



(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 201410253 A

(43) 公開日：中華民國 103 (2014) 年 03 月 16 日

(21) 申請案號：101133908

(22) 申請日：中華民國 101 (2012) 年 09 月 14 日

(51) Int. Cl. : *A61K38/16 (2006.01)* *C07K14/375 (2006.01)*
 A61P1/16 (2006.01) *A61P17/02 (2006.01)*

(71) 申請人：臺北醫學大學 (中華民國) TAIPEI MEDICAL UNIVERSITY (TW)
 臺北市信義區吳興街 250 號

(72) 發明人：歐耿良 OV, KENG LIANG (TW)；張榮善 CHANG, JUNGSHAN (TW)

(74) 代理人：陳長文

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：19 項 圖式數：8 共 31 頁

(54) 名稱

免疫調節蛋白於促進傷口癒合或組織損傷治療的用途

USE OF IMMUNOMODULATORY PROTEIN IN PROMOTION OF WOUND HEALING OR
TREATMENT OF TISSUE INJURY

(57) 摘要

本發明提供一種在有需要的個體促進傷口癒合或治療組織損傷的方法，該方法包括投予個體有效量的一或多種靈芝(Ganoderma)免疫調節蛋白。

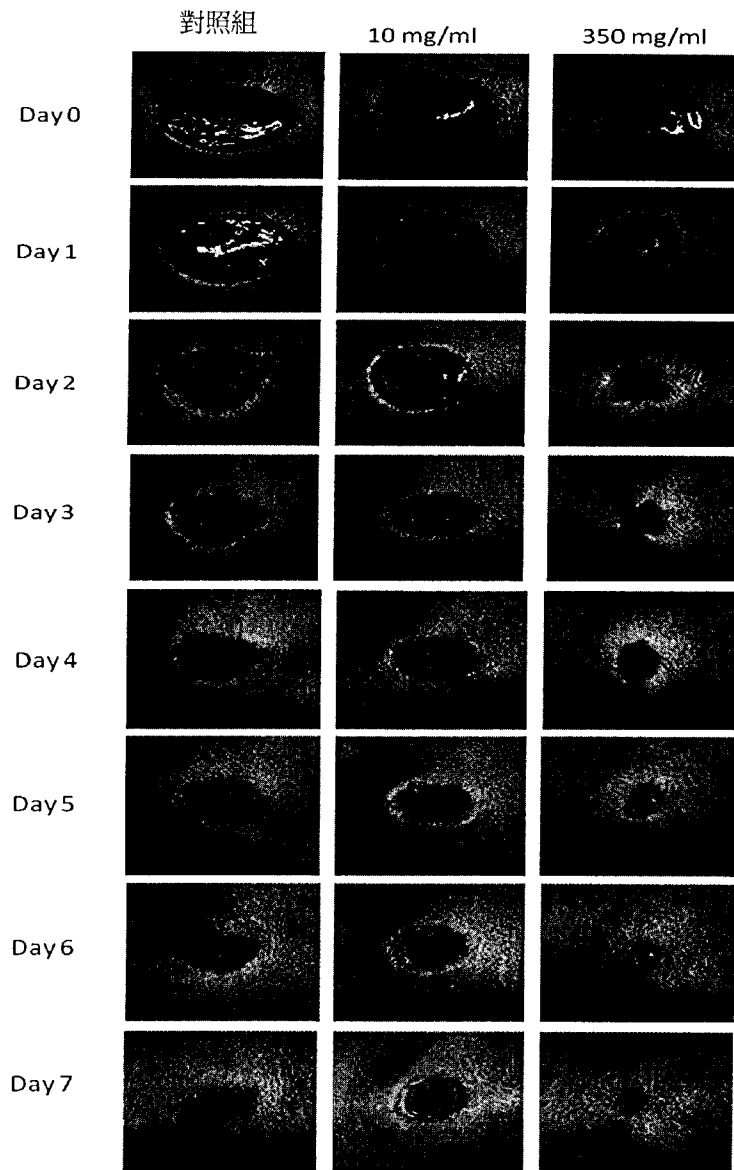


圖 1

發明摘要

申請案號：101133908

申請日：101.9.14

※IPC 分類：A61K 38/16 (2006.01)
C07K 14/375 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)
A61P 17/02 (2006.01)

【發明名稱】

免疫調節蛋白於促進傷口癒合或組織損傷治療的用途

USE OF IMMUNOMODULATORY PROTEIN IN PROMOTION OF
WOUND HEALING OR TREATMENT OF TISSUE INJURY

【中文】

本發明提供一種在有需要的個體促進傷口癒合或治療組織損傷的方法，該方法包括投予個體有效量的一或多種靈芝(*Ganoderma*)免疫調節蛋白。

【英文】

The invention provides a method for promoting wound healing or tissue injury treatment in a subject in need thereof, the method comprising administering to the subject an effective amount of one or more *Ganoderma* immunomodulatory protein.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第(1)圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

(無元件符號說明)

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

(無)

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】

免疫調節蛋白於促進傷口癒合或組織損傷治療的用途

USE OF IMMUNOMODULATORY PROTEIN IN PROMOTION OF
WOUND HEALING OR TREATMENT OF TISSUE INJURY

【技術領域】

本發明係關於促進傷口癒合或治療組織損傷的方法。特定言之，本發明利用免疫調節蛋白促進傷口癒合或治療組織損傷。

【先前技術】

傷口癒合是複雜的動態過程，使得組織的連續性及功能復原；理想上的傷口癒合是回到正常的組織結構、功能及外觀。傷口癒合的典型模型分成三或四的連續但重疊的階段：(1)立即反應，(2)發炎反應，(3)傷口邊緣上皮增殖及(4)組織再生(重塑)。發炎反應階段期間，血小板聚集且自基質凝結成塊，其捕捉血漿蛋白及血液細胞以誘導各種細胞進入。細胞增殖階段期間，新結締組織或肉芽組織及血管形成。在重塑階段期間，肉芽組織被膠原蛋白網絡取代及彈性蛋白使疤組織形成。

人類皮膚傷口癒合期間，重要的速率決定步驟為存在於傷口邊緣的上皮與真皮細胞遷移到創面床(wound bed)。肉芽組織形成於開放傷口使得上皮再生(re-epithelialization)階段發生，上皮細胞遷移越過新組織形成傷口與環境間的障蔽。傷口邊緣的基底角質細胞及真皮附屬物(如毛囊、汗腺及油脂腺)負責傷口癒合的上皮形成(epithelialization)階段。他們以片狀前進越過傷口位置並在其邊緣增殖，當他們在中央會合時即停止移動。人類角質細胞從切口邊緣側向移動越過創面床，最

後接近傷口，此過程為上皮再生。角質細胞移動後，真皮細胞，包括真皮纖維母細胞(dermal fibroblast)與真皮微血管內皮細胞，開始移動傷口，這些細胞積存基質蛋白，重塑新封閉的傷口並建立新血管。位於真皮層的纖維母細胞藉由產生細胞外間質(extracellular matrix)(如膠原蛋白及各種細胞激素)增進角質細胞的增殖與遷移，而在傷口癒合上扮演重要的角色。

已開發許多傷口癒合的組合物及方法。US 6,232,341提供一種傷口癒合的局部組合物，包括龍腦與次沒食子酸鈹。US 7,888,319揭示一種促進傷口癒合與組織再生的組合物及方法，包括 α 連接蛋白的羧端胺基酸序列或其保守型變體。US 8,084,491揭示一種促進傷口癒合的方法，包括投予治療有效量的含有托吡酯(topiramate)的組合物。US 8,258,093提供一種含有角質蛋白衍生物(如角質纖維、還原角蛋白或其組合)的醫藥組合物。

靈芝(一種擔子菌)是一種植物性菇類，用於傳統中藥至少2,000年。靈芝菇包括靈芝屬(*Ganoderma*)的數種真菌菌種，最普遍者為下列菌種，靈芝(*Ganoderma lucidum*)與松杉靈芝(*Ganoderma tsugae*)。靈芝菌種的許多治療效果已被報導，如免疫調節、抗腫瘤、護肝、抗氧化及降低膽固醇效果。最近鑑定出一種靈芝中的新一類醣蛋白，稱為免疫調節蛋白(immunomodulatory protein; FIP)。數種FIP已被分離並純化，包括LZ-8(分離自 *Ganoderma lucidum*)，FIP-fve(分離自 *Flammulina veltipes*)，FIP-vvo(分離自 *Volvariella volvacea*)，FIP-gts(分離自 *Ganoderma tsugae*)及FIP-gja(分離自 *Ganoderma sinensis*)。根據先前的研究，分離自 *G. tsugae*的FIP-gts，一種在亞洲受歡迎的化學預防菇類，具有抗癌功能且涉及hTERT/端粒酶表現的調節(Liao *et al.*, 2006, *Mol Carcinog*, 45, 220-229)。US 20100009915提供一種抑制癌細胞增殖的方法及抑制腫瘤細胞移動的方法，包括提供腫瘤細胞一種真菌免疫調

節蛋白的純化多肽，LZ-8。US 7,601,808揭示一種選殖自小孢子靈芝 (*Ganoderma microsporum*)的免疫調節蛋白(GMI)，且此蛋白具有免疫調節效果。

然而，沒有先前技藝揭示或建議靈芝免疫調節蛋白與傷口癒合的關係。

【發明內容】

本發明提供一種在有需要的個體促進傷口癒合或治療組織損傷的方法，該方法包括投予個體有效量的一或多種靈芝(*Ganoderma*)免疫調節蛋白或其片段或變體。靈芝免疫調節蛋白的具體實施例包括 LZ-8(分離自 *Ganoderma lucidum*)，FIP-gts(分離自 *Ganoderma tsugae*)，FIP-gja(分離自 *Ganoderma sinensis*)或分離自小孢子靈芝 (*Ganoderma microsporum*)的免疫調節蛋白(GMI)。

【圖式簡單說明】

圖1為C57BL/6小鼠背部皮膚傷口，其以LZ-8每日處理並在第0，1，2，3，4，5，6，7天攝取影像。傷口癒合的進展在相同距離照相7天。

圖2為起始傷口大小的部分對時間的作圖(每組3隻動物)；** P < 0.001.*** P < 0.0005。

圖3為使用MTT分析的細胞增殖測定。各種濃度的LZ-8用於治療人類肺纖維母細胞WI-38並於24小時後檢測。2 µg/ml vs. 控制組 * P < 0.05 .2 µg/ml vs. 10µg/ml # p<0.05 2 µg/ml vs. 50µg/ml, 100µg/ml ## p< 0.001。

圖4為以人類肺纖維母細胞WI-38遷移進行的傷口癒合分析。(a)細胞侵於10µg/ml LZ-8並於24小時後照相。(b)對照組的細胞移動長度對時間的作圖(每組重複5次)。** P < 0.001。

圖5為LZ-8治療組與生理食鹽水組的電手術傷口區域，其為3，7

與28天後的組織照相圖，其中點線顯示受傷區，其中SS表示不鏽鋼電手術裝置及其中LZiP代表LZ-8。

圖6為LZ-8治療組與生理食鹽水組的電手術傷口區域3天後之組織照片，其中SS表示不鏽鋼電手術裝置，LZiP代表LZ-8，NA代表正常區域，FA代表纖維化區及NE代表壞疽區。

圖7為LZ-8治療組與生理食鹽水組的電手術傷口區域7天後之組織照片，其中SS表示不鏽鋼電手術裝置，LZiP代表LZ-8，NA代表正常區域，FA代表纖維化區及NE代表壞疽區，及其中箭號指出壞疽區。

圖8 LZ-8治療組與生理食鹽水組的電手術傷口區域28天後之組織照片，其中SS表示不鏽鋼電手術裝置，LZiP代表LZ-8，NA代表正常區域，FA代表纖維化區及NE代表壞疽區，及其中箭號指出壞疽區。

【實施方式】

本發明驚訝地發現靈芝(*Ganoderma*)免疫調節蛋白顯著促進纖維母細胞遷移及細胞增殖，並加速組織封閉。因此，靈芝(*Ganoderma*)免疫調節蛋白有利於傷口癒合。

定義

本案例中使用的所有科學及技術用語具有一般用於技藝中的意義，除非另有說明。如本案例中所使用者，下列用字或語詞具有所界定的意義。

用語「一」為一種或超過一種(即至少一種)。

用語「促進」為活性、反應、狀況、疾病或其他生物參數的增進。用語「促進傷口癒合」為加強、改良、增加或誘導傷口的封閉、癒合或傷口的修復。

用語「個體」包括活的生物，如人類、猴子、乳牛、綿羊、馬、豬、牛、山羊、狗、貓、小鼠、大鼠、培養的細胞及其轉殖基因物種。在一較佳具體實施例，該個體為人類。

用語「投予」或「投藥」包括允許本發明靈芝免疫調節蛋白呈現其功能的投予路線。

用語「治療」為減低疾病或病況作用的方法。治療亦可為減少疾病或病況而不僅是症狀的原因。治療可為原程度的任何降低，且可為(但不限於)疾病、病況或症狀的減輕。

用語「有效量」為有效治療及/或促進傷口癒合的免疫調節蛋白的量。

促進傷口癒合或治療組織損傷之方法

在一方面，本發明提供一種在有需要的個體促進傷口癒合或治療組織損傷的方法，該方法包括投予個體有效量的一或多種靈芝(*Ganoderma*)免疫調節蛋白或其片段或變體。

在一具體實施例，促進傷口癒合或治療組織損傷是藉由纖維母細胞遷移及傷口邊緣上皮細胞增殖而增進傷口癒合的進展。

在一具體實施例，促進傷口癒合或治療組織損傷是藉由傷口邊緣上皮細胞增殖而增進傷口癒合的進展。

在另一具體實施例，促進傷口癒合或治療組織損傷是藉由加速組織封閉。

在另一具體實施例，促進傷口癒合或治療組織損傷是藉由不抑制嗜中性白血球浸潤。

用語「傷口」與「組織損傷」可被互換使用。傷口可為發現於個體任何位置的內部傷口或外部傷口。傷口包括，但不限於，下列：手術傷口；咬傷；燒燙傷；酸鹼灼傷；凍傷；曬傷；小切割傷；深切割傷；摩擦傷；裂傷；槍傷或刀傷；先天性疾病引起的傷口；牙科手術後的傷口；牙周病；外傷傷口；腫瘤相關傷口，其可歸類為與原發腫瘤或轉移有關的惡性皮膚潰瘍；潰瘍；腿部潰瘍；足部潰瘍；壓瘡；及角膜傷口。例如，本發明方法可用於治療引起上皮傷害(如切口)的

損傷，切割器械造成皮膚破損的傷口及裂傷，鈍器造成的皮膚破損的傷口及摩擦引起的皮膚傷口。本發明方法也可用於治療皮膚異常，如燒燙傷，念珠菌病，尿布疹，皮膚移植的提供與接受位置，潰瘍(皮膚潰瘍，褥瘡，靜脈曲張性潰瘍，鎌狀細胞血症潰瘍，及糖尿病性潰瘍)，乾癬，皮疹及曬傷及二度與三度燒燙傷。本發明方法亦可用於保護或加速口部組織的癒合，如嘴巴潰瘍，缺損，手術位置及潰瘍。本發明方法也可用於治療傷口，如角膜潰瘍，放射狀角膜切開術，角膜移植，角膜表層屈光矯治移植術或其他眼睛的手術導致的傷口。在一較佳具體實施例，本發明方法用於治療如挫傷，切傷及裂傷的傷口。

本發明方法也可用於治療個體內部器官傷口。此外，本發明方法也可用於治療移植期間由於缺血後再灌注損傷的氧化性損傷。本發明方法也可用於去除移植器官的再灌注損傷以及恢復及引起細胞增殖。

組織損傷可由下列導致，刮削傷，切傷，裂傷，撞傷，拉傷，咬傷，擦傷，子彈傷，爆炸傷，身體刺傷，戳傷，燒燙傷，風傷，曬傷，化學品灼傷，手術傷口，外科手術，醫療手術，宿主排斥，組織或器官移植，醫藥作用，醫藥副作用，褥瘡，輻射損傷，化妝品皮膚傷，內部器官損傷，疾病過程(如氣喘，癌症)，感染，感染劑，發育過程，成熟過程(如面皰)，遺傳異常，發育異常，環境毒素，過敏，頭皮損傷，面部損傷，顎部損傷，足部損傷，腳趾損傷，手指損傷，骨骼損傷，性器官損傷，關節損傷，排泄器官損傷，眼睛損傷，角膜損傷，肌肉損傷，脂肪損傷，肺損傷，氣道損傷，疝氣，肛門損傷，痔瘡，耳損傷，視網膜損傷，皮膚損傷，腹部損傷，手臂損傷，腿部損傷，運動損傷，背損傷，生產損傷，早產損傷，毒物咬傷，叮咬，肌腱損傷，韌帶損傷，心臟損傷，心臟瓣膜損傷，血管系統損傷，軟骨損傷，淋巴系統損傷，顱腦創傷，脫臼，食道穿孔，癩管，指甲損傷，外來體，骨折，凍瘡，手損傷，心臟不適疾病，裂傷，頸損傷，自殘，休

克，創傷性軟組織損傷，脊髓損傷，脊椎損傷，扭傷，拉傷，喉嚨損傷，牙齒損傷，創傷，神經系統損傷，老化，動膜瘤，中風，消化道損傷，侵害或缺血性損傷。

靈芝(*Ganoderma*)免疫調節蛋白

任何得自靈芝的免疫調節蛋白或其功能性片段皆可用於本發明方法。較佳地，該靈芝的免疫調節蛋白為LZ-8(得自*G. lucidum*)、FIP-gts(得自*Ganoderma tsugae*)、FIP-gja(得自*Ganoderma sinensis*)或得自*Ganoderma microsporum*的免疫調節蛋白。此等免疫調節蛋白的序列係為技藝中已知(參見Appl. Environ. Microbiol. doi:10.1128/AEM.01547-07; GenBank No. B2ZR75; 參見http://mrs.cmbi.ru.nl/mrs-5/entry?db=uniprot&id=B2ZR75_GANLU)。較佳地，該靈芝的免疫調節蛋白為LZ-8或其具有促進傷口癒合或治療組織傷害活性的功能性片段。較佳地，該LZ-8的有效量為1至10,000 µg/ml。更佳地，該LZ-8的有效量為500至10,000 µg/ml。

當此中提到特定蛋白質時，其變體、衍生物及片段亦包括。蛋白質變體及衍生物為技藝人士已瞭解的且可涉及胺基酸序列修飾。例如，胺基酸序列修飾典型為下列3類的一或多種：取代、插入或刪除變體。插入包括胺基酸及/或羧基端融合以及序列內插入單一或多個胺基酸殘基。插入通常為較胺端或羧端融合序列為小的插入序列，例如，1至4個殘基。刪除的特徵為自蛋白質序列去除1或多個胺基酸殘基。此等變體的製備可藉編碼蛋白質的DNA上的核苷酸的位置-專一性突變，藉此產生編碼變體的DNA，並因此在重組細胞培養表現DNA。在具已知序列的DNA的預定位置製備取代突變的技術為技藝中已知，包括例如，M13引子突變及PCE突變。胺基酸取代典型為單一殘基，但可發生在許多不同位置；插入通常是1至10個胺基酸殘基。刪除或插入較佳進行於鄰接的鹼基對，即，刪除2個殘基或插入2個殘基。取代、

刪除、插入或其任何組合可組合達成最後的構築體。突變不能位於讀框外的序列，且較佳將產生互補區域，其可產生二級mRNA結構，除非希望得到該mRNA的二級結構。取代變體為彼等已去除至少一個殘基及在其位置插入不同殘基。例如，以另一胺基酸殘基置換一胺基酸殘基，其為生物上或化學上類似於技藝人士已知者，為保守性取代。例如，保守性取代為以另一疏水性殘基取代一個疏水性殘基，或以另一極性殘基取代一個極性殘基。每一此中揭示的序列的保守性取代變體包含於此中的多肽範圍內。

靈芝(*Ganoderma*)免疫調節蛋白的投藥

靈芝(*Ganoderma*)免疫調節蛋白可調配成各種組合物並視局部或全身性治療而定，以各種方式投藥。投藥可為局部(包括眼部、陰道、肛門、鼻內)、口服、吸入或非經腸(例如藉靜膜內輸注、皮下、腹腔內或肌肉注射)。

用於非經腸投藥的組合物包括無菌的水性或非水性溶液，懸浮液，和乳劑。非水性溶劑的例子是丙二醇，聚乙二醇，植物油(如橄欖油)和可注射的有機酯，如油酸乙酯)。水性載體包括水，酒精/水溶液，乳劑或懸浮液，包括生理食鹽水和緩衝介質。非經腸載劑包括氯化鈉溶液，林格氏葡萄糖，葡萄糖和氯化鈉，乳酸林格氏液，或固定油。靜脈內載劑包括流體和營養補充劑，電解質補充劑(如彼等基於林格氏葡萄糖)，和類似物。防腐劑和其它添加劑也可存在，如，例如，抗微生物劑，抗氧化劑，螯合劑，和惰性氣體及其類似物。

用於局部給藥的組合物可包括軟膏，洗劑，乳霜劑，凝膠劑(例如，泊洛沙姆凝膠(poloxamer gel))，滴劑，栓劑，噴霧劑，液體和粉末。常規的藥物載劑，水溶液，粉末或油性基質，增稠劑及其類似物可能是必要的或希望的。所揭示的組合物可被施用於，例如，微纖維，聚合物(例如，膠原蛋白)，納米球，氣溶膠，乳液，乳霜，織物，塑料，

組織工程支架材料，基體材料，錠劑，移植容器，粉末，油，樹脂，傷口敷料，珠子，微珠，緩慢釋放珠，膠囊劑，注射劑，靜脈點滴，泵裝置，矽膠植入物，或任何生物工程材料。

用於口服投藥的組合物包括粉末或顆粒，在水或非水性介質的懸浮液或溶液，膠囊劑，香囊劑(sachet)，或錠劑。增稠劑，調味劑，稀釋劑，乳化劑，分散劑或粘合劑可為所希望的。

靈芝免疫調節蛋白的確切量會有所不同，根據不同個體(視品種而定)，年齡，體重和個體的一般狀況，個體被治療的傷口或損傷的嚴重性，投藥模式及其類似物。基於此中的教示，本領域中的普通技術人員可以使用僅使用常規實驗來決定適當的量。

例如，靈芝免疫調節蛋白可被用於在局部組合物中，可攝取組合物，和保護哺乳動物細胞、增加哺乳動物細胞恢復及增強細胞增殖的的組織培養基。例如，靈芝免疫調節蛋白可以用在局部護膚組合物以保護和增加皮膚組織的恢復率，如治療各種皮膚病，如光老化及曬傷光反應過程的恢復率。皮膚損傷的發生的原因有多種。損傷常發生於個人經常洗手，個人承受壓力的環境條件(過度暴露在陽光下或化學物)或具相關疾病的老人或個人。

例如，靈芝免疫調節蛋白也可以被用在噴嘴清洗或噴霧的形式來保護和加速受損的口腔組織的癒合，如口腔潰瘍和傷口。靈芝免疫調節蛋白可進一步用於在眼科製劑，如眼部護理產品中用於中和清洗隱形眼鏡的過氧化氫。靈芝免疫調節蛋白也可用於在肛門直腸乳膏和栓劑以治療如肛門瘙癢，直腸炎，肛裂，和痔瘡等病況。傷口癒合組合物也可以被用於可攝取組合物並增加糜爛，胃潰瘍，和胃粘膜出血的恢復率。其他可攝取的治療組合物，包括：中風藥物，自體免疫性疾病藥物，關節炎藥物，潰瘍藥物，癌症藥物(細胞毒性劑)，改善區域的心室功能、恢復正常的心跳速度和壓力功能的心臟藥物，修復受損

組織的肺部藥物，抑制酒精性脂肪生成與防止肝臟脂肪變性的肝臟藥物，抑制泌尿系結石的腎臟藥物，拮抗重金屬中毒、氰化物中毒、硫化鈉中毒與其他類型中毒的解毒藥物，以及減少和中和造成組織損傷的氧自由基產生的藥物，其保護且進一步增強受損哺乳動物細胞的恢復率。靈芝免疫調節蛋白可用於可攝取產品以治療炎症性疾病，如肝炎，胃炎，潰瘍性結腸炎，食管炎，關節炎，和胰腺炎。

本發明靈芝免疫調節蛋白也可用於組織培養基和器官移植培養基中，以減少和防止哺乳動物細胞受損並增加受損哺乳動物細胞的恢復率。靈芝的免疫調節蛋白可用於防止移植器官的再灌注損傷，以及恢復並導致細胞增殖。

靈芝免疫調節蛋白可進一步與可投藥到傷口、組織損傷或癌症發炎位置的任何已知的或新發現的物質投藥，可施用於傷口，組織損傷，炎症或腫瘤部位。例如，提供的組合物可進一步包括抗生素類中的一個或多個(例如，氨基糖苷類 (aminoglycosides)，頭孢菌素 (cephalosporins)，氯黴素 (chloramphenicol)，克林黴素 (clindamycin)，紅黴素 (erythromycins)，氟喹諾酮類 (fluoroquinolones)，大環內酯類 (macrolides)，保泰松 (azolides)，甲硝唑 (metronidazole)，青黴素-四環素-甲氧苄氨嘧啶-磺胺甲基異噁唑 (penicillin's, tetracyclin's, trimethoprin-sulfamethoxazole)，萬古黴素 (vancomycin))，類固醇 (例如 andranes (例如 辜酮)，Cholestanes (如膽固醇)，膽酸 (如膽酸)，糖皮質激素 (如地塞米松 (dexamethasone))，Estranes (如雌二醇)，孕烷 (pregnanes) (例如 孕酮)，麻醉和非麻醉性鎮痛藥 (例如 嗎啡，可待因，海洛因，羥嗎啡 (hydromorphone)，左啡諾 (levorphanol)，度冷丁 (meperidine)，美沙酮 (methadone)，氧丁酮 (oxydone)，丙氧酚 (propoxyphene)，芬太尼 (fentanyl)，納洛酮 (naloxone)，丁丙諾啡 (buprenorphine)，布托啡諾 (butorphanol)，納布啡 (nalbuphine)，噴他佐辛 (pentazocine))，化療 (如

抗癌藥物，如但不限於六甲蜜胺(altertamine)，天門冬醯胺酶(asparaginase)，博來黴素(bleomycin)，白消安(busulfan)，卡鉑(carboplatin)，卡氮芥(chlorambucil)，苯丁酸氮芥(chlorambucil)，順鉑(cisplatin)，克拉屈濱(cladribine)，環磷醯胺(cyclophosphamide)，阿糖胞苷(cytarabine)，達卡巴嗪(dacarbazine)，己烯雌酚(diethylstilbesterol)，炔雌醇(ethinyl)，雌二醇(estradiol)，依託泊苷(etoposide)，氟尿苷(floxuridine)，氟達拉濱(fludarabine)，氟脲嘧啶(flourouracil)，氟他胺(flutamide)，戈舍瑞林(goserelin)，羥基脲(hydroxyurea)，伊達比星(idarubicin)，異環磷醯胺(ifosfamide)，柳普林(leuprolide)，左旋咪唑(levamisole)，洛莫司汀(lomustine)，氮芥(methlorethamine)，甲羥孕酮(medroxyprogesterone)，甲地孕酮(megestrol)，美法崙(melphalan)，巯基嘌呤(mercaptopurine)，胺甲喋呤(methotrexate)，絲裂黴素(mitomycin)，米托坦(mitotane)，米托蒽醌(mitoxantrone)，紫杉醇(paclitaxel)，潘塔史塔汀(pentastatin)，派普布拉門(pipobroman)，普卡黴素(plicamycin)，潑尼松(prednisone)，丙卡巴肼(procarbazine)，鏈脲黴素(streptozocin)，他莫昔芬(tamoxifen)，替尼泊甙(teniposide)，長春花鹼(vinblastine)，長春新鹼(vincristine)，抗炎劑(例如，阿氯芬酸(alclofenac)，阿氯米松倍氯米松(alcometasone)，二丙酸鹽(dipropionate)，二羥孕酮(algestone)，安奈德(acetone)， α -澱粉酶(alpha amylase)，安西法爾(amcinafal)，安西非特(amcinafide)，氨芬酸鈉(amfenac sodium)，阿米勃雷糖鹽酸(amiprilose hydrochloride)，阿那白滯素(anakinra)，阿尼祿酸(anirolac)，阿尼紮芬(anitrazafen)，阿紮丙宗(apazone)，巴柳氮二鈉(balsalazide disodium)，苳達(bendazac)，苯噁洛芬(benoxaprofen)，苯噁洛芬鹽酸鹽(benoxaprofen hydrochloride)，鳳梨蛋白酶(bromelains)，溴苯雌烯(broperamole)，布地奈德(budesonide)，卡洛芬(carprofen)，環洛芬

(cicloprofen), 噲戊唑酮(cintazone), ; 克利洛芬(cliprofen), 丙酸氯倍他索(clobetasol propionate), 丙酸氯倍他松丁酸(clobetasone butyrate)、氯吡酸(clopirac), 氯硫卡松丙酸(cloticasone propionate), 可美薩松乙酸(cormethasone acetate), 可托多松(cortodoxone), 癸酸鹽(decanoate), 地夫可特(deflazacort), 庚酸羥酮(delatestryl), 帝寶-羥酮(depo-testosterone), 地奈德(desonide), 去羥米松(desoximetasone), 二丙酸地塞米松(dexamethasone dipropionate), 雙氯芬酸鉀(diclofenac potassium), 雙氯芬酸鈉(diclofenac sodium), 雙氟拉松二乙酸鹽(diflorasone diacetate), 二氟米酮鈉(diflumidone sodium), 二氟尼柳(diflunisal), 醋丁二氟龍(difluprednate), 雙酞嗪酮(diftalone), 二甲亞砜(dimethyl sulfoxide), 丙縮氫炎松(drocinonide), 甲地松(endrysone), 恩莫單抗(enlimomab), 依諾利康鈉(enolicam sodium), 噁比唑(epirizole), 依託度酸(etodolac), 依託芬那酯(etofenamate), 聯苯乙酸(felbinac), 非那莫(fenamole), 芬布芬(fenbufen), 芬氯酸(fenclofenac), 苯克洛酸(fenclorac), 芬度柳(fendosal), 苯吡惡二酮(fenpipalone), 芬替酸(fentiazac), 夫拉紮酮(flazalone), 氟紮可特(fluzacort), 氟滅酸(flufenamic acid), 氟滅酸(flufenamic acid), 氟咪唑(flumizole), 醋酸氟尼縮松(flunisolide acetate), 氟尼辛(flunixin), 氟尼辛葡甲胺(flunixin meglumine), 氟可丁丁酯(flucortin butyl), 氟米龍醋酸酯(fluorometholone acetate), 氟喹宗(fluquazone), 氟比洛芬(flurbiprofen), 炔氟聯苯(fluretofen), 丙酸氟替卡松(fluticasone propionate), 呋喃洛芬(furaprofen), 呋羅布芬(furobufen), 哈西奈德(halcinonide), 鹵倍他索丙酸酯(halobetasol propionate), 鹵潑尼松醋酸(halopredone acetate), 異丁芬酸(Ibufenac), 布洛芬(ibuprofen), 布洛芬鋁(ibuprofen aluminum), 布洛芬吡啶甲醇(ibuprofen piconol), 伊洛達普(ilonidap), 吲哚美辛(indomethacin), 吲哚美辛鈉(indomethacin

sodium) , 吲哚洛芬 (indoprofen) , 吲哚克索 (indoxole) , 吲四唑 (intrazole) , 醋異氟龍 (isoflupredone acetate) , 伊索克酸 (isoxepac) , 異惡噁醯胺 (isoxicam) , 酮洛芬 (ketoprofen) , 洛非咪唑鹽酸鹽 (lofemizole hydrochloride) , 氯諾昔康 (lomoxicam) , 氯替潑諾碳酸乙酯 (loteprednol etabonate) , 甲氯滅酸鈉 (meclofenamate sodium) , 甲氯芬那酸 (meclofenamic acid) , 二丁酸甲氯松 (meclorison dibutyrate) , 甲芬那酸 (mefenamic acid) , 美沙拉嗪 (mesalamine) , 美西克拉宗 (meseclazone) , 甲二氫辜酮 (mesterolone) , 去氫甲辜酮 (methandrostenolone) , 美替諾龍 (methenolone) , 美替諾龍醋酸 (methenolone acetate) , 甲潑尼龍磺庚酯 (methylprednisolone suleptanate) , 嗎尼氟酯 (morniflumate) , 萘丁美酮 (nabumetone) , 苯丙酸諾龍 (nandrolone) , 萘普生 (naproxen) , 萘普生鈉 (naproxen sodium) , 甲氧萘丙醇 (naproxol) , 尼馬宗 (nimazone) , 奧沙拉嗪鈉 (olsalazine sodium) , 肝蛋白 (orgotein) , 奧帕諾辛 (orpanoxin) , 氧甲氫龍 (oxandrolane) , 奧沙普秦 (oxaprozin) , 羥基保泰松 (oxyphenbutazone) , 羥甲烯龍 (oxymetholone) , 瑞尼托林鹽酸鹽 (paranyline hydrochloride) , 戊聚糖聚硫酸鈉 (pentose polysulfate sodium) , 甘油酸保泰松鈉 (phenbutazone sodium glycerate) , 吡非尼酮 (pirfenidone) , 吡羅昔康 (piroxicam) , 吡羅昔康肉桂酸 (piroxicam cinnamate) , 吡羅昔康吡酮胺 (piroxicam olamine) , 吡丙芬 (pirprofen) , 潑那紮特 (prednazate) , 普立地諾 (prifelone) , 普羅度酸 (prodolic acid) , 丙喹酮 (proquazone) , 普羅沙唑 (Proxazole) , 普羅沙唑檸檬酸 (Proxazole citrate) , 利美索龍 (rimexolone) , 氯馬斯汀 (romazarit) , 柳膽來司 (salcolex) , 沙那西定 (salnacedin) , 雙水楊酸酯 (salsalate) , 血根氯鉍 (sanguinarium chloride) , 氯唑惡酮 (seclazone) , 斯美辛 (sermetacin) , 康力龍 (stanozolol) , 蘇多西卡 (sudoxicam) , 舒林酸 (sulindac) , 舒洛芬 (suprofen) , 他美辛 (talmetacin) , 他尼摩酯 (talniflumate) , 醋柳酞酯

(talosalate), 替布費龍(tebufelone), 替尼達帕(tenidap), 替尼達帕鈉(tenidap sodium), 替諾昔康(tenoxicam), 替昔康(tesicam), 苳叉異啞酮(tesimide), 辜酮(testosterone), 辜酮混合物(testosterone blends), 四氫甲吲胺(tetrydamine), 硫平酸(tiopinac), 氫可的松新戊酸鹽(tixocortol pivalate), 托美汀(tolmetin), 托美丁鈉(tolmetin sodium), 三氯奈德(triclonide), 三氟氨酯(triflumidate), 疊氮吲酸(zidometacin), 苯醯吡酸鈉(zomepirac sodium), 或抗組胺劑(例如乙醇胺(ethanolamines)(如苯海拉明卡比沙明 diphenhydramine diphenhydramine), 乙二胺(ethylenediamine)(如苳吡二胺吡拉明(tripelennamine pyrillamine), 烷基胺(如撲爾敏(chlorpheniramine), 右氯苯那敏(dexchlorpheniramine), 溴苯那敏(brompheniramine), 曲普利啶(triprolidine)), 其他抗組胺劑, 如息斯敏(astemizole), 氯雷他定(loratadine), 非索非那定(fexofenadine), 氯非敏胺(bropheniramine), 氯馬斯汀(clemastine), 對乙醯氨基酚(acetaminophen), 偽麻黃鹼(pseudoephedrine), 曲普利啶(triprolidine))。

實例1 小鼠背部區域的皮膚傷口的傷口癒合進展

動物

8-12週大的C57BL/6小鼠 以異氟烷(isoflurane)吸入誘導麻醉並以腹腔內注射尿胺(urethane)(1g/kg)維持麻醉。以滅菌可拋棄式的活體取樣鉗(biopsy punch)在背部中線的每側產生4個全厚度傷口(full-thickness wound)。每個傷口以可變焦距實體顯微鏡(zoom stereo microscope)每天照相7天。在第7天時犧牲動物並去除具周圍區域的傷口(wounds with surrounded area), 並固定於含4%甲醛的溶液, 用於組織分析。

LZ-8之投藥

LZ-8由台灣益生生物科技公司提供。將LZ-8溶解於磷酸緩衝生理食鹽水(phosphate buffered saline; PBS)並貯存於4°C。將含各種濃度的

LZ-8的10微升PBS每日施用於中線的背部皮膚傷口。

傷口癒合分析

人類肺部纖維母細胞WI-38被接種並生長於含MEM培養基的6孔盤。當細胞生長達至多90%覆蓋度(confluence)時，使用1毫升滅菌移液器滴管(pipette tips)刮取並去除細胞。產生具相同寬度的人工裂開傷口單層(injury-gapped monolayer)用於進一步的研究。以不同濃度的LZ-8培養細胞並記錄及檢測裂開傷口的恢復。以具40倍物鏡及10倍目鏡的萊卡(Leica)顯微鏡攝取單層的影像。

結果顯示以LZ-8投藥的小鼠具較佳的傷口恢復，相較於對照組，傷口較小且組織修復率(tissue repair rate)顯示劑量相關的趨勢。以0.2 mg/ml的LZ-8投藥之小鼠在第7天呈現最小的傷口，建議LZ-8加速組織恢復及癒合(圖1)。測定並定量傷口區域。以0.2 mg/ml的LZ-8投藥之小鼠，90%起始傷口已恢復，大於其他小鼠(以0.01 mg/ml與0.02 mg/ml的LZ-8投藥)。LZ-8具傷口癒合的治療效果，及在此動物模型中，0.2 mg/ml為最適劑量(圖2)。培養於含0.04 µg/ml的LZ-8的人類肺纖維母細胞WI-38，相較於其他組，顯示較佳的增殖率及存活(圖3)。在該活體外傷口癒合分析，在24小時，相較於沒有任何處理的細胞，以0.2 µg/ml的LZ-8處理的細胞呈現最小的裂口(60%恢復)，具20%的增進(圖4a, 4b)。

實例2 小鼠背側區域的肝損傷的傷口癒合進展

LZ-8由台灣益生生物科技公司提供。將LZ-8溶解於磷酸緩衝生理食鹽水(phosphate buffered saline; PBS)並貯存於4°C。

動物及手術裝置

16隻健康的雄性Sprague-Dawley大鼠，重量200至300克，購自BioLASCO (台灣)並用於實驗。動物維持於25°C、12小時黑暗及12小時光線(根據實驗動物照護與使用的基準)。以標準平衡飼料(standard

balanced pellet diet)及水無限制餵食。動物實驗的流程由臺北醫學大學的機構動物照護及使用委員會(Institutional Animal Care and Use Committee for Taipei Medical University)審閱並核可(LAC-99-0037)。大鼠被標記使可個別辨識並在實驗前飼養於籠子14天，使適應實驗室環境。電燒刀單極頭(electrosurgical monopolar tip)不重複使用(ERBE, No. 20191-377, USA; needle type, stainless steel 304)。

手術程序

以異氟烷(Isoflurane)吸入誘導動物麻醉。清潔手術位置並以無菌方式覆蓋手術位置。電燒刀使用一般的不銹鋼針狀電極(stainless steel needle electrode)。肝臟經剖腹以牽開器避免傷害肝臟而使肝臟曝露。將SS-針插入肝葉(4 mm深度)以產生前部損傷(anterior lesion)，使用具固定運作時間(fixed activation time)(4秒)的固定電力設備(60 W)。電力及運作時間為一般使用的參數且基於先前的研究設定。針對LZ-8蛋白質組，10 μ l的1 mg/ml LZ-8蛋白質溶液滴於傷口表面；針對對照組，與實驗組相同，10 μ l的生理食鹽水滴於傷口表面。

組織學實驗以檢測損傷區

手術後0，3，7，和28天後分別將動物犧牲。除去肝臟，並固定在10%福爾馬林中性緩衝液。然後將樣品在梯度系列的乙醇中脫水並包埋於石蠟。自石蠟塊連續切片成5微米薄片並脫蠟。切片用蘇木精和曙紅(H&E，3008-1和3204-2，武藤敏郎，日本)染色。SS-針造成的總損傷區使用影像分析軟體(SPOT basic software, SPOT imaging solution, MI, USA)檢測。此外，觀察受傷部位的不同的組織學特徵。因此，損傷區域被進一步劃分成不同的分類以呈現熱擴散所造成的損傷，並且測定每一部份的區域。

LZ-8對電燒傷口的組織損傷癒合的效果藉組織學分析。結果也顯示LZ-8投藥的電燒傷口，與對照組動物相比，具有較佳的損傷恢復。 3

天治療後，LZ-8治療組的動物的電燒傷口區域小於生理食鹽水組(圖5)。另也發現LZ-8治療組的傷口癒合速度要快於生理食鹽水組。圖6顯示電燒傷口的免疫細胞浸潤區域。在兩個治療組，第3天時可觀察到免疫細胞浸潤。7天之後，可以觀察到電燒傷口壞死或纖維化區域。圖7顯示LZ-8治療組的壞死或纖維化區域小於生理食鹽水組。再者，在第28天，LZ-8治療組的電燒傷口幾乎已癒合，只有一個小面積的纖維化或壞死區域(圖8)。與此相反，生理食鹽水組仍然有一個可見的電燒傷口和大面積的纖維化和壞死區域。

【符號說明】

(無)

申請專利範圍

1. 一種一或多種靈芝(*Ganoderma*)免疫調節蛋白或其具有促進傷口癒合或治療組織損傷活性的功能性片段用於製備在有需要的個體促進傷口癒合或治療組織損傷的藥物的用途。
2. 如請求項1之用途，其中該傷口癒合的促進或組織損傷的治療係藉由傷口邊緣上皮細胞的纖維母細胞遷移及增殖而增進傷口癒合的進展。
3. 如請求項1之用途，其中該傷口癒合的促進或組織損傷的治療係藉由傷口邊緣上皮細胞的增殖而增進傷口癒合的進展。
4. 如請求項1之用途，其中該傷口癒合的促進或組織損傷的治療係藉由加速組織封閉。
5. 如請求項1之用途，其中該傷口癒合的促進或組織損傷的治療係藉由不抑制嗜中性白血球浸潤。
6. 如請求項1之用途，其中該靈芝的免疫調節蛋白為LZ-8(得自*Ganoderma lucidum*)、FIP-gts(得自*Ganoderma tsugae*)、FIP-gja(得自*Ganoderma sinensis*)或得自*Ganoderma microsporum*的免疫調節蛋白。
7. 如請求項1之用途，其中該靈芝的免疫調節蛋白為LZ-8。
8. 如請求項1之用途，其中該個體為人類、猴子、乳牛、綿羊、馬、豬、牛、山羊、狗、貓、小鼠、大鼠、培養的細胞及其轉殖基因物種。
9. 如請求項1之用途，其中該傷口或組織損傷為內部傷口或外部傷口，或內部組織損傷或外部組織損傷。
10. 如請求項1之用途，其中該傷口或組織損傷為手術傷口；咬傷；燒燙傷；酸鹼灼傷；凍傷；曬傷；小切割傷；深切割傷；摩擦傷；

裂傷；槍傷或刀傷；先天性疾病引起的傷口；牙科手術後的傷口；牙周病；外傷傷口；或腫瘤相關傷口。

11. 如請求項1之用途，其中該傷口或組織損傷為內部器官損傷。
12. 如請求項11之用途，其中該器官為肝臟。
13. 如請求項11之用途，其中該傷口或組織損傷為潰瘍；腿部潰瘍；足部潰瘍；壓瘡；或角膜傷口。
14. 如請求項11之用途，其可用於治療皮膚疾病。
15. 如請求項11之用途，其可用於保護或加速口部組織的癒合、促進嘴巴潰瘍癒合，促進口部缺損癒合或促進手術位置癒合。
16. 如請求項11之用途，其可用於治療眼部傷口。
17. 如請求項11之用途，其中該傷口或組織損傷為創傷性軟組織損傷，脊髓損傷，脊椎損傷，扭傷，拉傷，喉嚨損傷，牙齒損傷，創傷，神經系統損傷，老化，動膜瘤，中風，消化道損傷，侵害或缺血性損傷。
18. 如請求項1之用途，其中該靈芝免疫調節蛋白的有效量為1 $\mu\text{g/ml}$ 至10,000 $\mu\text{g/ml}$ 。
19. 如請求項1之用途，其中該靈芝免疫調節蛋白的有效量為500 $\mu\text{g/ml}$ 至10,000 $\mu\text{g/ml}$ 。

圖式

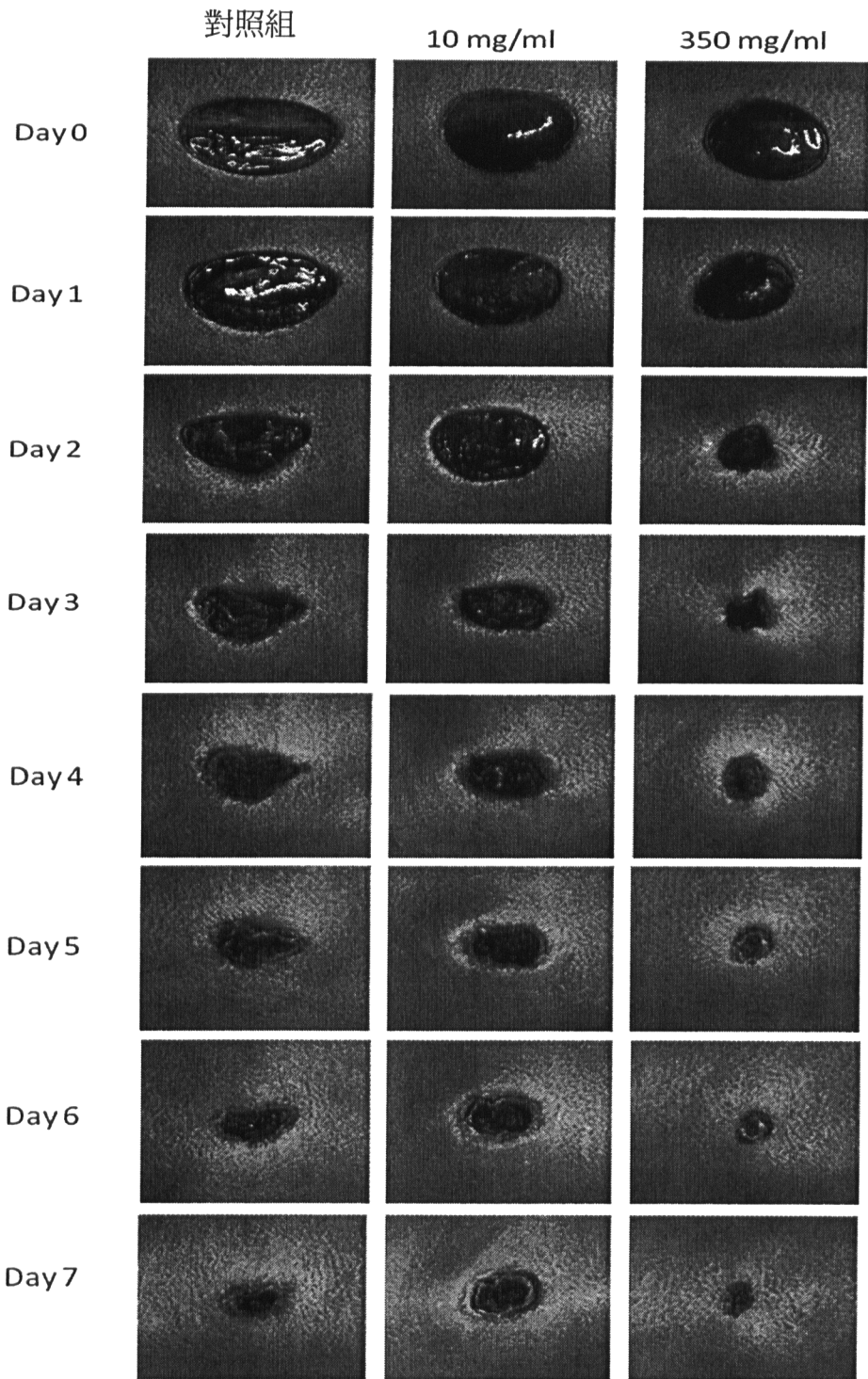


圖 1

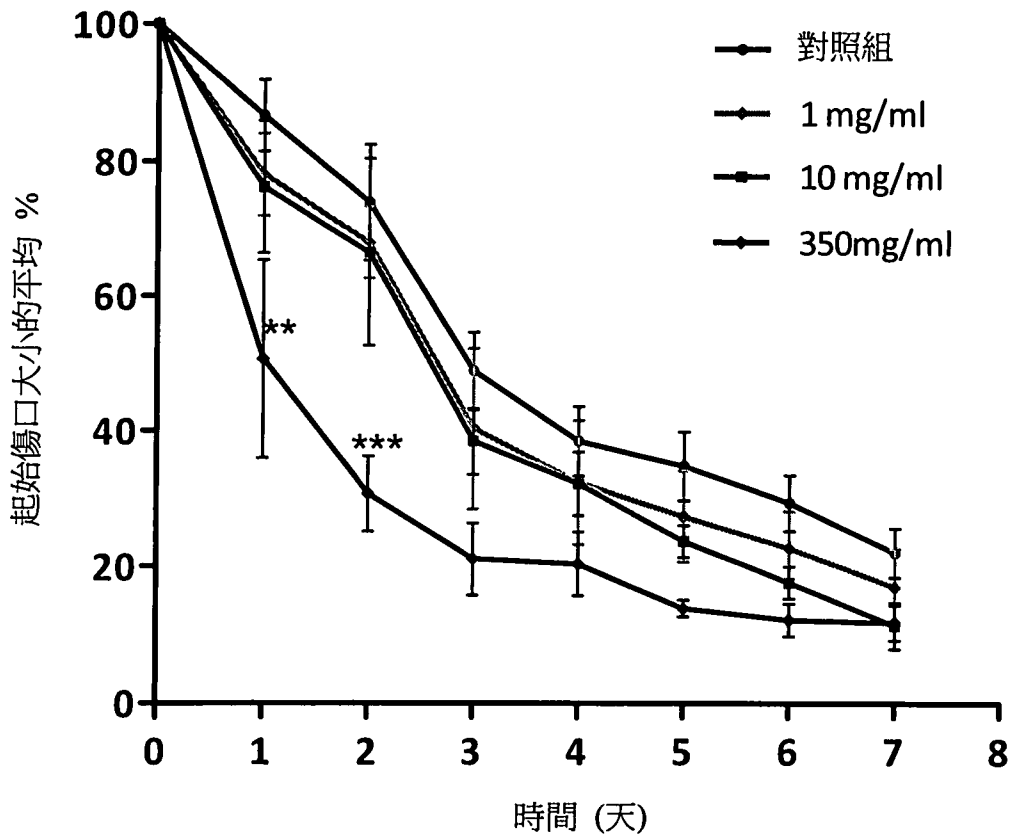
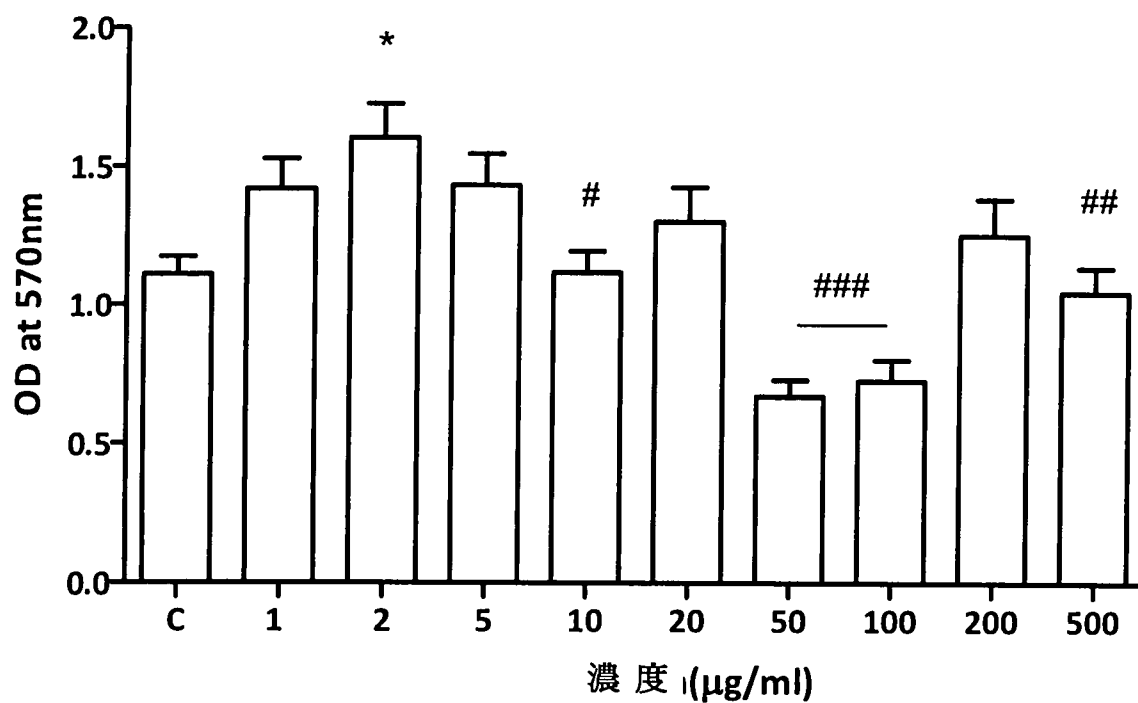


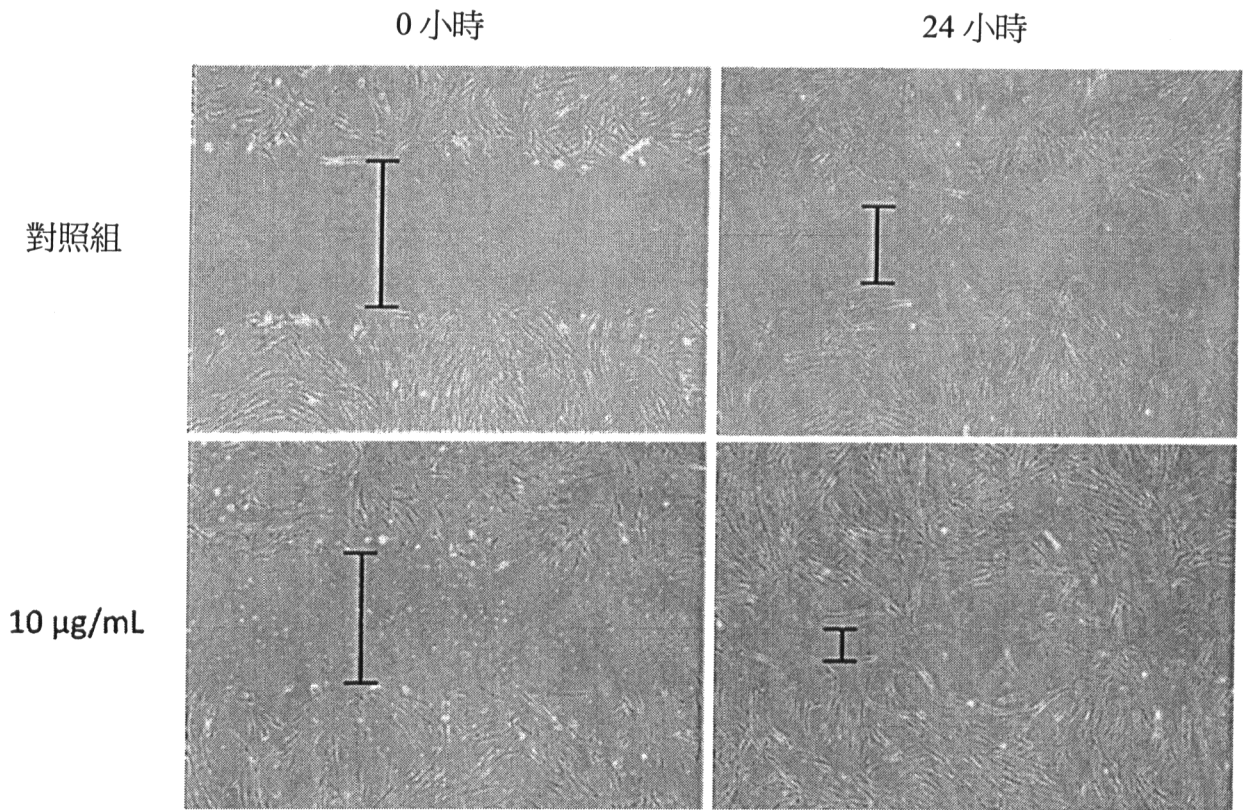
圖 2



2 μg/ml v.s. 對照組 * P < 0.05 .
2 μg/ml v.s. 10 μg/ml # p < 0.05
2 μg/ml v.s. 500 μg/ml ## p < 0.01
2 μg/ml v.s. 50 μg/ml, 100 μg/ml ### p < 0.001
(N=4)

圖 3

(a)



(b)

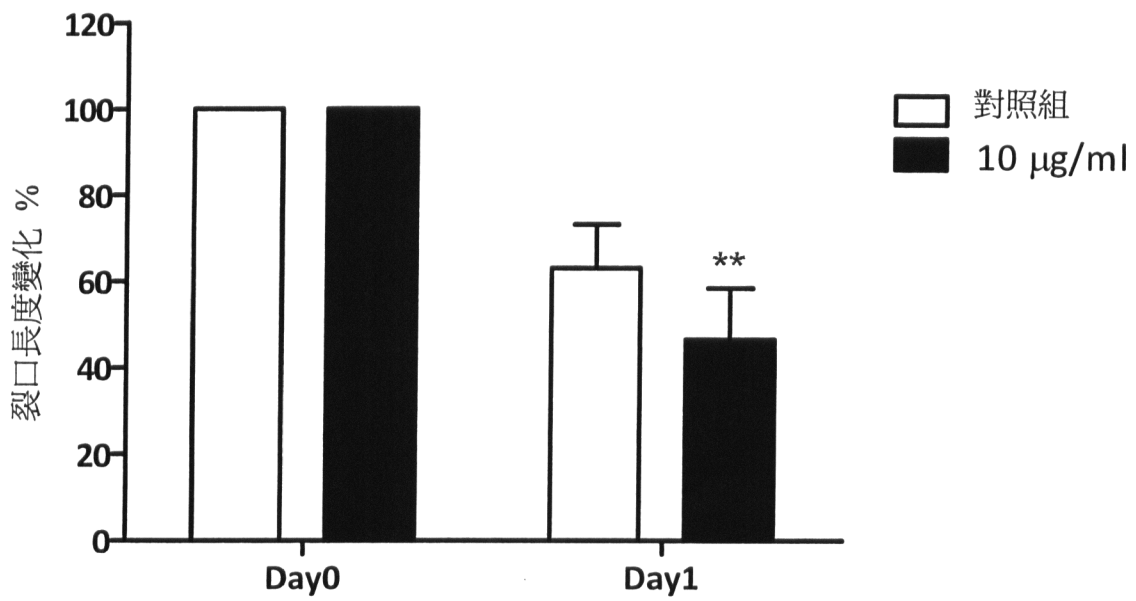


圖 4

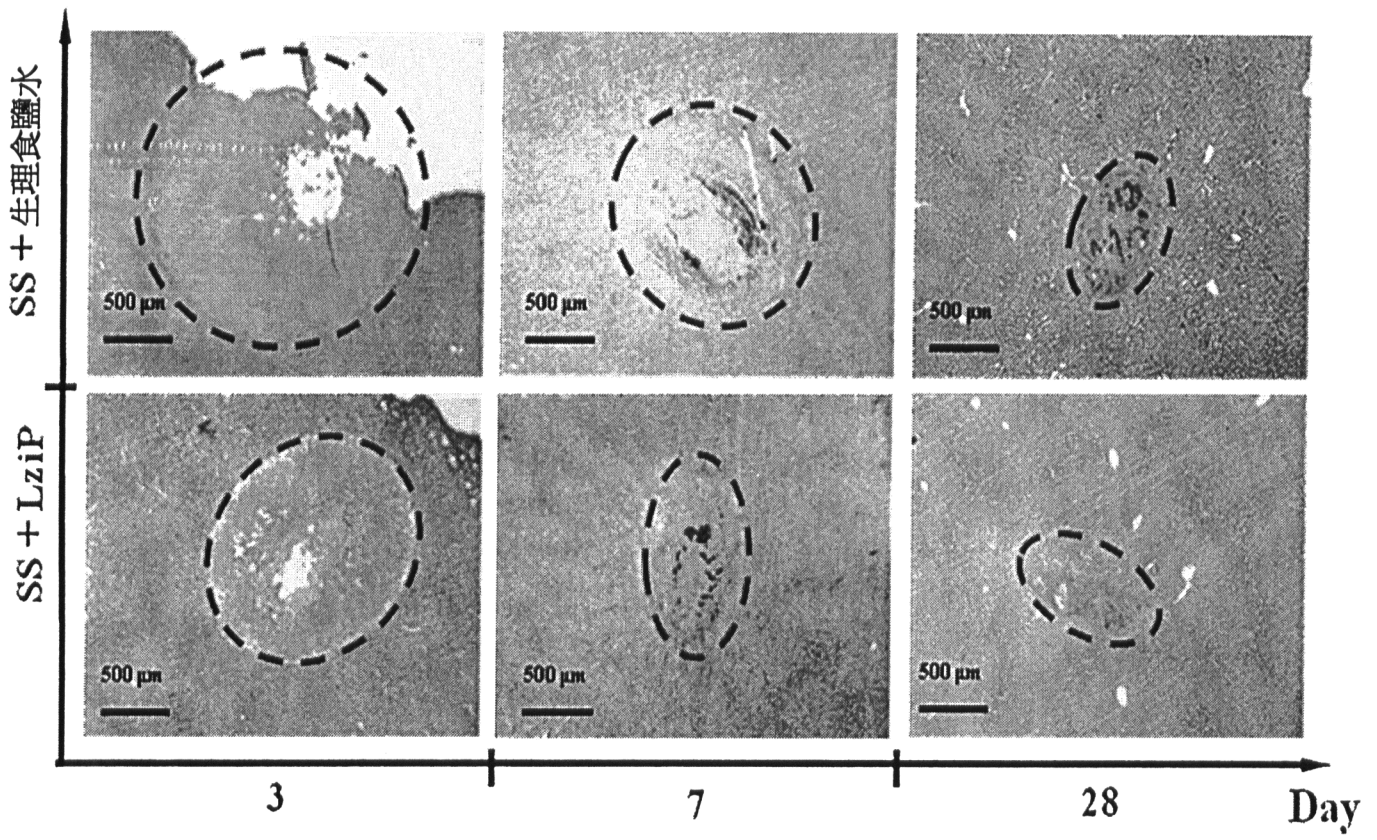


圖 5

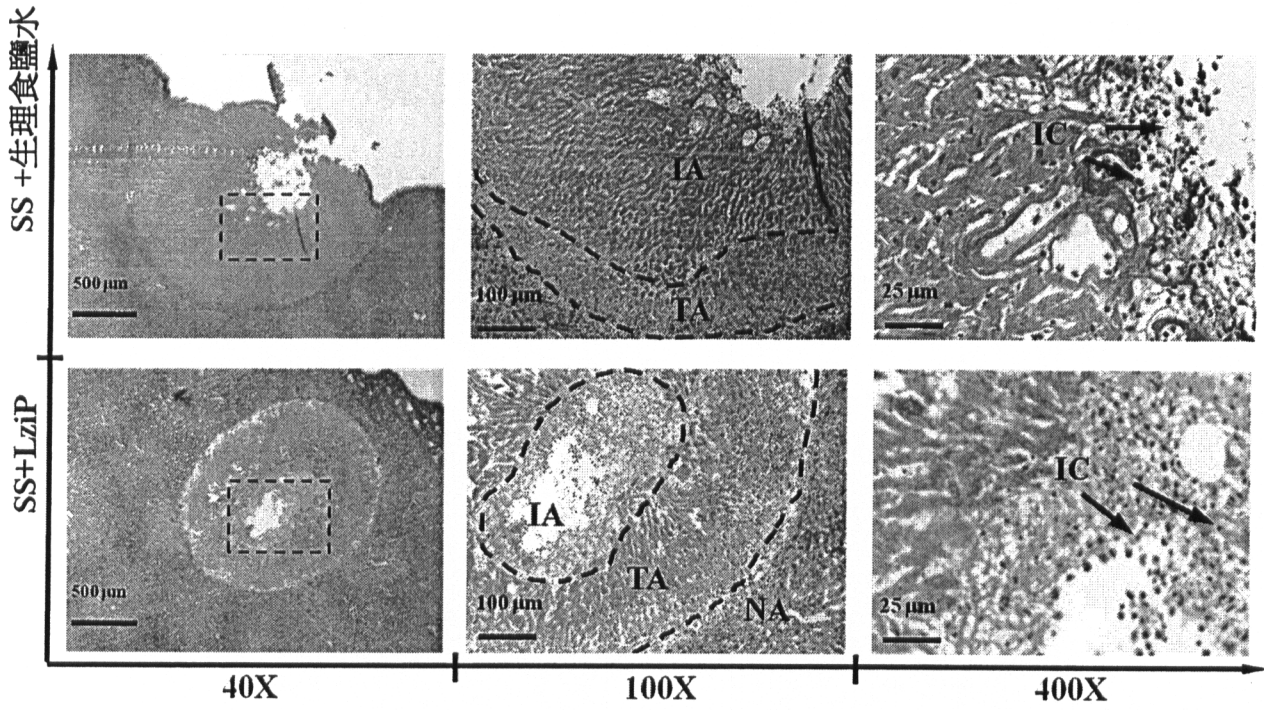


圖 6

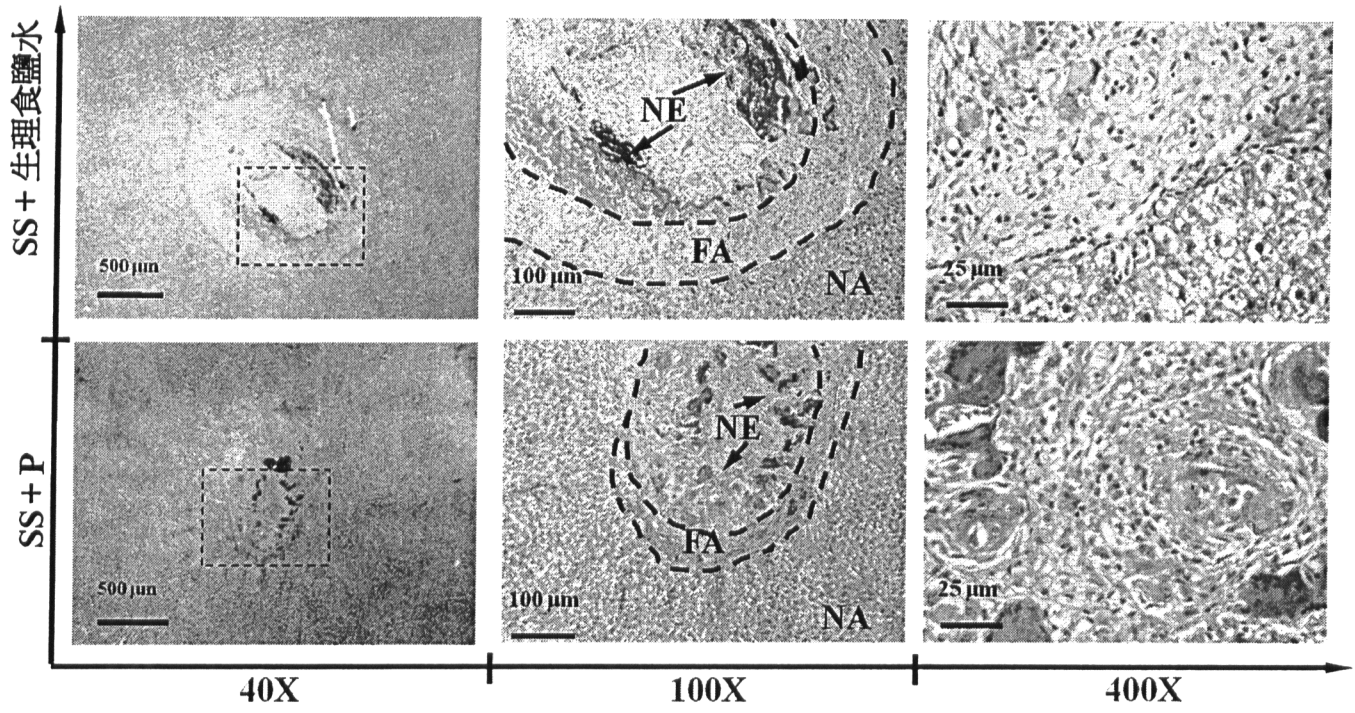


圖 7

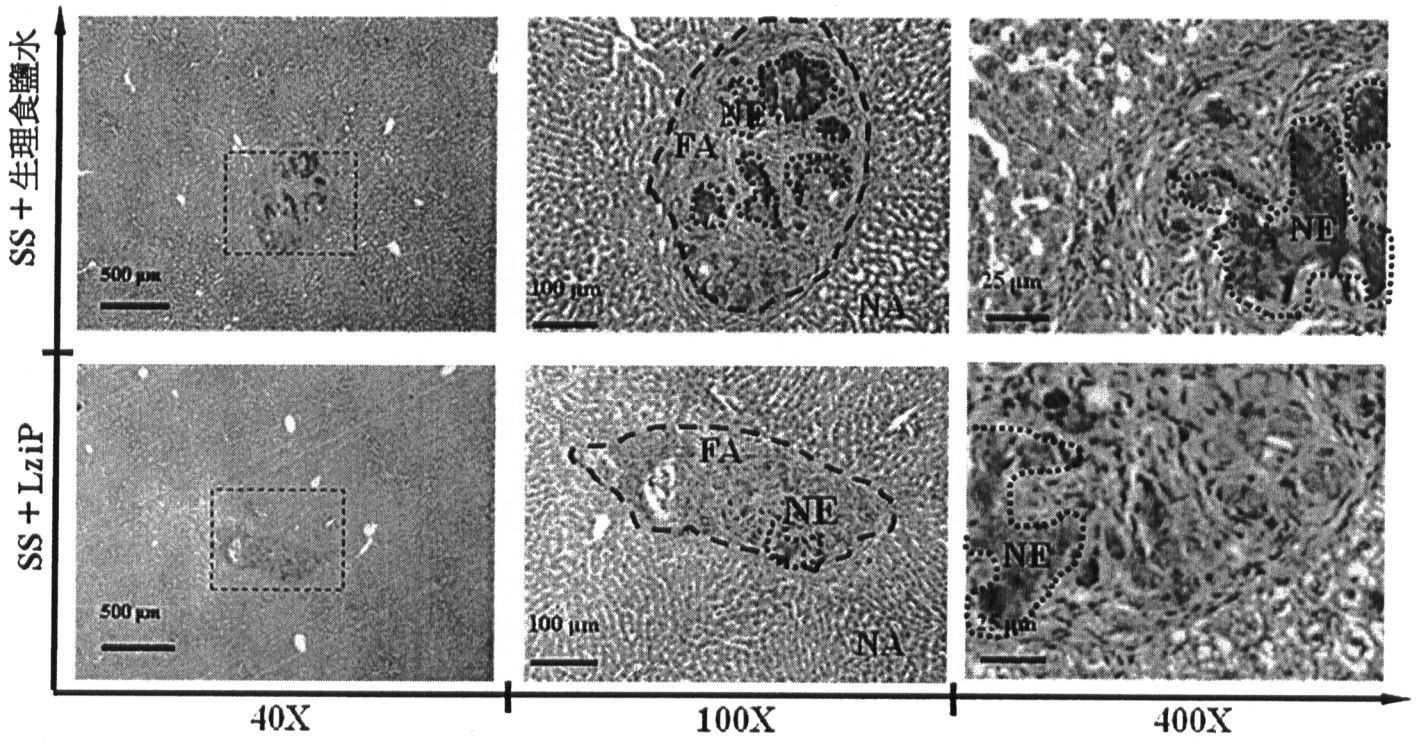


圖 8