

I299735

公告本

97年5月8日修正本

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：95100605

C07K 16/14 C12N 15/31

※申請日期：95.01.06

※IPC分類：A61K 39/40

※一、發明名稱：由小孢子靈芝選殖之免疫調節蛋白質/

An immunomodulatory protein cloned from
Ganoderma microsporum (中文/英文)

二、申請人：(共一人)

姓名或名稱：沃百特科技公司/WORLD BIO-TECH ALLIANCE CORP. (中文/
英文) (簽章) ID：

指定 為應受送達人

代表人：江美麗/WANG CHIANG, MEI-LI (中文/英文) (簽章)

住居所或營業所地址：英屬維爾京群島托透拉島道路鎮德瑞克商務中心
/DRAKE CHAMBERS, ROAD TOWN, TORTOLA, BRITISH VIRGIN ISLANDS (中文/
英文)

國籍：英屬維爾京群島/BRITISH VIRGIN ISLANDS (中文/英文)

三、發明人：(共一人)

姓名：林采菱/Lin, Tsai-Leng (中文/英文)

國籍：中華民國 (中文/英文)

(5)

四、聲明事項：

主張專利法第二十二條第二項第一款或第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

主張專利法第三十條生物材料：

須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係一種免疫調節蛋白及其製備方法，特別指由小孢子靈芝選殖，具有比 *Ganoderma lucidum* 分離之免疫調節蛋白更佳免疫調節效率之免疫調節蛋白。

【先前技術】

靈芝屬於真菌界 (Kindom Fungi)、擔子菌門 (Basidiomycota)、層菌綱 (Hymenomycetes)、無蕈褶目 (Aphyllophorales)、靈芝科 (Ganodermataceae) 的靈芝屬 (*Ganoderma*) (Alexopoulos et al. 1996)。目前靈芝屬在文獻中雖然有 300 種左右，但在藥理和臨床的研究中只有靈芝 (*Ganoderma lucidum*)、松杉靈芝 (*G. tsugae*)、薄樹靈芝 (*G. capense*)、狹長孢靈芝 (*G. boninense*)、無柄靈芝 (*G. resinaceum*) 等紅色芝和紫芝 (*G. sinense*)、日本靈芝 (*G. japonicum*) 等紫色靈芝與樹舌靈芝 (*G. applanatum*) 等少數特定的靈芝菌種被研究與利用 (許，1993)。靈芝經過三十年的藥理研究，發現其萃取物中具有鎮靜、鎮痛、鎮咳、強心、保肝 (Lin et al. 1993)、降血壓 (Lee and Rhee 1990)、降血脂 (Kabir et al. 1988)、降膽固醇 (Komoda et al. 1989)、抗過敏 (Chen et al. 1992)、抗發炎 (Lin et al. 1993)、抗病毒 (el-Mekkawy et al. 1998)、抗腫瘤與免疫調節功能 (Chen et al. 2004) 等活性成分。

Sasaki 等人於 1971 年發現樹舌靈芝 (*G. applanatum*) 的多醣體具抗腫瘤活性，使得多醣體成為靈芝第一項被證實

的活性成分 (Sasaki et al. 1971)。其作用機制並非在於直接殺死或抑制癌細胞，而是經由活化 T 細胞以及增強自然殺手細胞的能力 (Lei and Lin 1991)以提高免疫力來間接表現其抗癌活性。此外，對於單核的巨噬細胞可增強其吞噬能力，並促進抑制腫瘤生長的細胞激素如：介白質 (IL-2、IL-4)、干擾素 (IFN- γ) 及腫瘤壞死因子 (TNF- α) 等的合成與釋放 (Lieu et al. 1992)；藉由強化自然殺手細胞和巨噬細胞，直接攻擊不正常的腫瘤細胞，達到防癌、抗癌之效果。

靈芝的另一種活性物質，免疫調節蛋白 (immunomodulatory protein)，於 1989 年由日本學者 Kino 等人自 *G. lucidum* 菌絲體中分離出來，命名為 LZ-8 (Ling Zhi-8) (Kino et al. 1989)。LZ-8 由 110 個胺基酸所組成，分子量為 12,420 Da，並且與免疫球蛋白重鏈區之可變區域的胺基酸序列及二級結構有某程度的相似性 (Tanaka et al. 1989)。LZ-8 原態是以同源雙體 (homodimer) 的形式存在，具有促進淋巴球增殖以及抑制全身性過敏反應 (systemic anaphylaxis reaction) 和局部過敏反應 (Arthus reaction) 的作用。由於，LZ-8 對於人類紅血球卻不發生任何凝集反應 (Kino et al. 1989)，顯示其在人體醫學上有其應用之潛力。因此，日本明治集團同時在日本、歐洲以及美國申請關於 LZ-8 的專利，分別為：以 LZ-8 作為抗愛滋藥劑以及核酸序列之專利 JP2032026、JP3172184 以及 JP5068561；LZ-8 蛋白質特性以及作為免疫抑制藥劑之專利 EP0288959B1, US5334704。另外，LZ-8 的 -Leu-Ala-Trp-Asp-Val-Lys- 和

-Asn-Leu-Gly-Val-Lys-Pro-Ser-Tyr-Ala-Val-兩段部分醣蛋白(glycoprotein)序列亦享有專利保護(US5334704)。

LZ-8 與外源凝集素(lectin)一樣，具有凝集細胞以及促進淋巴球增殖的能力。由於外源凝集素對醣類具有專一性結合的能力，故又稱親醣蛋白。這種對醣類專一性結合的特性，使其具有結合細胞表面特定醣基，進而刺激細胞引發後續免疫反應之能力。自 1989 年 Kino 發現 LZ-8 可刺激鼠科脾臟細胞增殖以及避免局部性和全身性過敏反應，後續更有研究指出 LZ-8 可以有效抑制非肥胖性糖尿病鼠(nonobese diabetic, NOD) 的自體免疫性第一型糖尿病之發生(Kino et al. 1990)。此外，LZ-8 在胰臟異體移植方面可以顯著延緩排斥的時間。相較於其他免疫調節藥物(immunomodulatory drug)：CsA(cyclosporin A，來自真菌具有免疫抑制作用的勝肽)以及 FK506(tacrolimus，由土壤真菌所分泌具有免疫抑制作用的抗生素)對於胰臟皆有毒害的危險，LZ-8 對於胰島則沒有發現有任何毒害作用(vander Hem et al. 1995)。LZ-8 不論在活體外或是活體內的實驗，都顯現出免疫調節活性，但其確切作用機制卻不清楚。Kino 等人於 1991 年發現 LZ-8 可抑制老鼠抗體的產生，推測 LZ-8 乃藉由阻斷抗體的產生而達到抑制全身性及局部性過敏反應(Kino et al. 1991)。此後，更發現 LZ-8 是透過調控細胞表面附著的分子來達到調節細胞間的交互作用(Miyasaka et al. 1992)，而此交互作用正是自體免疫疾病患者所缺乏。

靈芝免疫調節蛋白 LZ-8 證實了單純之胜肽即具免疫調節功能，而其他研究也發現，從松杉靈芝 (*G. tsugae*) 菌絲體中純化出分子量約 13 kD 的免疫調節蛋白 FIP-gts (fungal immunomodulatory protein-gts)，與 LZ-8 的序列完全相同。FIP-gts 可以促進人類周邊淋巴球細胞 (human peripheral lymphocytes) 以及小鼠脾臟細胞增生，在濃度為 5 μg/ml 時，對人類周邊淋巴球細胞可達最高之增殖作用。除此之外，在一些非靈芝屬的菇類中也可純化出分子量約 13 kD 的免疫調節蛋白，例如：金針菇的 FIP-fve (Ko et al. 1995) 以及草菇的 FIP-vvo (Hsu et al. 1997)。LZ-8、FIP-fve 以及 FIP-vvo 且均含有與免疫球蛋白重鏈的可變區域相當之相似性。FIP-fve 和 FIP-vvo 不僅在序列以及結構上與 LZ-8 類似，在生理活性上也具有相似性。

藥用真菌之保健療效眾所周知，其有效成分也逐漸被純化分離出，然而目前所確知的有效成分多為多醣體或是三萜類化合物，但這些活性物質在純化上並無法排除其他活性物質如肽多醣及醣蛋白等的干擾，因此對於生理活性上機制的研究多有疑慮。此外，這些活性物質不是細胞壁組成份就是二次代謝產物，很難透過異源表現系統進行大量生產。

【發明內容】

本發明的目的在提供一種由小孢子靈芝選殖出的免疫調節蛋白質基因，其基因序列及所轉譯出的蛋白質序列與專利的 LZ-8 不同，且具有較 LZ-8 更有效率的免疫調節能力。

依據本發明目的之一種免疫調節蛋白基因，係選殖自小孢子靈芝 *Ganoderma microsporum*，具有序列表 SEQ ID NO 2 及 SEQ ID NO 3 之胺基酸序列。

本發明之具有上述免疫調節蛋白基因之一種免疫調節蛋白，其分子量為 15863.79 Da。

如上述的由小孢子靈芝選殖的免疫調節蛋白，因有與已專利 LZ-8 不同的蛋白質序列，故產生了較 LZ-8 更有效率的免疫調節能力。

以下僅以較佳的實施例說明本發明的可實施性及其功效特點：

【實施方式】

材料

本發明所用之菌株、質體與引子請參見表一、表二及表三。其中本發明所用之小孢子靈芝 *Ganoderma microsporum* RSH 0821 係以美國密西根州底特律市 Difco 公司的馬鈴薯葡萄糖洋菜 (Potato dextrose agar, PDA, Difco, Detroit, MI) 斜面培養基於 25°C 保存。異源表現系統則採用美國加州卡爾斯貝市 Invitrogen 公司 (Invitrogen, Carlsbad, CA, US) 的嗜甲醇酵母菌 *Pichia pastoris* 表達套組 (expression kit)。大腸桿菌 *Escherichia coli* JM109 為本發明進行分生操作及質體保存之宿主細胞，一般培養是使用美國馬里蘭州巴爾的摩市 Alpha Bioscience 公司 (Alpha Bioscience, Baltimore) 的固態平板培養基 (LB, Luria-Bertani agar) 或是液態培養基 (LB broth)，其培養溫度為 37°C；液態培養則需以 250 rpm 震

盪處理。菌株長期保存於-80°C 之含 25% 甘油之 LB broth。

表一

菌株	特性	來源
<i>Ganoderma</i> spp.		
<i>G. microsporum</i> RSH 0821	Heterokaryote, <i>gmi</i> 基因源	本實驗室
<i>G. tsugae</i> RSH 1109	Heterokaryote, <i>lz-8</i> 基因源	本實驗室
<i>E. coli</i>		
JM109	質體結構及儲存 <i>recA1</i> , <i>supE44</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>thiΔ(lac-proAB)</i> , F' [<i>traD36</i> , <i>proAB</i> ⁺ , <i>lacI</i> ^q , <i>lacZΔM15</i>]	Stratagene (美國加州拉裘勒)
Rosetta origami B (DE3)	宿主表達 F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdSB(r</i> _B ⁻ , <i>m</i> _B ⁻ <i>)</i> , <i>gal</i> , <i>dcm</i> , <i>lacY1</i> , <i>aphC</i> , <i>gor522::Tn10</i> , <i>trxB</i> , <i>pRARE(Cam</i> ^R <i>, Kan</i> ^R <i>, Tet</i> ^R <i>)</i>	Novagen (美國加州聖地牙哥)
<i>P. pastoris</i>		
KM71	宿主表達 <i>Mut</i> ^s , <i>his4</i> , <i>AOX1::ARG4</i> , <i>arg4</i>	Invitrogen (美國加州卡爾斯貝)

表二

質體	特性	來源
<i>E. coli</i>		
yT&A	TA 選殖載體, <i>lacZ</i> , Amp ^r	Yeastern (台灣台北)
pGEM-T	TA 選殖載體, <i>lacZ</i> , Amp ^r	Promega (美國威斯康辛州麥迪遜)
pGEX-4T-1	表現載體, tac 啟動子 (promoter), <i>lacI</i> ^q , Amp ^r , 在 N 端接有 GST-tag	Amersham Pharmacia (瑞典阿普塞)
pGEXL	pGEX-4T-1 與 <i>lz-8</i> 基因著生於 <i>BamHI/EcoRI</i> 位置	本實驗
<i>P. pastoris</i>		
pPICZα A	表現載體, <i>AOX1</i> 啟動子 (promoter), Zeo ^r , α-因子訊息肽, 在 C-端接有 c-myc 抗原決定位(epitope)與 His-tag	Invitrogen (美國加州卡爾斯貝)
pPLZ	pPICZαA 與 <i>lz-8</i> 基因著生於 <i>EcoRI/XbaI</i> 位置	本實驗
pPGMI	pPICZαA 與 <i>gmi</i> 基因著生於 <i>EcoRI/XbaI</i> 位置	本實驗

表三

引子	引子序列 (5'→3') ^a	參照來源
LZ8-F	TCCGACACTGCCTTGATCTTCAGG	本實驗
LZ8-R	GTTCCACTGGCGATGATGAAGTC	本實驗
LZ8-BF	GGATCCATGTCCGACACTGCCT	本實驗
LZ8-ER	GAATTCTAGTTCCACTGGCGA	本實驗
LZ8-EF	GAATTCATGTCCGACACTGCC	本實驗
LZ8-XR	TCTAGATAGTTCCACTGGCG	本實驗
3'GW-F	CGTTCGACTACACCCGAACTGGGGC	Kilstrup and Kristiansen, 2000
MKP22	GCGCTGCAGGCATGCGAGCTCCAAAGCTTGATCG	Kilstrup and Kristiansen, 2000
MKP23	AATTGATCAAGCTTGGGAGCTCGCATGCCTGCAGCGC	Kilstrup and Kristiansen, 2000
MKP24	GCGCTGCAGGCATGCGAGCTG	Kilstrup and Kristiansen, 2000
0821GW-R1	GAATTGATGGCCCGCCGAGC	本實驗
0821GW-R2	CCCTTCTAGTTCCACTGGGCAAC	本實驗
GMI-XR	TCTAGATAGTTCCACTGGGCA	本實驗

^a引子中之限制酶切點以粗體標示，*BamH I*：GGATCC，*EcoR I*：GAATTC，*HindIII*：AAGCTT，*Xba I*：TCTAGA。

小孢子靈芝免疫調節蛋白基因之選殖

小孢子靈芝染色體 DNA 之萃取：

參照 Al-Samarrai and Schmid (Al-Samarrai and Schmid 2000) 之方法。將小孢子靈芝菌絲體以菌塊接種方式置入 PDB 液態培養基中，以 25°C 培養一至數週後，採抽氣過濾法收集菌絲體並以蒸餾水清洗數次、去除水分。以液態氮研磨成粉狀，放置於 -20°C 冰箱保存。

聚合酶連鎖反應（PCR）分析：

以小孢子靈芝之染色體 DNA 為模板，LZ8-F/LZ8-R 為引子（表三），進行 PCR 擴增，其黏合溫度 T_a (annealing temperature) 為 $48\sim60^\circ\text{C}$ 、延伸時間 t_e (elongation time) 為 30 sec. (表四)，所得核酸片段經純化，以 TA 連接 (TA ligation) 方式接入保存質體 yT\&A 並轉形至 *E. coli* JM109 (表一) 後，進行核酸定序分析。

Genome Walking (基因組步)：

參考 Kilstorp and Kristiansen (Kilstorp and Kristiansen 2000) 之方法，利用限制酶將染色體 DNA 截切成小片段，並於片段兩端接上已知序列的轉接子 (adaptor) 成為模板 DNA，之後以基因專一性引子及轉接子上的專一性引子進行 PCR 擴增反應，最後可得大量的目標基因片段。

結果：

於 PCR 分析中利用 LZ-8 引子選殖出 *G. microsporum* 免疫調節蛋白新基因之部分序列約 330 bp (第一圖)。針對此新基因已知序列另設計專一性引子 3'GW-F 進行 3' genome walking，可得此新基因之三端未知序列 (第二圖)。為了將新免疫調節蛋白全基因一次選殖出來，於三端已知序列再設計兩條專一性引子 0821GW-R1 和 0821GW-R2(表三) 進行 5' genome walking，可得長約 450 bp 的基因片段 (第三圖 A)。合併之前所選殖出來的三端序列基因片段，則 *G. microsporum* 免疫調節蛋白新基因全長共 666 bp 並命名為 *gmi* (第三 B 圖)。

表四

DNA ^a 模板	引子 ^b	PCR 條件	
		T _a (°C) ^c	t _e (min.) ^d
3'端部分基因組步			
0821/ <i>EcoR I</i> , 0821/ <i>Hind III</i>	3'GW-R/MKP24	54, 56, 58, 60	2
5'端完整基因組步			
0821/ <i>EcoR I</i> , 0821/ <i>Hind III</i>	第 1 PCR 0821GW-R1/MKP24 第 2 PCR 0821GW-R2/MKP24	60 56	3 2

^a：經限制酶截切之染色體 DNA。

^b：請參表三。

^cT_a：黏合溫度 (annealing temperature)。

^dt_e：延伸時間 (elongation time)。

靈芝免疫調節蛋白 LZ-8 於 *E. coli* 之異源表現

pGEXL 表現載體之建構：

以 PCR 分析所得並保存於 yT&A 之 lz-8 基因做為模板，分別帶有限制酶 *BamHIII*、*EcoRIV* (表三) 切位的 LZ8-BF、LZ8-ER 為引子，進行 PCR 放大 (T_a = 60°C, t_e = 30 sec.)，所得片段保存於 yT&A 並依一般分生操作剪接入 pGEX-4T-1 相對位置，可得表現載體 pGEXL。接著轉形至 *E. coli* Rosetta-gami B (RGB) 進行表現。

E. coli 融合蛋白之表現：

將 1% 隔夜培養的種菌接種至 900 ml 含 100 µg/ml ampicillin (安比西林) 之 LB 液態培養基，於 37°C 震盪培養至 OD₆₀₀ = 0.6，以 0.5 mM IPTG (isopropyl-D-thiogalactopyranoside 異丙基-D-硫代半乳糖苷) 於 30°C 誘導隔夜。離心 (3000 g, 10 min., 4°C) 收集

菌體，懸浮於 5 ml 磷酸緩衝液 PBS (140mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.3) 後，進行超音波震盪破菌。離心 (14000 g, 20 min., 4°C) 前加入最終濃度 1% 的 Triton X-100 以增加融合蛋白之可溶性，取離心後上清液進行 Glutathione Sepharose 4B 管柱 (谷胱甘肽 Sepharose-4B 親合性層析柱) 純化，所得融合蛋白進行兔子多株抗體之製備。

靈芝屬免疫調節蛋白於 *P. pastoris* 之異源表現

pPLZ 及 pPGMI 表現載體之建構：

lz-8 及來自 *G. microsporum* 的免疫調節蛋白基因 *gmi* 基因分別以帶有 *EcoR I /Xba I* 等限制酶切位的引子 LZ8-EF/LZ8-XR 及 LZ8-EF/GMI-XR (表三) 進行 PCR 擴增放大後，所得片段保存於 pGEM-T 並依一般分生操作剪接入 pPICZαA 相對位置，可得表現載體 pPLZ 及 pPGMI，此表現載體可使目標蛋白之 N 端帶有 α 因子訊息勝肽 (α -factor signal peptide)，C 端接有 c-myc 抗原決定位 (epitope) 與 His-tag。重組蛋白被送至胞外的同時，訊息勝肽將被切除成為 reGMI (第六圖)。

P. pastoris 電穿孔轉形法：

參考 Invitrogen 公司的 *Pichia* 表達套組 (expression kit) 說明書以及 Wu and Letchworth (Wu and Letchworth 2004) 發表之轉形方法，將 *P. pastoris* KM71 於 200 mL YPD (Yeast Peptone Dextrose, 酵母膏胰葡萄糖瓊脂) 液態培

養基，以 30°C 培養至 OD₆₀₀（吸光值）約 1.0-2.0（1 單位 OD₆₀₀ 約相當 5 × 10⁷ cells/mL）後離心收菌。懸浮於 100-200 mL 前處理緩衝液（100 mM CH₃COOLi（醋酸鋰），10 mM DTT（dithiothreitol 二硫代蘇糖醇），0.6 M sorbitol（山梨糖醇），10 mM Tris-HCl（三羥甲基氨基甲烷鹽-酸鹽）pH 7.5），於室溫下靜置 30 分鐘後離心收菌。將菌體以 1 mL 冰的 1 M sorbitol 清洗三次，懸浮於 1 mL 冰的 1 M sorbitol (~10¹⁰ cells/mL)，即為電穿孔（electroporation）使用之勝任細胞（competent cells）。抽取表現質體並以 SacI 將質體截切為線狀且純化後，取 1 μg DNA (10 μL) 與 80 μL 之勝任細胞混合，移至之電穿孔玻璃管（cuvette, 0.2 cm, BTX）冰浴 5 分鐘，以加州聖地牙哥 BTX 公司（BTX, San Diego, CA）的 ECM 630 電穿孔系統（Electro Cell Manipulator Electroporation System）進行電穿孔，設定條件為 1.5 kV、25 μF、200 Ω。電穿孔後馬上加入於 1 mL 冰的 YPDS 液態培養基（1% yeast extract（酵母萃取物）；2% peptone（胰）；2% dextrose（葡萄糖）及 1M sorbitol（山梨糖醇）），於 30 °C 靜置 1-2 小時後將菌液塗佈於含 100 μg/ml zeocin（抗生素）的 YPDS 平板培養基，於 30°C 培養篩選；一般而言抗性越高的轉形株其插入的表現載體數目越多，重組蛋白的表現量也有較高之趨勢（Baneyx 2004）。

P. pastoris 融合蛋白之表現：

轉形株以含有 100 μg/ml zeocin 的 BMGY 液態培養基（1% yeast extract（酵母萃取物）；2% peptone（胰）；pH 6 的

potassium phosphate(磷酸鉀)100 mM; 1.34% YNB; $4 \times 10^{-5}\%$ biotin (生長素) 及 1% glycerol (甘油)) 於 30°C 培養活化兩次後，將到達靜止狀態(stationary phase) 的種菌接至 500 ml BMGY 使最終 OD₆₀₀ 為 0.1。培養 24 小時後，將培養基置換成 100 ml BMMY 液態培養基 (1% yeast extract (酵母萃取物)；2% peptone (脫)；pH 6 的 potassium phosphate (磷酸鉀) 100 mM；1.34% YNB； $4 \times 10^{-5}\%$ biotin (生長素) 及 0.5% MeOH (甲醇)) 誘導融合蛋白表現，其後每 24 小時添加甲醇使最終濃度為 0.5%，共連續誘導二天，收集胞外上清液。結果如第四圖所示，重組蛋白 reGMI 在 0.5% 甲醇誘導下，蛋白質濃度隨著誘導天數增加而增加。

P. pastoris 融合蛋白之純化：

以十倍膠體體積 pH 7.4 的 wash buffer (流洗液，50 mM NaH₂PO₄ (磷酸二氫鈉)，300 mM NaCl (氯化鈉)，10 mM imidazole (異吡唑)) 流洗 Ni-NTA (鎳-次氨基三乙酸) 管柱，重組蛋白 reLZ-8 及 reGMI 皆可完全吸附於管柱內。通入樣品後再以十倍膠體體積的 wash buffer 洗去非專一性吸附之雜蛋白；最後以含有不同 imidazole 濃度的磷酸緩衝液將融合蛋白流洗下來，分別為：reLZ-8 在 40~100 mM；reGMI 在 100~250 mM (第五圖)。純化所得之融合蛋白對 PBS 磷酸緩衝液透析後，以溶液狀態或是以乾燥粉末方式於 4°C 保存。雖然 *P. pastoris* 胞外上清液除了目標蛋白之外幾乎不見其他雜蛋白，但是唯有透過親和管柱純化才能將胞外液中的色素去除，降低重組蛋白進行免疫活性測定之干擾

因子。

P. pastoris 融合蛋白之特性分析

分子量與醣基修飾分析：

不論是重組蛋白 reLZ-8 及 reGMI，個別的理論分子量皆可由已知序列推知，但是這些重組蛋白在電泳膠片上所顯現出來的分子量皆大於理論分子量。為求得更準確之分子量，將 reGMI 進行 MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption /Ionization- Time Of Flight, 基質輔助鑄射解析電離飛行時間質譜) 質譜儀分析，結果如第七圖所示。reGMI 的測量值為 15863.79 Da，和理論值 15847.47 Da 幾乎相同，顯示 SDS-PAGE (十二烷基硫酸鈉-聚丙烯酰胺凝膠電泳) 在 Tris buffer 系統下會高估 reGMI 的分子量。此外也可由 MALDI-TOF 結果推知 *P. pastoris* 並不會對 reGMI 進行醣基化的修飾。

同源雙體分析：

原態 LZ-8 是以同源雙體的形式存在 (Tanaka, 1989)，而胺基酸序列與 LZ-8 相同的 FIP-gts 之生理活性與能否形成同源雙體有絕對關係 (Lin, 1997)。為初步判斷由 *P. pastoris* 所表現的重組蛋白 reGMI 在原態是否也是以同源雙體的形式存在，將此蛋白質溶液以不同濃度之戊二醛 (glutaraldehyde) 進行化學性的交聯鍵結 (crosslinking)。其原理在於戊二醛可以使蛋白質表面的 lysine(離胺酸) 彼此間透過胺基形成共價性建結，而空間位置相近的不同蛋白

質則有機會因此而相互結合固定。實驗結果如第八圖所示，在濃度為 0.01% 的戊二醛作用下，reGMI 同源雙體的訊號開始出現，隨著戊二醛濃度增加，同源雙體的比例也逐漸增加，顯示 reGMI 在原態是以同源雙體的形式存在。

蛋白質構形分析：

如第六圖中的方框所示，LZ-8 請求專利的兩段胺基酸序列分別為：

- (1)-Leu-Ala-Trp-Asp-Val-Lys- (LAWDVK) 及
- (2)-Asn-Leu-Gly-Val-Lys-Pro-Ser-Tyr-Ala-Val- (NLGVVKPSYAV)；

而來自 *G. microsporum* 的 GMI 與 LZ-8 請求專利相同區段的胺基酸序列为：

- (1) -Leu-Ala-Trp-Asn-Val-Lys- (LAWNVK) 及
- (2)-Asp-Leu-Gly-Val-Arg-Pro-Ser-Tyr-Ala-Val- (DLGVRPSYAV)。

GMI 在與 LZ-8 的已專利胺基酸序列上的差異明顯不同，而這些胺基酸上的差異或許會導致蛋白質構形上的改變，進而造成彼此間生理活性上的差異。為探討 reGMI 與 reLZ-8 在構形上的差異，兩者進行西方式雜合分析 (Western hybridization analysis)，結果發現 reGMI 可以被 LZ-8 的抗體所辨識但訊號很弱(第九圖)，顯示 reGMI 的確與 reLZ-8 雖具有相似之構形，但因序列上的差異使得 reGMI 在構形上與 reLZ-8 呈現一定的差異，此差異將可能影響到免疫調節之活性。因此，透過以下的免疫調節活性測試，以了解胺

基酸上的差異對兩者免疫調節活性之影響。

免疫調節活性測試

將純化後之 reGMI 以樹突細胞 (Dendritic cell) 進行免疫調節活性測定，流程如下：

取 5~6 週大 BALB/c 老鼠之骨髓細胞，以含 10% FCS (小牛血清) 之 RPMI-1640 培養基進行培養；於第二天添加 IL-4 和 GM-CSF (granulocyte/macrophage colony stimulating factor, 粒細胞/巨噬細胞集落刺激因子) 促使細胞分化；第四天更換至新培養盤繼續培養以去除巨噬細胞 (Macrophage)；第六天之未成熟的樹突細胞 (immature dendritic cells) 中加入不同濃度之蛋白質樣品，二十小時後蒐集上清液進行 IL-12 之 ELISA 測定 (ELISA, Enzyme-linked immunosorbent assay 酶素結合免疫吸附法)。

將純化後之 reGMI 以巨噬細胞與 T 細胞進行免疫調節活性測定，流程如下：

巨噬細胞株 J774A.1 和人類 T 細胞株 Jurkat cells (人類淋巴母細胞) 各以 RPMI-1640 含 10% FCS 之培養基進行培養，加入不同濃度之蛋白質樣品，六小時後蒐集上清液分別進行 TNF- α 和 IL-2 之 ELISA 測定。

結果：

為排除 *P. pastoris* 細胞壁組成份干擾之可能性 (Muller et al. 1997)，將 pPICZ α A 之 *P. pastoris* KM71 轉形株進行相同條件之表現、純化與透析後不含表現基因之

vector (載體) 為負控制組；LPS 為正控制組（第十～十二圖），不論於 BALB/c 老鼠骨髓樹突細胞、巨噬細胞株 J447A.1 或 Jurkat cells 皆不引發免疫反應。純化後之 reLZ-8 及 reGMI 以 0、0.625、1.25 和 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 等四種重組蛋白濃度施用於 BALB/c 老鼠之骨髓樹突細胞 (BALB/c mice bone marrow dendritic cells)，皆可刺激細胞分泌 IL-12 p40，其中 reGMI 於 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 下刺激樹突細胞分泌 IL-12p40 的量為相同濃度 reLZ-8 之六倍（第十圖）。IL-12 p40 為 IL-12 其中一個單體，IL-12 p40 表現量增加意味著 IL-12 表現量也可能增加，而 IL-12 乃樹突細胞啟動甚至維持 T_{H1} 免疫細胞群之重要細胞激素，IL-12 的存在也會抑制 T_{H2} 細胞生長分化 (Park and Scott 2001)。靈芝屬免疫調節蛋白也可直接作用於 T 細胞，如第十二圖為將 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 reLZ-8 與 reGMI 施用於人類 T 細胞株 Jurkat cells，皆可活化細胞分泌 IL-2 (介白質)。IL-2 可促未分化的 T 細胞增殖與分化。此外，IL-2 也是 T_{H1} 細胞分泌的細胞激素之一。TNF- α (腫瘤壞死因子) 為巨噬細胞引發發炎反應的細胞激素之一，也是判斷巨噬細胞是否被活化的一個指標。第十一圖顯示 reLZ-8 和 reGMI 在 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度下皆可活化老鼠巨噬細胞株 J774A.1 分泌 TNF- α 。

由上述的免疫活性測試得知，本發明之免疫調節蛋白 reGMI 不但具有促使各種細胞活化的能力，且具有較 reLZ-8 更高的免疫效率。

以上已透過各種實施方式充分說明本發明的可實施性及其實施後結果。惟，這些只是本發明的其中較佳實施例，不能視為本發明的限制條件，本發明的具體權利範圍以本發明的申請專利範圍中所記載者為依歸。

【圖式簡單說明】

第一圖係以 LZ-8 引子 (LZ8-F/LZ8-R) 對 *G. tsugae* 和 *G. microsporum* 進行 PCR 擴增的結果；其中第一 A 圖為擴增片段之電泳結果，第一 B 圖為擴增片段之定序結果；第一 A 圖中箭頭所示為所用引子，其中 3'GW-F 用於 3' genome walking。

第二圖係 *G. microsporum* 免疫調節蛋白基因之 3' genome walking 結果；其中第二 A 圖係以 3'GW-F/MKP24 等引子對模板 DNA 進行 PCR 擴增的片段之定序結果；而第二 B 圖為擴增後之電泳結果；第二 A 圖中箭頭所示為所用引子，0821GW-R1 及 0821GW-R2 用於 5' genome walking。

第三圖係 *G. microsporum* 免疫調節蛋白基因之 5' genome walking 結果；係以 5'GW-R1/MKP24 進行第一次 PCR 擴增後，再以 5'GW-R2/MKP24 進行第二次 PCR 擴增；其中第三 A 圖為擴增片段之定序結果，亦是 *G. microsporum* 免疫調節蛋白基因 *gmi* 全序列；第三 B 圖為擴增後之電泳結果；第三 A 圖中方框所示為 LZ-8 序列的專利區段。

第四圖係 *G. microsporum* 免疫調節蛋白 GMI 以 PICZ α A/*Pichia pastoris* KM71 進行異源表現。

第五圖係重組蛋白 reLZ-8 與 reGMI 以不同濃度之異毗哩流洗液進行親和管柱純化之結果；其中第五 A 圖為 reLZ-8；第五 B 圖為 reGMI。

第六圖係 LZ-8 與 GMI 重組蛋白 reLZ-8、reGMI 之胺基酸序列，其中方框所示為 LZ-8 序列的專利區段。

第七圖係 reGMI 之 MALDI-TOF 分析結果。

第八圖係 reGMI 以不同濃度之戊二醛進行交聯鍵結圖。

第九圖係等量 reLZ-8 與 reGMI 進行西方雜合反應之結果。

第十圖係 reGMI 促進 BALB/c 老鼠骨髓樹突細胞株分泌 IL-12p40 之結果。

第十一圖係 reGMI 促進老鼠巨噬細胞株 J774A.1 分泌 TNF- α 之結果。

第十二圖係 reGMI 促進人類 T 細胞株 Jurkat cells 分泌 IL-2 之結果。

【主要元件符號說明】

無

序列表

<110>沃百特科技有限公司/-World Bio-Tech Alliance Corp.

<120>由小孢子靈芝選殖之免疫調節蛋白質

<160> 3

<210> 1

<211> 666

<212> DNA

<213> *Ganoderma microsporum*

<400> 1

cttccgcggc aggttgtcgc ggcgctcgac gggccatcga attcacgaac ctgcagaacc 60
aatcccatac gcgatgttga aggccgcata cacgtgtcca tctacgccaa tggacgcgtc 120
agcttatccg gcatggcata gggtccttgg agctccgcaa cttacaccca acgccctcca 180
tactgcgtc caggcatgcg agctcccaag cttgatcgaa ttccctgacc tctgccccgc 240
agcattatgt ccgacactgc cttgatcttc acgctcgctt ggaatgtgaa gcagctcg 300
ttcgactaca ctccaaactg gggccgcggg cgtcccagca gctttatcga caccgtcacc 360
ttccccacgg tcctgactga caaggcgtac acgtaccgcg tcgtcggttc cgaaaaggac 420
ctcgccgtgc gccctcata cgccgtcgag agcgacggct cgccggaaat caacttcctc 480
gaataacaact ccggctacgg catcgccgac acgaacacga tccaaagtgtta cgtcattgac 540
cccgacaccc gcaacaattt cattgttgcc cagtggact agaaggagg agtgatcgcc 600
cccgacacccg ctgctcggcg ggccatcga ttcgatcaag ctgggagct cgcatgcctg 660
cagcgc 666

<210> 2

<211> 6

<212> PRT

<213> *Ganoderma microsporum*

<400> 2

Leu Ala Trp Asn Val Lys

1

5

I299735

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> *Ganoderma microsporum*

<400>3

Asp Leu Gly Val Arg Pro Ser Tyr Ala Val

1

5

10

五、中文發明摘要：

一種免疫調節蛋白（immunomodulatory protein），係選殖自小孢子靈芝 *Ganoderma microsporum*。分子量為 15863.79 Da。其基因序列及所轉譯出的蛋白質序列，與已知的由靈芝 *G. lucidum* 菌絲體中分離出來具有免疫功效的糖蛋白 LZ-8 專利所保護的不同，且具有較 LZ-8 更有效率的免疫調節能力。

六、英文發明摘要：

無

十、申請專利範圍：

1. 一種選殖自小孢子靈芝的免疫調節蛋白質，其胺基酸序列係由序列表 SEQ ID NO 1 之核苷酸序列所演繹生成。
2. 如申請專利範圍第 1 項的免疫調節蛋白質，係選殖自小孢子靈芝 *Ganoderma microsporum* RSH 0821。
3. 如申請專利範圍第 1 項的免疫調節蛋白質，其 MALDI-TOF 分析之分子量為 15863.79 Da。
4. 如申請專利範圍第 1 項的免疫調節蛋白質，係以同源雙體形式存在。
5. 如申請專利範圍第 1 項的免疫調節蛋白質，包括序列表 SEQ ID NO 2 及 SEQ ID NO 3 之胺基酸序列。
6. 一種核苷酸序列，如序列表 SEQ ID NO 1 所示。

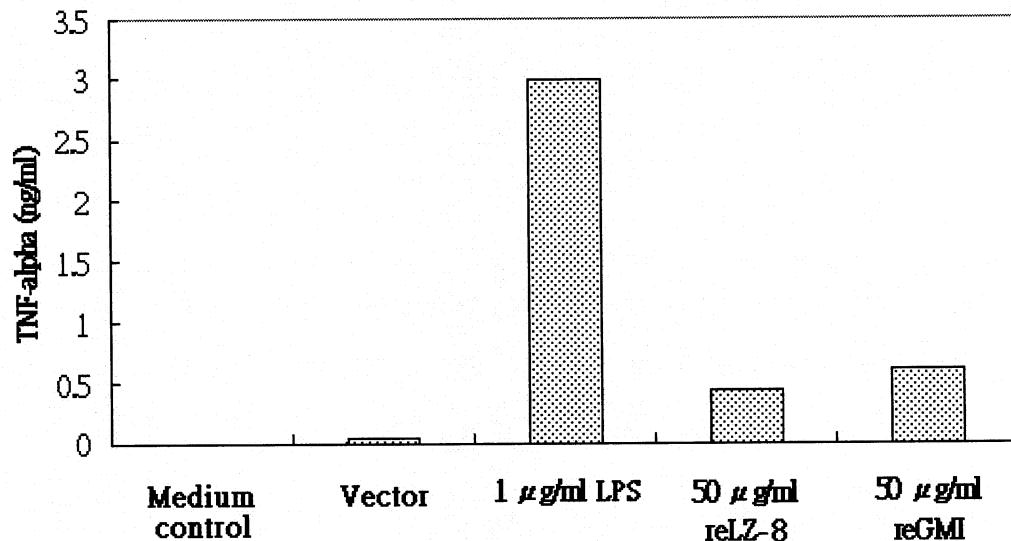
(SJ)299735

10 20 30 40 50 60 70
· · · · / / / / / / / / / / /
reLZ-8 EAEAEFMSDTALIIFRLAWDVK**K**LKFSDYTPNWGRGNPNNFIDTVTFPKVLTDKAYTYRVAVSGRNILGVKPS
reGMI EAEAEFMSDTALIIFTLAWNVK**D**LAFLDYTPNWGRGRPSSEIDTVTFPTVLTDKAYTYRVVVSGKD LGVRPS

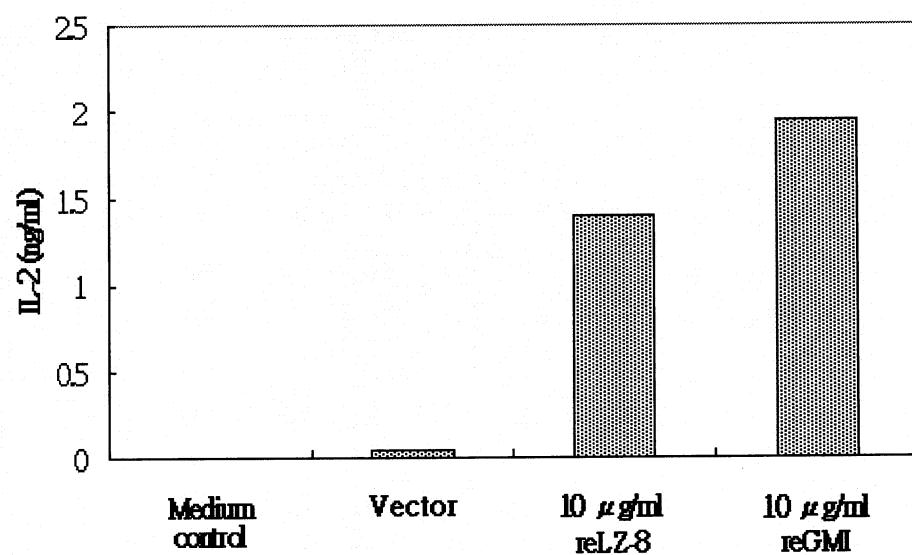
80 90 100 110 120 130 140
· · · · / / / / / / / / / /
reLZ-8 YAVESDGSSQKVNFLEYNSGYGIADTNTIQVFVVDPDTINNDFIIAQWNYLEQKLISEEDLN SAVDHHHHHH
reGMI YAVESDGSSQKINFLEYNSGYGIADTNTIQVYVIDPDTGNNFIVAQWNYLEQKLISEEDLN SAVDHHHHHH

第六圖

S299735



第十一圖



第十二圖

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第三圖

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：無

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：