

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200380110604.1

C12N 15/19 (2006.01)

C07K 14/52 (2006.01)

A61K 38/19 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009 年 10 月 14 日

[11] 授权公告号 CN 100549175C

[22] 申请日 2003.11.3

[21] 申请号 200380110604.1

[86] 国际申请 PCT/CN2003/000928 2003.11.3

[87] 国际公布 WO2005/042744 中 2005.5.12

[85] 进入国家阶段日期 2006.4.26

[73] 专利权人 沙东生物药业(天津)有限公司

地址 300457 天津经济技术开发区第四大街 80 号天大科技园 A1 座 8 层

[72] 发明人 朱 冰

[56] 参考文献

KR2001019100A 2001.3.13

WO0179495A 2001.10.25

CN1354183A 2002.6.19

WO9701633A1 1997.1.16

US6284236B1 2001.9.4

Expression and anti-tumor effects of Trail in human cholangiocarcinoma. Tanala S et al. Hepatology, Vol. 32 No. 3. 2002

TRA IL 与肿瘤治疗研究进展. 段永亮综述, 邹声泉审校. 国外医学(外科学分册), 第 30 卷第 1 期. 2003

重组人可溶性 TRAIL 分子诱导细胞凋亡机理探讨. 李宁丽等. 上海第二医科大学学报, 第 23 卷第 1 期. 2003

审查员 于 娜

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 周慧敏 王景朝

权利要求书 1 页 说明书 13 页 附图 4 页

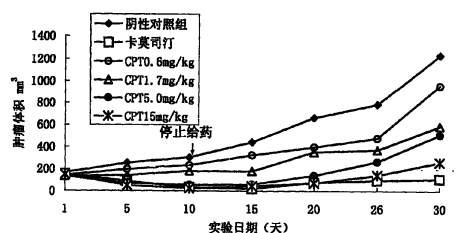
[54] 发明名称

一种具有抑癌作用的重组蛋白及其编码基因与应用

[57] 摘要

本发明公开了一种具有抑癌作用的重组蛋白及其编码基因与应用。本发明所提供的具有抑癌作用的重组蛋白是下列蛋白质之一：1) 具有序列表中 SEQ ID No: 2 氨基酸残基序列的蛋白质；2) 与 SEQ ID No: 2 的氨基酸残基序列同源性在 90% 以上且具有与 SEQ ID No: 2 相同活性的由 SEQ ID No: 2 衍生的蛋白质；3) 在 SEQ ID No: 2 的氨基酸残基序列的 N-端增加或删除 15 个或 15 个以内氨基酸残基得到的具有与 SEQ ID No: 2 相同活性的由 SEQ ID No: 2 衍生的蛋白质；4) 在 SEQ ID No: 2 的氨基酸残基序列的 C-端增加或删除 15 个或 15 个以内氨基酸残基得到的具有与 SEQ ID No: 2 相同活性的由 SEQ ID No: 2 衍生的蛋白质；5) 将 SEQ ID No: 2 的氨基酸残基序列经过一个或几个氨基酸残基的取代、缺

失或添加且具有与 SEQ ID No: 2 的氨基酸残基序列相同活性的由 SEQ ID No: 2 衍生的蛋白质。以上述重组蛋白为活性成分的药物对肿瘤细胞有明显的选择性抑制作用，不会引起正常组织细胞的凋亡，具有重要的应用价值。



- 1、一种具有抑癌作用的重组蛋白，如序列表中 SEQ ID N_o: 2 所示。
- 2、一种具有抑癌作用的重组蛋白的编码基因，它是下列核苷酸序列之一：
 - 1) 序列表中的 SEQ ID N_o: 1 所示的核苷酸序列；或者
 - 2) 编码序列表中 SEQ ID N_o: 2 所示氨基酸序列的核苷酸序列。
- 3、权利要求 2 所述的编码基因，其中所述基因的核苷酸序列如序列表中的 SEQ ID N_o: 1 所示。
- 4、一种以权利要求 1 所述重组蛋白为活性成分的治疗癌症的药物。
- 5、含有权利要求 2 或 3 所述基因的表达载体。
- 6、含有权利要求 2 或 3 所述基因的细胞系。
- 7、权利要求 1 所述的重组蛋白在制备治疗癌症的药物中的应用。
- 8、根据权利要求 7 的应用，其中所述癌症选自结肠癌、肺癌、多发性骨髓瘤、脑神经胶质瘤、白血病、乳腺癌、胰腺癌。
- 9、根据权利要求 8 的应用，其中所述癌症为多发性骨髓瘤。
- 10、根据权利要求 8 的应用，其中所述癌症为白血病。
- 11、根据权利要求 8 的应用，其中所述癌症为脑神经胶质瘤。
- 12、根据权利要求 8 的应用，其中所述癌症为肺癌。
- 13、根据权利要求 8 的应用，其中所述癌症为结肠癌。
- 14、根据权利要求 12 的应用，其中所述肺癌为小细胞肺癌。

一种具有抑癌作用的重组蛋白及其编码基因与应用

技术领域

本发明涉及基因工程及药学领域中的一种重组蛋白，它的编码基因及以其为活性成分的基因工程药物，特别是涉及一种具有抑癌作用的重组蛋白，它的编码基因及以其为活性成分的治疗癌症的药物。

背景技术

在进化过程中，哺乳动物逐渐形成了一套凋亡信号机制，能够引导个体细胞发生凋亡，其原理是致死细胞的配基与细胞表面死亡受体相互作用，从而达到使细胞凋亡的目的。这种有益的凋亡对于去除免疫反应终端激活的淋巴细胞，以及去除病毒感染细胞和癌变细胞有着重要的生理作用。例如 TNF 与受体 TNFR 的相互作用，以及 Fas 与 FAS/Fas/Apo1/CD95 受体的相互作用。

死亡受体的激活直接参与细胞凋亡的级联反应。它们可以诱导多种肿瘤细胞的凋亡，是潜在的抗癌因子。虽然 TNF 和 Fas1 可以诱导癌细胞的凋亡，但它们在抗癌治疗中有着严重的毒副作用。TNF 的注射能引起类似于感染性休克的致命的炎症反应，这种反应主要是由位于血管内皮细胞及巨噬细胞内的由 TNF 激活的前转录因子 TNF- κ B 介导，抗 Fas 抗体可导致肝组织内 Fas 依赖的细胞凋亡，形成致命的肝损伤。

1995年Wiley等发现了肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配基 (TNF related apoptosis inducing ligand 简称TRAIL)，TRAIL的发现与它和TNF、FasL的序列具有同一性有关。TRAIL通过与死亡受体DR4的DR5相互作用引起细胞凋亡，与TNF和FasL不同，TRAIL的mRNA可以在人体许多正常组织中持续表达，这就意味着TRAIL在引起凋亡的同时存在着保护正常组织的生理机制。这些机制包括表达抑制性的受体，可以与DR4和DR5竞争结合配基，TRAIL可以与DCR1、DCR2 和DPG等3种受体相互作用，因此TRAIL的毒性要小于TNF 和FasL。

发明公开

本发明的目的是提供一种具有抑癌作用的重组蛋白及其以该蛋白为活性成分的能够有效治疗癌症的药物。

本发明所提供的具有抑癌作用的重组蛋白是下列蛋白质之一：

1) 具有序列表中 SEQ ID No: 2 氨基酸残基序列的蛋白质；

2) 与 SEQ ID No: 2 的氨基酸残基序列同源性在 90%以上且具有与 SEQ ID No: 2 相同活性的由 SEQ ID No: 2 衍生的蛋白质;

3) 在 SEQ ID No: 2 的氨基酸残基序列的 N-端增加或删除 15 个或 15 个以内氨基酸残基得到的具有与 SEQ ID No: 2 相同活性的由 SEQ ID No: 2 衍生的蛋白质;

4) 在 SEQ ID No: 2 的氨基酸残基序列的 C-端增加或删除 15 个或 15 个以内氨基酸残基得到的具有与 SEQ ID No: 2 相同活性的由 SEQ ID No: 2 衍生的蛋白质;

5) 将 SEQ ID No: 2 的氨基酸残基序列经过一个或几个氨基酸残基的取代、缺失或添加且具有与 SEQ ID No: 2 的氨基酸残基序列相同活性的由 SEQ ID No: 2 衍生的蛋白质。

序列表中 SEQ ID No: 2 的蛋白质为重组人 TRAIL 环化变构体 (recombinant circularly permuted form of TRAIL, 简称为 CPT), 由 166 个氨基酸残基组成。

本发明所提供的治疗癌症的药物 (CPT), 其活性成分是上述蛋白质之一。

需要的时候, 在上述药物中还可以加入一种或多种药学上可接受的载体。所述载体包括药学领域常规的稀释剂、赋形剂、填充剂、粘合剂、湿润剂、崩解剂、吸收促进剂、表面活性剂、吸附载体、润滑剂等, 必要时还可以加入香味剂、甜味剂等。

本发明的药物可以制成注射液、片剂、粉剂、粒剂、胶囊、口服液、膏剂、霜剂等多种形式。上述各种剂型的药物均可以按照药学领域的常规方法制备。

本发明所提供的治疗癌症药物 (CPT) 的活性成分 (蛋白) 的编码序列是下列核苷酸序列之一:

1) 序列表中的 SEQ ID No: 1;

2) 编码序列表中 SEQ ID No: 2 蛋白质序列的多核苷酸;

3) 与序列表中 SEQ ID No: 1 限定的 DNA 序列具有 90%以上同源性, 且编码相同功能蛋白质的 DNA 序列;

4) 编码由 SEQ ID No: 2 衍生的蛋白质的 DNA 序列, 所述由 SEQ ID No: 2 衍生的蛋白质为在 SEQ ID No: 2 的氨基酸残基序列的 N-端增加或删除 15 个或 15 个以内氨基酸残基得到的具有与 SEQ ID No: 2 相同活性的多肽;

5) 编码由 SEQ ID No: 2 衍生的蛋白质的 DNA 序列, 所述由 SEQ ID No: 2 衍生的蛋白质为在 SEQ ID No: 2 的氨基酸残基序列的 C-端增加或删除 15 个或 15 个以内氨基酸残基得到的具有与 SEQ ID No: 2 相同活性的多肽;

6) 编码由 SEQ ID No: 2 衍生的蛋白质的 DNA 序列, 所述由 SEQ ID No: 2 衍生的蛋白质为将 SEQ ID No: 2 的氨基酸残基序列经过一个或几个氨基酸残基的取代、缺失或添加且具有与 SEQ ID No: 2 的氨基酸残基序列相同活性的多肽。

序列表中的 SEQ ID No: 1 由 501 个碱基组成。它的编码框是自 5' 端第 1 位核苷酸到第 498 位核苷酸。

含有本发明基因的表达载体及细胞系(例如大肠杆菌, 酵母等表达体系)均属于本发明的保护范围。

附图说明

图 1 为不同处理条件下人神经胶质瘤 U251 的肿瘤体积曲线;

图 2 为不同处理条件下人神经胶质瘤 U251 的瘤体大小;

图 3 为不同处理条件下人肺癌 NCI-H460 的肿瘤体积曲线;

图 4-1 至 4-6 为不同处理条件下人肺癌 NCI-H460 的组织病理学切片(HE 染色 $\times 100$);

图 5 为不同处理条件下人肺癌 NCI-H460 的瘤体大小;

图 6 为不同处理条件下人结肠癌 COLO 205 的肿瘤体积曲线;

图 7-1 至 7-5 为接种了人结肠癌 COLO 205 并经不同处理后的 BLAB/c-nu 裸小鼠。

实施发明的最佳方式

实施例 1、重组人源 TRAIL 环化变构体编码基因的构建及表达

编码人 TRAIL 第 121-281 位氨基酸残基的基因序列来自于人脾脏 cDNA 文库, 编码人源 TRAIL 第 135-281 位氨基酸残基的基因用人源 *TRAIL* 基因作模板用常规 PCR 方法获得, 然后将编码 *TRAIL* 135-281 位氨基酸残基的 DNA 序列通过 PCR 方法在 3' 端连接上编码 TRAIL 氨基酸残基 122-135 的 DNA 序列, 并将编码五个甘氨酸的 DNA 序列插入编码 TRAIL135-281 和 TRAIL122-135 氨基酸残基的序列之间, 甘氨酸的灵活性可以保证蛋白质的正确折叠。这样得

到的编码 CPT 基因用 NcoI 和 BamHI 连接到载体质粒 pet28b 上（也可以用其它的载体质粒），得到表达质粒。经检测 DNA 序列正确。

将表达质粒转化进大肠杆菌菌株 BL21(DE3) 中，转化后的大肠杆菌接种到 10ml 含有 20 μ g/ml 卡那霉素的 LB 液体培养基中，在 37 $^{\circ}$ C 摇床上培养 12 小时。然后将该 10ml 培养物接种到 1L 含 20 μ g/ml 卡那霉素的 LB 液体培养基中继续培养，当其 OD₆₀₀ 值达到 0.6 时，将 0.2 ml 1M 的 IPTG 加入 1L 培养物中来诱导蛋白质表达。诱导 3 小时后离心收集细胞，将沉淀用 100ml 含 100mM Tris (pH7.9)、150 mM NaCl 的缓冲液悬浮。

4 $^{\circ}$ C 下超声波裂解细胞后，用 Beckman JA20 转头在 15,000rpm 下离心。由于表达的蛋白质可以结合螯合金属树脂，可通过金属螯合层析来进行纯化。将离心后的上清泵入将含有树脂的固化 Ni 层析柱中，经过含 50mM Tris (pH7.9)、0.5M NaCl 和 50mM 咪唑的缓冲液冲洗来去除其中的杂蛋白。然后被结合上的蛋白质由含 50mM Tris (pH7.9)、0.5M NaCl 和 200mM 咪唑的缓冲液洗脱下来，被洗脱下来的蛋白质用 PBS 缓冲液进行透析。

最后，蛋白质通过装在 AKTA HPLC 系统 (Pharmacia) 中的离子交换柱和 Superdex 200 (Pharmacia) 凝胶层析进行纯化。分析表明得到的是氨基酸残基序列为 SEQ ID No: 2 的蛋白质。即本发明的抑癌药物，该产品呈白色粉末状，易溶于水。

实施例 2、采用四氮唑盐还原法 (MTT) 测定本发明药物对癌细胞的杀伤作用

试剂：RPMI1640 为 GIBCO 产品；MTT 为 BebcO 产品；小牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司。

细胞株：COLO 205（人结肠癌细胞）、NCI-H460（人肺癌细胞）RPMI 8226（人多发性骨髓瘤细胞）、U251（人脑神经胶质瘤细胞）引自美国 ATCC，HL-60（人早幼粒白血病细胞）、MDA-MB-231、MDA-MB-435（人乳腺癌细胞）、SCLC（人小细胞肺癌）、H125（人肺癌细胞）、PC-3（人胰腺癌细胞）。

收集生长良好的肿瘤细胞，用含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养基配制成 1×10^4 /ml 细胞悬液，接种于 96 孔培养板内，每孔 100 μ l（含 1000 个肿瘤细胞）。置 37 $^{\circ}$ C，5% CO₂ 温箱内培养 24 小时后加药。

实验设空白对照、氟尿嘧啶或阿霉素阳性对照，受试样品设 5 个浓度，

每浓度 3 个平行孔。于 37℃, 5% CO₂ 温箱内培养 4 天后弃培养液, 每孔加入 MTT 溶液 100μl (0.4mg/ml, RPMI 1640 配制), 37℃ 继续孵育 4 小时。

弃去上清液, 每孔加入 DMSO 150μl 以溶解 Fomazan 颗粒。轻度振荡后, 用 BIORAD 550 型酶标仪在检测波长 540nm, 参考波长 450nm 下测定 OD 值。

以药物的不同浓度及对细胞的抑制率作图得到剂量反应曲线, 从中求出半数抑制浓度 (IC₅₀)。结果如表 1 所示, 可以看出, CPT 对人肿瘤细胞 U251, COLO205, NCI-H460、MDA-MB-435 细胞均有极强的杀伤活性, IC₅₀<0.01μg/ml。对 HL-60, MDA-MB-231, PC-3, H125 细胞也有很强的杀伤作用, IC₅₀<0.1μg/ml。对 RPMI 8226 细胞有较好活性, IC₅₀<1μg/ml。对 SCLC 细胞生长也显示一定抑制作用。同野生型 TRAIL 相比, CPT 诱导癌细胞凋亡的活性要强 5-10 倍。

表 1. CPT 对人肿瘤细胞株杀伤作用结果 (x±SD)

瘤株	IC ₅₀ (μg/ml)		
	CPT	Fu	Adr
U251	<0.001	0.981±0.077	
COLO 205	0.006±0	0.826±0.051	
MDA-MB-435	0.008±0.002	0.199±0.138	
HL-60	0.014±0.013		0.006±0
NCI-H460	0.002±0.001	0.566±0.016	
MDA-MB-231	0.043±0.0131	0.318±0.055	
PC-3	0.067±0.002	4.928±0.753	
H125	0.085±0.006	0.138±0.031	
RPMI 8226	0.824±0.093	<0.1	
SCLC	10±0	0.617±0.0257	

注: FU 为氟尿嘧啶对照 Adr 为阿霉素对照

实施例 3、本发明药物对裸小鼠人癌异种移植瘤的生长抑制作用

在本实施例中, 所用动物为: BLAB/c-nu 裸小鼠, 6-8 周大小, 每次实验选用同一性别。

瘤株: 人脑神经胶质瘤 U251、人肺癌 NCI-H460、人结肠癌 COLO 205 裸小鼠

移植瘤，由体外培养细胞接种于裸鼠皮下成活，传代并保存。

实验过程：选择肿瘤生长良好，全身状况较好荷瘤动物，颈椎脱臼处死。无菌条件下取出瘤块，用手术刀切割成直径 2-3mm 的瘤块，套管针接种于裸小鼠腋后皮下。约 7-10 天后实验动物腋后可见肿瘤。用游标卡尺测量肿瘤长、宽径，按瘤体积大小分层分组。每组 7-8 只动物。

实验过程中，每周测量动物肿瘤长、宽径及体重 2 次。计算肿瘤体积 (TV) 及相对肿瘤体积 (RTV)，绘制肿瘤体积生长变化图。实验结束时将动物处死后剥离肿瘤，称瘤重，计算药物对肿瘤生长抑制率。

肿瘤体积 (TV) 的计算公式为：长 $\times$ 宽² $\div$ 2。

相对肿瘤体积 (RTV) 的计算公式为：V_t / V_o (其中 V_o 为分笼给药时测量所得 TV，V_t 为以后每次测量时的 TV。)

t 检验法比较各组动物肿瘤重量、肿瘤体积、RTV 等指标的统计学差别。抗肿瘤活性的评价指标为相对肿瘤增殖率 T/C (%)，计算公式为：

$$T/C (\%) = \frac{\text{治疗组 (T) RTV}}{\text{阴性对照组 (C) RTV}} \times 100$$

疗效评价标准：T/C (%) > 60 为无效；

T/C (%) $\leq$ 60，并经统计学处理 P < 0.05 为有效。

一、对人脑神经胶质瘤 U251 的抑制作用

以卡莫斯汀(天津氨基酸公司人民制药厂产品)为阳性对照药，以 40mg/kg 剂量腹腔注射给药 1 次。设 0.6mg/kg、1.7 mg/kg、5.0 mg/kg、15.0mg/kg 4 个剂量组，腹腔注射给药，实验疗程均为 10 次给药。

实验结果如表 1、表 2 及图 1、图 2 所示，表明，CPT 对人脑神经胶质瘤 U251 裸小鼠移植性肿瘤生长具有明显的抑制作用，4 剂量组肿瘤重量抑制率分别为 30.5%、44.5%、64.8% 和 87.5%。各组肿瘤重量与对照组相比均显示明显或非常明显统计学差别。其抗肿瘤作用呈明显剂量依赖性。5.0mg/kg、15mg/kg 组的相对肿瘤增殖率 T/C (%) 均 < 60，相对肿瘤体积 (RTV) 在 15.0mg/kg 剂量给药组与对照组相比统计学差异显著。

表 2. CPT 对人神经胶质瘤 U251 生长抑制作用 (x $\pm$ SD) —

组别	动物数 (只)		体重 (g)		瘤重 (g)	抑制率 (%)
	开始	结束	开始	结束		
阴性对照	8	8	21.9±1.1	22.3±2.6	1.28±0.50	
卡莫司汀对照	8	7	22.8±0.7	19.4±2.1	0.09±0.06**	93.0
CPT 0.6mg/kg	8	8	21.0±0.8	21.0±1.4	0.89±0.49	30.5
1.7mg/kg	8	8	21.6±1.2	21.5±2.0	0.71±0.22*	44.5
5.0mg/kg	8	8	22.0±1.1	21.9±3.2	0.45±0.26**	64.8
15mg/kg	8	8	21.6±1.1	21.1±1.7	0.16±0.15**	87.5

表 3. CPT 对人神经胶质瘤 U251 生长抑制作用 ($\bar{x} \pm SD$)

组别	肿瘤体积 (mm ³)		RTV	T/C (%)
	开始	结束		
阴性对照	165±72	1238±244	3.34±2.28	
卡莫司汀对照	153±35	109±78**	0.54±0.29**	16.0
CPT 0.6mg/kg	141±40	961±582	2.77±1.97	82.9
1.7mg/kg	131±34	588± 215**	2.12±1.29	63.5
5.0mg/kg	133±57	510± 333**	1.32±1.24*	39.5
15mg/kg	148±58	261± 238**	0.71±0.57**	21.3

* P<0.05 ** P<0.01 与阴性对照组比较

二、对人肺癌 NCI-H460 的抑制作用

以环磷酰胺（上海华联制药有限公司产品）为阳性对照药，应用剂量为 100mg/kg，腹腔注射，2 周后补加 80mg/kg 给药 1 次。设 1.7 mg/kg、5.0 mg/kg、15.0mg/kg 3 个剂量组，每日腹腔注射给药 1 次，给药 10 次。

实验结果如表 4、表 5 及图 3、图 5 所示，表明 CPT 对人肺癌 NCI-H460 裸小鼠移植性肿瘤生长具有明显的抑制作用，3 剂量组肿瘤重量抑制率分别为 52.2%、74.5% 和 87.0%。各组肿瘤重量与对照组相比均显示明显或非常明显统计学差别。中、高剂量组的相对肿瘤增殖率 (%) 均 < 60%，相对肿瘤体积 (RTV) 与对照组相比统计学差异显著。

表 4. CPT 对人肺癌 NCI-H460 的生长抑制作用

组别	动物数 (只)		体重 (g)		瘤重 (g)	抑制率 (%)
	开始	结束	开始	结束		
阴性对照	8	7	21.4±0.9	19.3±1.0	1.61±0.65	
环磷酰胺对照	8	7	20.0±1.3	16.1±2.2	0.96±0.35*	40.4
CPT1.7mg/kg	8	7	20.1±1.9	19.8±1.6	0.77±0.19**	52.2
5.0mg/kg	8	8	20.4±1.9	18.5±2.5	0.41±0.28**	74.5
15mg/kg	8	8	20.9±1.1	21.1±1.7	0.21±0.10**	87.0

表 5. CPT 对人肺癌 NCI-H460 的生长抑制作用

组别	肿瘤体积 (mm ³)		RTV	T/C (%)
	开始	结束		
阴性对照	169±58	1874±637	5.98±4.05	
环磷酰胺对照	179±52	1121±434	3.67±2.15	61.4
CPT1.7mg/kg	200±103	706±170*	2.27±1.13*	38.0
5.0mg/kg	187±51	469±359**	1.49±0.76**	24.9
15mg/kg	192±63	189±102**	0.79±0.25**	13.2

* P<0.05 ** P<0.01 与阴性对照组比较

组织病理学检查结果如图 4—1 至图 4—6 所示, 图 4—1、4—3、4—5 为阴性对照组, 图 4—1 显示肿瘤组织呈弥漫性团实片状, 中央大片液化性坏死, 边缘有薄层结缔组织包膜, 无明显淋巴细胞浸润; 图 4—3 显示肿瘤细胞呈巢索、片状实性, 组织内毛细血管丰富, 肿瘤边缘无明显淋巴细胞浸润; 图 4—5 显示肿瘤细胞呈圆形、多角形, 细胞核大、胞质少, 染色质疏松, 核仁明显, 有 2—3 个核仁, 有多数核分裂像; 图 4—2、4—4、4—6 为 CPT15mg/kg 组, 图 4—2 显示肿瘤组织呈团块实性, 中央片状坏死, 肿瘤内教多结缔组织增生, 边缘有薄层结缔组织包膜, 无明显淋巴细胞浸润; 图 4—4 显示肿瘤细胞呈巢索状排列, 组织内毛细血管少, 中央坏死, 边缘有薄层结缔组织包膜, 少数淋巴细胞浸润; 图 4—6 显示肿瘤细胞呈圆形、多角形, 细胞核大、胞质少, 染色质疏松, 核分裂像, 肿瘤组织内毛细血管少, 多数点状、小灶性坏

死。

可见本发明的药物对人肺癌 NCI-H460 细胞具有较强的抑制作用。

三、对人结肠癌 COLO 205 生长的抑制

以注射用羟基喜树碱（商品名：喜素，黄石李时珍药业集团武汉李时珍药业有限公司产品）为阳性对照药，应用剂量为 1mg/kg，腹腔注射，每日给药 1 次，于连续给药 15 天后停药，因观察发现该组肿瘤增长较明显，于 8 天后补充给药 1 周应用剂量为 100mg/kg，腹腔注射，2 周后补加 80mg/kg 给药 1 次。设 1.7 mg/kg、5.0 mg/kg、15.0mg/kg 3 个剂量组，每日腹腔注射给药 1 次，给药 15 次。

实验结果如表 6、表 7、图 6 及图 7—1 至 7—5 所示，其中图 7—1 为阴性对照组；图 7—2 为 15.0mg/kg 实验组；图 7—3 为 5.0mg/kg 实验组；图 7—4 为 1.7mg/kg 实验组；图 7—5 为羟基喜树碱阳性对照组；结果表明，CPT 对人结肠癌 COLO 205 裸小鼠移植性肿瘤生长具有明显的抑制作用，用药 5 天后可观察到高剂量组肿瘤体积较分组时明显缩小，随给药次数增多甚至消失，停药后继续观察 4 周，1/3 的动物未发现肿瘤生长。大体解剖仅能于皮下见到接种痕迹。3 剂量组肿瘤重量抑制率分别为 79.6%、90.8%和 97.4%。各组肿瘤重量与对照组相比均显示明显或非常明显统计学差别。各给药组的相对肿瘤增殖率 T/C (%) 均<60，相对肿瘤体积 (RTV) 与对照组相比统计学差异显著。其中高剂量组的 T/C (%) <10，显示 CPT 对该肿瘤的高度活性。

表 6. CPT 对人结肠癌 COLO 205 生长抑制作用

组别	动物数 (只)		体重 (g)		瘤重 (g)	抑制率 (%)
	开始	结束	开始	结束		
阴性对照	8	8	19.5±0.8	21.9±1.9	1.96±0.73	
喜树碱对照	8	8	20.4±0.9	21.0±2.5	0.66±0.26**	66.3
CPT1.7mg/kg	8	8	20.6±1.1	20.6±3.0	0.40±0.33**	79.6
5.0mg/kg	8	7	20.2±0.8	21.4±1.2	0.18±0.15**	90.9
15mg/kg	8	8	20.0±0.5	21.1±2.4	0.05±0.05**	97.4

表 7. CPT 对人结肠癌 COLO 205 生长抑制作用

组别	肿瘤体积 (mm ³)	RTV	T/C (%)
----	-------------------------	-----	---------

	开始	结束		
阴性对照	151±79	2532±1190	8.30±5.53	
喜树碱对照	150±34	845±66**	3.92±1.91*	47.2
CPT1.7mg/kg	205±47	582±408**	1.62±0.62**	19.5
5.0mg/kg	180±63	314±175**	0.91±0.35**	11.0
15mg/kg	192±81	52±53**	0.33±0.27**	4.0

* P<0.05 ** P<0.01 与阴性对照组比较

工业应用

采用四氮唑盐（MTT）还原法测定药物的抗癌作用，以不同浓度药品对肿瘤细胞抑制率作图，得到剂量效应曲线，计算半数有效浓度（IC₅₀）。多种人肿瘤细胞株观察证明：CPT制剂具有非常明显的抑制肿瘤细胞生长作用，对包括人肺癌、结肠癌、乳腺癌、胃癌、胰腺癌、神经胶质瘤、血液细胞癌、膀胱癌、前列腺癌、直肠结肠癌、子宫颈癌和脑瘤细胞等10余种肿瘤细胞均有非常明显的体外杀伤活性，其对U251（人脑神经胶质瘤细胞）、COLO 205（人结肠癌细胞），NCI-H460（人肺癌细胞），MDA-MB-435（人乳腺癌细胞）的半数抑制浓度（IC₅₀）<0.01μg/ml。对HL-60（人早幼粒白血病细胞），MDA-MB-231（人乳腺癌细胞），PC-3（人胰腺癌细胞）、H125（人肺癌细胞）的IC₅₀<0.1μg/ml。对RPMI 8226（人多发性骨髓瘤细胞）IC₅₀<1μg/ml。对SCLC（人小细胞肺癌）生长亦显示一定抑制作用。

体内试验结果显示：用15mg/kg/日剂量，连续10—15天给动物腹腔注射CPT，对人结肠癌COLO 205、人肺癌NCI-H460、人神经胶质瘤U251等肿瘤生长均显示非常明显的生长抑制作用。

与不给药对照组相比，CPT可明显减缓动物肿瘤生长速度，在移植瘤生长早期高剂量用药可使肿瘤体积缩小甚至消失。药物剂量效应关系明显，药效作用与给药疗程显示一定相关。在人结肠癌COLO 205裸鼠移植瘤模型观察到，给小鼠腹腔注射15mg/kg/日剂量的CPT 15次至停药4周后实验结束时，该组动物所荷肿瘤仍小于给药前肿瘤体积，其中1/3的动物肿瘤接种部位无法确认肿瘤存在，仅在解剖后见到接种痕迹。

所观察的各项指标证明，CPT给药对实验所选用的人癌裸鼠移植性肿瘤生长抑制作用显著。与对照组相比，CPT 15mg/kg给药对U251的瘤重抑制率分别为87.5%%和87.7%，对NCI-H460的瘤重抑制率分别为87.0%和88.8

%，对 COLO 205 的瘤重抑制率分别为 97.4.0%和 97.8%，统计学差异非常显著；本发明利用 3 个模型进行了实验，结果显示，CPT 以 5.0mg/kg 剂量，连续 10—15 天给药，3 个动物模型的相对肿瘤体积 (RTV) 与阴性对照组相比均显示明显统计学差别，15mg/kg 剂量与阴性对照组相比均显示非常明显统计学差别，T/C (%) 均在 25 以下，甚至低于 10，显示高度的抗肿瘤活性和良好的实验重现性。

CPT 给药对动物无明显毒副作用，在实验观察期内除给药组小鼠荷瘤体积较小外，体重、存活数等生存状态与对照组比较无明显不同。证明 CPT 对肿瘤细胞有明显的选择性抑制作用，不会引起正常组织细胞的凋亡，因此可以用作安全有效的治疗癌症的药物，具有重要的理论意义及应用价值，市场前景广阔。

序列表

<160>2

<210>1

<211>501

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>1

```

acattgtctt ctccaaactc caagaatgaa aaggctctgg gccgcaaat aaactcctgg      60
gaatcatcaa ggagtgggca ttcatcctg agcaacttgc acttgaggaa tggatgaactg      120
gtcatccatg aaaaagggtt ttactacatc tattccaaa catactttcg atttcaggag      180
gaaataaaag aaaacacaaa gaacgacaaa caaatggtcc aatatattta caaatacaca      240
agttatcctg accctatatt gttgatgaaa agtgctagaa atagttgttg gtctaaagat      300
gcagaatatg gactctattc catctatcaa gggggaatat ttgagcttaa ggaaaatgac      360
agaatTTTTG tttctgtaac aaatgagcac ttgatagaca tggaccatga agccagtttt      420
tttggggcct ttttagttgg cggtggtggt ggtggtgtag cagctcacat aactgggacc      480
agaggaagaa gcaacacata a                                     501

```

<210>2

<211>166

<212>PRT

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>2

```

Thr Leu Ser Ser Pro Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ala Leu Gly Arg Lys
1           5           10          15
Ile Asn Ser Trp Glu Ser Ser Arg Ser Gly His Ser Phe Leu Ser Asn
          20          25          30
Leu His Leu Arg Asn Gly Glu Leu Val Ile His Glu Lys Gly Phe Tyr

```

[illegible]

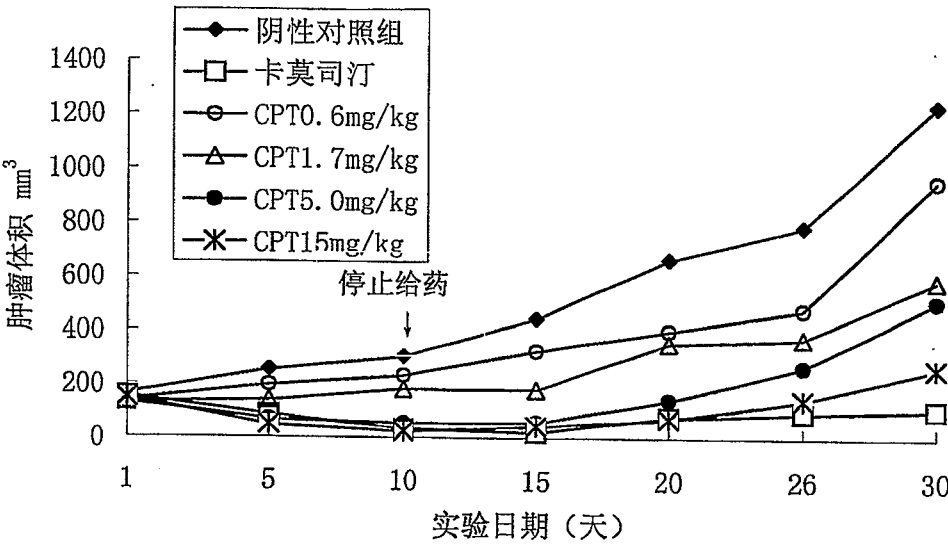


图 1

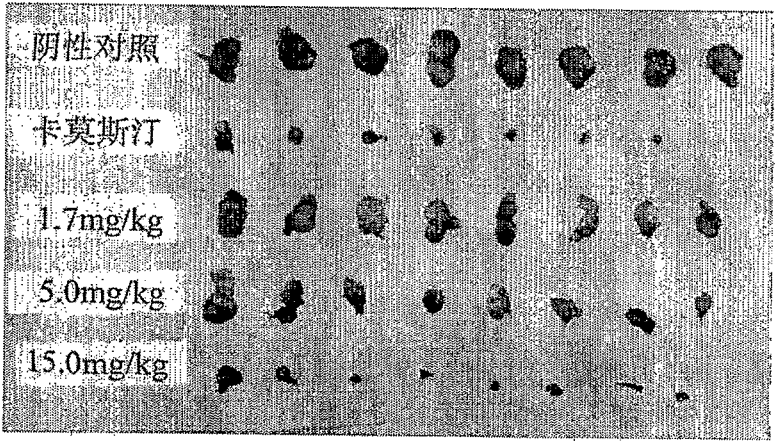


图 2

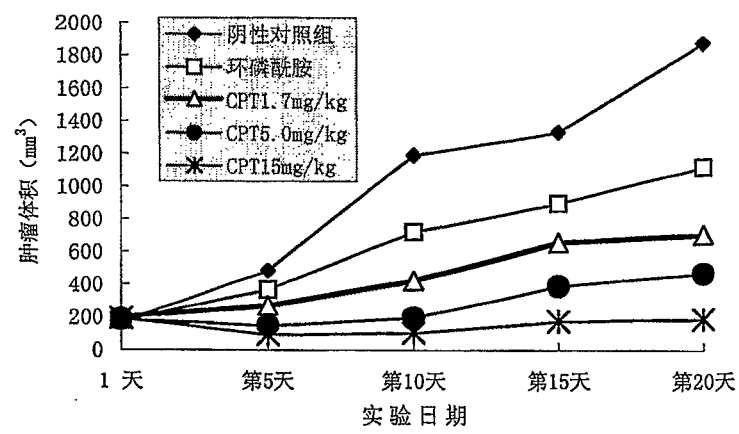


图 3

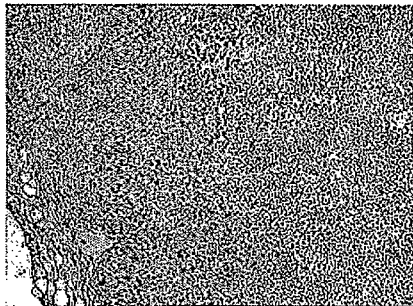


图 4—1

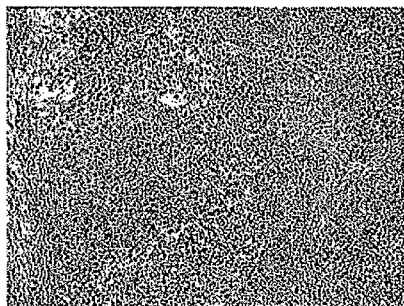


图 4—2

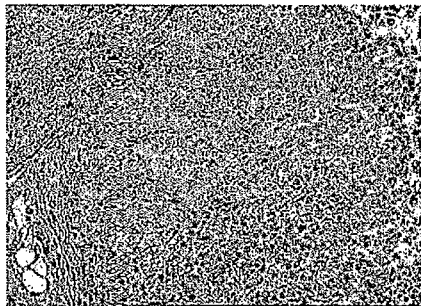


图 4—3

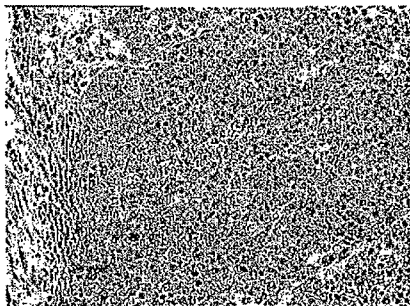


图 4—4

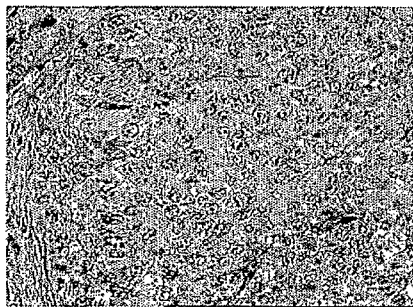


图 4—5

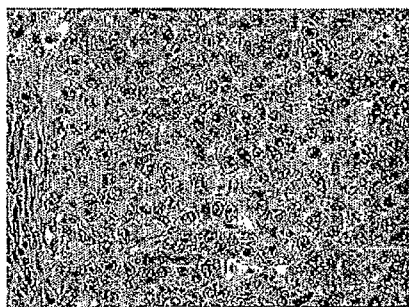


图 4—6

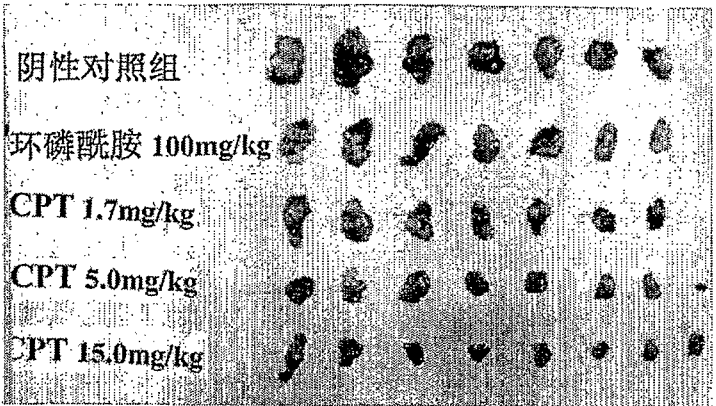


图 5

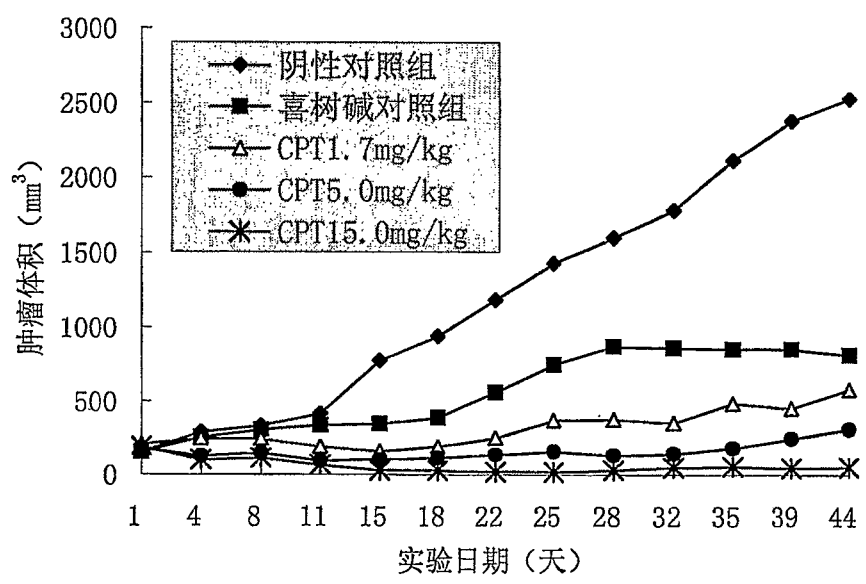


图 6

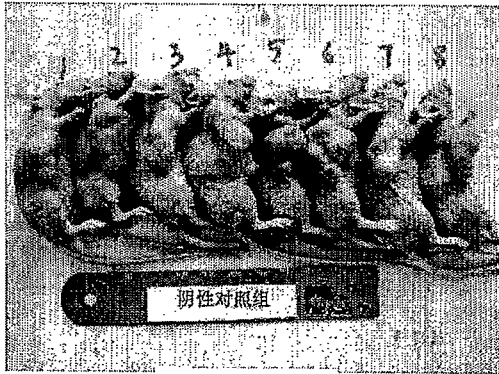


图 7-1

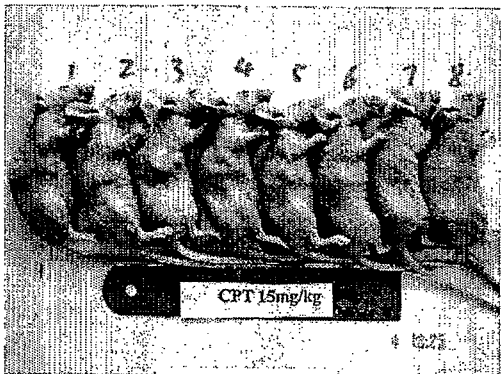


图 7-2

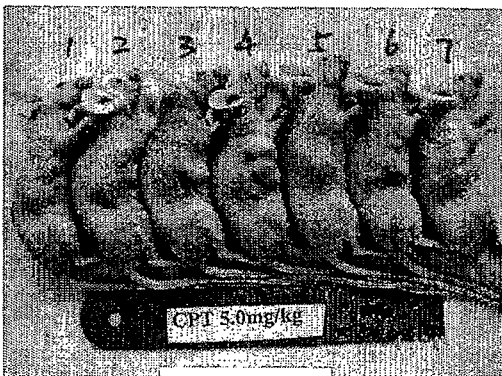


图 7-3

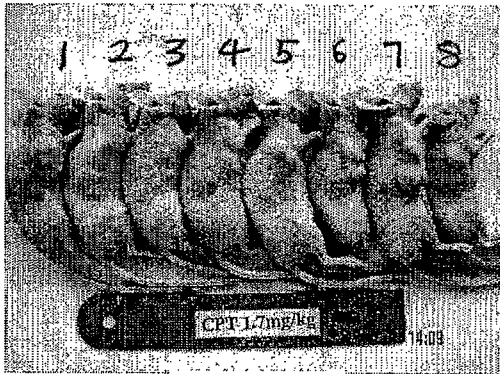


图 7-4

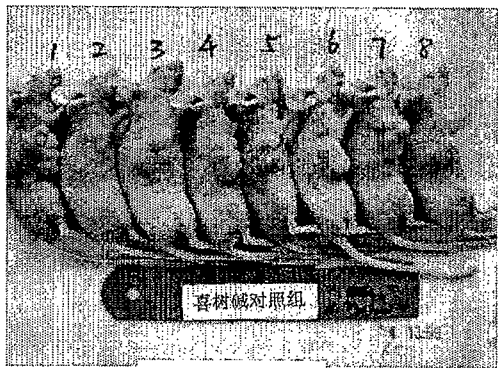


图 7-5