



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I619507 B

(45)公告日：中華民國 107 (2018) 年 04 月 01 日

(21)申請案號：103110733

(22)申請日：中華民國 103 (2014) 年 03 月 21 日

(51)Int. Cl. : A61K38/44 (2006.01)

A61P11/06 (2006.01)

A61P37/00 (2006.01)

(30)優先權：2013/03/22

中華民國

102110344

(71)申請人：東宇生物科技股份有限公司 (中華民國) PROMD BIOTECH. CO., LTD. (TW)

臺南市善化區大利二路 1 號

(72)發明人：王志堯 WANG, JIU-YAO (TW)；蘇偉誌 SU, WEI CHIH (TW)；陳湘陵 CHEN, HSIANG LING (TW)；黃浚憲 HUANG, CHUN HSIEN (TW)；吳小俐 WU, HSIAO LI (TW)；李光智 LEE, KUANG CHIH (TW)；蔡佩瑜 TSAI, PEI YU (TW)；曾群富 TSENG, CHUN FU (TW)

(74)代理人：鄭志玲

(83)生物材料寄存：

食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心 BCRC 910304 2006 年 01 月 11 日

(56)參考文獻：

TW 200829175A

WO 2012/144501A1

NCBI GenBank:EJN53651 (2012 年 07 月 30 日)

莊榮輝，表現蛋白質之純化與檢定，<http://juang.bst.ntu.edu.tw/BCT/Chapters/BCT2005%20C4.pdf>，2004 年 4 月 7 日。

審查人員：蔡付樺

申請專利範圍項數：9 項 圖式數：25 共 53 頁

(54)名稱

治療或預防過敏性疾病的有效成分

ACTIVE INGREDIENT FOR TREATMENT OR PREVENTION OF ALLERGIC DISEASES

(57)摘要

本發明關於一種治療或預防過敏性疾病的有效成分，其中該有效成分為甘油醛-3-磷酸脫氫酶 (G3PDH)。也提供甘油醛-3-磷酸脫氫酶用於製備具有治療或預防過敏性疾病藥劑的用途，以及用於製備具有治療或預防氣喘或異位性皮膚炎藥劑的用途。

The present invention relates to an active ingredient for treatment or prevention of allergic diseases; wherein the active ingredient is glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase (G3PDH). The uses of G3PDH in manufacturing a medicament for treating or preventing allergy diseases, and that for treating or preventing asthma or atopic dermatitis are also provided.

指定代表圖：

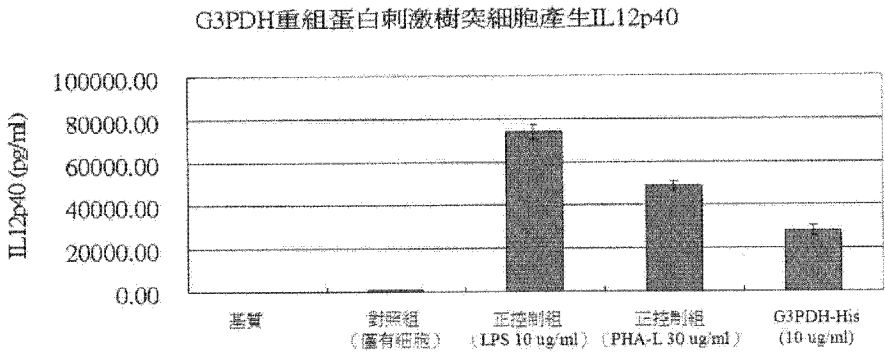


圖 24

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】(中文/英文)

治療或預防過敏性疾病的有効成分/ACTIVE INGREDIENT FOR
TREATMENT OR PREVENTION OF ALLERGIC DISEASES

【技術領域】

【0001】 本發明是關於一種抗過敏活性物質的用途，特定而言，該包含該抗過敏活性物質的組合物可用於製備預防或治療過敏性疾病的藥劑，尤其是氣喘或異位性皮膚炎。

【先前技術】

【0002】 過敏疾病，例如過敏性濕疹、蕁麻疹、反覆發作的過敏性鼻炎、過敏性氣喘及異位性皮膚炎，在台灣及其他已開發國家已成為嚴重的社會問題，廣為人知的衛生假說為：嬰幼兒接觸免疫刺激病原體的機會愈少，愈容易引發過敏相關疾病的產生。相關研究指出，過敏疾病發生時，人體內的免疫反應會使 Th1 細胞數量下降，連續產生多種細胞激素促使免疫反應朝向 Th2 途徑，形成體液免疫反應，例如 IgE 的產生及嗜伊紅血球過多等，經由刺激 Th1 型免疫反應以調節、平衡過敏所引發 Th2 型免疫反應，將可達到改善過敏體質的效果。

【0003】 針對氣喘的治療，目前仍以藥物治療為主：如類固醇和抑制肥大細胞釋放發炎物質的藥物、氣管擴張劑和免疫療法等。然而，包括抗炎藥物和氣管擴張劑在內的藥物治療仍無法真正的改變過敏免疫反應，僅為一種治標的方法。

【0004】 於異位性皮膚炎治療上，目前係以局部塗抹類固醇 (topical corticosteroids, TCS) (Lowenberg et al., 2008) 或是局部免疫抑制劑 (topical calcineurin inhibitors, TCI) (Hultsch et al., 2005; Kim et al., 2010) 為最快速有效的方式。但是，仍有一些副作用的疑慮如長期使用類固醇會有皮膚萎縮、皮膚色素改變、皮膚出現血絲、甚至造成像妊娠紋般的擴張紋，且類固醇於人體吸收後可能影響賀爾蒙分泌。而免疫抑制劑也會造成皮膚灼熱

與刺激感等的副作用。因此，異位性皮膚炎的治療仍需以有效改善皮膚發炎反應並且沒有副作用為目標。

【0005】 另一方面，減敏療法雖能改變過敏免疫體質，但是通常需要較長的一段時間，且有時會出現一些副作用，並非所有的病人都能夠使用。

【0006】 因此，仍需開發具抗過敏活性的活性成分，以刺激免疫細胞、調節 Th1/Th2 免疫反應為作用機制。

【發明內容】

【0007】 本發明基於發現甘油醛-3-磷酸脫氫酶（Glyceraldehyde 3-phosphate Dehydrogenase, G3PDH）具有抗過敏活性，可降低個體過敏反應，因而可開發為治療或預防過敏性疾病之藥劑，進一步驗證其亦可開發為治療或預防氣喘或異位性皮膚炎之藥劑。

【0008】 因此，本發明提供一種甘油醛-3-磷酸脫氫酶（Glyceraldehyde 3-phosphate Dehydrogenase, G3PDH）或其具相同功能的變異體或片段用於製備降低個體過敏反應藥劑的用途。

【0009】 在一方面，本發明提供一種甘油醛-3-磷酸脫氫酶或其具相同功能的變異體或片段用於製備治療或預防過敏性疾病藥劑的用途。其中該過敏性疾病可為氣喘或異位性皮膚炎。

【0010】 另一方面，本發明所提供之甘油醛-3-磷酸脫氫酶具有 SEQ ID NO: 1 的胺基酸序列。

【0011】 此外，本發明所提供之甘油醛-3-磷酸脫氫酶係選自由加氏乳酸桿菌（*Lactobacillus gasseri*）PM-A0005 菌株（簡稱「PM-A0005 菌株」）及其萃取物、區分物、次區分物或有效成分所組成的群組；其中該 PM-A0005 菌株為具有與寄存於台灣新竹食品工業發展研究所寄存編號 BCRC 910304 菌株功能相同的性質。

【0012】 在一方面，本發明所提供之 PM-A0005 菌株的萃取物、區分物及次區分物可與生理上可接受的賦形劑或稀釋劑製成一醫藥組合物或食品組合物。

【0013】 在另一方面，本發明所提供之甘油醛-3-磷酸脫氫酶或其具相同功能的變異體或片段可與生理上可接受的賦形劑或稀釋劑製成一醫藥

組合物或食品組合物。

【0014】 除此之外，本發明提供一種加氏乳酸桿菌 (*Lactobacillus gasseri*) PM-A0005 菌株用於製備治療或預防異位性皮膚炎藥劑的用途，其中該 PM-A0005 菌株為具有與寄存於台灣新竹食品工業發展研究所寄存編號 BCRC 910304 菌株功能相同的性質。

【0015】 根據本發明的實施例，該 PM-A0005 菌株的萃取物係以溶菌酶分解該 PM-A0005 菌株菌體後再以硫酸銨沉澱胞質蛋白質而獲得。在本發明一具體實施例中，該萃取物係以硫酸銨濃度 0-25% 或 50-75% 沉澱胞質蛋白質而獲得，其萃取物編號分別為 AS_0-25% 及 AS_50-75%。

【0016】 根據本發明的實施例，該 PM-A0005 菌株萃取物的區分物係以溶菌酶分解該 PM-A0005 菌株菌體後再以硫酸銨沉澱胞質蛋白質而獲得萃取物後，其再經離子交換層析 (ion-exchange chromatography) 分離而得。在本發明一具體實施例中，該區分物編號分別為 IE1-2、IE1-3、IE3-2 及 IE3-3。

【0017】 根據本發明另一實施例，該 PM-A0005 菌株萃取物的次區分物係以溶菌酶分解該 PM-A0005 菌株菌體後再以硫酸銨沉澱胞質蛋白質而獲得之萃取物，其經離子交換層析分離獲得區分物後，再以膠體過濾層析法 (gel filtration chromatography) 分離而得。其中該次區分物編號為 IE3-3G1。而在本發明一具體實施例中，該次區分物 IE3-3G1 之有效成分為甘油醛-3-磷酸脫氫酶。

【0018】 本發明的各種具體實例於下文詳述。本發明的其他特徵將可由下文有關該等各種具體實例的詳細敘述、圖式及申請專利範圍而清楚呈現。

【圖式簡單說明】

【0019】 在本發明中所呈現的較佳具體實施例圖示係以闡述本發明為目的。應被理解的是，本發明並不侷限於所示之較佳具體實施例。數據以平均值 \pm SD 表示之。其中*： $P < 0.05$ 、**： $P < 0.01$ 、***： $P < 0.001$ ，成對 t 檢定 (paired *t*-test)。

圖 1A-1C 顯示該 PM-A0005 菌株萃取物經離子交換層析進一步分離活性物

質的結果。圖 1A 為離子交換層析的條件設定；圖 1B 為萃取物 AS_0-25% 所分離出 3 個區分物 (fractions)；及圖 1C 為萃取物 AS_50-75% 所分離出 3 個區分物。

圖 2A-2E 顯示將區分物 IE1-2、IE1-3、IE3-2 和 IE3-3 利用膠體過濾層析進一步分離活性物質的結果。圖 2A 為膠體過濾層析的條件設定；圖 2B 為區分物 IE1-2 所分離出 1 個次區分物 (subfraction) IE1-2G1；圖 2C 為 IE1-3 所分離出 2 個次區分物 IE1-3G1 和 IE1-3G2；圖 2D 為 IE3-2 所分離出 3 個次區分物 IE3-2G1、IE3-2G2 和 IE3-2G3；及圖 2E 為 IE3-3 所分離出 5 個次區分物 IE3-3G1、IE3-3G2、IE3-3G3、IE3-3G4 和 IE3-3G5。

圖 3 為在給予小鼠萃取物 AS_50-75% (塵蟎致敏-AS) 及次區分物 IE3-3G1 (塵蟎致敏-IE) 後，以甲基膽鹼誘發氣管收縮並測量小鼠呼吸道阻力的結果，其中呼吸道阻力係以 Penh 表示。

圖 4A-4C 為塵蟎致敏小鼠的肺部組織變化評估，顯示投予萃取物 AS_50-75% 和次區分物 IE3-3G1 可顯著降低肺臟的發炎與細胞浸潤現象。圖 4A 為肺部細胞沖洗液的細胞計數結果；圖 4B 為肺部細胞沖洗液的細胞分類；及圖 4C 為肺部細胞沖洗液中胸腺活化調節趨化因子 (thymus and activation-regulated chemokine, TARC) 濃度，其中塵蟎致敏-AS 組投予萃取物 AS_50-75%；塵蟎致敏-IE 組投予次區分物 IE3-3G1。

圖 5 為塵蟎致敏小鼠的肺部組織 H&E 染色結果，發現經投予萃取物 AS_50-75% 和次區分物 IE3-3G1 分別可有效地降低小鼠氣管壁增厚及改善免疫細胞大量浸潤等現象。其中對照組為正常小鼠；塵蟎致敏組以塵蟎致敏；而塵蟎致敏-AS 組投予萃取物 AS_50-75%；塵蟎致敏-IE 組則投予次區分物 IE3-3G1。

圖 6A-6D 為劑量 10^7 CFU 或 10^9 CFU 之 PM-A0005 口服治療異位性皮膚炎小鼠之生理特徵。圖 6A 為小鼠皮膚外觀；圖 6B 係以 Cutometer[®]MPA 580 測量皮膚含水量之結果；圖 6C 係以 Cutometer[®]MPA 580 所測量之 pH 值；及圖 6D 係利用 Tewameter TM210 儀器測量表皮水分經皮膚蒸發量 (Trans-epidermal water loss, TEWL) 之結果。

圖 7A-7D 為 IE3-3G1 或 PBS 以腹腔 (intraperitoneal, i.p.) 注射治療以塵蟎

(Der p) 或卵白蛋白 (Ovalbumin, OVA) 致敏之異位性皮膚炎小鼠生理特徵。圖 7A 為小鼠皮膚外觀；圖 7B 為以 Cutometer[®]MPA 580 測量皮膚含水量之結果；圖 7C 係以 Cutometer[®]MPA 580 所測量之 pH 值；及圖 7D 係利用 Tewameter TM210 儀器測量表皮水分經皮膚蒸發量 (Trans-epidermal water loss, TEWL) 之結果。

圖 8A-8C 為劑量 10^7 CFU 或 10^9 CFU 之 PM-A0005 口服治療異位性皮膚炎小鼠後其皮膚厚度及嗜酸性粒細胞浸潤結果。圖 8A 為致敏皮膚位置之蘇木精-伊紅染色 (hematoxylin-eosin stain, H&E stain) 切片結果；圖 8B 係以 H&E 染色切片所測量之皮膚厚度；及圖 8C 為每切片視圖之嗜酸性粒細胞數目。

圖 9A-9C 為 IE3-3G1 或 PBS 以腹腔 (i.p.) 注射治療以塵蟎 (Der p) 或卵白蛋白 (OVA) 致敏之異位性皮膚炎小鼠其皮膚厚度及嗜酸性粒細胞浸潤結果。圖 9A 為致敏皮膚位置之蘇木精-伊紅染色 (H&E stain) 切片結果；圖 9B 係由 H&E 染色切片所測量之皮膚厚度；及圖 9C 為每切片視圖之嗜酸性粒細胞數目。

圖 10 為劑量 10^7 CFU 或 10^9 CFU 之 PM-A0005 口服治療異位性皮膚炎小鼠後其胸腺基質淋巴細胞生成素 (thymic stromal lymphopoietin, TSLP) 表現結果。

圖 11A-11B 為劑量 10^7 CFU 或 10^9 CFU 之 PM-A0005 口服治療異位性皮膚炎小鼠後其蘭格罕細胞 (langerhans cells) 之數目變化。圖 11A 為致敏皮膚位置染色切片結果；圖 11B 為每切片視圖於表皮層或真皮層之蘭格罕細胞細胞數目。

圖 12 為 IE3-3G1 或 PBS 以腹腔 (i.p.) 注射治療以塵蟎 (Der p) 或卵白蛋白 (OVA) 致敏之異位性皮膚炎小鼠其 TSLP 表現結果。

圖 13A-13B 為 IE3-3G1 或 PBS 以腹腔 (i.p.) 注射治療以塵蟎 (Der p) 或卵白蛋白 (OVA) 致敏之異位性皮膚炎小鼠其蘭格罕細胞 (langerhans cells) 之數目變化。圖 13A 為致敏皮膚位置染色切片結果；圖 13B 為每切片視圖於表皮層或真皮層之蘭格罕細胞細胞數目。

圖 14A-14B 為劑量 10^7 CFU 或 10^9 CFU 之 PM-A0005 口服治療異位性皮膚

(lipopolysaccharide, LPS) 或 PHA-L 為正控制組，僅有細胞而未額外添加刺激物者為對照組。

圖 25 為 G3PDH 重組蛋白刺激小鼠脾臟細胞產生細胞激素 IFN- γ 以評估對於免疫調節的功效的結果。其中以添加 LPS 或 PHA 為正控制組，僅有細胞而未額外添加刺激物者為對照組。

【0020】 【實施方式】

【0021】 除非另有定義，此處所始有使用的技術及科學名詞具有與本發明所屬技術領域中熟習此技藝者一般所了解的相同含義。此處所使用，如有矛盾的情形，以本文件（包括定義）為準。

【0022】 本文所使用的「一」乙詞，如未特別指明，係指該冠詞的文法上受詞為一個或一個以上（即至少為一個）。例如「一成份」係指一成份或多於一成份。

【0023】 本文所使用的「過敏性疾病」乙詞，是指過敏原、過敏原特異性的免疫球蛋白 E (IgE) 以及肥大細胞等的共同作用所引發的疾病。首先是過敏原與附在肥大細胞固定區 (fragment constant, Fc) 受體的免疫球蛋白 E 結合後，促使肥胖細胞進行去顆粒作用。而由顆粒釋出一些介質如組織胺，白三烯素及趨化因子等，這些介質進而造成血管的通透性增加及氣管的收縮而導致症狀，同時也會吸引一些其他的細胞如中性白血球，嗜伊紅性白血球等，導致相當程度的發炎反應，造成更進一步皮膚、黏膜組織或是血管的慢性發炎。過敏疾病包括但不限於異位性皮膚炎、過敏性鼻炎與氣喘、以及一些特定的食物與昆蟲叮咬引起的過敏。這些疾病會導致相當程度的發炎反應，造成皮膚、黏膜組織或是血管的慢性發炎。

【0024】 本文所使用的「氣喘」乙詞，是指因吸入具有誘發性的過敏原引起無法控制的氣道過度反應，並伴隨呼吸道結構的改變，包括但不限於上皮的增生、黏膜組織的變形、呼吸道平滑肌的增生、以及細胞外基質的增生。

【0025】 本文所使用的「異位性皮膚炎」乙詞，是指一種皮膚炎的形式，其為一種復發性但不具有傳染性的皮膚發炎及皮膚搔癢症狀，包括但不限於神經性皮膚炎、內源性濕疹、屈部濕疹及嬰兒濕疹。

【0026】 本文所使用的「具相同功能的變異體」乙詞，是指一使用例如重組基因技術而得，藉由一或若干個胺基酸插入、缺失或取代不同於已知蛋白質胺基酸序列但不影響其功能的多肽。例如，胺基酸取代是以另一具有相似結構及/或化學性質之胺基酸置換一胺基酸之結果(意即保守胺基酸置換)。而保守胺基酸取代可基於涉及殘基之極性、電荷、溶解性、疏水性、親水性及/或兩親性質之相似性而進行。胺基酸插入或胺基酸缺失則較佳在約 1 至 20 個胺基酸範圍內，更佳為 1 至 10 個胺基酸。允許之變化可係藉由使用重組基因技術在多肽分子中系統地使胺基酸插入、缺失或取代及檢定所得重組變異體之活性及功能實驗而找出具相同功能之變異體。本文所使用的「具相同功能的片段」乙詞，是指已知蛋白質或具相同功能變異體中提供相同功能的部位的胺基酸片段。例如，抗原決定部位的胺基酸序列。

【0027】 本文所使用的「可接受」乙詞，是指該載劑必需與組合物的活性成分相容（較佳為能穩定該活性成分）且對被治療個體無害。

【0028】 本文所使用的「有效量」乙詞，是指相較於未接受此量的對應個體，藥物或藥劑的用量造成所欲的藥理或生理上的結果，或疾病、異常或副作用的治療、治癒、預防、或改善，或減少疾病或異常的發生。服用的有效量或有效劑量可根據所使用的特定有效成分、服用模式、年齡、體型、以及所欲治療個體的條件而改變。藥劑的精確服用量則係依醫師的判斷進行投藥且依個體差異而異。

【0029】 根據本發明，發現甘油醛-3-磷酸脫氫酶（Glyceraldehyde 3-phosphate Dehydrogenase, G3PDH）具有非可預期的抗過敏活性。在本發明一具體實例中，針對甘油醛-3-磷酸脫氫酶（G3PDH）進行小鼠樹突細胞共培養實驗，顯示 G3PDH 可有效誘發小鼠樹突細胞表現 IL-12 及刺激脾臟細胞表現 IFN- γ ，顯示其具有刺激免疫細胞、調節免疫反應的功效。因此，本發明提供甘油醛-3-磷酸脫氫酶或其具相同功能的變異體或片段用於製備降低個體過敏反應藥劑的用途。

【0030】 因此，本發明提供甘油醛-3-磷酸脫氫酶或其具相同功能的變異體或片段用於製備降低過敏性疾病以及氣喘或異位性皮膚炎藥劑的用

途。

【0031】 本發明之一實施例中，甘油醛-3-磷酸脫氫酶具有如 SEQ ID NO: 1 所示的胺基酸序列。惟本發明所使用之甘油醛-3-磷酸脫氫酶當包含不同來源以及製程的甘油醛-3-磷酸脫氫酶，或其具相同功能的變異體或片段。

【0032】 根據本發明，以甘油醛-3-磷酸脫氫酶（G3PDH）為活性成分可進一步與生理上可接受的賦形劑或稀釋劑製成一醫藥組合物，或一食品組合物。

【0033】 根據本發明，包含以甘油醛-3-磷酸脫氫酶為活性成分的組合物、萃取物、區分物、次區分物（subfraction）亦可用於製備治療或預防氣喘或異位性皮膚炎藥劑。

【0034】 根據本發明，該甘油醛-3-磷酸脫氫酶是分離自加氏乳酸桿菌（*Lactobacillus gasseri*）PM-A0005 菌株，該 PM-A0005 菌株由東宇生物科技股份有限公司開發，於 2006 年 1 月 11 日寄存於台灣新竹的食品工業發展研究所，寄存編號 BCRC 910304。並於 2007 年 1 月 5 日申請專利並於 2012 年 1 月 21 日取得台灣專利第 I356680 號。但於該已獲准的專利中並未曾知悉其具有預防或治療過敏性氣喘或異位性皮膚炎的功效，亦未得悉其有效成分。

【0035】 根據本發明，該 PM-A0005 菌株的萃取物可經由本技術領域所熟知的標準方法，例如利用溶菌酶分解菌體並以硫酸銨沉澱胞質蛋白質而獲得。在本發明的一具體實施例中，係將該 PM-A0005 菌株以溶菌酶處理而釋出細胞質內容物，接續以濃度遞增的硫酸銨沉澱蛋白質以獲得不同硫酸銨濃度的萃取物，根據不同的硫酸銨濃度可獲得 4 個不同蛋白質萃取物，分別命名為 AS_0-25%、AS_25-50%、AS_50-75%、AS_75-100%。將此 4 種蛋白質萃取物與小鼠樹突細胞共同培養，發現 AS_0-25% 和 AS_50-75% 具有誘發小鼠樹突細胞產生高於對照組（僅有細胞）3 倍以上的 IL-12 表現量，顯示其具有刺激免疫細胞、調節免疫反應的功效；進而將 AS_50-75% 經腹腔注射投予小鼠，可顯著降低塵蟎致敏小鼠呼吸道阻力，並顯著抑制肺臟的細胞浸潤與發炎現象。因此證實該 PM-A0005 菌株的萃取物具有預防或治療過敏性氣喘的功效。

【0036】 根據本發明，該 PM-A0005 菌株的區分物 (fraction)，可經由本技術領域所熟知的標準方法，自上述方法所獲的萃取物，接續經離子交換層析 (ion-exchange chromatography) 分離而得。在本發明的一具體實施例中，進一步將萃取物 AS_0-25% 和 AS_50-75% 利用 HiTrap™ DEAE-FF 管柱以離子交換層析法分離活性物質。經由離子交換層析法，AS_0-25% 可以分離出 3 個區分物 IE1-1、IE1-2 和 IE1-3；AS_50-75% 可以分離出 3 個區分物 IE3-1、IE3-2 和 IE3-3。將此 6 種蛋白質區分物與小鼠樹突細胞共同培養，發現該等區分物可誘發小鼠樹突細胞產生高於對照組 (僅有細胞) IL-12 表現量，顯示其具有刺激免疫細胞、調節免疫反應的功效。其中 IE1-2、IE1-3、IE3-2 和 IE3-3 的 IL-12 表現量更高於對照組 3 倍以上。

【0037】 根據本發明，該 PM-A0005 菌株的次區分物 (subfraction)，可經由本技術領域所熟知的標準方法，自上述方法所獲的區分物以膠體過濾層析法 (Gel-filtration chromatography) 的方式進行更進一步的分離活性物質而得。在本發明的一具體實施例中，進一步將區分物 IE1-2、IE1-3、IE3-2 和 IE3-3 利用 Sephacryl™ S-300 HR 管柱給以膠體過濾層析分離，IE1-2 可以分離出 1 個次區分物 (subfraction) IE1-2G1；IE1-3 可以分離出 2 個次區分物 IE1-3G1 和 IE1-3G2；IE3-2 可以分離出 3 個次區分物 IE3-2G1、IE3-2G2 和 IE3-2G3；IE3-3 可以分離出 5 個次區分物 IE3-3G1、IE3-3G2、IE3-3G3、IE3-3G4 和 IE3-3G5。將此 11 種蛋白質次區分物與小鼠樹突細胞共同培養，發現次區分物可誘發小鼠樹突細胞產生高於對照組 (僅有細胞) 的 IL-12 表現量，顯示其具有刺激免疫細胞、調節免疫反應的功效，尤以 IE3-3G1 的 IL-12 表現量較對照組高出約 7.3 倍以上為最佳；其中將 IE3-3G1 經腹腔注射投予小鼠，可顯著降低塵蟎致敏小鼠呼吸道阻力，並顯著抑制肺臟的細胞浸潤與發炎現象，證實本發明的次區分物具有降低過敏反應，特別是預防或治療過敏性氣喘的功效。此外，在 OVA 或是 Der p 經皮致敏之小鼠以腹腔注射 IE3-3G1 後，顯著減緩皮膚發炎現象，亦證明本發明次區分物具有降低預防或治療異位性皮膚炎的功效。

【0038】 本發明該 PM-A0005 菌株的萃取物、區分物及次區分物可進一步與生理上可接受的賦形劑或稀釋劑製成一醫藥組合物，或一食品組合

物。因其具有刺激免疫細胞 IL-12 表現的功效，可降低塵蟎致敏小鼠的呼吸道阻力及抑制肺臟的細胞浸潤與發炎現象；亦可刺激抑制發炎的 IL-10 細胞激素，以降低經 OVA 或是 Der p 經皮致敏所造成的皮膚發炎反應，故可用於治療或預防過敏性氣喘或異位性皮膚炎。另外，該 PM-A0005 菌株本身亦具有治療或預防異位性皮膚炎之功效。

【0039】 根據本發明，可依本發明技術領域具有一般通常知識者習知或標準的方法，依需要選用適當的飲食用材料製成口服藥物、食品或飲品。該食品或飲品包括但不限於乳品、發酵乳製品、飲料、運動飲料、營養添加物或保健食品、糖果或是膠質。

【0040】 一些適當賦形劑的實例包括乳糖、右旋糖、蔗糖、山梨糖、甘露糖、澱粉、阿拉伯膠、磷酸鈣、褐藻酸鹽、黃蓍樹膠、明膠、矽酸鈣、微晶纖維素、聚乙烯吡咯啉酮、纖維素、滅菌水、糖漿和甲基纖維素。該組合物可另外包括潤滑劑，例如，滑石粉、硬脂酸鎂和礦物油；濕潤劑；乳化和懸浮劑；保存劑，例如，羥基苯甲酸甲酯和丙酯；甜味劑；以及調味劑。

【0041】 本發明進一步以下列實例說明，其係提供示範的目的而非用以限制本發明。

【0042】 實例 1 PM-A0005 菌株的製備

【0043】 加氏乳酸桿菌 PM-A0005 菌株以 MRS 培養基於 37°C 培養 24 小時，挑選單一菌落於 5ml 的無菌培養基（表 1）於 37°C 培養 20 小時。第 3 天以無菌方式製作種子罐，取出菌液以 50 倍稀釋於培養基中以 37°C 培養 16 小時。第 4 天將 100 ml 菌液接種於含有 3.5 公升培養基的桌上型微處理控制發酵槽（型號：Major Science, MS-F1）中進行發酵，於 37°C、pH 6.0 條件下培養 5.5 小時。當發酵結束後，取出發酵菌液並使用高速離心機去除上清液留下菌泥，計數菌數達到 10⁹。

表 1

品名	英文名稱	添加比例
葡萄糖	Glucose	2%

酵母抽出物	Yeast extract	3%
牛肉蛋白腩	Meat Peptone S2 ; 編號 : 19518	3%
磷酸氫二鉀	dipotassium phosphate	0.2%
硫酸鎂	magnesium sulfate	0.005%
硫酸錳	manganese sulfate	0.001%
醋酸鈉	sodium acetate	0.1%
檸檬酸銨	triammonium citrate	0.05%
碳酸鈣	calcium carbonate	0.1%
Tween 80	Tween 80	0.1%

【0044】 實例 2 PM-A0005 菌株萃取物的製備

【0045】 將實例 1 製備的 PM-A0005 菌株菌泥以 PBS 清洗 3 次，以 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) 均勻懸浮菌液並加入 1%溶菌酶 (lysozyme)，冰上靜置反應 2 小時以釋出細胞質內容物。溶菌酶反應後置於超高速離心機於 4°C 以 22,500g 離心 30 分鐘，分成上清液 (cytosolic fraction) 及沉澱物 (cell-wall fraction) 二部份。將上清液置於冰浴並緩緩加入硫酸銨粉末至所需濃度 (0~25%)；達到目標濃度後，繼續攪拌 10 分鐘並以 22,500g 於 4°C 離心 30 分鐘，以適量體積的 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) 回收沉澱的蛋白質，同時將離心後上清液繼續以硫酸銨進行沈澱。重複以濃度為 25~50%、50~75%及 75~100%硫酸銨進行沉澱，獲得 4 種濃度的蛋白質萃取物，分別命名為 AS_0-25%、AS_25-50%、AS_50-75%、AS_75-100%。使用透析膜 (分子量 6,000~8,000)，將收集到的 4 種蛋白質萃取物置於 5 公升的 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) 於 4°C 透析 24 小時，透析結束後使用高速離心機以 4°C 轉速 22,500g 離心 30 分鐘，收集上清液，並測量蛋白質濃度。

【0046】 實例 3 小鼠樹突細胞的分離及介白素-12 (IL-12) 測定

【0047】 犧牲小鼠取得腿骨並清除肌肉組織，以針筒注入 5-10 ml 培養基將細胞沖出，將細胞懸浮液於 4°C 以 1,500 rpm 離心 10 分鐘，去除上清液。加入 1 ml 紅血球溶離緩衝液 1 分鐘以去除紅血球，隨後加入 9 ml PBS 於 4°C 以 1,500 rpm 離心 10 分鐘沉澱細胞。去除上清液，以 PBS 清洗 2 次後將

細胞懸浮於培養基中，加入 IL-4 (1 µl/ml) 及 GM-CSF (1.5 µl/ml) 共同培養促使細胞分化成樹狀細胞。培養 8 天後收集細胞並調整細胞濃度為 4×10⁶/ml。將樹狀細胞與待測物共同培養 48 小時，收取細胞培養的上清液。利用酵素免疫分析法 (ELISA) 偵測上清液中 IL-12p40 的含量。

【0048】 將此 4 種蛋白質萃取物 (10 µg) 與小鼠樹突細胞共同培養，經由 ELISA 測量小鼠樹突細胞的細胞激素 IL-12 (IL-12p40) 分泌量以評估免疫調節功效。實驗結果顯示，AS_0-25%、AS_25-50%、AS_50-75%、AS_75-100% 分別刺激小鼠樹突細胞產生 544.62 pg/ml、315.90 pg/ml、597.27 pg/ml 和 159.80 pg/ml 的 IL-12 (表 2)，其中 AS_0-25% 和 AS_50-75% 可誘發小鼠樹突細胞表現 IL-12 高於對照組 (僅有細胞) 3 倍以上。

表 2

					小鼠樹突細胞				未含有細胞			
	基質	對照組 (僅有細胞)	LPS 10ug/ml	PHA 30ug/m;	AS_ 0-25%	AS_ 25-50%	AS_ 50-75%	AS_ 75-100%	AS_ 0-25%	AS_ 25-50%	AS_ 50-75%	AS_ 75-100%
第 1 組	0.00	126.67	432.31	466.16	529.23	342.57	584.10	173.08	-0.25	-0.51	0.26	0.26
第 2 組	1.28	120.52	506.41	545.90	493.08	300.26	615.39	154.87	0.26	0.26	1.03	0.00
第 3 組	-1.02	111.28	466.67	532.05	611.54	304.87	592.31	151.54	0.00	0.52	-0.51	-0.77
平均	0.09	119.49	468.46	514.70	544.62	315.90	597.27	159.83	0.00	0.09	0.26	-0.17
標準差	1.16	7.74	37.08	42.61	60.71	23.21	16.22	11.59	0.26	0.53	0.77	0.53

【0049】 實例 4 PM-A0005 菌株區分物的製備及活性測試

【0050】 將實例 2 所得經硫酸銨沉澱後的蛋白，經由離子交換樹脂管柱層析系統 (BioLogic Duo Flow Chromatography System, Bio-Rad) 初步分離活性物質。使用的離子交換樹脂管柱為 DEAE-FF (HiTrap™, GE Healthcare)。進行蛋白質層析前，以 2 倍以上管柱體積的緩衝液 A (50 mM Tris-HCl, pH 8.5) 充滿離子交換管柱進行平衡，隨後注入蛋白質樣本，以 6 倍以上管柱體積的緩衝液 A 進行純化，同時啟動分劃收集器收集流出物，

每 1 ml 收集 1 管。收集 30ml 後。利用緩衝液 B (50 mM Tris-HCl pH 8.5, 1M NaCl) 提升鹽度梯度沖提蛋白質，最後再以 100%的緩衝液 B 洗出殘餘蛋白質。其中 AS_0-25%的蛋白質萃取物可分離出 IE1-1、IE1-2、IE1-3 三種區分物 (fraction)；AS_50-75%的蛋白質萃取物可分離出 IE3-1、IE3-2、IE3-3 三種區分物。

【0051】 進一步將萃取物 AS_0-25%和 AS_50-75%以離子交換層析法 (ion-exchange chromatography) 分離活性物質 (圖 1A)。經由離子交換層析，AS_0-25%可以分離出 3 個區分物 (fraction)，分別為 IE1-1、IE1-2 和 IE1-3 (圖 1B)；AS_50-75%可以分離出 3 個區分物 IE3-1、IE3-2 和 IE3-3 (圖 1C)。

【0052】 將此 6 個區分物經由測量小鼠樹突細胞的 IL-12 (IL12p40) 分泌量以評估免疫調節功效。實驗結果顯示顯示 IE1-1、IE1-2、IE1-3、IE3-1、IE3-2 和 IE3-3 分別刺激小鼠樹突細胞產生 IL-12 達 427.6 pg/ml、1135.85 pg/ml、1213.2 pg/ml、258.87 pg/ml、1098.41 pg/ml 和 1850.39 pg/ml (表 3)，其中 IE1-2、IE1-3、IE3-2 和 IE3-3 可誘發小鼠樹突細胞表現 IL-12 高於對照組 (僅有細胞) 3 倍以上。

表 3

	基質	對照組 (僅有細胞)	LPS 10 ug/ml	PHA 30 ug/ml	IE1-1
第 1 組	-0.38	169.62	1796.54	1588.08	201.93
第 2 組	-1.15	164.23	1689.62	1678.85	191.93
第 3 組	0.00	169.65	713.10	703.44	679.31
第 4 組	0.00	156.55	889.65	737.24	637.24
平均	-0.39	165.01	1272.23	1176.90	427.60
標準差	0.54	6.19	550.18	528.67	266.94
	IE1-2	IE1-3	IE3-1	IE3-2	IE3-3
第 1 組	1522.69	1508.08	248.85	1722.69	1878.85
第 2 組	1563.46	1668.85	274.23	1775.77	1821.93

第 3 組	696.55	717.93	257.24	447.58	1850.39
第 4 組	760.69	957.93	255.17	447.58	1850.39
平均	1135.85	1213.20	258.87	1098.41	1850.39
標準差	471.25	449.08	10.84	751.82	23.24

【0053】 實例 5 PM-A0005 菌株次區分物的製備及活性測試

【0054】 經實例 4 離子交換樹脂管柱層析分離所獲得的區分物 IE1-2、IE1-3、IE3-2、IE3-3 再以膠體過濾管柱層析分離 (Sephacryl™ S-300 HR Column, Amersham Bioscience)。進行前，管柱與操作機器先以 2 倍以上管柱體積的緩衝液 (50 mM Tris-HCl, pH 9.5, 50mM NaCl) 進行平衡。取樣本以針筒注入管柱，樣本體積約為膠體體積的 3%以下，再注入樣本後以預定流速約 0.5 ml/min 進行，收集所得的樣本進行蛋白質定量及活性分析。

【0055】 將區分物 IE1-2、IE1-3、IE3-2 和 IE3-3 利用膠體過濾層析 (Gel-filtration chromatography) (圖 2A) 進行更進一步的分離活性物質。經由膠體過濾層析法，IE1-2 可以分離出 1 個次區分物(subfraction) IE1-2G1 (圖 2B)；IE1-3 可以分離出 2 個次區分物 IE1-3G1 和 IE1-3G2 (圖 2C)；IE3-2 可以分離出 3 個次區分物 IE3-2G1、IE3-2G2 和 IE3-2G3(圖 2D)；IE3-3 可以分離出 5 個次區分物 IE3-3G1、IE3-3G2、IE3-3G3、IE3-3G4 和 IE3-3G5 (圖 2E)。

【0056】 將此 11 個經由膠體過濾層析純化所獲得的次區分物經由測量小鼠樹突細胞的細胞激素 IL-12 (IL12p40) 分泌量以評估免疫調節功效。實驗結果顯示 IE1-2G1、IE1-3G1、IE1-3G2、IE3-2G1、IE3-2G2、IE3-2G3、IE3-3G1、IE3-3G2、IE3-3G3、IE3-3G4 和 IE3-3G5 分別刺激小鼠樹突細胞產生 176.5 pg/ml、559.63 pg/ml、327.75 pg/ml、813.38 pg/ml、398.75 pg/ml、234.50 pg/ml、1493.63 pg/ml、215.13 pg/ml、203.63 pg/ml、227.38 pg/ml、245.50 pg/ml 的 IL-12 (表 4)，其中 IE3-3G1 可誘發小鼠樹突細胞 IL-12 的表現，高於對照組 (僅有細胞) 7.3 倍以上。

表 4

	基質	對照組	LPS	PHA	IE1-2G1	IE1-3G1	IE1-3G2	IE3-2G1
--	----	-----	-----	-----	---------	---------	---------	---------

		(僅有 細胞)	10ug/ml	30ug/ml				
第 1 組	1.25	270.75	1369.75	1411.75	183.00	920.75	487.00	448.25
第 2 組	0.50	136.50	1743.50	1813.00	170.00	198.50	168.50	1178.50
平均	0.87	203.63	1556.63	1612.38	176.50	559.63	327.75	813.38
標準差	0.53	94.93	264.28	283.73	9.19	510.71	225.21	516.36
	IE3-2G2	IE3-2G3	IE3-3G1	IE3-3G2	IE3-3G3	IE3-3G4	IE3-3G5	
第 1 組	393.00	258.50	1325.75	259.25	259.75	275.75	294.00	
第 2 組	404.50	210.50	1661.50	171.00	147.50	179.00	197.00	
平均	398.75	234.50	1493.63	215.13	203.63	227.38	245.50	
標準差	8.13	33.94	237.41	62.40	79.37	68.41	68.59	

【0057】 實例 6 PM-A0005 菌株的有效成分可降低小鼠的過敏性氣喘

【0058】 材料與方法

【0059】 1.以塵蟎致敏小鼠的動物模式製備

【0060】 將家塵蟎萃取物 (Der p extract) 和氫氧化鋁混合均勻以腹腔注射方式致敏小鼠，每次注射時間間隔 1 週，共注射 3 次。第 3 次注射後 1 週，於氣管內接種過敏原誘發反應。小鼠秤重後進行麻醉，以鑷子夾出小鼠的舌頭，再以微量注射器於喉嚨滴進 50 μ l 的家塵蟎抗原溶液 (0.5 mg/ml)。等待小鼠發出嗆鼻聲後鬆開鑷子，放掉舌頭，小鼠保持直立狀態 1 分鐘後，並以光照致恢復清醒。

【0061】 2.支氣管肺泡沖洗液的收集及白血球分類

【0062】 以 1ml 低溫無菌生理食鹽水經由針頭慢慢注入肺部致整個肺完全膨脹再回抽，如此反覆三次後，將沖洗液置於冰上暫存。重複此沖洗步驟，將收集到的肺泡沖洗液 (2 次共約 1.8 ml)，以 1,200 rpm、4℃ 離心 10 分鐘。收集上清液保存於 -70℃ 冰箱。將沉澱的細胞經伊紅 Y (eosin Y) 染色並計算細胞數目。取 50-100 μ l 支氣管肺泡沖洗液，以 cytopsin 離心機製作細胞抹片，進行劉氏染色 (Liu's stain) 並以油鏡觀察白血球及計數。

【0063】 3.組織切片染色

【0064】 已固定的組織切片首先脫臘並復水 (rehydrate)，浸於蒸餾水後，以 0.5%過碘酸反應 15 分鐘，以自來水沖洗 5 分鐘，再次浸於蒸餾水後，用希夫氏 (Schiff's) 試劑反應 5 分鐘，自來水沖洗 5 分後脫水並封片。在光學顯微鏡觀察，醣蛋白及中性黏液呈紅色，細胞核呈現藍色。

【0065】 4.小鼠呼吸道阻力測量

【0066】 利用小動物無創呼吸道高反應系統 (Unrestrained Whole Body Plethysmography) (BUXCO) 進行呼吸道阻力 (enhance pulsed) 測量，以噴霧的方式給予老鼠 0 mg/ml，6.25 mg/ml，12.5 mg/ml，25 mg/ml，50 mg/ml 溶於 PBS 的甲基膽鹼後，量測呼吸道阻力值 (Penh value) 做為評估標準。

【0067】 5.小鼠脾臟細胞的分離及干擾素- γ (IFN- γ) 測定

【0068】 取小鼠脾臟添加適量 PBS 緩衝液並以玻棒搗碎至無碎片，混合均勻後以 500 rpm 離心 1 分鐘分離殘餘組織及脾臟細胞，將含有脾臟細胞的上清液以 Ficoll 分離 (於 16°C 以 720g 離心 25 分鐘)，接續以 PBS 清洗 3 次，將細胞懸浮於 RPMI-1640 培養基，進行細胞計數並調整濃度至 4×10^6 /ml。將脾臟細胞與待測物共同培養 48 小時，收取細胞培養的上清液並利用酵素免疫分析法 (ELISA) 偵測上清液中 IFN- γ 的含量。

【0069】 結果

【0070】 利用塵蟎致敏小鼠氣喘動物模式來評估萃取物 AS_50-75% (AS) 及次區分物 IE3-3G1 (IE) 是否具有降低過敏反應的功效。以塵蟎誘發小鼠呼吸道過敏氣喘反應後，會引發呼吸道高度反應性 (airway hyperresponse, AHR)，此處利用非侵入性方式測量老鼠呼吸道對氣管收縮劑甲基膽鹼的抵抗力，以呼吸道阻力值 (Penh value) 來評估小鼠的肺部功能是否良好，Penh value 越高代表小鼠呼吸道阻力大，其肺部狀態差。如圖 3 所示，由實驗結果發現，正控制組 (塵蟎致敏組) 隨著給予甲基膽鹼濃度的提升，而其 Penh value 也隨的增加，但給予萃取物 AS_50-75% (塵蟎致敏-AS) 和次區分物 IE3-3G1 (塵蟎致敏-IE) 的組別，其 Penh value 與正控制組相比顯著性的下降，顯示降低塵蟎致敏小鼠呼吸道阻力，緩解氣喘。

【0071】 進一步觀察肺部細胞沖洗液，發現塵蟎致敏小鼠其肺部細胞沖洗液中細胞數量大幅增加（圖 4A），顯示肺臟有發炎、細胞浸潤現象，相對於此，投予萃取物 AS_50-75%和次區分物 IE3-3G1 可顯著降低肺部細胞沖洗液中細胞數目，而由血球細胞分類結果可知嗜酸性白血球及嗜中性白血球比例大幅降低，顯示有效抑制發炎現象（圖 4B）。此外，測量肺部細胞沖洗液中胸腺活化調節趨化因子（thymus and activation-regulated chemokine, TARC）濃度，結果顯示投予 AS_50-75%和 IE3-3G1 的小鼠其肺臟中 TARC 表現量相較於正控制組顯著下降（圖 4C）。肺泡組織切片的 H&E 染色結果可發現，經投予 AS_50-75%和 IE3-3G1 可有效地降低小鼠氣管壁增厚及改善免疫細胞大量浸潤等現象（圖 5）。

【0072】 由上述結果可知，經投予萃取物 AS_50-75%和次區分物 IE3-3G1，可有效降低塵蟎致敏小鼠呼吸道阻力，並顯著抑制肺臟的細胞浸潤與發炎現象，顯示其可有效抑制小鼠呼吸道過敏反應、緩解氣喘現象。

【0073】 實例 7 PM-A0005 菌株及其有效成分可改善小鼠的異位性皮膚炎

【0074】 材料與方法

【0075】 1.以塵蟎或卵白蛋白（Ovalbumin，OVA）致敏小鼠的動物模式製備

【0076】 小鼠經皮致敏及實驗動物模式如下：

【0077】 小鼠經皮致敏模式係於小鼠麻醉後將 1 x 1 公分的紗布混合 100μl 的 PBS 溶液（137mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 1.8mM KH₂PO₄, pH 7.2, 溶於 1L ddH₂O）及 50μg/隻的塵蟎萃取物或是 100μg/隻的卵白蛋白後固定於小鼠頸背部上。七天後拆除紗布並讓小鼠休息十四天。重複上述步驟兩次，並於第五十天時將小鼠犧牲。給予 PM-A0005 菌株之實驗組別其經皮致敏模式同上，並且從第一天開始，每天分別餵食 200μl 的 PBS 緩衝液（控制組）、 1×10^7 CFU 或是 1×10^9 CFU 的 PM-A0005 菌株，並於第五十天犧牲小鼠。另外，給予 IE3-3G1 之實驗組別其經皮致敏模式同上，並在每次固定紗布時，同時以腹部注射投予 25μg IE3-3G1，總共三次，並於第五十天犧牲小鼠。

【0078】 2. 皮膚生理狀況測量

【0079】 小鼠麻醉後利用 Cutometer[®]MPA 580 測量皮膚含水量以及 pH 值。而表皮水分經皮膚蒸發量則是利用 Tewameter TM210 儀器進行測量。

【0080】 3. 小鼠脾臟細胞增生反應及細胞激素分泌

【0081】 取出小鼠脾臟並利用無菌針筒推進器尾端將脾臟磨碎，磨好的脾臟細胞懸浮液於 4℃ 下以 300g 離心 5 分鐘。去除上清液後以 3ml 紅血球細胞 (red blood cell, RBC) 裂解緩衝液回溶靜置於冰上。接著以等體積 cRPMI 培養基 (RPMI-1640 培養基含有 2mM L-麩醯胺酸 (L-glutamine)、50mM 2-巰基乙醇 (2-mercaptoethanol, 2-ME)、1mM 丙酮酸鈉 (sodium pyruvate)、0.5% 青鏈黴素 (Penicillin-Streptomycin)、1mM 非必需胺基酸及胎牛血清 (Fetal Bovine Serum), pH 7.2) 終止反應並於 4℃ 下以 300g 離心 5 分鐘。最後以 1ml cRPMI 回溶細胞，計算細胞數目並調整細胞濃度至 $1 \times 10^7/\text{ml}$ 。

【0082】 將脾臟細胞分別加入 Der p、OVA 或白血球凝集素 (leucoagglutinin, PHA-L) 共同培養 48 小時及 72 小時，並於前四個小時 (第 44 及 68 小時) 加入 10 μl 八肽膽囊收縮素 (cholecystokinin-8, CCK-8)，4 小時後用 450nm 波長測量吸光值，再除以未給予細胞刺激的讀值，所得比值即為脾臟細胞增生的情形。

【0083】 另外，將脾臟細胞與 Der p、OVA 或 PHA-L 共同培養 48 小時後，收取細胞培養的上清液並利用酵素免疫分析法 (ELISA) 偵測上清液中 IFN- γ 、IL-10 及 IL-17 的含量。

【0084】 4. 流式細胞儀分析小鼠淋巴細胞分群

【0085】 取出小鼠腋下淋巴結後利用含 2% 胎牛血清的 RPMI 將細胞數目調整至 $5 \times 10^5/\text{管}$ ，並於 4℃ 下以 400g 離心 5 分鐘後去除上清液。依據 CD3、CD4、CD25 抗體所需濃度分別加入 100 $\mu\text{l}/\text{管}$ ，冰上避光作用 30 分鐘以 1ml 含 2% 胎牛血清的 RPMI 回溶，並於 4℃ 下以 400g 離心 5 分鐘，再以固定及通透緩衝液進行處理，最後利用 FACSCalibur 流式細胞儀分析。

【0086】 5. 血清中免疫球蛋白 E (IgE) 抗體總量及血清中 OVA 及 Der p 特異性 IgE 測定

【0087】 將 IgE 捕捉抗體 (capture antibody)、OVA 及 Der p 分別以塗覆緩衝液 (coating buffer) (50mM 碳酸鹽塗覆緩衝液: 0.015M Na₂CO₃、0.035M NaHCO₃, pH 9.6 溶於 1L ddH₂O) 稀釋 100 倍後, 以 100μl/孔的量加至 96 孔盤並於室溫靜置 1 小時。接著以 TBST (50mM Tris-base、0.14M NaCl、0.05% Tween 20, pH 8.0 溶於 1L ddH₂O) 沖洗, 並加入 200μl/孔的阻斷緩衝液 (50mM Tris-base, 0.14M NaCl, 1% BSA, pH 8.0) 靜置於室溫下並以 TBST 沖洗。每孔加入 100μl 已由樣本/共軛稀釋液 (sample/conjugate diluents) (50mM Tris-base、0.14M NaCl、1% BSA, 0.05% Tween 20、pH 8.0) 稀釋 50 倍的小鼠血清或已知濃度的小鼠 IgE 標準品, 經室溫反應 1 小時後, 以 TBST 沖洗。接著加入 HRP-共軛 IgE 偵測抗體 (HRP-conjugated IgE detection antibody) 並避光靜置於室溫下, 以 TBST 沖洗後加入 TMB (3,3',5,5'-Tetramethyl Benzidine) 呈色。最後加入 2N H₂SO₄ 終止呈色反應並用 450nm 波長測定吸光值。

【0088】 6. 組織切片染色

【0089】 已固定的組織切片首先脫臘並於復水後分別進行免疫組織化學染色及蘇木精-伊紅染色 (hematoxylin-eosin stain, H&E stain)。

【0090】 A. 免疫組織化學染色

【0091】 復水後將玻片放入檸檬酸鈉 (Sodium Citrate) 緩衝液 (10mM sodium citrate, 0.05% Tween20, pH 6, 溶於 1L ddH₂O) 並於高壓下在室溫靜置 5 分鐘。放入 TBST 5 分鐘後, 取出玻片以疏水筆 (PAP pen) 在組織外劃圈並放入 TBST 浸潤。接著在畫好圈的組織滴上過氧化酶阻斷劑 (Peroxidase Blocking Agent) 並以 TSBT 清洗。接著滴上蛋白質阻斷劑 (Protein Blocking Agent) 並以 TSBT 清洗。胸腺基質淋巴細胞生成素 (thymic stromal lymphopoietin, TSLP)、介白素-17 (Interleukin-17) 及蘭格素 (Langerin) 之抗體分別利用一般抗體稀釋液進行稀釋。接著以 TSBT 清洗後滴上 NovoLink™ Polymer 10 分鐘。以 TSBT 清洗後再加入 DAB (3,3'-Diaminobenzidine) 呈色 5 分鐘並以蒸餾水終止反應, 最後加入蘇木精並以蒸餾水終止反應。待乾燥後進行封片。

【0092】 B. 蘇木精-伊紅染色 (hematoxylin and eosin stain, H&E

stain)

【0093】 復水後將玻片以蘇木精染色 5 分鐘，以自來水沖洗並再次浸於蒸餾水。接著以伊紅染色 30 秒，並接續浸潤於乙醇及二甲苯 (xylene)，待乾燥後進行封片。

【0094】 結果

【0095】 1. PM-A0005 及其有效成分 IE3-3G1 可減緩異位性皮膚炎小鼠皮膚屏障功能缺失

【0096】 餵食小鼠不同劑量 (1×10^7 CFU 或 1×10^9 CFU) 的 PM-A0005 相較於僅餵食 PBS 緩衝液或是不餵食的控制組，發現其小鼠皮膚較為平整光滑，且皮屑的產生減少 (圖 6A)。而不論餵食不同劑量 PM-A0005 的組別或是控制組，測量小鼠皮膚含水量後發現各組別之間並無統計上的差異 (圖 6B)。在餵食不同劑量 PM-A0005 的組別，其皮膚 pH 值有升高之現象 (圖 6C)。而經皮膚水分散失量，不論有無餵食 PM-A0005 都沒有統計上的差異 (圖 6D)。

【0097】 在以 OVA 或 Der p 經皮致敏並以腹腔注射 IE3-3G1 之小鼠，相較於僅腹腔注射 PBS 緩衝液的小鼠，可發現其小鼠皮膚的皺折減少也較為平整光滑，且皮屑的產生減少 (圖 7A)。測量小鼠皮膚含水量，其腹腔注射 IE3-3G1 的小鼠高於僅腹腔注射 PBS 緩衝液小鼠的皮膚含水量，其中以 OVA 經皮致敏的組別具有顯著的差異 (圖 7B)。在 OVA 經皮致敏的小鼠，無論有無給予 IE3-3G1，其小鼠皮膚 pH 值沒有變化；而在 Der p 經皮致敏並以腹腔注射 IE3-3G1 的小鼠，其小鼠皮膚 pH 值低於僅以腹腔注射 PBS 的小鼠組別 (圖 7C)。而在經皮膚水分散失量上，不論 OVA 或 Der p 經皮致敏並給予 IE3-3G1 隻小鼠，相較於僅腹腔注射 PBS 緩衝液小鼠，其經皮膚水分散失量皆呈現下降 (圖 7D)。

【0098】 2. PM-A0005 及其有效成分 IE3-3G1 可減緩異位性皮膚炎小鼠的皮膚發炎反應

【0099】 由蘇木精-伊紅染色的皮膚組織切片中，可發現在餵食 PBS 緩衝液或不餵食的控制組中，其表皮層和真皮層產生增厚，且同時產生大量免疫細胞的浸潤 (圖 8A 及 8B) 及嗜酸性粒細胞 (eosinophils) 數量的增

序列表

<110> 東宇生物科技股份有限公司
<120> 治療或預防過敏性疾病的有效成分
<130> PMD0008TW-1
<160> 4
<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 346
<212> PRT
<213> Lactobacillus gasseri
<400> 1

Met Thr Val Arg Ile Gly Ile Asn Gly Phe Gly Arg Ile Gly Arg Leu
1 5 10 15

Ala Phe Arg Arg Ile Met Asp Leu Gly Glu Lys Ser Ser Asp Ile Glu
20 25 30

Val Val Ala Ile Asn Asp Leu Thr Thr Pro Ala Leu Leu Ala His Leu
35 40 45

Leu Lys Tyr Asp Ser Thr His Gly Thr Phe Asn His Glu Val Ser Ala
50 55 60

Thr Asp Asp Ser Ile Val Val Asp Gly Lys Lys Tyr Arg Val Tyr Ala
65 70 75 80

Glu Pro Gln Ala Gln Asn Ile Pro Trp Val Lys Asn Asp Gly Val Asp
85 90 95

Phe Val Leu Glu Cys Thr Gly Phe Tyr Thr Ser Lys Ala Lys Ser Glu
100 105 110

Ala His Leu Lys Ala Gly Ala Lys Arg Val Leu Ile Ser Ala Pro Ala
115 120 125

Gly Ser Asp Leu Lys Thr Ile Val Tyr Gly Val Asn Asp Asp Thr Leu
130 135 140

Thr Ala Asp Asp Lys Ile Val Ser Ala Gly Ser Cys Thr Thr Asn Ser

145		150		155		160									
Leu	Ala	Pro	Met	Val	Asn	Ala	Leu	Gln	Lys	Glu	Phe	Gly	Ile	Glu	Val
				165					170					175	
Gly	Thr	Met	Thr	Thr	Ile	His	Ala	Tyr	Thr	Ser	Thr	Gln	Met	Leu	Leu
			180					185					190		
Asp	Gly	Pro	Val	Arg	Gly	Gly	Asn	Leu	Arg	Ser	Ala	Arg	Ala	Ala	Ala
		195					200					205			
Ile	Asn	Ile	Ile	Pro	His	Ser	Thr	Gly	Ala	Ala	Lys	Ala	Ile	Gly	Leu
	210					215					220				
Val	Val	Pro	Glu	Leu	Asn	Gly	Lys	Leu	Asn	Gly	His	Ala	Gln	Arg	Val
225					230					235					240
Pro	Val	Pro	Asp	Gly	Ser	Val	Thr	Asp	Leu	Val	Ser	Ile	Leu	Ser	Lys
				245					250					255	
Asp	Val	Thr	Ala	Asp	Glu	Val	Asn	Glu	Ala	Val	Lys	Lys	Tyr	Glu	Ser
			260					265					270		
Pro	Ser	Phe	Ala	Tyr	Asn	Asp	His	Asn	Ile	Val	Ser	Ser	Asp	Val	Leu
		275					280					285			
Gly	Met	Thr	Ala	Gly	Ser	Ile	Phe	Asp	Pro	Thr	Gln	Thr	Met	Val	Thr
	290					295					300				
Thr	Ala	Gly	Asp	Lys	Gln	Leu	Val	Lys	Thr	Val	Ala	Trp	Tyr	Asp	Asn
305					310					315					320
Glu	Tyr	Ser	Phe	Thr	Cys	Gln	Met	Val	Arg	Thr	Leu	Leu	Lys	Phe	Ala
				325					330					335	
Thr	Leu	Leu	Glu	His	His	His	His	His	His						
			340					345							

<210> 2
 <211> 1017
 <212> DNA
 <213> lactobacillus gasseri

<400> 2

ttaaagagta gcaaatttca ataaagtacg aaccatttgg caagtgaatg agtattcggtt 60
gtcgtaccaa gcaacagtct taactaattg cttgtcacct gcagtagtta ccatgggttg 120
agttgggtca aagattgaac cagcagtcac acctaaaacg tcgctagaaa cgatgttggtg 180
gtcgttgtat gcaaataaag gactttcgta cttcttaact gcttcgttaa cttcgtcagc 240
agttacatcc ttgcttaaga ttgaaaccaa ttcagttaca gaaccatctg gaactggaac 300
acgttgtgcg tgaccattca acttaccgtt caattctgga acaacaagac caatagcctt 360
agcagcacca gttgagtgag gaataatgtt gatagctgca gcacgagcag aacgtaagtt 420
accaccacgt acaggaccat ctaaaagcat ttgagttgaa gtgtaagcgt ggatagtagt 480
catagtacca acttcaatgc cgaattcctt ttgtaaagca ttaaccattg gtgctaata 540
gttagtagta catgaaccag ctgaaacaat cttgtcgtca gcagtcaaag tatcatcggtt 600
tacgccgtaa acaatgggtct tcaagtctga accagcaggt gcagaaatta atacacgctt 660
tgcaccagcc ttaaggtgag cttctgactt agctttgcta gtgtagaaac cagtacattc 720
aagaacgaag tcaacaccat cgttcttaac ccaaggaatg ttttgtgctt gtgggttcagc 780
gtaaacacgg tacttcttac cgtcaactac gattgagtca tcagttgctg aaacttcgtg 840
gttgaaagta ccatgagttg agtcgtactt aagtaagtga gctaaaagtg ctggagtagt 900
caagtcgttg attgcaacaa cttcaatatc tgaagacttt tcgcctaaat ccataatacg 960
acggaatgct aaacgaccaa tacggccgaa accgttaata ccaattttaa ctgtcat 1017

<210> 3
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工合成

<220>
<223> 引子

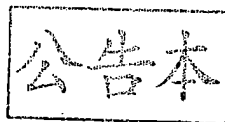
<400> 3
gctctagaat gacagttara attggtatta a 31

<210> 4
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工合成

<220>
<223> 引子

<400> 4
aaataacttt aaacgatrak aagagctcgc c 31

發明摘要



※ 申請案號： 103110733

※ 申請日： 103. 3. 21

※IPC 分類： A61K 38/44 (2006.01)

A61P 11/06 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

治療或預防過敏性疾病的有效成分/ACTIVE INGREDIENT FOR
TREATMENT OR PREVENTION OF ALLERGIC DISEASES

【中文】

本發明關於一種治療或預防過敏性疾病的有效成分，其中該有效成分為甘油醛-3-磷酸脫氫酶 (G3PDH)。也提供甘油醛-3-磷酸脫氫酶用於製備具有治療或預防過敏性疾病藥劑的用途，以及用於製備具有治療或預防氣喘或異位性皮膚炎藥劑的用途。

【英文】

The present invention relates to an active ingredient for treatment or prevention of allergic diseases; wherein the active ingredient is glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase (G3PDH). The uses of G3PDH in manufacturing a medicament for treating or preventing allergy diseases, and that for treating or preventing asthma or atopic dermatitis are also provided.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：圖 24。

【本代表圖的符號簡單說明】：無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：無

炎小鼠後其總 IgE (圖 14A) 及 OVA-特異性 IgE (圖 14B) 之變化。

圖 15A-15C 為 IE3-3G1 或 PBS 以腹腔 (i.p.) 注射治療以塵蟎 (Der p) 或卵白蛋白 (OVA) 致敏之異位性皮膚炎小鼠其總 IgE (圖 15A)、OVA-特異性 IgE (圖 15B) 及 Der p-特異性 IgE (圖 15C) 之變化。

圖 16 為劑量 10^7 CFU 或 10^9 CFU 之 PM-A0005 口服治療異位性皮膚炎小鼠其以白血球凝集素 (leucoagglutinin, PHA-L) 或不同濃度 OVA 刺激脾臟細胞後, 該脾臟細胞之增生能力變化結果。

圖 17A-17B 為 IE3-3G1 或 PBS 以腹腔 (i.p.) 注射治療以塵蟎 (Der p) 或卵白蛋白 (OVA) 致敏之異位性皮膚炎小鼠其以 PHA-L、不同濃度 OVA (圖 17A) 或 Der p (圖 17B) 刺激脾臟細胞後, 該脾臟細胞之增生能力變化結果。

圖 18A-18C 為劑量 10^7 CFU 或 10^9 CFU 之 PM-A0005 口服治療異位性皮膚炎小鼠其以 PHA-L、不同濃度 OVA 刺激脾臟細胞後, 其細胞激素 IFN- γ (Interferon- γ) (圖 18A)、IL-17 (圖 18B) 及 IL-10 (圖 18C) 之變化結果。

圖 19A-19C 為 IE3-3G1 或 PBS 以腹腔 (i.p.) 注射治療以塵蟎 (Der p) 或卵白蛋白 (OVA) 致敏之異位性皮膚炎小鼠其以 PHA-L、不同濃度 Der p 或 OVA 刺激脾臟細胞後, 其細胞激素 IFN- γ (圖 19A)、IL-17 (圖 19B) 及 IL-10 (圖 19C) 之變化結果。

圖 20 為劑量 10^7 CFU 或 10^9 CFU 之 PM-A0005 口服治療異位性皮膚炎小鼠其 IL-17 表現情形之染色切片結果。

圖 21 為 IE3-3G1 或 PBS 以腹腔 (i.p.) 注射治療以塵蟎 (Der p) 或卵白蛋白 (OVA) 致敏之異位性皮膚炎小鼠其 IL-17 表現情形之染色切片結果。

圖 22 為次區分物 IE3-3G1 的蛋白質二維電泳分析結果。編號 1~編號 5 為甘油醛-3-磷酸脫氫酶; 編號 6 為果糖二磷酸醛縮酶。

圖 23 以考馬斯藍染色及使用抗組胺酸 (Histidine) 抗體進行西方墨點分析鑑定 G3PDH 重組蛋白質。其中 M: 蛋白質分子標記; 1: 次區分物 IE3-3G1; 2: G3PDH-His 重組蛋白。

圖 24 為 G3PDH 重組蛋白刺激小鼠樹突細胞產生細胞激素 IL-12 (IL12p40) 以評估對於免疫調節的功効的結果。其中以添加脂多醣

103年6月23日修正替換頁
第22-27頁

加（圖 8C）。而在餵食不同劑量 PM-A0005 的小鼠組別，其表皮層和真皮層增厚情形減緩且免疫細胞浸潤減少（圖 8A 及 8B），而嗜酸性粒細胞數目亦減少（圖 8C）。

【0100】 在 OVA 或 Der p 經皮致敏並以腹腔注射 PBS 緩衝液的組別，其表皮層和真皮層均明顯增厚，且同時產生大量免疫細胞的浸潤（圖 9A 及 9B）及嗜酸性粒細胞數量的增加（圖 9C）。而在 OVA 或是 Der p 經皮致敏並以腹腔注射 IE3-3G1 的組別，其表皮層和真皮層增厚情形減緩且免疫細胞浸潤減少（圖 9A 及 9B），而嗜酸性粒細胞數目亦減少（圖 9C）。

【0101】 3. PM-A0005 及其有效成分 IE3-3G1 可減少表皮層 TSLP 產生並減少蘭格罕細胞的轉位

【0102】 利用免疫組織化學染色後可發現餵食 PBS 緩衝液之組別或不餵食的控制組中，其表皮層的 TSLP 大量表現（圖 10）且蘭格罕細胞位於真皮層的數目明顯增加（圖 11A 及 11B）。相對於餵食不同劑量 PM-A0005 的小鼠組別，其表皮層的 TSLP 表現量明顯減少（圖 10）且蘭格罕細胞位於真皮層的數目亦明顯減少（圖 11A 及 11B）。

【0103】 在 OVA 或是 Der p 經皮致敏並以腹腔注射 PBS 緩衝液的組別，其表皮層的 TSLP 大量表現，而 OVA 或是 Der p 經皮致敏並以腹腔注射 IE3-3G1 的組別，其表皮層的 TSLP 表現量則明顯減少（圖 12）。而腹腔注射 PBS 緩衝液的組別，不論是利用 OVA 或是 Der p 經皮致敏，其蘭格罕細胞位於真皮層的數目明顯增多。而腹腔注射 IE3-3G1 之組別，其位於真皮層的蘭格罕細胞數目明顯減少（圖 13A 及 13B）。

【0104】 4. PM-A0005 及其有效成分 IE3-3G1 對於血清中總 IgE 以及特異性 IgE 的表現

【0105】 小鼠在未處理前及每次經皮致敏後進行臉頰採血以收取血清，並利用 ELISA 方式檢測小鼠血清中的免疫球蛋白 IgE。結果發現每天餵食不同劑量 PM-A0005 的小鼠組別與控制組比較後，其血清中總 IgE 量並無統計上的差異（圖 14A）。而 OVA 特異性 IgE 的表現量在餵食 1×10^7 CFU 的 PM-A0005 組別相較控制組有明顯下降（圖 14B）。另外，比較餵食不同劑量 PM-A0005 的組別後，發現餵食劑量 1×10^7 CFU 的小鼠相較於餵食劑量

1×10^9 CFU 的小鼠，其 OVA 特異性 IgE 表現量略為減少（圖 14B）。

【0106】 而在 OVA 或 Der p 經皮致敏並以腹腔注射 IE3-3G1 的組別，其血清中總 IgE 的量和控制組織間並無統計上的差異（圖 15A）。而 OVA 特異性 IgE 和 Der p 特異性 IgE 在腹腔注射 IE3-3G1 或 PBS 的組別間亦無統計上的差異（圖 15B 及 15C）。

【0107】 **5. PM-A0005 及其有效成分 IE3-3G1 對於脾臟細胞增生能力之影響**

【0108】 將脾臟細胞分別投予不同濃度 PHA-L 或 OVA，並於 72 小時後測量吸光值。結果顯示，餵食給予不同劑量 PM-A0005 之組別及控制組皆無影響脾臟細胞對於特定抗原 OVA，或非特定抗原 PHA-L 的增生能力（圖 16）。

【0109】 另外，將脾臟細胞分別投予不同濃度 PHA-L、OVA 或 Der p，並於 72 小時後測量吸光值。在 OVA 經皮致敏並以腹腔注射 PBS 緩衝液或 IE3-3G1 之小鼠組別，其不會影響脾臟細胞對於特定抗原 OVA 或非特定抗原 PHA-L 的增生能力（圖 17A）。而在 Der p 經皮致敏並以腹腔注射 IE3-3G1 隻小鼠組別，相較於僅給予腹腔注射 PBS 緩衝液的小鼠組別，其脾臟細胞對於特定抗原 Der p 的增生反應有明顯的下降（圖 17B）。

【0110】 **6. PM-A0005 及其有效成分 IE3-3G1 影響小鼠脾臟細胞中細胞激素的分泌**

【0111】 在投予 PHA-L 後，餵食不同劑量 PM-A0005 小鼠相較於僅餵食 PBS 緩衝液之組別其 IFN- γ 分泌量均下降（圖 18A）。而 IL-17 在餵食不同劑量 PM-A0005 的組別，相較於餵食 PBS 緩衝液之組別，其分泌量亦呈下降（圖 18B）。另外，在抑制發炎反應的細胞激素 IL-10 表現量上，餵食劑量 1×10^7 CFU 的 PM-A0005 組別相較於餵食 PBS 緩衝液之組別及不餵食的控制組，其表現量呈現上升；而在餵食劑量 1×10^9 CFU 的 PM-A0005 組別相較於不餵食的控制組，其表現量亦呈上升。除此之外，餵食劑量 1×10^7 CFU 相較於餵食劑量 1×10^9 CFU 的 PM-A0005，其 IL-10 的表現量更為提高（圖 18C）。

【0112】 在投予 PHA-L 後，在 IFN- γ 之分泌量上，OVA 經皮致敏並

以腹腔注射 IE3-3G1 的組別與腹腔注射 PBS 緩衝液之組別並沒有差異。而 Der p 經皮致敏並以腹腔注射 IE3-3G1 之組別，相較於以腹腔注射 PBS 緩衝液之組別，其 IFN- γ 的分泌量明顯上升(圖 19A)。而在 IL-17 之分泌量上，OVA 經皮致敏並以腹腔注射 IE3-3G1 的組別係低於以腹腔注射 PBS 緩衝液之組別，但 Der p 經皮致敏在 IL-17 之分泌量上沒有統計差異(圖 19B)。另外，在抑制發炎反應的細胞激素 IL-10 表現量，OVA 經皮致敏並以腹腔注射 IE3-3G1 之組別，相較於以腹腔注射 PBS 緩衝液的組別，其脾臟細胞在投予特定抗原 OVA 後，其分泌出較多的 IL-10，但 Der p 經皮致敏在 IL-10 表現量沒有統計上差異(圖 19C)。

【0113】 7. PM-A0005 及其有效成分 IE3-3G1 可降低皮膚中的 IL-17 分泌量

【0114】 小鼠皮膚組織藉由免疫組織化學染色後，可發現餵食不同劑量 PM-A0005 的組別，相較於餵食 PBS 緩衝液之組別及不餵食的控制組，其皮膚中的 IL-17 表現量明顯下降(圖 20)。

【0115】 另外，無論係以 OVA 或 Der p 經皮致敏並以腹腔注射 IE3-3G1 之組別，相較於以腹腔注射 PBS 緩衝液的組別，其 IL-17 表現量均呈現下降(圖 21)。

【0116】 實例 8 IE3-3G1 有效成分鑑定

【0117】 經膠體過濾管柱層析分離出來的次區分物 IE3-3G1 委託成功大學醫學院蛋白質體核心實驗室進行二維電泳分析，並由 LC-MS/MS 進行蛋白質鑑定，接續比對 Matrix Science 資料庫確認。

【0118】 將次區分物 IE3-3G1 進行二維電泳分析以進行有效成分的鑑定。分析結果顯示在 40 kD 有 5 個蛋白質點、在 25 kD 有 1 個蛋白質點，共有 6 個蛋白質點。接續以 LC-MS/MS 鑑定蛋白質，經由序列資料庫比對後確認此 6 個蛋白質點編號 1~編號 5 為甘油醛-3-磷酸脫氫酶 (Glyceraldehyde 3-phosphate Dehydrogenase, G3PDH)、編號 6 為果糖二磷酸醛縮酶(Fructose-bisphosphate Aldolase)(圖 22)。由二維電泳和 LC-MS/MS 蛋白質身分鑑定結果，得知本發明有效成分為約 40kD 的蛋白質，即甘油醛-3-磷酸脫氫酶 (G3PDH)。

【0119】 實例 9 建構包含 G3PDH 基因的質體及 G3PDH 重組蛋白表現

【0120】 為了進一步證實 G3PDH 為 PM-A0005 菌株中的有效成分，利用分子生物學的方式進行重組蛋白表現。根據基因體資料庫的 DNA 序列設計含有限制酶切位的引子 (oligo-primer)，利用聚合酵素鏈鎖反應進行增幅，並與 pET303/CT-His (Invitrogen, USA) 表現載體進行 DNA 重組，以獲得 pET303-G3PDH-His 構築體。將 pET303-G3PDH-His 構築體轉染至 *E. coli* DH5 α 勝任細胞中進行此構築體的複製。以質體萃取套組 (mini plasmid extraction kit, Viogen, USA) 純化此構築體，並以 DNA 定序確認。

【0121】 首先，由 NCBI 基因資料庫中搜尋出 *Lactobacillus gasseri* G3PDH 的基因序列 (SEQ ID NO:2)，以專一性引子 (表 5) 由加氏乳酸桿菌 PM-A0005 菌株基因體以聚合酶連鎖反應放大，再利用限制酶 XbaI 和 XhoI 切割，且純化的 pET303/CT-His 質體亦使用 XbaI 和 XhoI 切割後，將 G3PDH 基因與質體混合，並用 DNA 連接酶連結後以大腸桿菌選殖及增殖成為重組質體 pET303-G3PDH-His，並經 DNA 定序確認基因序列。

表 5

G3PDH 基因正向引子	5'-GCTCT AGAAT GACAG TTARA ATTGG TATTA A-3' (SEQ ID NO: 3)
G3PDH 基因反向引子	3'-AAATA ACTTT AAACG ATRAG AAGAG CTCGC C-5' (SEQ ID NO: 4)

【0122】 經前述 DNA 定序的 G3PDH DNA 序列，轉譯成蛋白質的胺基酸序列，即如 SEQ ID NO: 1 所示的胺基酸序列。

【0123】 接著將 pET303-G3PDH-His 重組質體轉殖到 BL21-DE5，並以菌落 PCR 確定轉殖成功。將含有重組質體 pET303-G3PDH-His 的 BL21-DE5 菌體於 37℃ 培養於 LB 培養液中，當 OD 到達 0.4 時於將菌液移至 26℃ 培養並加入 IPTG 誘導重組蛋白表現，隨後於 4℃ 下以 4,000 rpm 離心 20 分鐘沉澱菌體。利用溶菌酶 (1 mg/ml) 溶解菌體，並於 4℃ 下以 22,500g 離心 30 分鐘去除沉澱物，使用能與 His-tag 做專一性結合帶有鎳離子的親和性管住純化上清液中重組蛋白，以分光光度計於吸光值 280 nm 量測蛋白

質濃度，並以考馬斯藍（Coomassie Blue）染色及使用抗組胺酸（Histidine）抗體進行西方墨點分析鑑定蛋白質純度。結果顯示 G3PDH 重組蛋白質的大量表現，得到較純的重組蛋白 G3PDH-His，並利用 Anti-His 抗體確認該重組蛋白含有 His-tag（如圖 23）。

【0124】 實例 10 G3PDH 可刺激免疫細胞分泌 IL-12 及 IFN-γ

【0125】 將 G3PDH 重組蛋白與小鼠樹突細胞共同培養以評估對於免疫調節的功效，其中以添加 LPS 或 PHA-L 為正控制組，僅有細胞而未額外添加刺激物者為對照組，其結果表 6 所示。結果顯示 G3PDH 可誘發小鼠樹突細胞產生細胞激素 IL-12 平均達 28235.06 pg/ml，為對照組（僅有細胞）的 44 倍（如圖 24 所示）。

表 6

	培養基	對照組 (僅有細胞)	正控制組 (LPS 10 μg/ml)	正控制組 (PHA 30 μg/ml)	G3PDH-His 10 μg/ml
第一組	-0.30	632.06	71382.12	47440.94	29735.06
第二組	0.29	653.23	76382.12	50323.29	26735.06
平均	0.00	642.64	73882.12	48882.12	28235.06
標準差	0.42	14.97	3535.53	2038.13	2121.32

【0126】 另一方面，將 G3PDH 重組蛋白與小鼠脾臟細胞共同培養以評估對於免疫調節的功效，其中以添加 LPS 或 PHA 為正控制組，僅有細胞而未額外添加刺激物者為對照組，其結果如表 7 所示。結果顯示 G3PDH 可誘發小鼠脾臟細胞產生細胞激素 IFN-γ 平均達 341.32 pg/ml，為對照組（僅有細胞）的 10 倍(如圖 25 所示)。

表 7

	培養基	對照組 (僅有細胞)	正控制組 (LPS 10 μg/ml)	正控制組 (PHA-L 30 μg/ml)	G3PDH-His 10 μg/ml
第一組	28.42	33.68	407.37	442.63	343.68

第二組	31.05	30.00	441.58	414.74	338.95
平均	29.74	31.84	424.47	428.68	341.32
標準差	1.86	2.61	24.19	19.72	3.35

【0127】 總結，經由體外及體內試驗的結果證實該加氏乳酸桿菌 PM-A0005 菌株及其萃取物、區分物、次區分物，以及其有效成分甘油醛-3-磷酸脫氫酶具有刺激免疫細胞 IL-10、IL-12 及 IFN- γ 分泌的功效，因此可調控 Th1 型免疫反應而抑制免疫球蛋白、改善 Th2 免疫反應過剩的過敏現象及影響 Th17 細胞分化，因此可用於刺激免疫細胞、調節免疫反應。此外，上述成分亦可顯著降低塵蟎致敏小鼠呼吸道阻力、顯著抑制肺臟的細胞浸潤與發炎現象及改善表皮層與真皮層增厚和免疫細胞浸潤現象，因此可用於治療或預防過敏性疾病如氣喘及異位性皮膚炎。

【0128】 咸信本發明所屬技藝中具一般知識者基於本文的敘述，無須進一步的例示即可將本發明應用至其最廣泛的範圍。因此，應了解此處所提供的敘述及申請專利範圍係供例示目的而非以任何方式限制本發明的範疇。

【符號說明】

無。

【生物材料寄存】

國內寄存資訊【請依寄存機構、日期、號碼順序註記】

食品工業發展研究所，2006 年 1 月 11 日，寄存編號 BCRC 910304。

國外寄存資訊【請依寄存國家、機構、日期、號碼順序註記】

【序列表】（請換頁單獨記載）

申請專利範圍

1. 一種具有如 SEQ ID NO: 1 的胺基酸序列的多肽用於製備降低個體過敏反應藥劑或組合物的用途，其中該多肽係純化自加氏乳酸桿菌 (*Lactobacillus gasseri*) PM-A0005 菌株 (簡稱「PM-A0005 菌株」) 之甘油醛-3-磷酸脫氫酶 (Glyceraldehyde 3-phosphate Dehydrogenase, G3PDH)，而該 PM-A0005 菌株寄存於台灣新竹食品工業發展研究所，寄存編號 BCRC 910304。
2. 如請求項 1 的用途，其係用於製備治療過敏性疾病藥劑的用途。
3. 如請求項 2 的用途，其中該過敏性疾病為氣喘。
4. 如請求項 2 的用途，其中該過敏性疾病為異位性皮膚炎。
5. 如請求項 1 或 2 的用途，其中該多肽係以溶菌酶分解該 PM-A0005 菌株菌體後再以硫酸銨沉澱胞質蛋白質而獲得。
6. 如請求項 6 的用途，其中該多肽係以硫酸銨濃度 0-25% 或 50-75% 沉澱胞質蛋白質而獲得。
7. 如請求項 1 或 2 的用途，其中該多肽係以溶菌酶分解該 PM-A0005 菌株菌體後再以硫酸銨沉澱胞質蛋白質而獲得萃取物後，其再經離子交換層析 (ion-exchange chromatography) 分離而得。
8. 如請求項 1 或 2 的用途，其中該多肽係以溶菌酶分解該 PM-A0005 菌株菌體後再以硫酸銨沉澱胞質蛋白質而獲得之萃取物，其經離子交換層析分離獲得區分物後，再以膠體過濾層析法分離而得。
9. 如請求項 1 或 2 的用途，其中該多肽與生理上可接受的賦形劑或稀釋劑製成一醫藥組合物或食品組合物。