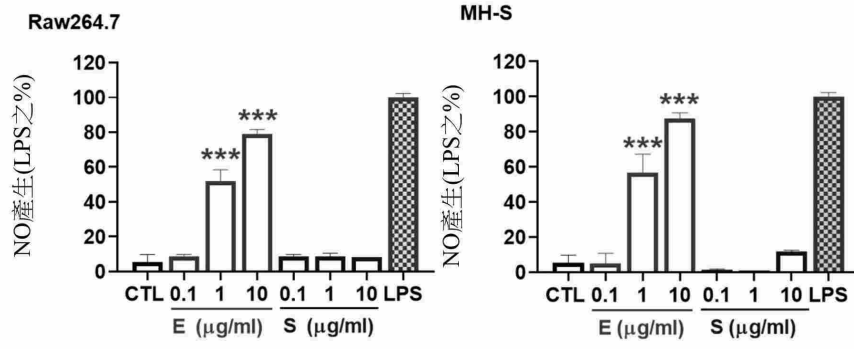


【圖1A】

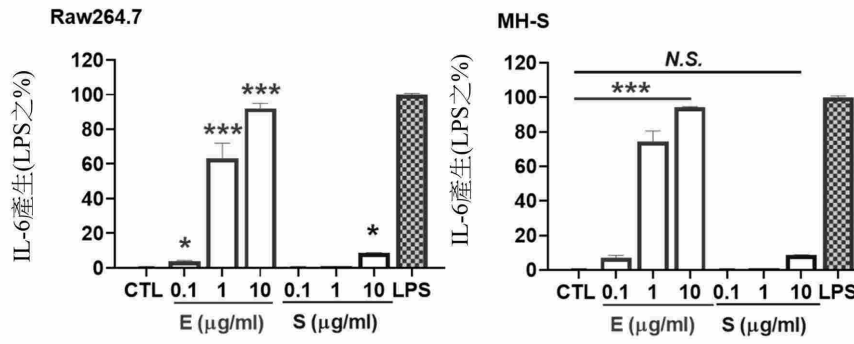


【圖1B】

(5)

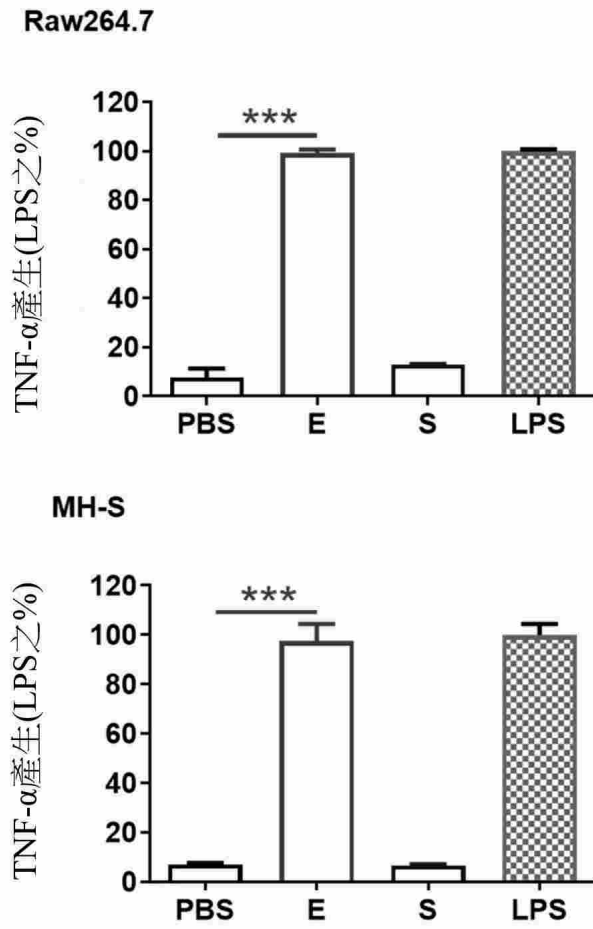


【圖2A】



【圖2B】

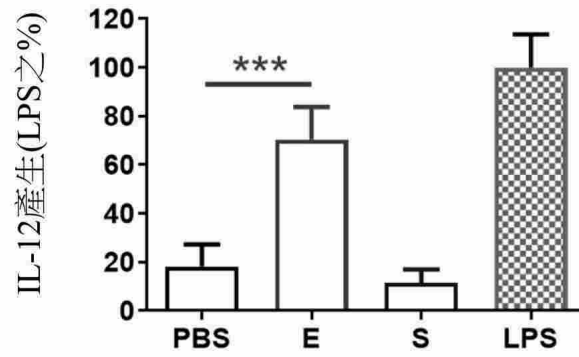
(6)



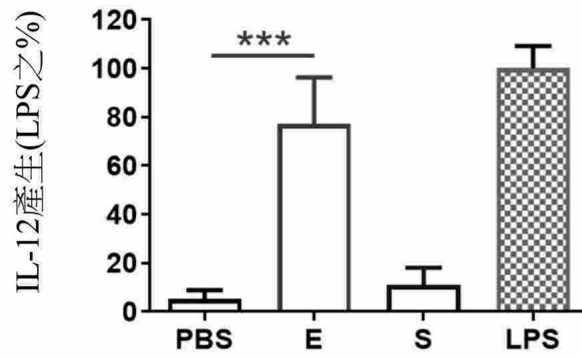
【圖3A】

(7)

Raw264.7

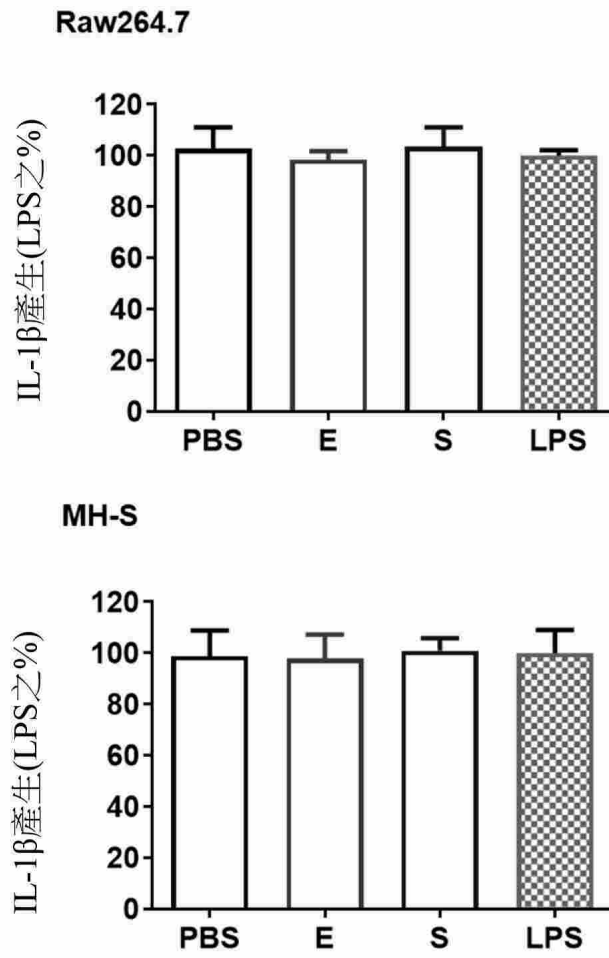


MH-S



【圖3B】

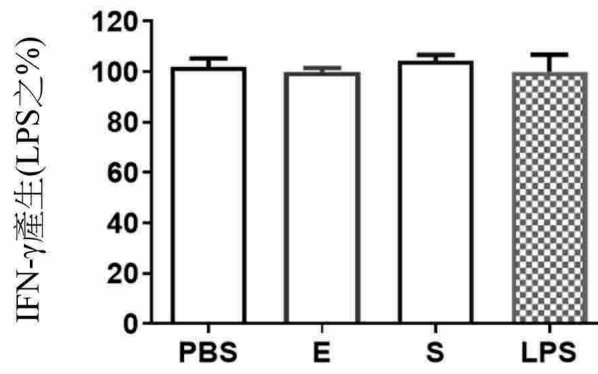
(8)



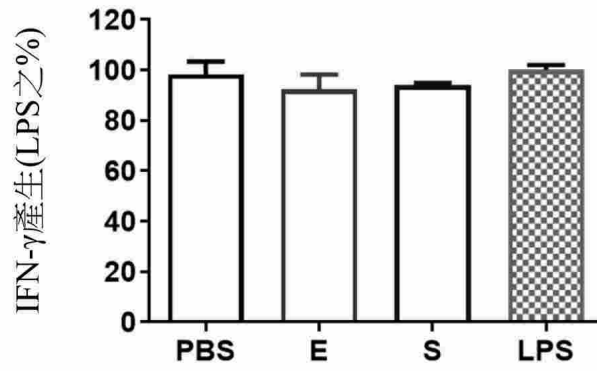
【圖3C】

(9)

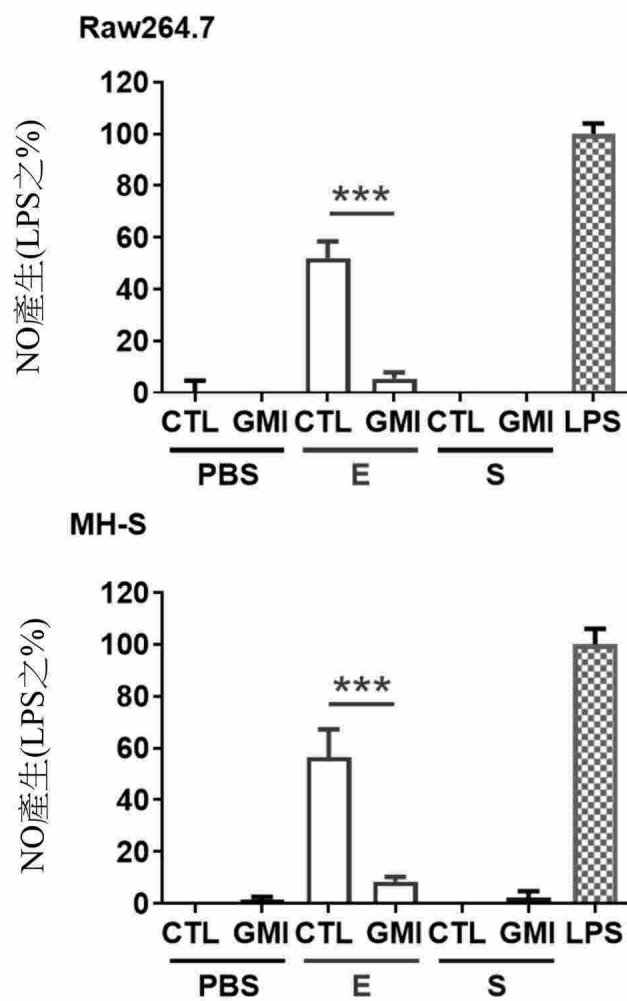
Raw264.7



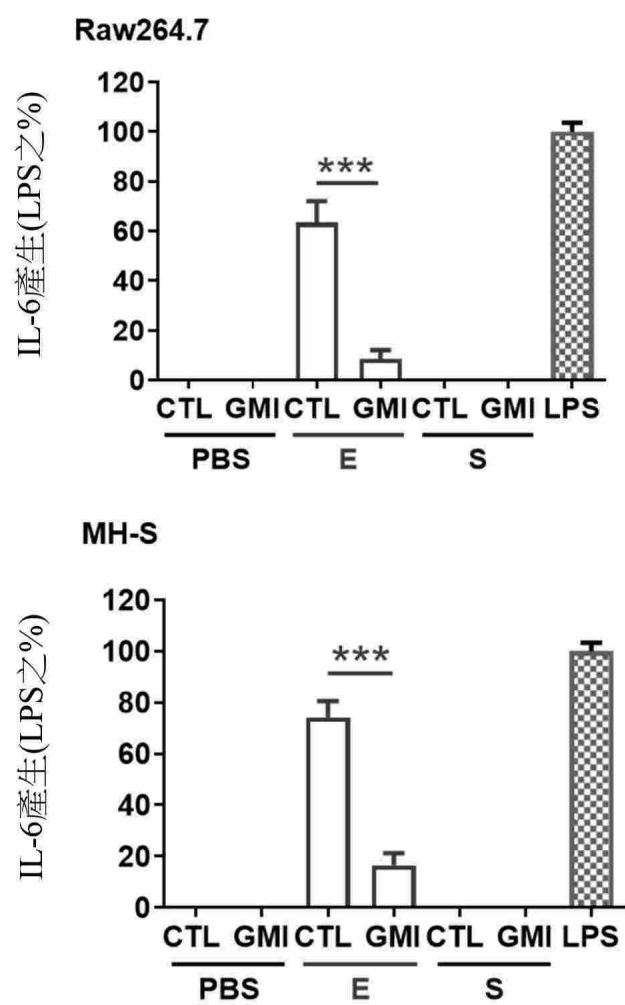
MH-S



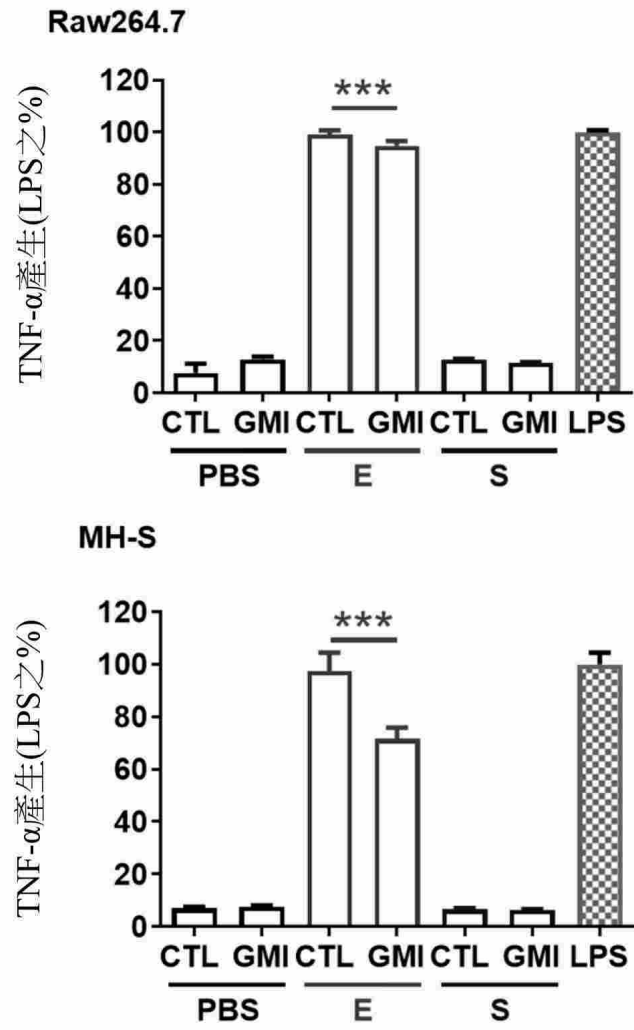
【圖3D】



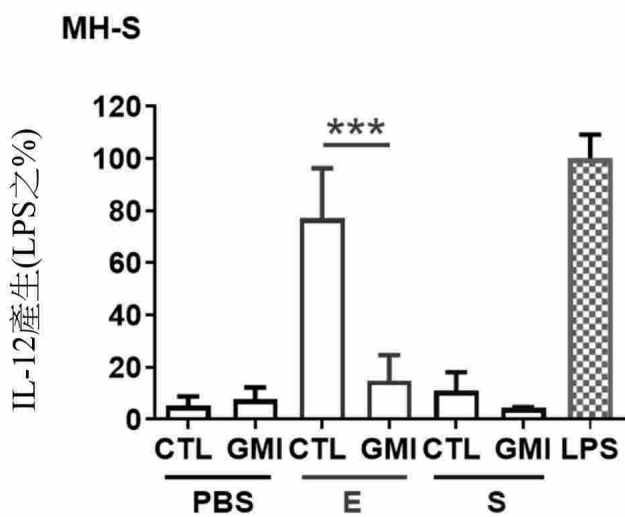
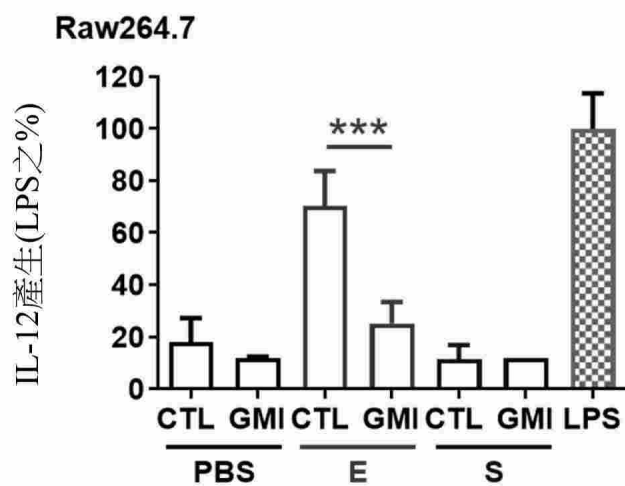
【圖4A】



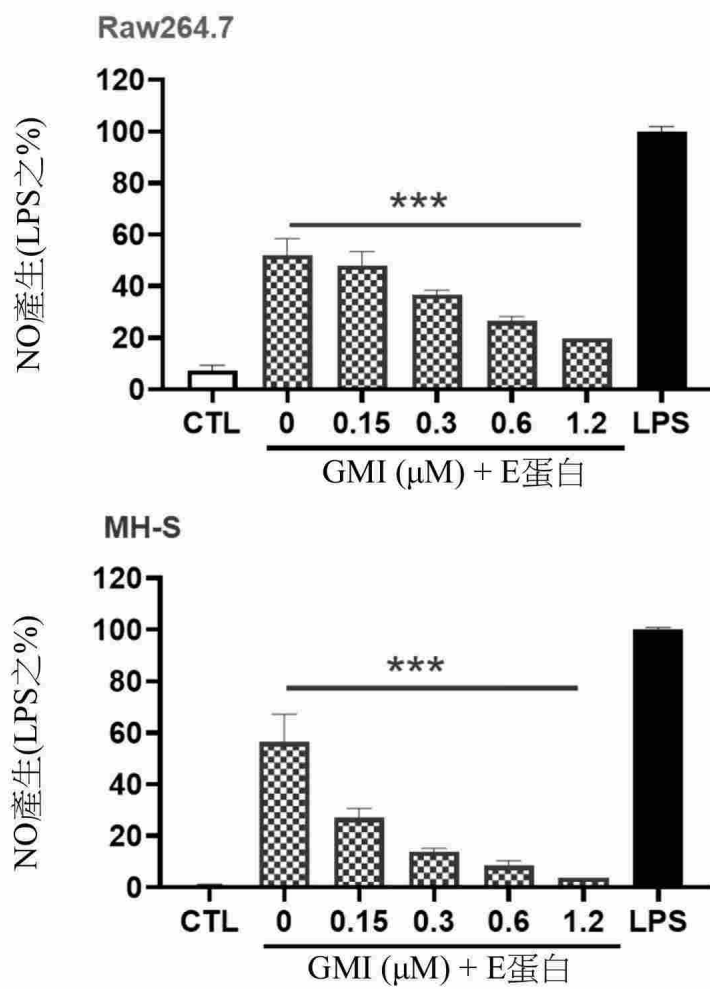
【圖4B】



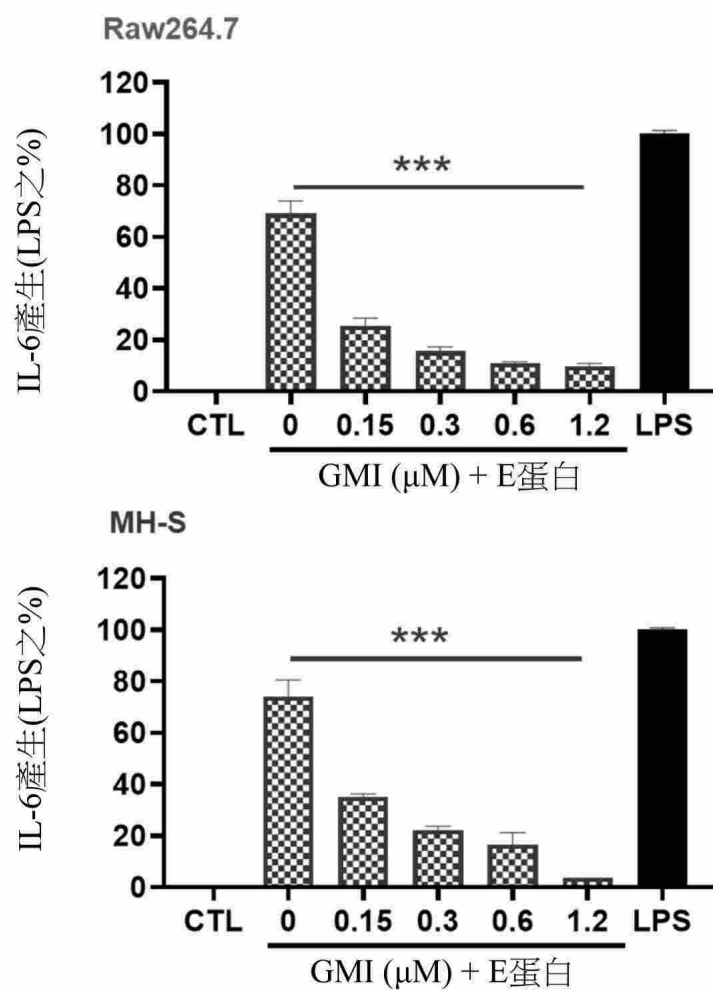
【圖4C】



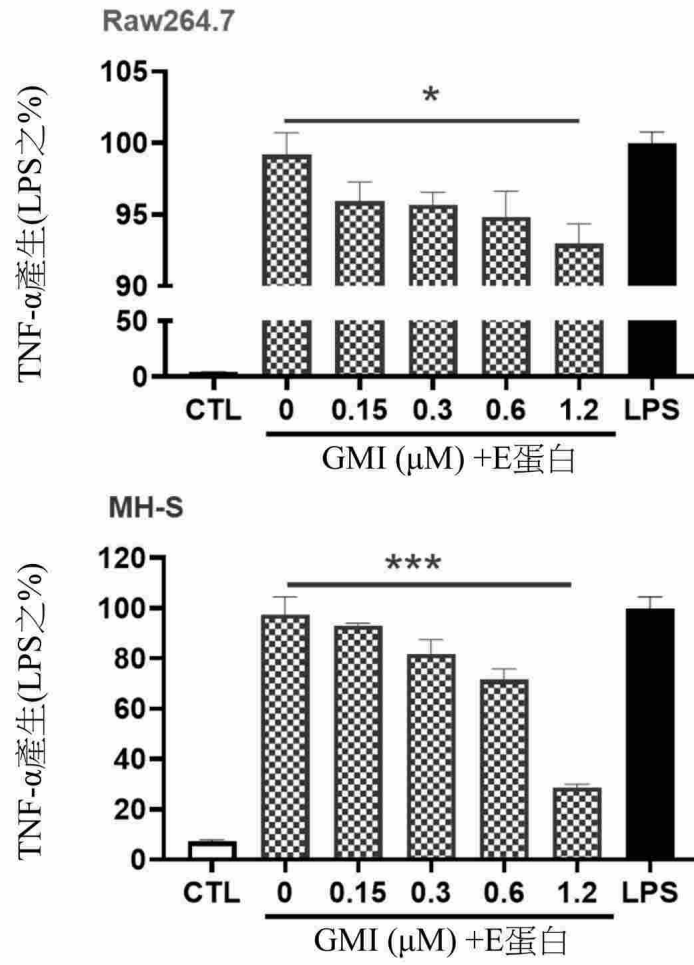
【圖4D】



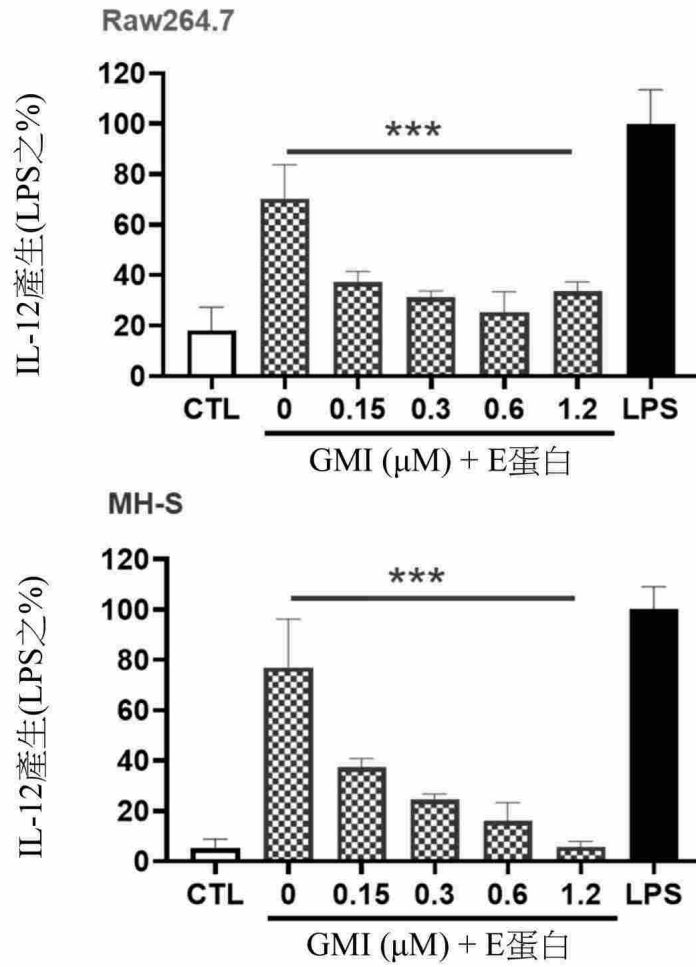
【圖5A】



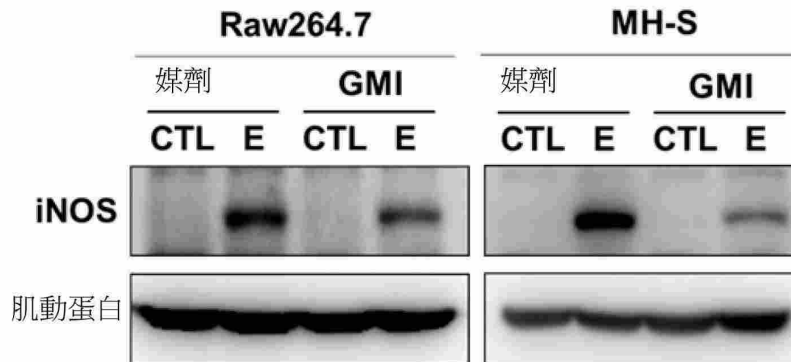
【圖5B】



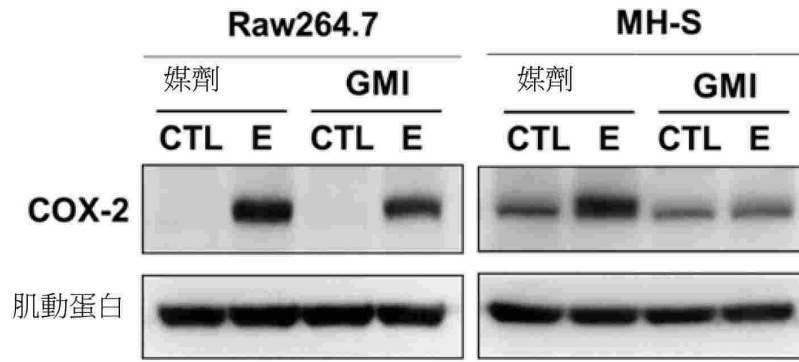
【圖5C】



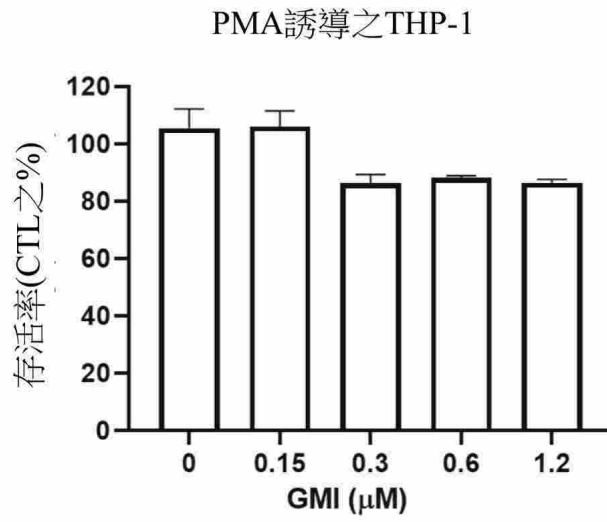
【圖5D】



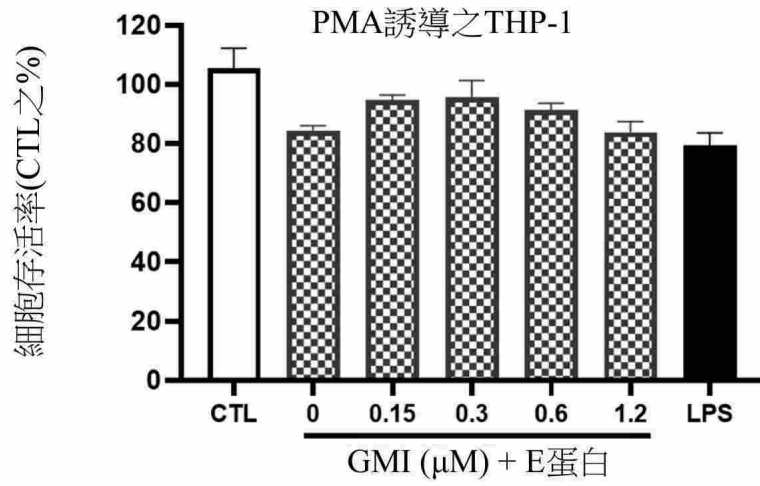
【圖6A】



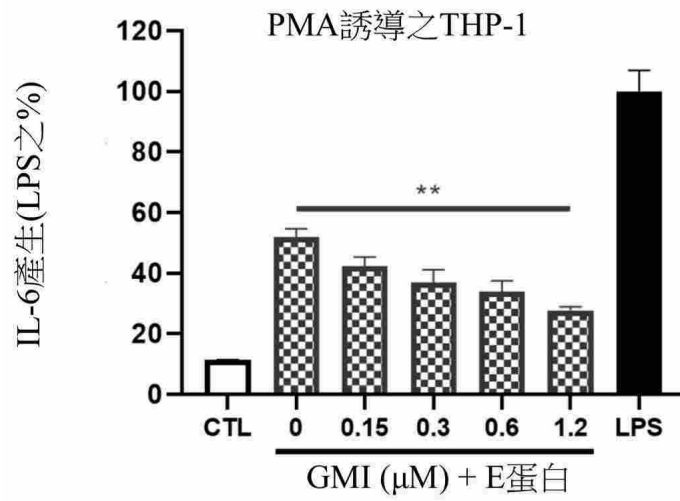
【圖6B】



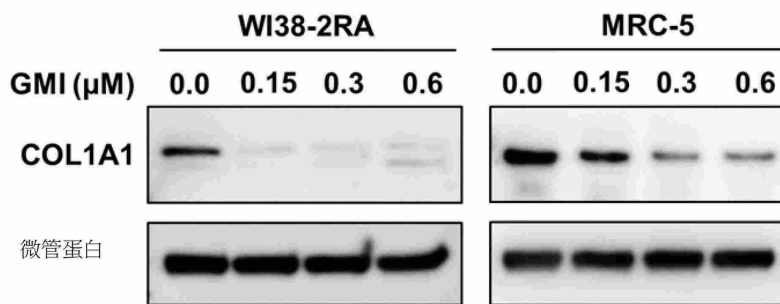
【圖7A】



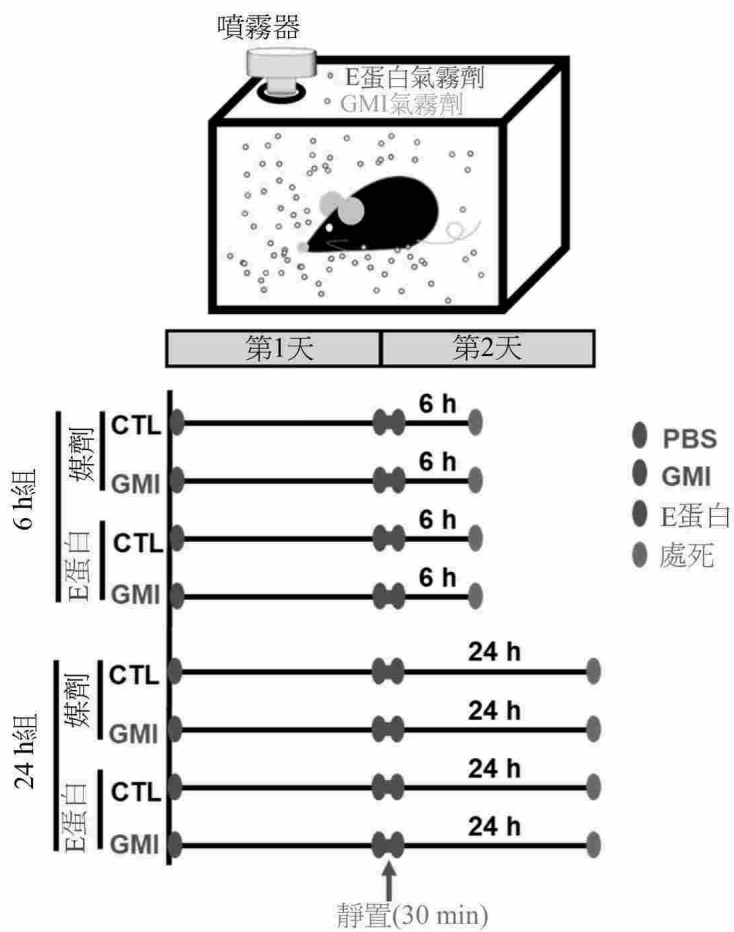
【圖7B】



【圖7C】

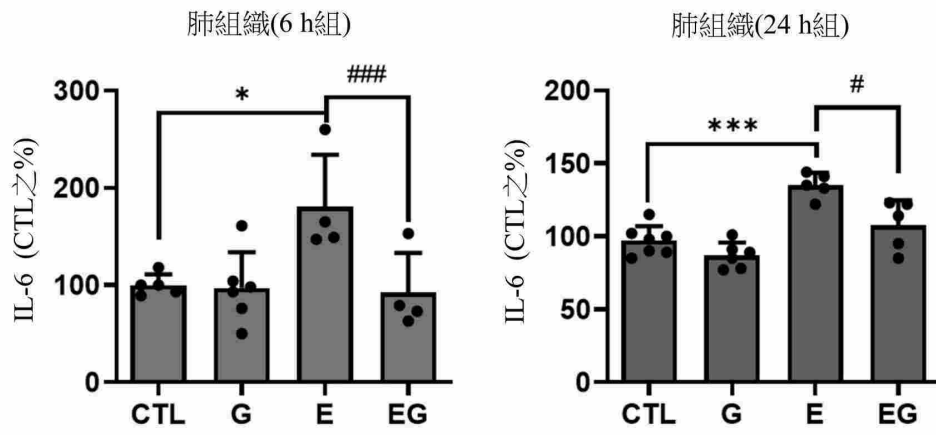


【圖8】

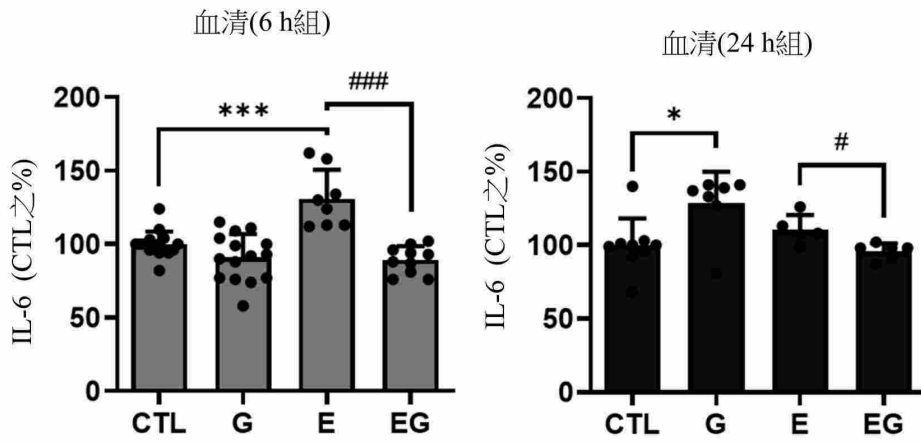


【圖9A】

(21)



【圖9B】



【圖9C】