202214843

(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 202214843 A

(43)公開日： 中華民國 111 (2022) 年 04 月 16 日

(21)申請案號：110114207 (22)申請日： 中華民國 110 (2021) 年 04 月 20 日

(51)Int. Cl.： *C12N5/071 (2010.01)* *C07K4/06 (2006.01)*
C07K14/375 (2006.01) *A61K36/074 (2006.01)*

(30)優先權：2020/10/05 美國 63/087,677

(71)申請人：蘑法生物科技股份有限公司 (中華民國) MYCOMAGIC BIOTECHNOLOGY CO., LTD (TW)
新北市深坑區北深路三段 270 巷 12 號 8 樓之 1

(72)發明人：李澧洲 LEE, MICHAEL (TW)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：13 項 圖式數：6 共 32 頁

(54)名稱

促進幹細胞增殖與繁殖之方法

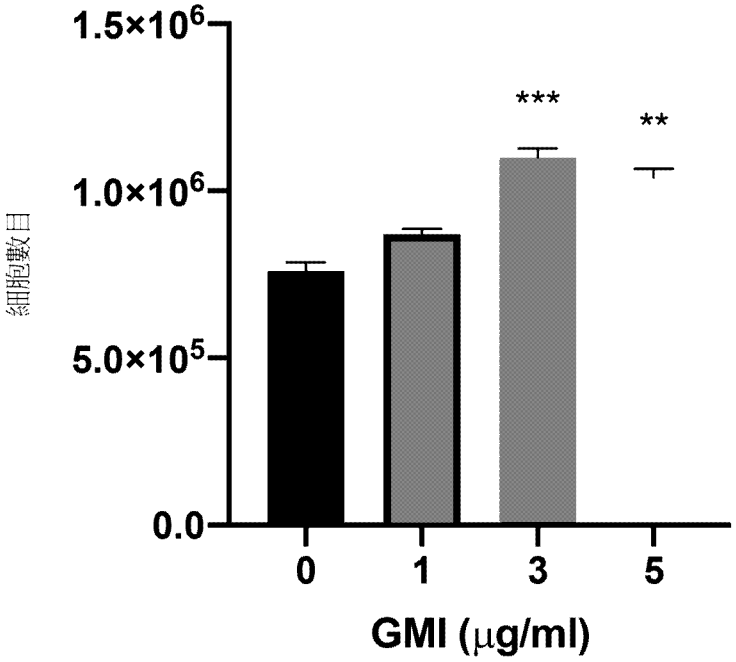
(57)摘要

本發明提供一種增殖或繁殖未分化幹細胞之方法，其包含使幹細胞群體與有效量之靈芝免疫調節蛋白或其重組體或其片段接觸。

The present disclosure provides a method for proliferating or propagating undifferentiated stem cells, comprising contacting a population of stem cells with an effective amount of Ganodermaimmunomodulatory protein or a recombinant thereof or a fragment thereof.

指定代表圖：

ADSC



【圖1(B)】

202214845

【發明摘要】

【中文發明名稱】

促進幹細胞增殖與繁殖之方法

【英文發明名稱】

METHODS FOR PROMOTING PROLIFERATION AND PROPAGATION OF STEM CELLS

【中文】

本發明提供一種增殖或繁殖未分化幹細胞之方法，其包含使幹細胞群體與有效量之靈芝免疫調節蛋白或其重組體或其片段接觸。

【英文】

The present disclosure provides a method for proliferating or propagating undifferentiated stem cells, comprising contacting a population of stem cells with an effective amount of *Ganoderma* immunomodulatory protein or a recombinant thereof or a fragment thereof.

【指定代表圖】

圖1(B)

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

促進幹細胞增殖與繁殖之方法

【英文發明名稱】

METHODS FOR PROMOTING PROLIFERATION AND PROPAGATION OF STEM CELLS

【技術領域】

【0001】 本發明係關於一種促進幹細胞增殖之方法。詳言之，本發明提供一種使用免疫調節蛋白促進幹細胞增殖之方法。

【先前技術】

【0002】 富潛能幹細胞之特徵為自我複製及分化之能力。幹細胞通常藉由形態以及特徵性標記物之存在來表徵。幹細胞分化可引起細胞形態之表型改變。幹細胞分化亦可引起幹細胞標記物或端粒酶活性之損失。幹細胞分化可進一步促使獲取三個胚胎胚層—外胚層、中胚層或內胚層中之一或多者所特有之標記物或形態。當前，使用消除分化細胞且促進未分化細胞擴增之培養試劑來繁殖未分化之富潛能幹細胞。

【0003】 然而，此項技術中需要開發一種促進未分化幹細胞擴增之方法。

【發明內容】

【0004】 本發明意外地發現靈芝(*Ganoderma*)免疫調節蛋白或其重組體提供增殖或繁殖未分化幹細胞且維持幹細胞未分化之有益功效。

【0005】 在一個態樣中，本發明提供一種增殖或繁殖未分化幹細胞之方法，其包含使幹細胞群體與有效量之靈芝免疫調節蛋白、其重組體或

其片段接觸。

〔0006〕在另一態樣中，本發明亦提供一種幹細胞培養補充劑，其包含足以增殖或繁殖未分化幹細胞之量的靈芝免疫調節蛋白、其重組體或其片段及化學成分確定之幹細胞培養基。

〔0007〕在一個實施例中，本文所述之幹細胞維持未分化。

〔0008〕在一個實施例中，本文所述之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。在一個實施例中，靈芝免疫調節蛋白之重組體包含SEQ ID NO: 4之胺基酸序列。在一個實施例中，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。

〔0009〕SEQ ID NO: 1至4之序列如下列出。

LAWNMK (SEQ ID NO: 1)

DLGMRPSYAM (SEQ ID NO: 2)

MSDFALIFTLAWNMKQLAEDYTPNWGRGRRSSEDLVTEPIVLTDKAYTY

RVAVSGKDLGMRPSYAMESDGSQKINFLFYNSGYGLADLNTLQVAVIDPD

TGNNFLVAQWNEQEKLISEEDLNSAVDLLLDHHHHH (SEQ ID NO: 3)

LAELAEEMSDFALIFTLAWNMKQLAEDYTPNWGRGRRSSEDLVTEPIVLT

DKAYTYRVAVSGKDLGMRPSYAMESDGSQKINFLFYNSGYGLADLNTLQV

YVIDPDTGNNFLVAQWNEQEKLISEEDLNSAVDLLLDHHHHH (SEQ ID NO: 4)

〔0010〕在一個實施例中，靈芝免疫調節蛋白或其重組體或片段之量小於15 μg/mL；較佳地，小於12.5 μg/mL。在一典實施例中，靈芝免疫調節蛋白或其重組體或片段之量在約1.0 μg/mL至約15 μg/mL、約1.5 μg/mL至約15 μg/mL、約2.0 μg/mL至約15 μg/mL、約2.5 μg/mL至約15 μg/mL、約3.0 μg/mL至約15 μg/mL、約3.5 μg/mL至約15 μg/mL、約4.0 μg/mL至約15 μg/mL、約4.5 μg/mL至約15 μg/mL、約5.0 μg/mL至約15

μg/mL、約5.5 μg/mL至約15 μg/mL、約6.0 μg/mL至約15 μg/mL、約6.5 μg/mL至約15 μg/mL、約7.0 μg/mL至約15 μg/mL、約7.5 μg/mL至約15 μg/mL、約8.0 μg/mL至約15 μg/mL、約8.5 μg/mL至約15 μg/mL、約9.0 μg/mL至約15 μg/mL、約9.5 μg/mL至約15 μg/mL、約10.0 μg/mL至約15 μg/mL、約10.5 μg/mL至約15 μg/mL、約11.0 μg/mL至約15 μg/mL、約11.5 μg/mL至約15 μg/mL、1.0 μg/mL至約12.5 μg/mL、約1.5 μg/mL至約12.5 μg/mL、約2.0 μg/mL至約12.5 μg/mL、約2.5 μg/mL至約12.5 μg/mL、約3.0 μg/mL至約12.5 μg/mL、約3.5 μg/mL至約12.5 μg/mL、約4.0 μg/mL至約12.5 μg/mL、約4.5 μg/mL至約12.5 μg/mL、約5.0 μg/mL至約12.5 μg/mL、約5.5 μg/mL至約12.5 μg/mL、約6.0 μg/mL至約12.5 μg/mL、約6.5 μg/mL至約12.5 μg/mL、約7.0 μg/mL至約12.5 μg/mL、約7.5 μg/mL至約12.5 μg/mL、約8.0 μg/mL至約12.5 μg/mL、約1.5 μg/mL至約10 μg/mL、約1.5 μg/mL至約8.5 μg/mL、約1.5 μg/mL至約8.0 μg/mL、約1.5 μg/mL至約7.5 μg/mL、約1.5 μg/mL至約7.0 μg/mL、約1.5 μg/mL至約6.5 μg/mL、約1.5 μg/mL至約6.0 μg/mL範圍內。在另一實施例中，靈芝免疫調節蛋白或其重組體或片段之量為約1.5 μg/mL、約1.5625 μg/mL、約3.0 μg/mL、約3.125 μg/mL、約6.25 μg/mL或約12.5 μg/mL。

【0011】 在一個實施例中，幹細胞群體係人類來源的。

【0012】 在一個實施例中，幹細胞群體包含誘導性富潛能幹(iPS)細胞群體、胚胎幹(ES)細胞群體、生殖細胞群體、組織特異性幹細胞群體或成體幹細胞群體。在一些實施例中，幹細胞為胚胎幹細胞、間葉幹細胞(MSC)、骨髓基質細胞、造血幹細胞、脂肪來源幹細胞、內皮幹細胞、牙

髓幹細胞或神經幹細胞。

【圖式簡單說明】

【0013】 圖1(A)及1(B)展示GMI對ADSC增殖之作用。將ADSC (5×10^5個細胞)用不同濃度之GMI (0、1、3及5 μg/ml)處理3天。在處理之後，收穫細胞，且藉由血球計分析總細胞數目(B)。藉由光學顯微鏡拍攝相差影像(A)。一式三份地進行實驗(n=3)。對比無GMI處理之對照細胞，**p<0.01及***p<0.001。

【0014】 圖2展示在GMI處理之後ADSC中之表面標記物之表現量的比較。將ADSC (5×10^5個細胞)用不同濃度之GMI (0、1、3及5 μg/ml)處理3天。在培育之後，收穫細胞且用特異性MSC陽性(CD29、CD146、CD166、CD106、CD90、CD105、CD73、CD44)及陰性(CD34、CD45、CD11b、CD19、HLA-DR)表面標記物抗體染色。藉由流動式細胞測量術(BD Accuri™ C6 Plus)分析結果。一式三份地進行實驗(n=3)。

【0015】 圖3(A)及3(B)展示對照ADSC或經GMI處理之ADSC中之分化能力。將ADSC用不同濃度之GMI (0、3及5 μg/ml)處理3天。在處理之後，將對照ADSC (6×10^4個細胞)及經GMI處理之ADSC (6×10^4個細胞)與生脂分化培養基一起培養21天(A)或與成骨分化培養基一起培養14天(B)。在所指示時間點拍攝ADSC之相差影像。上圖及中間圖展示在生脂或成骨分化誘導之後改變的細胞形態。下圖展示在生脂或成骨分化誘導之後的染色結果。成骨分化中比例尺等於100 mm且生脂分化中等於50 mm。

【0016】 圖4(A)及4(B)展示GMI對BMSC增殖之作用。將BMSC (2×10^5個細胞)用不同濃度之GMI (0、1、3及5 μg/ml)處理3天。在處理之

後，收穫細胞，且藉由血球計分析總細胞數目(B)。藉由光學顯微鏡拍攝相差影像(A)。一式三份地進行實驗(n=3)。對比無GMI處理之對照細胞，*p<0.05及**p<0.01。

【0017】 圖5展示在GMI處理之後BMSC中之表面標記物之表現量的比較。將BMSC (2×10^5個細胞)用不同濃度之GMI (0、1、3及5 μg/ml)處理3天。在培育之後，收穫細胞且用特異性MSC陽性(CD29、CD146、CD166、CD106、CD90、CD105、CD73、CD44)及陰性(CD34、CD45、CD11b、CD19、HLA-DR)表面標記物抗體染色。藉由流動式細胞測量術(BD Accuri™ C6 Plus)分析結果。一式三份地進行實驗(n=3)。

【0018】 圖6(A)及6(B)展示對照BMSC或經GMI處理之BMSC中之分化能力。將BMSC用不同濃度之GMI (0、3及5 μg/ml)處理3天。在處理之後，將對照BMSC (6×10^4個細胞)及經GMI處理之BMSC (6×10^4個細胞)與生脂分化培養基一起培養21天(A)或與成骨分化培養基一起培養14天(B)。在所指示時間點拍攝BMSC之相差影像。上圖及中間圖展示在生脂或成骨分化誘導之後改變的細胞形態。下圖展示在生脂或成骨分化誘導之後的染色結果。成骨分化相片中比例尺等於100 mm且生脂分化相片中等於50 mm。

【實施方式】

【0019】 除非另外定義，否則本文中所用之所有技術及科學術語均具有與一般熟習本發明所屬技術者通常所理解之含義相同的含義。儘管與本文所述之彼等方法及材料類似或等效之方法及材料可用於實踐或測試本發明，但目前描述較佳方法及材料。本文所提及之所有公開案均以引用的方式併入本文中。

【0020】 在本申請案中，除非另外特定陳述，否則單數之使用包括複數，冠詞「一(a/an)」意謂「至少一種」，且「或」之使用意謂「及/或」。

【0021】 如本文所用，「生長」係指尺寸、數目或體積變得更大、更長或更多或者增加之過程。

【0022】 如本文所用，「分化」係指使細胞或組織之組織或複雜性程度增加且伴有更專門之功能的發育過程。

【0023】 如本文所用，「有效量」意謂足以繁殖未分化幹細胞且維持幹細胞未分化之量。

【0024】 如本文所用，「個體」係指人類或非人類動物。

【0025】 如本文所用，「富潛能幹細胞」係指可分化成形成身體器官、神經系統、皮膚、肌肉及骨架之三個胚胎胚層之全部細胞，但不分化成滋養層及胎盤之胚胎組分的細胞。

【0026】 如本文所用，「幹細胞」係指具有能夠自我更新(藉由細胞分裂而製得更多幹細胞)之高增殖潛力的未分化細胞，其可產生可進行終末分化，分化成超過一種不同細胞表型之子細胞。

【0027】 如本文所用，「增殖」係指細胞生長且分裂產生子細胞且子細胞具有與該細胞相同之表型的過程。

【0028】 如本文所用，「繁殖」係指細胞群體藉由單細胞連續分裂成相同子細胞進行之擴增。

【0029】 如本文所用，「細胞培養」或「培養」係指細胞維持在人造(例如活體外)環境中。

【0030】 如本文所用，「細胞培養基」、「培養基(culture medium)」

或「培養基(medium)」(及在各種情況下，複數種培養基)係指支持細胞培養及/或生長之營養組合物。

【0031】「化學成分確定之培養基」係指已知所有化學組分之適合於人類或動物細胞之活體外或活體外細胞培養的生長培養基。在一特定實施例中，化學成分確定之培養基完全不含動物來源組分且不含胎牛血清、牛血清白蛋白或人類血清白蛋白，因為此等產物來源於牛或人類來源且含有白蛋白與脂質之複雜混合物。

【0032】意外地發現，幹細胞與靈芝免疫調節蛋白或其重組體或片段一起培養可增殖或繁殖幹細胞但不使其分化。亦即，靈芝免疫調節蛋白或其重組體或片段可增殖或繁殖未分化幹細胞且在若干繼代中維持其未分化。所得未分化幹細胞是多潛能或富潛能的。

【0033】因此，本發明提供一種增殖或繁殖未分化幹細胞之方法，其包含使幹細胞群體與有效量之靈芝免疫調節蛋白或其重組體或其片段接觸。

【0034】幹細胞之某些實施例包括胚胎幹細胞、間葉幹細胞(MSC)、骨髓基質細胞、造血幹細胞、脂肪來源幹細胞、內皮幹細胞、牙髓幹細胞及神經幹細胞。經工程改造之幹細胞之一特定實施例為MSC。

【0035】靈芝免疫調節蛋白或其重組體或片段之製備已描述於US 7,601,808中。詳言之，在US 7,601,808中，靈芝免疫調節蛋白稱為GMI；靈芝免疫調節蛋白之重組體稱為reGMI；且靈芝免疫調節蛋白之片段稱為SEQ ID NO:2及3。靈芝免疫調節蛋白或其重組體或片段的量小於15 μg/mL，較佳12.5 μg/mL。

【0036】靈芝免疫調節蛋白或其重組體或片段可添加至包含必需礦

質營養素、必需鹽、必需胺基酸、一或多種補充劑及玻尿酸之化學成分確定之幹細胞培養基中。示例性商購培養基包括經典調配物，諸如DMEM、DMEM:F12、RPMI及或其改良。

【0037】 另外，本發明提供一種幹細胞培養補充劑，其包含足以增殖或繁殖未分化幹細胞之量的靈芝免疫調節蛋白、其重組體或其片段及化學成分確定之幹細胞培養基。

【0038】 此項技術中已知用於活體外培養幹細胞之化學成分確定之細胞培養基。靈芝免疫調節蛋白、其重組體或其片段可添加至化學成分確定之細胞培養基以增殖或繁殖未分化幹細胞及化學成分確定之幹細胞培養基。

【0039】 培養基可用於所有細胞加工步驟中，該等加工步驟包括冷凍保存、解凍、再懸浮、調節、擴增或維持細胞群體，尤其包含造血幹細胞之細胞群體。

【0040】 藉由本文所述之培養基支持之細胞可根據由研究者決定之實驗條件培養。然而，應瞭解既定動物細胞類型之最佳塗鋪及培養條件可由一般技術者僅使用常規實驗即可確定。

【0041】 提供以下實例以說明但不限制所主張之發明。

實例

【0042】 材料與方法

【0043】 人類骨髓來源及脂肪組織來源間葉幹細胞之培養

【0044】 自56歲供體之骨髓中提取骨髓來源間葉幹細胞(BMSC)且組織來源間葉幹細胞自ATCC (Manassas, VA, USA)獲得。脂肪來源幹細胞(ADSC)係購自Lonza。將ADSC在含有MSC補充劑(2% FBS、5 ng/ml

rhFGF鹼性、5 ng/ml rhFGF酸性及5 ng/ml EGF)及L-丙胺醯基-L-麩醯胺酸(2.4 mM)之間葉幹細胞基本培養基(美國菌種保存中心，ATCC)下接種於10 cm培養皿中。將BMSC在含有7% FBS、15 ng/mL rhIGF-1、125 pg/ml rhFGF-b及L-丙胺醯基-L-麩醯胺酸(2.4 mM)之間葉幹細胞生長套組(ATCC)下接種於10 cm培養皿中。在接種後24小時以及隨後每3天改變培養基。當達到匯合時，藉由使用0.15%胰蛋白酶在37℃下分離細胞4分鐘，且收集之細胞每10天以初始細胞接種密度繼代。藉由使用相差顯微鏡記錄細胞形態。

【0045】 MSC增殖

【0046】 將ADSC (5×10^5個細胞)及BMSC (2×10^5個細胞)接種於10 cm培養皿中，歷時24小時，且接著用不同濃度之GMI (0、1、3及5 μg/ml)處理72小時。在處理之後，將細胞用DPBS洗滌兩次且與1 ml阿庫酶(accutase)一起在37℃下培育5分鐘。在培育之後，收集細胞且用DPBS洗滌。最後，藉由血球計對總細胞數目計數。

【0047】 流動式細胞測量術分析

【0048】 藉由流動式細胞測量術，評估自不同繼代收穫之對照MSC及經GMI處理之MSC的細胞表面標記物表現。簡言之，收集細胞，用DPBS洗滌且與含有1%牛血清白蛋白之非特異性阻斷溶液一起培育30分鐘。在阻斷之後，將細胞用DPBS洗滌且離心以移除阻斷溶液。接著，將細胞與螢光結合之抗人類抗體一起培育45分鐘。特定言之，針對CD29 (557332)、CD106 (563525)、CD146 (563619)及CD166 (565461)之抗體係購自BD Pharmingen；人類MSC分析套組(562245)亦購自BD Pharmingen。針對小鼠IgG之抗體用作陰性染色同型對照。使染色MSC再

懸浮於DPBS中且藉由使用流動式細胞測量術(BD Accuri™ C6 Plus)進一步分析。

【0049】 **MSC生脂及成骨分化**

【0050】 為評估GMI處理是否影響MSC之分化潛能，如先前描述將細胞接種在10 cm培養皿中且與間葉幹細胞生長套組(ATCC)加不同濃度之GMI一起培育3天。在GMI處理之後，收穫細胞且接種於24孔盤中，以進行生脂及成骨分化分析。分別藉由使用間葉幹細胞生脂套組及間葉幹細胞成骨套組(EMD Millipore Corp., MA, USA)進行生脂及成骨分化分析。在生脂分化條件下，將細胞用含有1 mM地塞米松(dexamethasone)、0.5 mM IBMX、10 μg/ml胰島素及100 mM吲哚美辛(indomethacin)之生脂誘導培養基處理。在成骨分化條件下，將細胞用含有0.1 mM地塞米松、0.2 mM抗壞血酸2-磷酸鹽及10 mM甘油2-磷酸鹽之成骨誘導培養基處理。當細胞100%匯合時，小心地自各孔抽吸培養基且添加0.5 ml生脂誘導培養基或成骨誘導培養基。每2-3天用新鮮誘導培養基替換WHAT。在誘導21天或14天之後BMSC可能分化成脂肪細胞或骨細胞。藉由以下實驗進一步分析MSC分化。

【0051】 **組織學染色**

【0052】 在生脂分化分析中，小心地自各孔抽吸培養基，且隨後在室溫下藉由4%三聚甲醛固定脂肪細胞30分鐘。在固定之後，將各孔用PBS沖洗三次，且隨後用水沖洗兩次。將足夠油紅O溶液(0.4毫升/孔)添加至各孔中。隨後，將培養盤在室溫下培育50分鐘。在培育之後，移除油紅O溶液，且用1 ml水沖洗孔三次。使用蘇木精溶液(0.4毫升/孔)將細胞核染色5分鐘。最後，藉由顯微鏡觀測結果且在光學顯微鏡(放大率，×400)

下拍攝。在成骨分化分析中，小心地自各孔抽吸培養基且藉由在室溫下在冰冷70%乙醇中培育1小時來固定骨細胞。在固定之後，小心地抽吸乙醇且用水沖洗兩次，持續5分鐘。抽吸水且添加足夠茜素紅(Alizarin Red)溶液以覆蓋孔(0.5毫升/孔)，隨後在室溫下培育30分鐘。在培育之後，移除茜素紅溶液且用1 ml水洗滌孔四次。隨後，將1 ml水添加至各孔中以防止細胞乾燥。最後，藉由顯微鏡觀測結果且在光學顯微鏡(放大率，×100)下拍攝。

【0053】 **統計分析**

【0054】 統計資料以平均值 ± SEM呈現。藉由史都登氏*t*檢驗(Student's *t* test)進行統計分析以在兩個組之間進行比較，其中顯著性設定在小於0.05之*p*值下。

【0055】 **實例1**

【0056】 **低劑量GMI處理誘導ADSC增殖**

【0057】 此等實例中使用由Mycomagic Biotechnology Co., Ltd.製造之GMI，且其自小孢靈芝(*Ganoderma microsporum*)產生及改善(參見美國專利第7,601,808號，以全文引用的方式併入本文中)。人類脂肪來源幹細胞(ADSC，PT-5006)係購自Lonza。先前研究指示GMI可抑制腫瘤生長且進一步誘導腫瘤細胞死亡，但沒有證據顯示GMI對ADSC增殖之作用。為瞭解GMI對ADSC增殖之作用，使用血球計進行細胞增殖分析。將脂肪來源幹細胞(5×10^5個細胞)在含有MSC補充劑(2% FBS、5 ng/ml rhFGF鹼性、5 ng/ml rhFGF酸性及5 ng/ml EGF)及L-丙胺醯基-L-麩醯胺酸(2.4 mM)之間葉幹細胞基本培養基(美國菌種保存中心，ATCC)下接種於10 cm培養皿中。在培育24小時之後，將細胞用不同濃度之GMI (0、

1、3及5 μg/ml)處理72小時。在處理之後，藉由使用1 ml阿庫酶溶液收穫細胞且藉由血球計對總細胞數目計數(圖1B)。藉由光學顯微鏡(放大率，×100)拍攝相差影像(圖1A)。圖1A及1B展示GMI可能顯著誘導ADSC增殖。

【0058】 在GMI處理之後表面標記物持續在ADSC上表現

【0059】 用於流動式細胞測量術分析之抗體，諸如抗CD29-PE (557332)、抗CD146-Alexa Fluor647 (563619)、抗CD166-BB515 (565461)及抗CD106-Percp-Cy5.5 (563525)，係購自BD Biosciences。人類MSC分析套組(562245)係購自BD Biosciences。在細胞計數之後，進一步分析細胞之細胞表面標記物表現量。收穫對照ADSC及經GMI處理之ADSC且進一步用抗CD29、抗CD106、抗CD146、抗CD166、抗CD90、抗CD105、抗CD73、抗CD44及陰性標記物混合抗體染色30分鐘。在染色之後，將細胞用PBS洗滌兩次且再懸浮於1 ml PBS中。藉由流動式細胞測量術(BD ACCURI™ C6 Plus)評估對照細胞及經GMI處理之細胞的細胞表面標記物。評估八種MSC特異性表面標記物CD29、CD106、CD146、CD166、CD90、CD105、CD73及CD44，及五種其他標記物CD34、CD11b、CD19、CD45及HLA-DR。如圖2中所示，在GMI處理之後，超過90%之對照及經GMI處理之ADSC仍表現MSC陽性標記物，諸如CD29、CD166、CD90、CD105、CD73及CD44。雖然ADSC顯示較低含量之CD146及CD106，但CD146及CD106表現群體不受GMI處理影響。另外，ADSC上之陰性表面標記物，諸如CD34、CD11b、CD19、CD45及HLA-DR，藉由陰性對照混合抗體量測。如圖2中所示，MSC陰性標記物表現群體在GMI (5 μg/ml)處理之後增加。

【0060】 經GMI處理之ADSC中保留生脂及成骨分化能力

【0061】 根據圖1，結果顯示GMI可誘導ADSC增殖。為瞭解GMI處理是否影響其生脂及成骨分化能力，將ADSC用不同濃度之GMI (0、3及5 μg/ml)處理3天。在GMI處理之後，收穫ADSC且接種於24孔盤中，以進行生脂分化及成骨分化分析。分別藉由使用間葉幹細胞生脂套組(SCR020)及間葉幹細胞成骨套組(SCR028，EMD Millipore Corp., MA, USA)進行生脂及成骨分化分析。當細胞100%匯合時，自各孔抽吸培養基且添加0.5 ml生脂誘導培養基或成骨誘導培養基至孔中。接著每2-3天用新鮮誘導培養基替換培養基。在21天或14天之後ADSC可能分化成脂肪細胞或骨細胞。在生脂分化分析(圖3A)中，自各孔抽吸培養基，且隨後藉由在室溫下在4%三聚甲醛中培育脂肪細胞30分鐘來固定脂肪細胞。在固定之後，將各孔用PBS沖洗三次，且隨後用水沖洗兩次。移除水且將油紅O溶液(0.4毫升/孔)添加至孔中。隨後，在室溫下培育該等孔50分鐘。移除油紅O溶液，且用1 ml水沖洗孔三次。使用蘇木精溶液(0.4毫升/孔)將所得細胞染色5分鐘。最後，藉由顯微鏡觀測結果且在光學顯微鏡(放大率，×400)下拍攝。在成骨分化分析(圖3B)中，自各孔抽吸培養基且藉由在室溫下在冰冷70%乙醇中培育骨細胞1小時來固定骨細胞。在固定之後，移除乙醇且用水沖洗孔兩次，持續5分鐘。抽吸水且將茜素紅溶液添加至孔中以覆蓋孔(0.5毫升/孔)。在室溫下培育該等孔30分鐘。在培育之後，移除茜素紅溶液且用1 ml水洗滌孔四次。將1 ml水添加至各孔中以防止細胞乾燥。最後，藉由顯微鏡觀測結果且在光學顯微鏡(放大率，×100)下拍攝。如圖3A及圖3B中所示，經歷脂肪生成之ADSC不僅將其形態改變為多邊形或圓形形狀，而且在細胞質中產生豐富的脂質微滴(由紅色顯示)。

另一方面，藉由茜素染色，經歷骨生成之ADSC展示對照及經GMI處理之細胞中之礦物質沈積。基於此等觀測結果，經GMI處理之ADSC保留其生脂及成骨分化能力。

【0062】 **實例2：**

【0063】 **低劑量GMI處理誘導BMSC增殖**

【0064】 人類骨髓來源幹細胞(BMSC)係購自ATCC。藉由使用血球計進行細胞增殖分析。先前研究指示GMI可抑制腫瘤生長且進一步誘導腫瘤細胞死亡，但沒有證據顯示GMI對BMSC增殖之作用。為研究GMI對BMSC增殖之作用，將BMSC (2×10^5個細胞)在含有7% FBS、15 ng/mL rhIGF-1、125 pg/ml rhFGF-b及L-丙胺醯基-L-麩醯胺酸(2.4 mM)之間葉幹細胞生長套組(ATCC)下接種於10 cm培養皿中。在培育24小時之後，將細胞用不同濃度之GMI (0、1、3及5 μg/ml)處理72小時。在處理之後，藉由使用阿庫酶溶液收穫細胞且藉由血球計對細胞數目計數(圖4B)。藉由光學顯微鏡(放大率，×100)拍攝相差影像(圖4A)。圖4A及4B展示GMI可能顯著誘導BMSC增殖。

【0065】 **在GMI處理之後表面標記物持續在BMSC上表現**

【0066】 用於流動式細胞測量術分析之抗體，諸如抗CD29-PE (557332)、抗CD146-Alexa Fluor647 (563619)、抗CD166-BB515 (565461)及抗CD106-Percp-Cy5.5 (563525)，係購自BD Biosciences。人類MSC分析套組(562245)係購自BD Biosciences。在細胞計數之後，進一步分析細胞之細胞表面標記物表現量。將對照BMSC及經GMI處理之BMSC用抗CD29-PE、抗CD106-Percp-Cy5.5、抗CD146-Alexa Fluor647、抗CD166-BB515、抗CD90-FITC、抗CD105-Percp-Cy5.5、

抗CD73-APC、抗CD44-PE及經PE標記之陰性標記物混合抗體染色30分鐘。在染色之後，用PBS洗滌細胞兩次且再懸浮於1 ml PBS中。藉由流動式細胞測量術(BD ACCURI™ C6 Plus)評估對照及經GMI處理之細胞的細胞表面標記物。評估八種MSC特異性表面標記物CD29、CD106、CD146、CD166、CD90、CD105、CD73及CD44，及五種其他標記物CD34、CD11b、CD19、CD45及HLA-DR。如圖5中所示，在GMI處理之後，超過90%之對照及經GMI處理之BMSC仍表現MSC陽性標記物，諸如CD29、CD166、CD90、CD105、CD73及CD44。雖然BMSC顯示較低含量之CD146及CD106，但CD146及CD106表現群體不受GMI處理影響。另外，BMSC上之陰性表面標記物，諸如CD34、CD11b、CD19、CD45及HLA-DR，藉由陰性對照混合抗體量測。如圖5中所示，MSC陰性標記物表現群體在GMI (5 μg/ml)處理之後增加。

【0067】 經GMI處理之BMSC中保留生脂及成骨分化能力

【0068】 根據圖4，GMI可誘導BMSC增殖。為瞭解GMI誘導之BMSC增殖是否影響其生脂及成骨分化能力，進行生脂及成骨分化分析。將BMSC用不同濃度之GMI (0、3及5 μg/ml)處理3天。在GMI處理之後，收穫BMSC細胞且接種於24孔盤中，以進行生脂分化及成骨分化分析。分別使用間葉幹細胞生脂套組及間葉幹細胞成骨套組(EMD Millipore Corp., MA, USA)進行生脂及成骨分化分析。當細胞100%匯合時，自各孔抽吸培養基且添加0.5 ml生脂誘導培養基或成骨誘導培養基至孔中。每2-3天用新鮮誘導培養基替換培養基。在誘導21天或14天之後BMSC可能分化成脂肪細胞或骨細胞。在生脂分化分析(圖6A)中，自各孔抽吸培養基，且隨後藉由在室溫下在4%三聚甲醛中培育脂肪細胞30分鐘來固定脂肪細胞。在

固定之後，用PBS沖洗各孔三次，且隨後用水沖洗兩次。抽吸水且將油紅O溶液(0.4毫升/孔)添加至孔中。在室溫下培育該等孔50分鐘。在培育之後，移除油紅O溶液且用1 ml水沖洗孔三次。使用蘇木精溶液(0.4毫升/孔)將細胞核染色5分鐘。然後，藉由顯微鏡觀測細胞且在光學顯微鏡(放大率，×400)下拍攝。在成骨分化分析(圖6B)中，自各孔抽吸培養基且藉由在室溫下在冰冷70%乙醇中培育1小時來固定骨細胞。在固定之後，移除乙醇且用水沖洗孔兩次，持續5分鐘。抽吸水且添加茜素紅溶液以覆蓋孔(0.5毫升/孔)。在室溫下培育該等孔30分鐘。在培育之後，移除茜素紅溶液且用1 ml水洗滌孔四次。將1 ml水添加至各孔中以防止細胞乾燥。最後，藉由顯微鏡觀測結果且在光學顯微鏡(放大率，×100)下拍攝。如圖6A及圖6B中所示，經歷脂肪生成之BMSC不僅將其形態改變為多邊形或圓形形狀，而且在細胞質中產生豐富的脂質微滴(以紅色顯示)。另一方面，藉由茜素染色，經歷骨生成之BMSC展示對照及經GMI處理之細胞中之礦物質沈積。圖6展示經GMI處理之BMSC保留生脂及成骨分化能力。

【0069】 雖然已結合上文所闡述之特定實施例來描述本發明，但其許多替代方案及其修改及變化對於一般技術者而言將顯而易見。所有此類替代方案、修改及變化被視為屬於本發明之範疇內。

【序列表】

<110> 蘑法生物科技股份有限公司(MYCOMAGIC BIOTECHNOLOGY CO., LTD)

<120> 促進幹細胞增殖與繁殖之方法

<130> none

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 6
<212> PRT
<213> 小孢靈芝

<400> 1

Leu Ala Trp Asn Val Lys
1 5

<210> 2
<211> 10
<212> PRT
<213> 小孢靈芝

<400> 2

Asp Leu Gly Val Arg Pro Ser Tyr Ala Val
1 5 10

<210> 3
<211> 111
<212> PRT
<213> 小孢靈芝

<400> 3

Met Ser Asp Thr Ala Leu Ile Phe Thr Leu Ala Trp Asn Val Lys Gln
1 5 10 15

Leu Ala Phe Asp Tyr Thr Pro Asn Trp Gly Arg Gly Arg Pro Ser Ser
20 25 30

Phe Ile Asp Thr Val Thr Phe Pro Thr Val Leu Thr Asp Lys Ala Tyr
35 40 45

Thr Tyr Arg Val Val Val Ser Gly Lys Asp Leu Gly Val Arg Pro Ser
50 55 60

Tyr Ala Val Glu Ser Asp Gly Ser Gln Lys Ile Asn Phe Leu Glu Tyr
65 70 75 80

Asn Ser Gly Tyr Gly Ile Ala Asp Thr Asn Thr Ile Gln Val Tyr Val
85 90 95

Ile Asp Pro Asp Thr Gly Asn Asn Phe Ile Val Ala Gln Trp Asn
100 105 110

<210> 4
<211> 140
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 重組蛋白

<400> 4

Glu Ala Glu Ala Glu Phe Met Ser Asp Thr Ala Leu Ile Phe Thr Leu
1 5 10 15

Ala Trp Asn Val Lys Gln Leu Ala Phe Asp Tyr Thr Pro Asn Trp Gly
20 25 30

Arg Gly Arg Pro Ser Ser Phe Ile Asp Thr Val Thr Phe Pro Thr Val
35 40 45

Leu Thr Asp Lys Ala Tyr Thr Tyr Arg Val Val Val Ser Gly Lys Asp
50 55 60

Leu Gly Val Arg Pro Ser Tyr Ala Val Glu Ser Asp Gly Ser Gln Lys
65 70 75 80

```
Ile Asn Phe Leu Glu Tyr Asn Ser Gly Tyr Gly Ile Ala Asp Thr Asn
                85                  90                  95

Thr Ile Gln Val Tyr Val Ile Asp Pro Asp Thr Gly Asn Asn Phe Ile
            100                 105                 110

Val Ala Gln Trp Asn Tyr Leu Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp
        115                 120                 125

Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His
    130                 135                 140
```

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種用於增殖或繁殖未分化幹細胞之方法，其包含使幹細胞群體與有效量之靈芝免疫調節蛋白、其重組體或其片段接觸。

【請求項2】

如請求項1之方法，其中該等幹細胞在該繁殖之後保持未分化。

【請求項3】

如請求項1之方法，其中該靈芝免疫調節蛋白包含SEQ ID NO: 3之胺基酸序列。

【請求項4】

如請求項1之方法，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。

【請求項5】

如請求項1之方法，其中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。

【請求項6】

如請求項1之方法，其中該靈芝免疫調節蛋白或該其重組體或該其片段的量小於15 μg/mL。

【請求項7】

如請求項1之方法，其中該靈芝免疫調節蛋白或該其重組體或該其片段的量小於12.5 μg/mL。

【請求項8】

如請求項1之方法，其中該靈芝免疫調節蛋白或該其重組體或該其片

段的量在約1.0 μg/mL至約15 μg/mL範圍內。

【請求項9】

如請求項1之方法，其中該靈芝免疫調節蛋白或該其重組體或該其片段的量在約1.5 μg/mL至約12.5 μg/mL範圍內。

【請求項10】

如請求項1之方法，該靈芝免疫調節蛋白或該其重組體或該其片段的量在約1.5 μg/mL至約6.5 μg/mL範圍內。

【請求項11】

如請求項1之方法，其中該幹細胞群體係人類來源的。

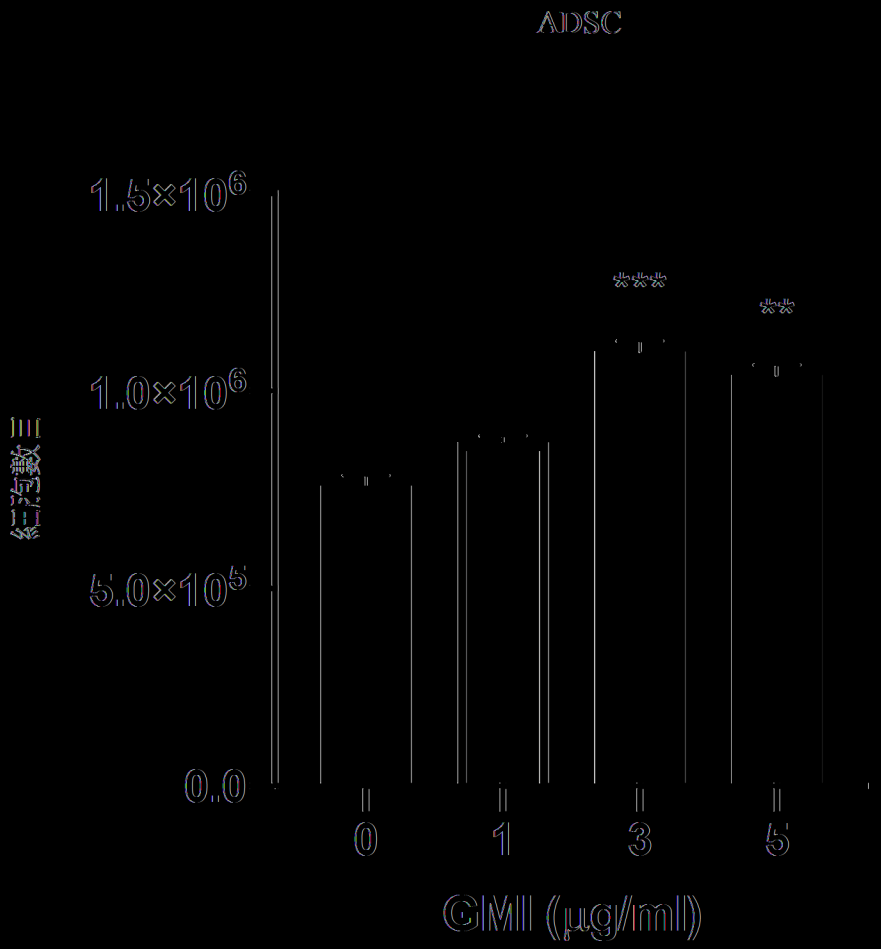
【請求項12】

如請求項1之方法，其中該幹細胞群體包含誘導性富潛能幹(iPS)細胞群體、胚胎幹(ES)細胞群體、生殖細胞群體、組織特異性幹細胞群體或成體幹細胞群體。

【請求項13】

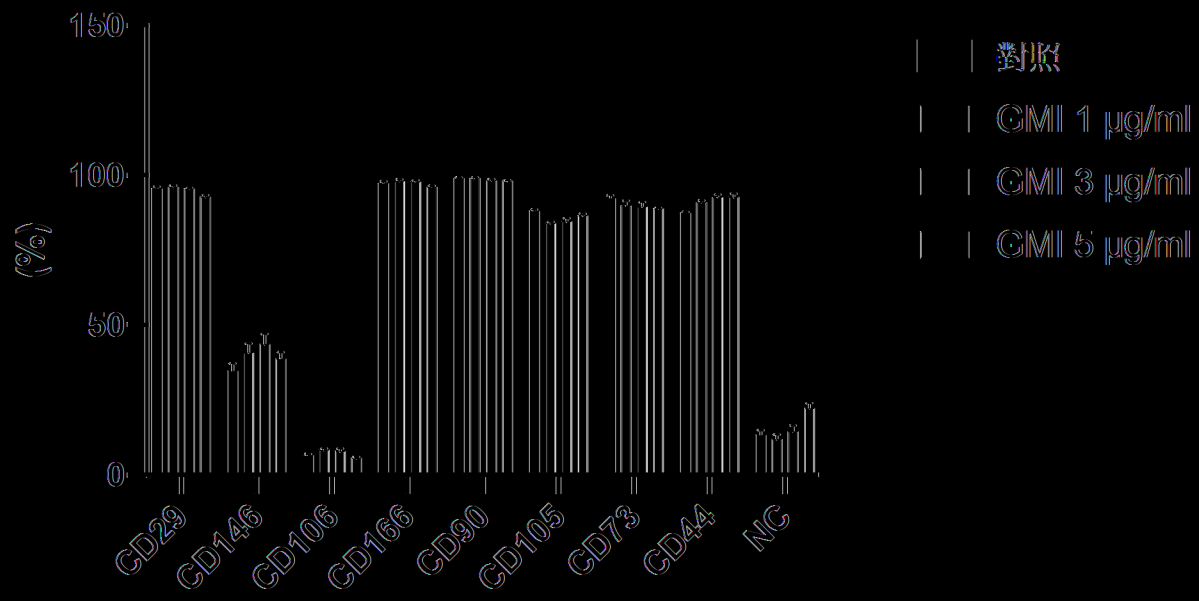
如請求項1之方法，其中該等幹細胞為胚胎幹細胞、間葉幹細胞(MSC)、骨髓基質細胞、造血幹細胞、脂肪來源幹細胞、內皮幹細胞、牙髓幹細胞或神經幹細胞。

(發明圖式)



(圖1(B))

用GMI處理之ADSC



圖(圖2)

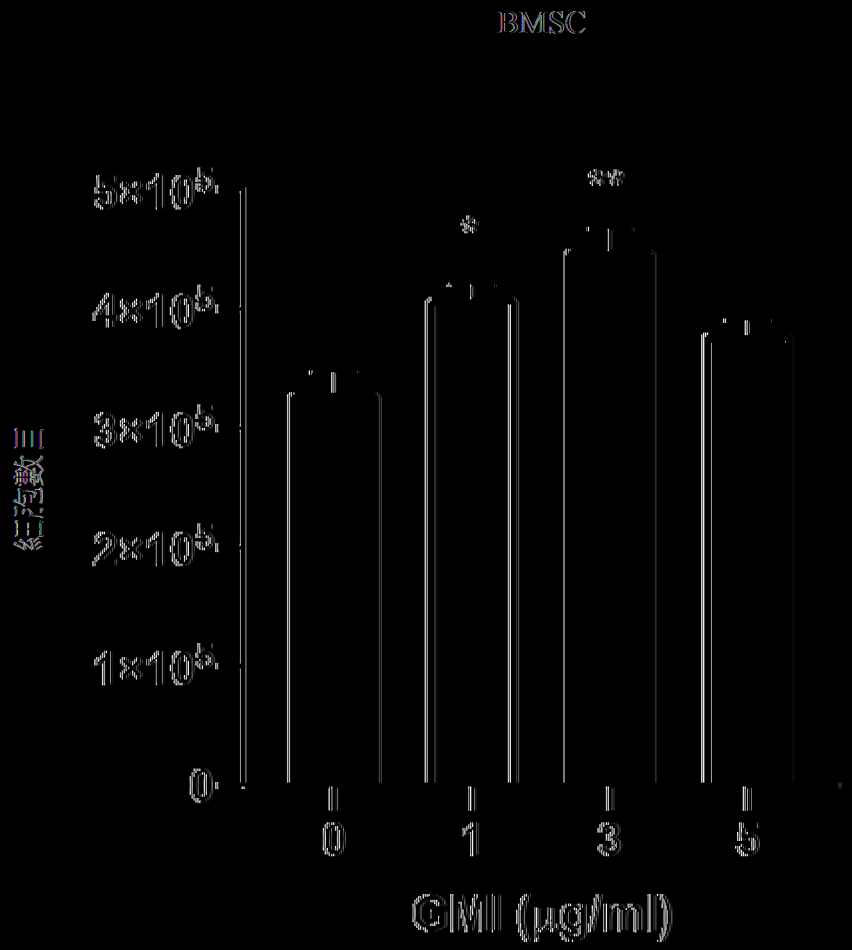


圖4(B)

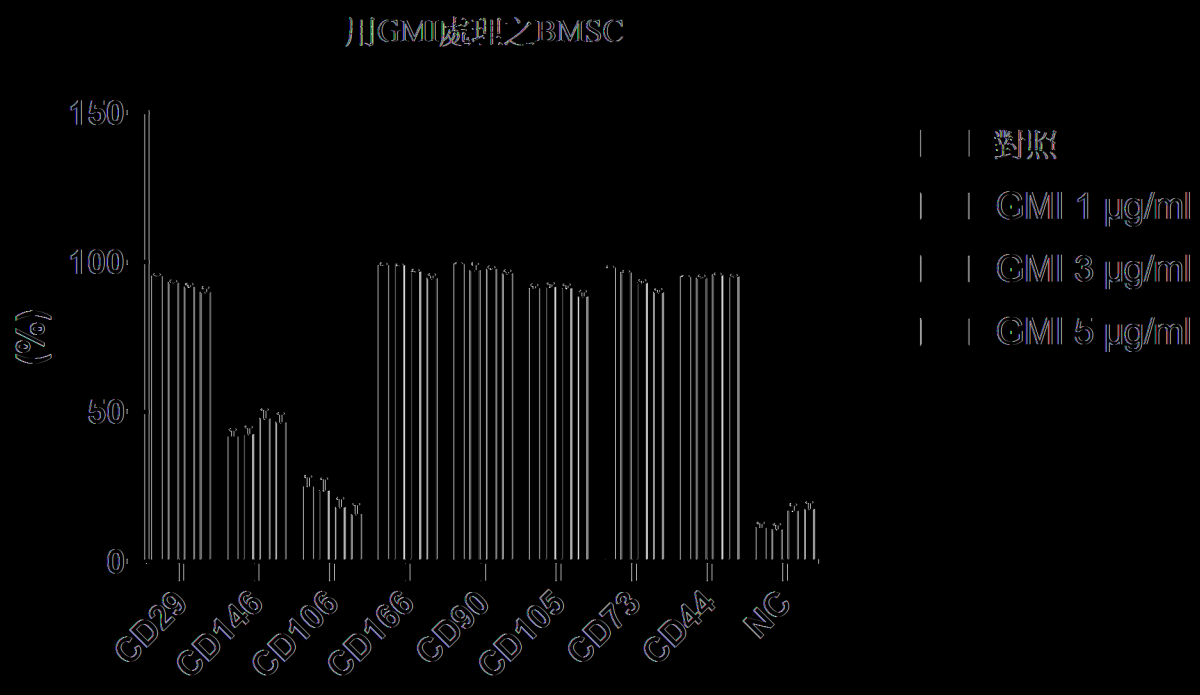

用GMI處理之BMSC
150
100
50
0
(%)
CD29
CD146
CD106
CD166
CD90
CD105
CD73
CD44
NC
對照
GMI 1 μg/ml
GMI 3 μg/ml
GMI 5 μg/ml

圖5

GV1 3 d/s
GV1 15 d/s
GV1 30 d/s
GV1 2 d/s
GV1 2 d/s
GV1 2 d/s