

【11】證書號數：I414307

【45】公告日：中華民國 102 (2013) 年 11 月 11 日

【51】Int. Cl. : A61K38/10 (2006.01) A61K38/16 (2006.01)
A61P35/00 (2006.01)

發明

全 9 頁

【54】名稱：小孢子靈芝免疫調節蛋白 (GMI) 之新用途
NEW USES OF AN IMMUNOMODULATORY PROTEIN (GMI) FROM
GANODERMA MICROSPORUM

【21】申請案號：099142868

【22】申請日：中華民國 99 (2010) 年 12 月 08 日

【11】公開編號：201200149

【43】公開日期：中華民國 101 (2012) 年 01 月 01 日

【30】優先權：2010/06/29

美國

12/826,230

【72】發明人：柯俊良 (TW) KO, JUNN LIANG

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

新北市深坑區北深路 3 段 270 巷 12 號 8 樓之 1

【74】代理人：陳長文

【56】參考文獻：

TW 200726775B

審查人員：吳秀中

[57]申請專利範圍

1. 一種小孢子靈芝(*Ganoderma microsporum*)免疫調節蛋白(GMI)或其重組物於製備抑制癌細胞中 EGF 受體活性之藥劑之用途，其中該 GMI 具有(1) -Leu-Ala-Trp-Asn-Val-Lys-(LAWNVK ; SEQ ID NO : 1)及(2) -Asp-Leu-Gly-Val-Arg-Pro-Ser-Tyr-Ala-Val-(DLGVRPSYAV ; SEQ ID NO : 2)之胺基酸序列或具有如
MSDTALIFTLAWNPKQLAFDYTPNWGRGRPSSFIDTVTFPTVLTDKAYTYRVVVS
DLGVRPSYAVESDGSQKINFLEYNSGYGIADTNTIQVYVIDPDTGNNFIVAQWN(SEQ ID NO : 3)之胺基酸序列。
2. 一種小孢子靈芝免疫調節蛋白(GMI)於製備治療 EGF 受體活性介導之癌細胞侵襲和轉移之藥劑之用途，其中該 GMI 具有(1) -Leu-Ala-Trp-Asn-Val-Lys-(LAWNVK ; SEQ ID NO : 1)及(2) -Asp-Leu-Gly-Val-Arg-Pro-Ser-Tyr-Ala-Val-(DLGVRPSYAV ; SEQ ID NO : 2)之胺基酸序列或具有如
MSDTALIFTLAWNPKQLAFDYTPNWGRGRPSSFIDTVTFPTVLTDKAYTYRVVVS
DLGVRPSYAVESDGSQKINFLEYNSGYGIADTNTIQVYVIDPDTGNNFIVAQWN(SEQ ID NO : 3)之胺基酸序列。
3. 如請求項 2 之用途，其中該癌細胞係來自肺癌、肺，頭和頸之鱗狀細胞癌、乳癌膀胱癌、腦癌、肝癌或大腸癌。
4. 如請求項 3 之用途，其中該肺癌為非小細胞肺癌(NSCLC)。
5. 如請求項 2 之用途，其中該 GMI 係以非經腸給藥。
6. 如請求項 2 之用途，其中該 GMI 係以口服或直腸給藥。
7. 如請求項 2 之用途，其中該 GMI 係用於癌症化學預防。
8. 如請求項 2 之用途，其中該 GMI 可與放射性治療和化療組合給藥。

(2)

9. 如請求項 2 之用途，其中該 GMI 可進一步與一抗癌劑同時、連續或分開投予。
10. 如請求項 9 之用途，其中該癌細胞係來自肺癌、肺，頭和頸之鱗狀細胞癌、乳癌、膀胱癌、腦癌、肝癌或大腸癌。
11. 如請求項 10 之用途，其中該肺癌為非小細胞肺癌(NSCLC)。
12. 如請求項 9 之用途，其中該抗癌劑係由下列各物組成之群中選出：順鉑(cisplatin)吉西他濱(gemcitabine)；碘阿黴素(iododoxorubicin)；奧馬鉑(ormaplatin)；奧沙利鉑(oxaliplatin)；鉑錯合物；鉑化合物；鉑-三胺錯合物；長春瑞濱(vinorelbine)；折尼鉑(zeniplatin)；吉非替尼(gefitinib)、拉帕替尼(lapatinib)及厄洛替尼(erlotinib)。
13. 一種醫藥組成物，其包括小孢子靈芝(*Ganoderma microsporum*) 免疫調節蛋白(GMI)或其重組物及一抗癌劑；其中該 GMI 具有(1) -Leu-Ala-Trp-Asn-Val-Lys-(LAWNVK；SEQ ID NO：1)及(2) -Asp-Leu-Gly-Val-Arg-Pro-Ser-Tyr-Ala-Val-(DLGVRPSYAV；SEQ ID NO：2)之胺基酸序列或具有如
MSDTALIFTLAWNVKQLAFDYTPNWGRGRPSSFIDTVTFPTVLTDKAYTYRVVVSGK
DLGVRPSYAVESD GSQKINFLEYNSGYGIADTNTIQVYVIDPDTGNNFIVAQWN(SEQ
ID NO：3)之胺基酸序列；及其中該抗癌劑係由下列各物組成之群中選出：順鉑(cisplatin) 吉西他濱(gemcitabine)；碘阿黴素(iododoxorubicin)；奧馬鉑(ormaplatin)；奧沙利鉑(oxaliplatin)；鉑錯合物；鉑化合物；鉑-三胺錯合物；長春瑞濱(vinorelbine)；折尼鉑(zeniplatin)；吉非替尼(gefitinib)、拉帕替尼(lapatinib)及厄洛替尼(erlotinib)。

圖式簡單說明

圖 1 係顯示 GMI 和 AG1478 抑制 A549 細胞之癌細胞遷移。A549 細胞(1.2×10^5 細胞/24 孔)係以劑量增加的 GMI(2、4、8 $\mu\text{g/ml}$)處理 24 h。進行傷口癒合分析以評估(A)GMI 或(B) AG1478 對 A549 細胞遷移之抑制效應。將全滿的 A549 單層細胞劃出缺痕，及以(A)GMI 或(B)AG1478 處理 24 h 後，以顯微鏡監看修復狀況。以虛線作為計時起點，計算遷移到傷口區域的細胞。

圖 2 係顯示 GMI 抑制 EGF-引起的 A549 細胞侵襲。將 A549 細胞(2×10^4 細胞/孔)植入膜的上層並以不同濃度的 GMI(4、8、16 $\mu\text{g/ml}$)處理 2 小時。下層填入添加 10 ng/ml 或 100 ng/ml EGF 之 DMEM。約 24 h 後，侵入的 A549 細胞通過該膜，並計算遷移至膜上的細胞來定量。將細胞固定、染色及如文中所述計數。數據係以平均值 \pm SD 表示。

圖 3 係顯示 GMI 對 A549 細胞訊號傳導路徑之效應。將 A54 細胞(5×10^5 細胞/60 mm)以各種濃度的 GMI(4、16 $\mu\text{g/ml}$)或 AG1478(EGFR 抑制劑)預處理 8 小時，之後以 EGF(如所示)培養 10 分鐘。將細胞裂解液以磷酸化-專一性 EGFR(Y1068)(A 和 B)、抗-磷酸化-AKT(A)、抗-AKT(A)、抗-磷酸化-GSK3 β (A)或抗-磷酸化-STAT3 抗體(B)進行免疫印跡。以西方墨點抗 β -肌動蛋白(A 和 B)測定蛋白裝填。

圖 4 係顯示 GMI、PI3K 抑制劑和 EGFR 抑制劑對 EGF-引發的 A549 細胞侵襲之效應。將 EGF(10 ng/ml)塗覆在下層作為趨化劑。將經無血清培養的細胞(2×10^4 細胞/孔)種入由塗覆基質膠基(Matrigel)底膜基質之 8- μm 孔徑的過濾器所組成的上層，及然後以 8 $\mu\text{g/ml}$ GMI、50 μM Ly294002(PI3K 抑制劑)或 2 μM AG1478(EGFR 抑制劑)培養 24 h。於光顯微鏡下計算侵襲膜下表面之細胞。數據係以平均值 \pm SD 表示。

圖 5 係顯示 GMI 抑制 EGF-引起的 Cdc42 活化。將 A549 細胞種入 100 mm 盤並培養至約 80%的滿度。然後將細胞以各種劑量的 GMI(4、16 $\mu\text{g/ml}$)處理。GMI 抑制了 Cdc42 活化，但對 Rac1 僅具極小效用。將 A549 細胞以各種濃度的 GMI 預處理 24 h，之後以 10 ng/mL EGF 刺激 3 分鐘。之後，將細胞以冷的 PBS 清洗並置於 RIPA 緩衝液盤中裂解。使用固定在麩胱

(3)

甘肽微珠上之 PAK1 的 GST-PBD 融合蛋白沉降活化的 GTP-結合 Rac1 或 Cdc42 並以抗-Rac1 和抗-Cdc42 抗體偵測活化的 Rac1 和 Cdc42。

圖 6 係顯示 GMI 對 EGF-引發的 F-肌動蛋白/G-肌動蛋白比例和絲狀偽足(filopodia)形成之效應。將 A549 細胞(1×10^4 細胞/孔)種入附蓋的 24 孔盤中。將 A549 細胞以各種濃度的 GMI (2、4、8 $\mu\text{g/ml}$)預處理 1 h，之後以 10 ng/mL EGF 刺激 23 h。將有或無經 EGF 處理的 A549 細胞以 Texas Red®-X 鬼筆環肽(phalloidin)和 Alexa Fluor 488 DNase I 結合物染色以偵測 F-肌動蛋白(紅色)和 G-肌動蛋白(綠色)。以 Texas Red®-X 鬼筆環肽標定的 F-肌動蛋白顯示，A549 細胞出現許多絲狀偽足，而經 GMI-處理的細胞則出現較少的絲狀偽足纖維。

圖 7 係顯示順鉑和 GMI 共處理對 CaLu-1 細胞存活力之效應。

圖 1A

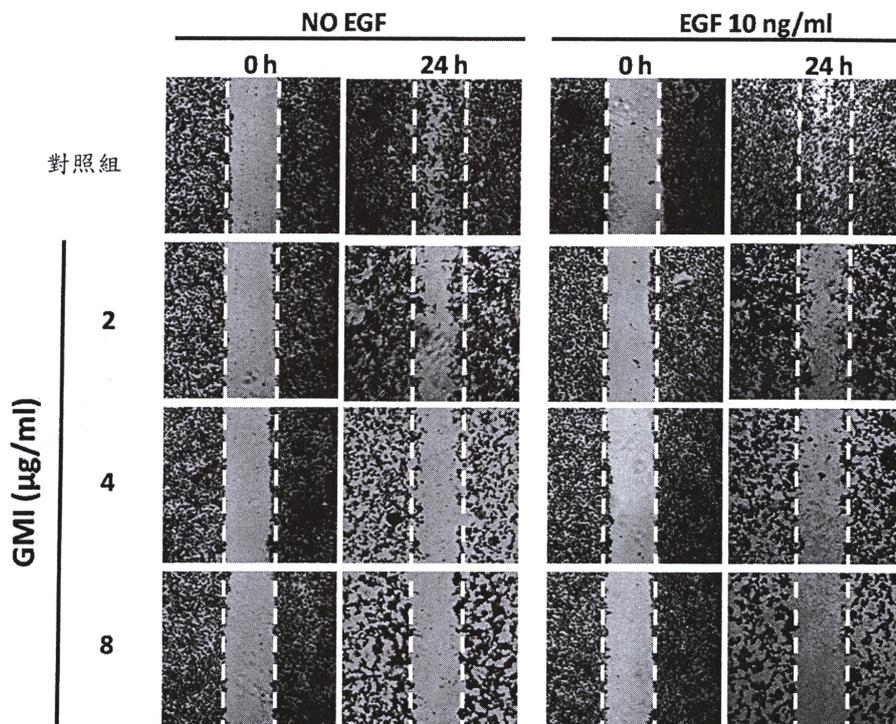


圖 1

(4)

圖 1B

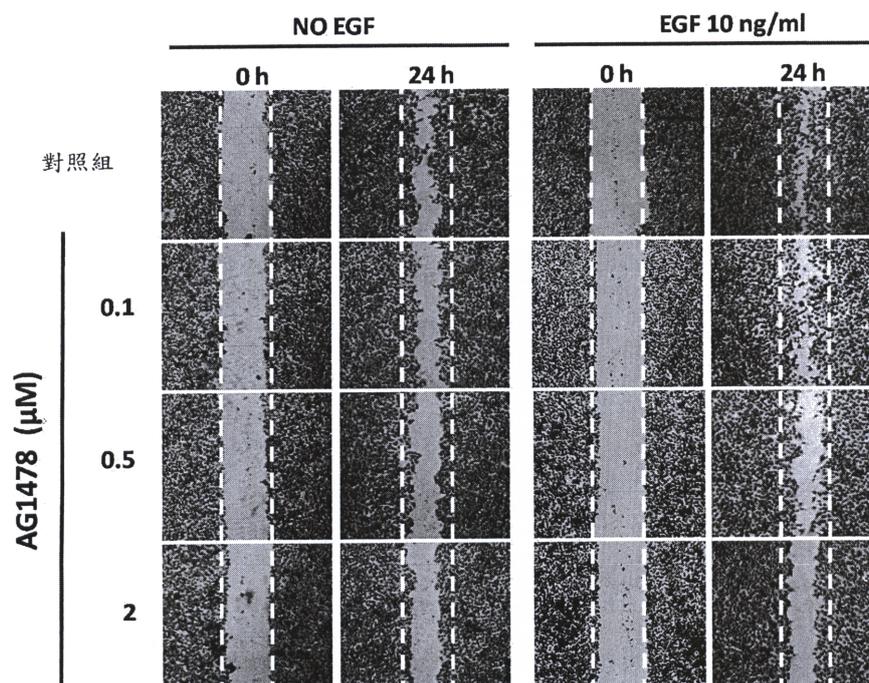


圖 1

(5)

圖 2A

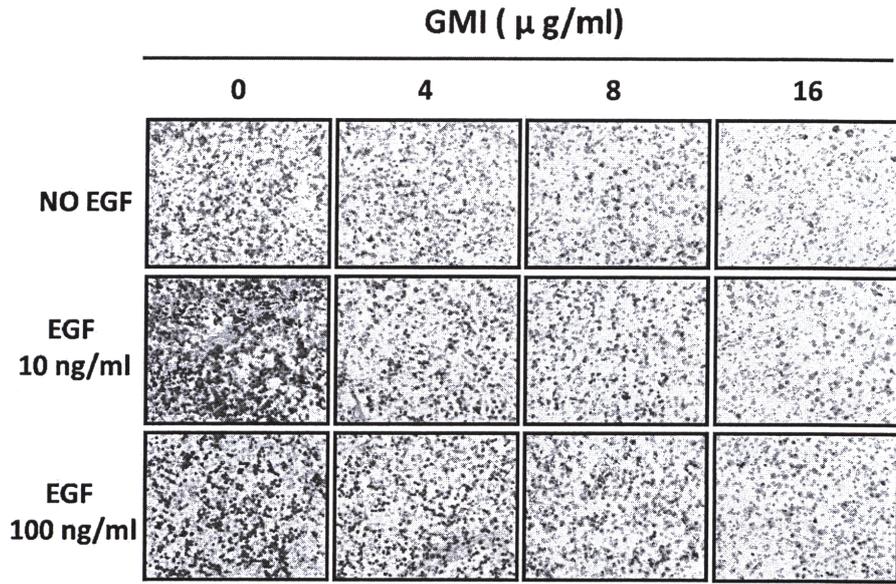


圖 2

圖 2B

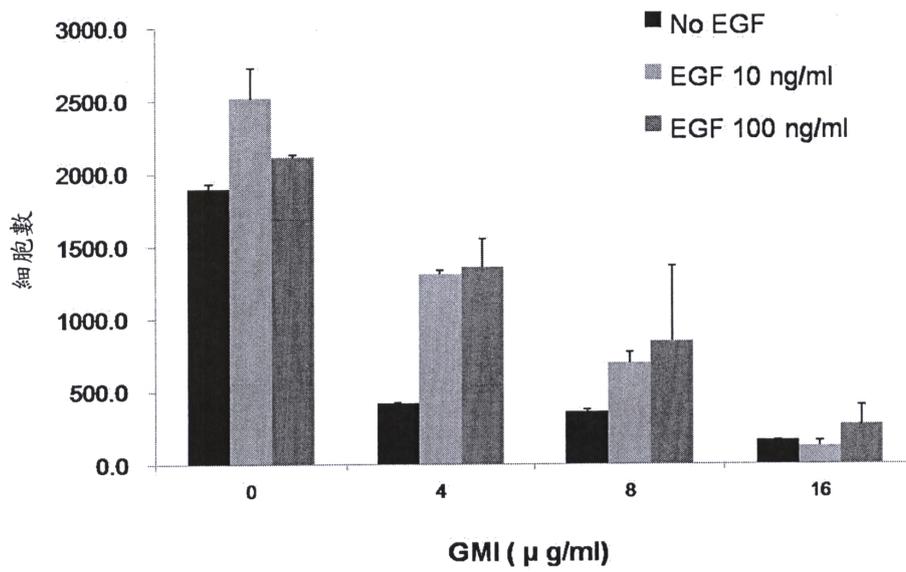


圖 2

(6)

圖 3A

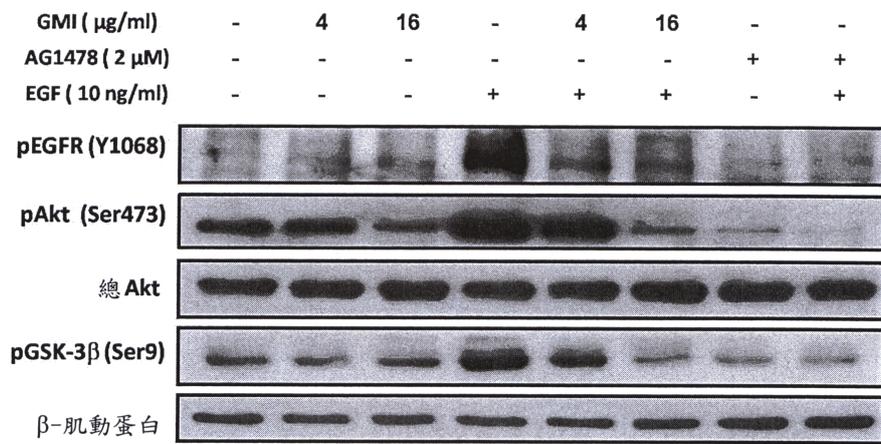


圖 3

圖 3B

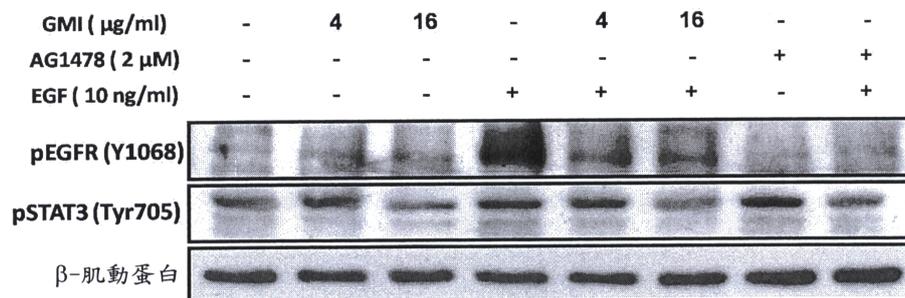


圖 3

(7)

圖 4A

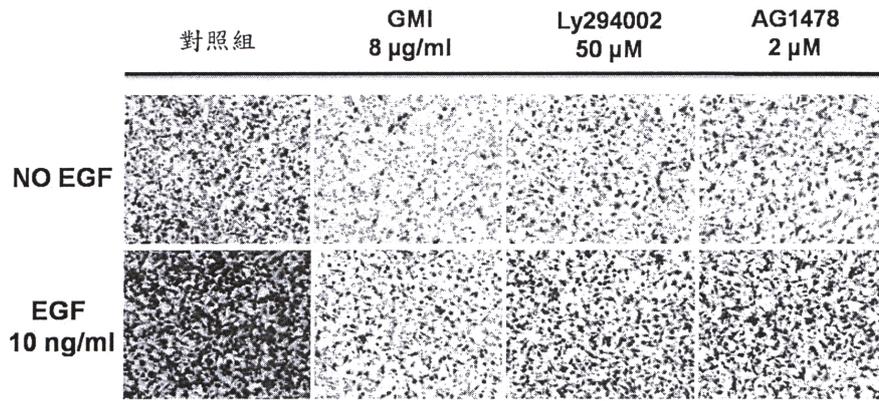


圖 4

圖 4B

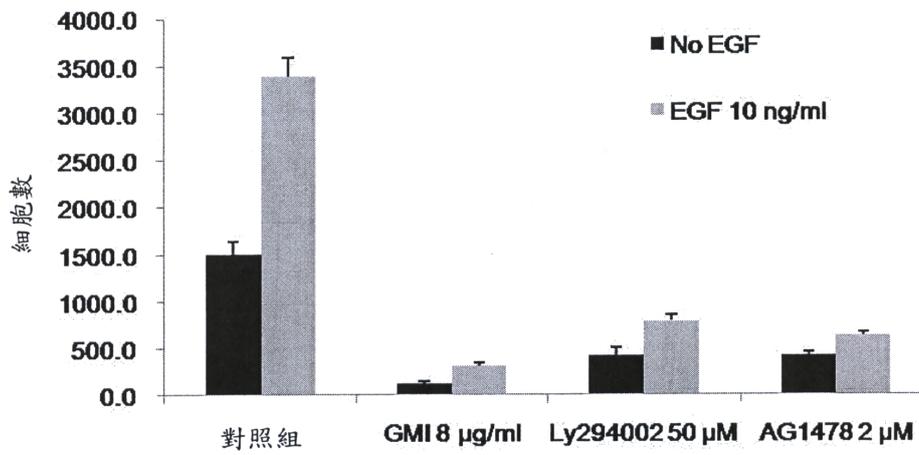


圖 4

(8)

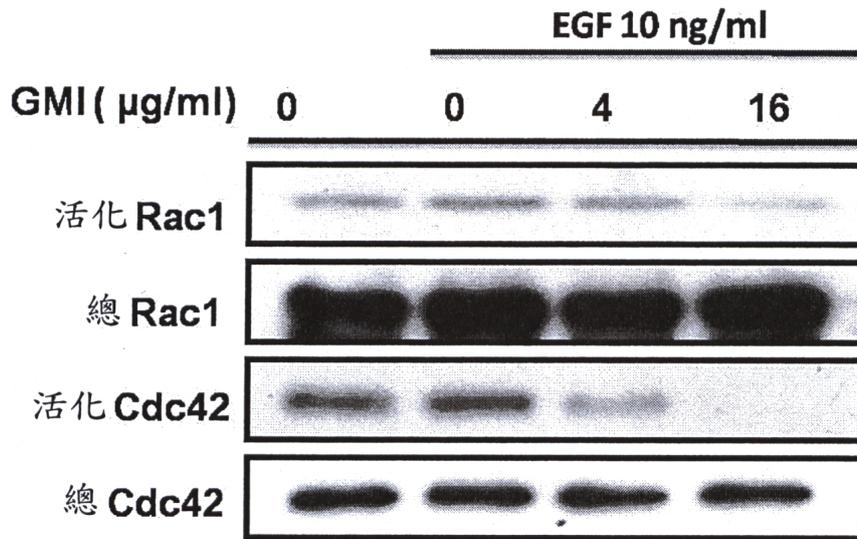


圖 5

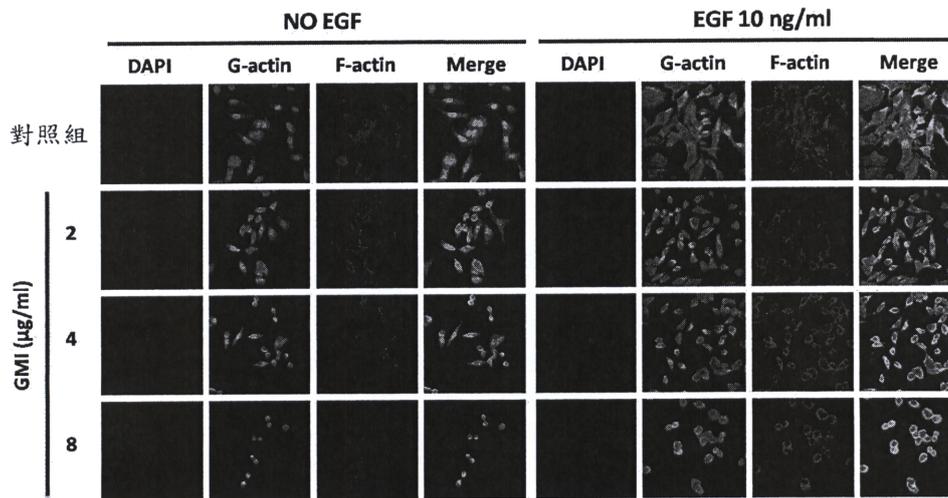


圖 6

(9)

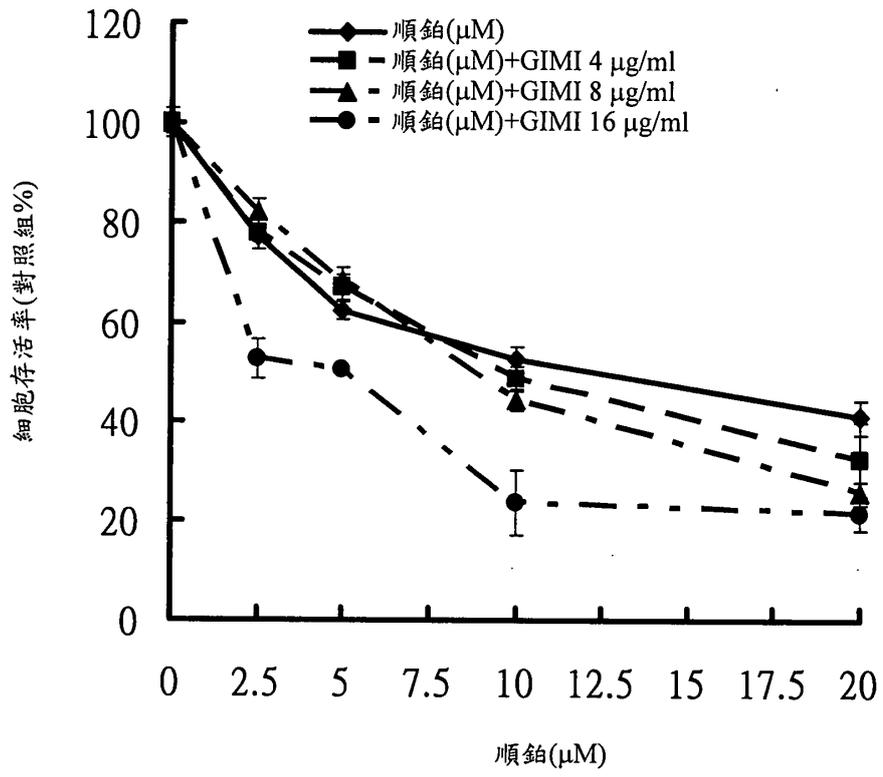


圖 7