

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局



(43) 国际公布日
2009年8月6日 (06.08.2009)

PCT

(10) 国际公布号
WO 2009/094850 A1

- (51) 国际专利分类号:
A61K 38/16 (2006.01) A61P 37/06 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) C07K 14/375 (2006.01)
A61P 37/02 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2008/002142
- (22) 国际申请日: 2008年12月30日 (30.12.2008)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
200810050206.X
2008年1月3日 (03.01.2008) CN
- (71) 申请人及
(72) 发明人: 张喜田(ZHANG, Xitian) [CN/CN]; 中国上海市奉贤区金汇塘路369号30栋, Shanghai 201418 (CN)。
- (72) 发明人; 及
(75) 发明人/申请人 (仅对美国): 孙非(SUN, Fei) [CN/CN]; 中国上海市奉贤区金汇塘路369号30栋, Shanghai 201418 (CN)。
- (74) 代理人: 中国商标专利事务所有限公司(CHINA TRADEMARK & PATENT LAW OFFICE CO., LTD); 中国北京市西城月坛南街14号月新大厦8层, Beijing 100045 (CN)。
- (81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。
- (84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。
- 根据细则4.17的声明:
— 发明人资格(细则4.17(iv))
- 本国际公布:
— 包括国际检索报告。

(54) Title: RECOMBINANT GANODERMA LUCIDIUM IMMUNOMODULATORY PROTEIN (rLZ-8) AND USES THEREOF

(54) 发明名称: 重组灵芝免疫调节蛋白 (rLZ-8) 及其用途

(57) Abstract: Provided are the use of the recombinant Ganoderma lucidium immunomodulatory protein (rLZ-8) for the manufacturing of a medicament for antitumor, increasing leukocyte and inhibiting immunological rejection and the pharmaceutical composition comprising the rLZ-8 protein, wherein the rLZ-8 protein is expressed from pichia yeast.

(57) 摘要:

提供了重组灵芝免疫调节蛋白 (rLZ-8) 在制备用于抗肿瘤、升高白细胞和抑制免疫排斥反应的药物中的应用以及包含该 rLZ-8 蛋白的药物组合物, 其中该 rLZ-8 蛋白表达自毕赤酵母。



WO 2009/094850 A1

重组灵芝免疫调节蛋白 (rLZ-8) 及其用途

技术领域

本发明涉及一种真菌免疫调节蛋白，特别是一种特定空间结构的重组灵芝免疫调节蛋白对肿瘤、白细胞减少症及过敏性疾病等适应症的治疗用途。

背景技术

现有文献表明真菌灵芝含有的某类蛋白具有广泛的免疫调节活性，它可以促进淋巴细胞增殖，促进人外周血淋巴细胞产生细胞因子的作用，凝集红细胞活性，对粘附分子施加影响，抑制过敏反应和免疫抗肿瘤作用。

1989年，由日本Kino等人第一次从赤灵芝菌丝体提取物中分离得到了一种免疫调节蛋白，即灵芝免疫调节蛋白 (Immunoregulatory Protein from *Ganoderma Lucidium*, LZ-8)，命名为LZ-8，并测定了其基因序列、氨基酸顺序和免疫生理活性。蛋白质测序表明LZ-8由110个氨基酸残基组成，氨基端乙酰化。分子量为12.4 kD，等电点为4.4。

发明人首次公开了基因重组灵芝免疫调节蛋白的晶体空间结构，其结构的主要特征为：包括一个N-端的形成二聚体所需的重要结构域和一个C端的FNIII结构域，N-端结构域由一个 α -helix (序列为2-SDTA-LIFRLAWDVK-15, 14个氨基酸组成)和 β -strand (序列为16-KLSFD-20, 5个氨基酸组成)，其中在 α -helix上的Ser的残基被乙酰化封闭。Lz-8单体上的N端 α -helix和 β -strand与另一单体上相同的结构域通过空间交换形成了重要的二聚体结合结构域，呈哑铃状。C-端的FNIII结构域属于免疫球蛋白三文治结构，包含 β -sheet I和 β -sheet II两个结构，二者分别由 β -strands A-B-E和 β -strands G-F-C-D形成。研究结果表明基因重组灵芝免疫蛋白的本质作用可能是通过N端 α 螺旋A形成同源二聚体 (研究表明，其N端13个氨基酸残基对Fip形成有功能的同源二聚体十分必要)，借此结合到淋巴细胞，通过一系列信息传递，并促进淋巴细胞分泌各种细胞因子，实现免疫调节功能。

现临床所应用具有升高白细胞作用的药物中，重组集落细胞刺激因子 (Human Granulo- cyte Macrophage Colony Stimulating Fa) 是唯一一种用于治疗各种原因所导致的白细胞或粒细胞减少症及骨髓抑疗法所引起的白细胞减少症的基因工程重组蛋白制剂。尽管多年的临床应用证明具有明显的疗效，但所有产品均注明了它的临床不良反应为发热、骨痛、肌痛、皮疹、瘙痒、腹痛、腹泻等。少数患者初次用药可出现首次剂量反应，表现为面部潮红、出汗及血压下降、血氧饱和度降低。严重但罕见的不良反应有：变态反应、支气管痉挛、心力衰竭、室上性心动过速、毛细血管渗漏综合征、脑血管疾病、精神错乱、惊厥、血压下降、颅内压升高、肺水肿等。

以往的研究报道认为，真菌免疫调节蛋白抗肿瘤的作用均是通过免疫途径实现的，发明人的研究发现灵芝免疫调节蛋白对人急性髓性粒细胞白血

病细胞 HL-60、人早幼粒白血病细胞 NB4、人慢性髓性白血病细胞 K562 等肿瘤细胞具有直接杀伤作用，而不是免疫途径杀伤肿瘤细胞。

灵芝免疫蛋白的主要功能还在于它可以促进末梢淋巴细胞和脾脏细胞的增生，诱导动物和人体的巨噬细胞分泌多种细胞因子(白细胞介素，肿瘤坏死因子和干扰素等)，进而防御及消除病原体的侵害，维护机体的健康，完成免疫调节功能，但详尽的调节机制目前还不完全明确。本发明认为，该种蛋白还可以明显抑制全身性过敏反应，抑制肿瘤生长，对抗器官移植后的排异现象。

10

发明内容

本发明的目的是发现重组灵芝免疫调节蛋白 (rLZ-8) 的晶体结构及其在医学治疗领域的新用途。

15 本发明的内容为重组灵芝免疫调节蛋白 (rLZ-8) 在抗肿瘤、升高白细胞及抑制免疫排斥反应等医学治疗领域中的应用。

本发明的重组灵芝免疫调节蛋白 (rLZ-8) 是通过基因工程技术在毕赤酵母中重组表达而获得的，该蛋白的核苷酸序列是根据已公开的天然灵芝免疫调节蛋白的基因序列 (M58032) 重新设计并人工合成的。

20 本发明通过 X 射线衍射的方法首次获得了重组灵芝免疫调节蛋白 (rLZ-8) 的晶体结构。该蛋白的晶体培养条件为：1.75M ammonium sulfate, 0.1M Tris pH6.0, 6.4% PEG400。利用悬滴气相扩散法可以获得了空间群为 P32 的单晶。在 X 射线衍射仪的像板衍射数据收集系统中收集了一套 1.8 埃分辨率的晶体数据，再通过利用 CCP4 等结构解析软件进行分析计算，再以相位交换的方法来解得一套晶体结构。在每一个非对称单位中可发现 4 个分子，其中两个分子间各以 N 端 alpha-helix 之间的疏水作用和反向平行的 beta-strand 之间的氢键形成二聚体。单个分子的 C 端有一个 FNIII 型类免疫球蛋白折叠，该结构域由两个 beta-sheet 形成。在 beta-sheet 的表面及交界处各有一个推测为糖连结位点。

30 本发明在体外抗肿瘤实验中，用 IMDM 细胞培养液配制的不同浓度的 rLZ-8 加入到体外培养的人早幼粒白血病细胞 NB4 和人慢性髓性白血病细胞 K562 中，可明显的观察到 rLZ-8 对两种肿瘤细胞的杀伤作用，用 MTT 法检测，实验数据表明药效与剂量呈显著的依赖关系。在体内抑瘤实验中，将纯化后 rLZ-8 对荷 S180、H22 小鼠给药，连续给药 10 天，对腹水瘤小鼠每日称体重，脱颈处死，对皮下接种肿瘤小鼠剖瘤称重，计算肿瘤抑制率，并测量各组给药前后的血液中白细胞数。结果表明，rLZ-8 对肿瘤呈剂量依赖性抑制，对环磷酰胺组对比不会显著降低小鼠白细胞数量。体外杀伤肿瘤细胞、体内抑瘤实验都显示，本发明中的 rLZ-8 具有显著的抗肿瘤作用。

40 本发明在实验中还用荧光染料 FITC 标记 rLZ-8，用 FITC-rLZ-8 孵育人急性髓性粒细胞白血病细胞 HL-60 细胞、大鼠心肌细胞，兔软骨细胞，收集细胞并多次洗涤，置于显微镜下观察，在 HL-60 细胞样本发出亮度很高的绿色荧光，与其正常对照组呈极显著差异，而大鼠心肌细胞和兔软骨细胞没有被染色，说明 HL-60 细胞可以被 rLZ-8 识别，但不能标记另外两

种细胞。这种作用可能与肿瘤细胞表面有较多高度折叠卷曲的寡糖链有关，因为 rLZ-8 的 C 端 FNIII 型类免疫球蛋白结构域中存在两个糖链结合位点，而正常组织的细胞表面则不具备这个特点，如大鼠心肌细胞和兔软骨细胞。同时，我们在这个实验中还发现 rLZ-8 对 HL-60 细胞有较强的杀伤作用，而对另外两种细胞则无明显作用效果，推测这种 rLZ-8 杀伤细胞的选择性可能与其识别细胞表面受体有关。

为进一步明确 rLZ-8 的抗肿瘤机制，本发明还应用 PI 单染和 ANNEXIN V & FITC 双染两种方法对经 rLZ-8 直接杀伤 K562 和 NB4 等肿瘤细胞进行细胞凋亡检测，结果进一步阐明 rLZ-8 对肿瘤细胞的杀伤作用机制可能是诱导肿瘤细胞发生细胞凋亡。

本发明公开了 rLZ-8 具有预防和治疗白细胞减少症的作用。在环磷酰胺所致大、小鼠白细胞减少症的治疗实验中，将生理盐水配制的 rLZ-8 对经环磷酰胺作用的大鼠白细胞低下模型进行给药，用金磊赛强（集落细胞刺激因子）为阳性药物，连续给药 7 天，于第 3 天和第 7 天尾静脉取血，检测血液中白细胞数量，对比治疗前后白细胞数变化，分析药物疗效。与环磷酰胺对照组比较，在给药第 3 天 rLZ-8 药物组已明显升高大鼠白细胞，差异及其显著，在给药第 7 天时恢复到正常水平。

在 γ 辐射所致小鼠白细胞减少症的治疗实验中，除正常对照组外，每组小鼠于辐射的同一天开始腹腔注射等体积的生理盐水、阳性药物（金磊赛强）、不同剂量的 rLZ-8。照射条件为 7.50 Gy, 180 mV, 15 mA, 剂量率为 450 伦/分。各组动物分别于给药前、照射第 5、7、9 天尾静脉采血计白细胞数。照射后 7 天称体重脱臼处死，取脾脏称重，计算脾脏系数。然后固定于 Bouin 氏液，6h 后计脾脏表面造血灶（CFU-S）数。在 γ 辐射所致小鼠白细胞减少症的预防实验中，在进行辐射前 5 天开始给药，其后的实验方法与治疗实验一致。二者的实验数据均表明 rLZ-8 可以预防并治疗 γ 辐射所导致的白细胞减少症。

本发明证明其 rLZ-8 不产生溶血作用、对人血四种血型红细胞没有凝集作用和不产大鼠骨髓像的异常变化。

本发明所述的 rLZ-8 可以作为一种免疫抑制剂。在实验中发现 rLZ-8 可以抑制小鼠系统性过敏反应，使经牛血清白蛋白 BSA 致敏的小鼠没有出现抽搐、活动减少或死亡等阳性反应。

本发明的内容包括制备一种 rLZ-8 为活性成分的药物制剂，该药物制剂主要以非胃肠道途径给药，如普通注射剂、冷冻干燥注射剂、脂质体注射剂、靶向给药的注射剂等，也可制成经胃肠道途径给药的制剂，如片剂、胶囊剂、喷雾剂、凝胶剂、凝胶吸收剂、口服药、混悬剂、冲剂、贴剂、丸剂、散剂、注射剂、输液剂、栓剂、稀释制剂、控释制剂等。

本发明的药物制剂其中重组灵芝免疫调节蛋白（rLZ-8）的含量为 1-99%，其他为药物可接受的载体可以是，淀粉、糊精、蔗糖、乳糖、纤维素类、硬脂酸镁、吐温-80、卡波姆、甲基纤维素、羧甲基纤维素钠、海藻酸钠、甘油、明胶、聚乙二醇、硫柳汞、尼泊金丙酯、尼泊金甲酯、尼泊金乙酯、三氯叔丁醇、苯甲酸钠、硼砂、新洁尔灭、山梨醇、丙二醇异丙醇、月桂氮卓酮、异丙醇/丙二醇（1：1）、异丙醇/（1：2）和异丙醇/丙二醇（2：1）、三乙醇胺、氢氧化钠凡士林、硬脂酸、液体石蜡、羊毛脂、十八醇、十六醇、单硬脂酸甘油酯、月桂醇硫酸钠、司盘 60、平平加 0、甘露醇、山梨醇等。

本领域的药物制剂可以通过本领域通常的方法制备。

说明书附图说明：

- 图 1 rLZ-8 的晶体结构示意图
- 5 图 2 rLZ-8 对 NB4 肿瘤细胞体外杀伤实验结果
- 图 3 rLZ-8 对 K562 肿瘤细胞体外杀伤实验结果
- 图 4 rLZ-8 诱导 K562 和 NB4 细胞凋亡的 PI 单染检测结果
- 图 5 rLZ-8 诱导 K562 和 NB4 细胞凋亡的 Annexin V/PI 双染检测结果
- 图 6 接种 S180 艾氏腹水瘤细胞小鼠的体重变化实验结果
- 10 图 7 接种 H22 移植性肿瘤细胞小鼠的体重变化实验结果
- 图 8 FITC-rLZ-8 对大鼠心肌组织的标记实验结果（暗、明场）
- 图 9 FITC-rLZ-8 对兔软骨细胞的标记实验结果（暗、明场）
- 图 10 FITC-rLZ-8 对 HL-60 细胞的标记实验结果（暗、明场）
- 图 11 大鼠骨髓涂片结果

15

具体实施方式：

实施例 1：重组灵芝免疫调节蛋白的获得

1. rLZ-8 基因人工合成、工程菌构建和筛选

20 根据毕赤酵母遗传密码偏爱性，在天然灵芝免疫调节蛋白基因序列（M58032）编码区的基础上，重新设计编码了 rLZ-8 基因（SEQ1）进行人工全基因合成，该序列与天然灵芝免疫调节蛋白基因编码的氨基酸序列相同，所不同的地方在于利用了更适合毕赤酵母表达系统的密码子。

25 用该序列（SEQ1）与酵母 α -因子前导肽编码序列相连成为融合基因，克隆入 pMD18-T 载体中。将测序正确的载体线性化，转入酵母基因组中，在 MM 和 MD 平板上筛选甲醇利用高效型 Mut⁺菌株。

天然灵芝免疫调节蛋白基因序列（M58032）序列编码区为：
 AGCATCATGTCCGACACTGCCTTGATCTTCAGGCTCGCCTGGGACGT
 GAAGAAGCTCTCGTTCGACTACACCCCGAACTGGGGCCGCGGCAAC
 30 CCCAACAACCTTCATCGACACTGTCACCTTCCCGAAAGTCTTGACCGA
 CAAGGCGTACACGTACCGCGTCGCCGTCTCCGGACGGAACCTCGGC
 GTGAAACCCTCGTACGCGGTCGAGAGCGACGGCTCGCAGAAGGTCA
 ACTTCCTCGAGTACAACCTCCGGGTATGGCATAGCGGACACGAACACG
 ATCCAGGTGTTTCGTTGTCGACCCCGACACCAACAACGACTTCATCAT

CGCCCAGTGGAAGTACTAGGAGGAGGCAG。

经重新设计的重组灵芝免疫调节蛋白(rLZ-8)的核苷酸序列(SEQ1)是:
 ATGTCTGATACTGCTTTGATCTTCAGATTGGCTTGGGATGTTAAGAAG
 TTGTCTTTTGATTACACTCCAAACTGGGGTAGAGGTAACCCAAACAA
 5 CTTCATTGATACTGTTACTTTTCCTAAGGTTTTGACTGATAAGGCTTAC
 ACTTACAGAGTTGCTGTTTCTGGTAGAACTTGGGTGTTAAGCCATCT
 TACGCTGTTGAATCTGATGGTTCTCAAAGGTTAACTTCTTGGGAATAC
 AACTCTGGTTACGGTATTGCTGATACTAACACTATTCAAGTTTTCGTTG
 TTGATCCAGATACTAACAACGATTTTCATTATCGCTCAATGGAAGTACT
 10 AA;

所述重组灵芝免疫调节蛋白(rLZ-8)的氨基酸序列是:

MSDTALIFRLAWDVKKLSFDYTPNWGRGNPNNFIDTVTFPKVLTDKAY
 TYRVAVSGRNLGVKPSYAVESDGSQKVNFLYNSGYGIADTNTIQVF
 VVDPDTNNDFIQAQWN;

2. rLZ-8 工程菌的表达

对规模发酵表达的温度、转速、pH 值、装液体积、甲醇添加量等条
 进行检测, 确立了酵母工程菌在 80L 发酵罐规模下表达 rLZ-8 的工艺条件
 优化方法。根据 rLZ-8 的理化特性, 设计了发酵培养基的配方。目的蛋白
 20 产量约为 $800\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

3. rLZ-8 纯化工艺

发酵液离心机离心→将上清用管式离心机分离→超滤→阳离子交换纯
 化柱→AKTA蛋白质纯化工作站制备目的蛋白→强阴离子交换作用层析→疏
 25 水作用纯化柱→凝胶过滤层析。

4. rLZ-8 纯度鉴定及分子量测定

利用反相液相色谱对分离纯化的产物进行纯度分析, rLZ-8 纯度为 >99%。
 激光飞行质谱鉴定重组表达的 rLZ-8 分子量为 12722Da。

5. rLZ-8 高级空间结构的确定

利用悬滴气相扩散法获得了空间群为 P32 的单晶。晶体培养条件为: 1.75
 30 M ammonium sulfate, 0.1M Tris pH 6.0, 6.4% PEG400。在 MarResearch 345
 dtd 像板衍射数据收集系统收集了一套 1.8 埃分辨率的晶体衍射数据。利用
 CCP4 等软件进行结构解析, 通过相位交换, 解得一套晶体结构, 以下为晶
 体 rLZ-8 的结构简要描述:

LZ-8 的结构包括一个 N-端的形成二聚体所需的重要结构域和一个 C 端
 35 的 FNIII 结构域。rLZ-8 的 N-端结构域由一个 α -helix (序列为 2-SDTAL
 IFRLAWDVK-15, 14 个氨基酸组成) 和 β -strand (序列为 16-KLSFD-20, 5 个
 氨基酸组成), 其中在 α -helix 上的 Ser 的残基被乙酰化封闭。Lz-8 单体上的
 N 端 α -helix 和 β -strand 与另一单体上相同的结构域通过空间交换形成了重要
 的二聚体结合结构域, 呈哑铃状。C-端的 FNIII 结构域属于免疫球蛋白三文
 40 治结构, 包含 β -sheet I 和 β -sheet II 两个结构, 如图 1 所示二者分别由
 β -strands A-B-E 和 β -strands G-F-C-D 形成, 其中的 β -strand 序列为:

A. 21-TPNWGRG-27; B. 34-IDTVTFP-39; C. 48-YTYRVAV-54; D. 57-RNLGVKP
 -63; E. 72-SQKVN-76; F. 91-TIQVFVVDPD-100; G. 102-NNDFIQAQW-110。

实施例 2: rLZ-8 对人早幼粒白血病细胞 NB4 的杀伤作用**1. 试剂**

rLZ-8 除菌后用 IMDM 培养液配制成 8 个浓度, 分别为 $0.78\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $1.56\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $3.125\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $6.25\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $12.5\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $25\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $50\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $100\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 。

2. 实验方法

96 孔培养板中, 实验孔加 NB4 肿瘤细胞和 rLZ-8 各 0.1ml, rLZ-8 浓度由低到高; 阴性对照组加 NB4 肿瘤细胞和培养液各 0.1ml, 阳性药物对照组为三氧化二砷 (As_2O_3); 每组作 6 个复孔。置 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 培养箱中 48h, 在细胞培养终止前 4h 加入 MTT $15\mu\text{l}$ ($5\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$), 细胞培养终止后加入 $100\mu\text{l}$ 0.1mol L^{-1} 盐酸异丙醇, 在酶联免疫检测仪上 570nm 测 OD 值。

3. 实验结果

表 1 和图 2 显示, rLZ-8 药物组在 $\text{OD}_{570\text{nm}}$ 的光吸收值与 NB4 正常对照组比较, 有明显差异, 说明 rLZ-8 在体外对 NB4 肿瘤细胞有较强杀伤作用。

表 1 rLZ-8 对 NB4 细胞体外杀伤作用 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

分组	剂量 ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	$\text{OD}_{570\text{nm}}$	生长抑制率 (%)
正常对照	—	1.16 ± 0.020	—
阳性药对照组	10	$0.33\pm 0.01^*$	72
rLZ-8 组	0.78	$0.71\pm 0.03^*$	39
	1.56	$0.65\pm 0.05^*$	44
	3.125	$0.53\pm 0.04^*$	54
	6.25	$0.45\pm 0.02^*$	61
	12.5	$0.30\pm 0.04^*$	74
	25	$0.22\pm 0.01^*$	81
	50	$0.11\pm 0.01^*$	91
	100	$0.08\pm 0.01^*$	93

*与 NB4 正常对照组比较, $P<0.01$

实施例 3: rLZ-8 对人慢性髓性白血病细胞 K562 的杀伤作用**1. 试剂**

rLZ-8 除菌后用 IMDM 培养液配制成 6 个浓度, 分别为 $3.125\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $6.25\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $12.5\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $25\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $50\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $100\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 。

2. 实验方法

96 孔培养板中, 试验孔加 K562 肿瘤细胞 0.1ml 和 rLZ-8 0.1ml, rLZ-8 浓度由低到高; 阴性对照组加 K562 细胞和培养液各 0.1ml; 阳性药物三氧化二砷; 每组作 6 个复孔。置 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 培养箱中 48h, 在细胞培养终止前 4h 加入 MTT $15\mu\text{l}$ ($5\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$), 细胞培养终止后加入 $100\mu\text{l}$ $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸异丙醇, 在酶联免疫检测仪上 570nm 测 OD 值。

3. 实验结果

表 2 和图 3 所示, rLZ-8 药物组在 OD_{570nm} 的光吸收值与 K562 正常对照组比较, 有明显差异, 说明 rLZ-8 在体外对 K562 细胞同样具有杀伤作用。

表 2 rLZ-8 对 K562 肿瘤细胞体外杀伤作用 ($\bar{x}\pm s$, n=6)

分组	剂量 ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	OD _{570nm}	生长抑制率 (%)
正常对照	—	1.01±0.01	—
阳性药对照组	10	0.22±0.03*	78.2
rLZ-8 组	3.125	0.66±0.03*	34.7
	6.25	0.58±0.03*	42.6
	12.5	0.52±0.05*	48.5
	25	0.31±0.02*	69.3
	50	0.25±0.04*	75.2
	100	0.19±0.03*	81.2

5 *与 K562 正常对照组比较, $P<0.01$

实施例 4: rLZ-8 对血液肿瘤细胞凋亡作用的影响

1. PI 单染流式细胞仪检测

1. 1 仪器和细胞株

10 荧光显微镜, 型号 Leica ASLMD、K562、NB4。

1.2 试剂

rLZ-8 分别设高、中、低三个剂量组, 用含 2% FCS 的 IMDM 培养液配制成浓度为 $0.1\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$, $2.5\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 。碘化乙锭 (PI) $50\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 。

15 **1.3 实验分组**

K562 设为正常对照组、阳性药物组 (As_2O_3 $0.5\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)、rLZ-8 低剂量组 ($0.1\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)、rLZ-8 中剂量组 ($0.5\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)、rLZ-8 高剂量组 ($2.5\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$); NB4 设为正常对照组, rLZ-8 低剂量组 ($0.1\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)、rLZ-8 中剂量组 ($0.5\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)、rLZ-8 高剂量组 ($2.5\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)。

20

1.4 实验方法

将 K562 细胞与 NB4 细胞分别加入 24 孔板, 1ml/孔, 并加入不同浓度 rLZ-8, 1ml/孔, 每组设 3 个复孔。置 37°C 、5% CO_2 培养箱 24h, 将每个浓度组细胞收集, PBS 洗涤 2 次并调整细胞浓度为 $1\times 10^6/\text{ml}$, 70% 冰乙醇固定, 置 -20°C 过夜。固定后细胞用 PBS 洗涤 2 次, 加入 PI (终浓度为 $50\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) 室温避光孵育 10min, $1000\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5min, 弃上清液用 $400\mu\text{l}$ PBS 重悬沉淀。1h 之内上机检测。

25

1.5 实验结果

30

由表 3 和图 4 可见, 与 K562 及 NB4 正常对照组比较, rLZ-8 药物组细胞凋亡率均有所提高, 可以得出使细胞凋亡是 rLZ-8 杀死肿瘤细胞的途径之一。

表 3 rLZ-8 诱导 K562 及 NB4 细胞凋亡的实验结果 (%)

凋亡率	正常对照组	rLZ-8 ($0.1\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	rLZ-8 ($0.5\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	rLZ-8 ($2.5\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)
-----	-------	--	--	--

K562	8.89	16.43	17.91	21.57
NB4	4.06	19.23	24.51	38.60

2. Annexin V-FITC 试剂盒流式细胞仪检测细胞凋亡

2.1 仪器和细胞株

FACS Calibur 型流式细胞仪美国 Becton-Dickinson 公司。NB4、HL-60。

5 2.2 试剂

rLZ-8 用含 2%FCS 的 IMDM 培养液配制成 $0.1\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$, $2.5\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, 三氧化二砷(As_2O_3) $5\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 。AnnexinV-FITC 试剂盒: 结合缓冲液 4 \times ; 碘化丙锭溶液(PI), $20\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, 0.2ml。

2.3 实验分组

10 NB4 设正常对照组, 阳性药物组(As_2O_3 $0.5\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), rLZ-8 低剂量组($0.1\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)、rLZ-8 中剂量组 ($0.5\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)、rLZ-8 高剂量组($2.5\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$); HL-60 设正常对照组, rLZ-8 低剂量组($0.1\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)、rLZ-8 中剂量组 ($0.5\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)、rLZ-8 高剂量组($2.5\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)。

15 2.4 实验方法

将 NB4 细胞和 HL-60 细胞分别加入 24 孔板, 1ml/孔, 并加入不同浓度 rLZ-8, 1ml/孔, 每组设 3 个复孔。置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中 24 小时, 将每个浓度组细胞收集, 用 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的 PBS 洗细胞 2 次, 用 250 μl 结合缓冲液重新悬浮细胞, 调节其浓度为 $1\times 10^6/\text{ml}$ 。取 100 μl 的细胞悬液于 20 5ml 流式管中, 加入 5 μl 的 Annexin V/FITC 和 10 μl 的 $20\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ PI 溶液, 混匀后于室温避光孵育 15min, 在反应管中加 400 μl PBS, 流式细胞仪分析。

2.5 实验结果

25 由图 5 及表 4 可以看出, NB4-rLZ-8 组和 HL-60-rLZ-8 组凋亡率明显高于其正常对照组, 并且, HL-60-rLZ-8 组, 随着 rLZ-8 浓度的增加, 凋亡率亦增加。

表 4 rLZ-8 诱导 NB4 及 HL-60 细胞凋亡的实验结果 (%)

凋亡率	正常对照组	阳性药组	rLZ-8 ($0.1\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	rLZ-8 ($0.5\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	rLZ-8 ($2.5\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)
NB4	6.1	23.4	21.0	22.3	34.0
HL-60	0.4	39.7	30.5	40.7	47.7

实施例 5: rLZ-8 对小鼠 S180 艾氏腹水瘤的抑制实验

30 1. 实验材料

小鼠, 体重 18—22g, 雌雄各半, 由吉林大学实验动物中心提供。小鼠艾氏腹水细胞株 S180 由本室提供。环磷酰胺 (CTX), 江苏恒瑞医药股份有限公司, 批号: 06101921。S180 腹水瘤及实体瘤实验组均分为正常对照组、阴性对照组、阳性对照组、rLZ-8 低剂量治疗组 ($0.25\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、rLZ-8 中 35 剂量治疗组 ($0.5\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、rLZ-8 高剂量治疗组 ($1\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)。每组 10 只。

2. 实验方法

S180 皮下抑瘤实验方法: 取生长良好的 S180 细胞, 以适量无菌生理盐水稀释成瘤细胞悬液, 细胞计数为 $1\times 10^6\cdot\text{ml}^{-1}$, 每鼠右腋窝皮下接种 0.2ml

(正常对照组除外)。接种 24h 后, 给予治疗。正常对照组和阴性对照组给予生理盐水 $0.2\text{ml}\cdot\text{只}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, 腹腔注射; 阳性对照组给予环磷酰胺 $20\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, $0.2\text{ml}\cdot\text{只}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, 腹腔注射。rLZ-8 治疗组分别给予相应剂量尾静脉注射, $0.2\text{ml}\cdot\text{只}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 。连续 10 天。分别于给药前、给药 10d 后从小鼠眼眶静脉丛取血, 送检于吉大一院检验科测白细胞数。并在停药次日, 颈椎脱臼处死全部小鼠, 解剖取出瘤块, 称瘤重。按下式计算抑瘤率:

$$\text{抑瘤率}(\%) = (\text{阴性对照组平均瘤重} - \text{实验组平均瘤重}) / \text{阴性对照组平均瘤重} \times 100\%$$

S180 腹水抑瘤实验方法: 取生长良好的 S180 细胞, 以适量无菌生理盐水稀释成瘤细胞悬液, 细胞计数为 $1 \times 10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$, 每鼠腹腔接种 0.2ml (正常对照组除外)。接种 24h 后, 给予治疗。正常对照组和阴性对照组给予生理盐水 $0.2\text{ml}\cdot\text{只}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, 腹腔注射; 阳性对照组给予环磷酰胺 $20\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, $0.2\text{ml}\cdot\text{只}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, 腹腔注射。rLZ-8 治疗组分别给予相应剂量尾静脉注射, $0.2\text{ml}\cdot\text{只}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 。连续 10 天。每日称重, 观察小鼠体重变化程度, 作体重增长曲线。

153. **3. 实验结果**

S180 皮下抑瘤实验结果: 由表 5 可以看出, 3 个剂量的 rLZ-8 均能抑制 S180 的生长, 抑瘤率分别为 16.8%、25.7% 和 45.5%。rLZ-8 治疗组瘤重与阴性对照组比较, 均具有显著差异 ($P < 0.01$)。

由表 6 可以看出, 给药前, 各组小鼠白细胞数均在同一水平上, 与阴性对照组比较无差异 ($P > 0.05$)。治疗 10 天后, 阴性对照组白细胞数较正常对照组高, rLZ-8 低剂量组和中剂量组白细胞数与阴性对照组比较无差异 ($P > 0.05$), 高剂量组与正常对照组比较无差异 ($P > 0.05$), 阳性对照组白细胞数明显降低, 与正常对照组及阴性对照组比较均有显著差异 ($P < 0.01$)。

表 5. rLZ-8 对小鼠移植性肿瘤 S180 的抑制作用 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

分组	剂量 ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	瘤重 (g)	抑瘤率 (%)
阴性对照组	—	1.01 ± 0.03	—
CTX 组	20	$0.35 \pm 0.02^*$	65.3
rLZ-8 低剂量组	0.25	$0.84 \pm 0.03^*$	16.8
rLZ-8 中剂量组	0.5	$0.75 \pm 0.02^*$	25.7
rLZ-8 高剂量组	1	$0.55 \pm 0.03^*$	45.5

* 与阴性对照组比较, $P < 0.01$

表 6. rLZ-8 对小鼠移植性肿瘤 S180 白细胞影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

分组	剂量 ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	白细胞数	
		给药前	给药 10d
正常对照组	—	9.49 ± 0.27	9.54 ± 0.33
阴性对照组	—	9.54 ± 0.25	10.44 ± 0.34
CTX 组	20	$9.56 \pm 0.31^*$	$4.41 \pm 0.25^*$
rLZ-8 低剂量组	0.25	$9.48 \pm 0.30^*$	$10.44 \pm 0.18^{**}$
rLZ-8 中剂量组	0.5	$9.43 \pm 0.44^*$	$10.34 \pm 0.31^{**}$
rLZ-8 高剂量组	1	$9.49 \pm 0.36^*$	$9.55 \pm 0.36^{**}$

*与阴性对照组比较, $P < 0.01$; **与阴性对照组比较, $P > 0.05$

S180 腹水抑瘤实验结果: 实验结果表明, 各组小鼠腹水出现时间基本一致, 阴性对照组小鼠体重增长迅速, 存活时间减少。由图 6 可见, rLZ-8 组

小鼠平均体重增长趋势比正常组大，但比阴性对照组比较小。说明 rLZ-8 能够在一定程度上抑制小鼠腹腔 S180 肿瘤细胞的生长。

实施例 6: rLZ-8 对小鼠肝癌细胞 H22 的抑制实验

51. **实验材料**

小鼠，体重 18—22g，雌雄各半，由吉林大学实验动物中心提供。小鼠肝癌细胞株 H22，由本室提供。环磷酰胺 (CTX)，江苏恒瑞医药股份有限公司，批号：06101921。

2. 实验方法

10 H22 肝癌细胞实验组均分为正常对照组、阴性对照组、阳性对照组、rLZ-8 低剂量治疗组 (0.25mg · kg⁻¹)、rLZ-8 中剂量治疗组 (0.5mg · kg⁻¹)、rLZ-8 高剂量治疗组 (1mg · kg⁻¹)。每组 10 只。

15 H22 皮下抑瘤实验方法：取生长良好的 H22 细胞，以适量无菌生理盐水稀释成瘤细胞悬液，细胞计数为 10⁷ · L⁻¹，每鼠右腋窝皮下接种 0.2ml (正常对照组除外)。接种 24h 后，给予治疗。正常对照组和阴性对照组给予生理盐水 0.2ml · 只⁻¹ · d⁻¹，腹腔注射；阳性对照组给予环磷酰胺 20mg · kg⁻¹，0.2ml · 只⁻¹ · d⁻¹，腹腔注射。rLZ-8 治疗组分别给予相应剂量尾静脉注射，0.2ml · 只⁻¹ · d⁻¹。连续 10 天。分别于给药前、给药 10d 后从小鼠眼眶静脉丛取血，送检于吉大一院检验科测白细胞数。并在第停药次日，颈椎脱臼处死全部小鼠，解剖取出瘤块，称瘤重。按下式计算抑瘤率：

$$\text{抑瘤率}(\%) = (\text{对照组平均瘤重} - \text{实验组平均瘤重}) / \text{对照组平均瘤重} \times 100\%$$

25 H22 腹水抑瘤实验方法：取生长良好的 H22 细胞，以适量无菌生理盐水稀释成瘤细胞悬液，细胞计数为 10⁷ · L⁻¹，每鼠腹腔接种 0.2ml (正常对照组除外)。接种 24h 后，给予治疗。正常对照组和阴性对照组给予生理盐水 0.2ml · 只⁻¹ · d⁻¹，腹腔注射；阳性对照组给予环磷酰胺 20mg · kg⁻¹，0.2ml · 只⁻¹ · d⁻¹，腹腔注射。rLZ-8 治疗组分别给予相应剂量尾静脉注射，0.2ml · 只⁻¹ · d⁻¹。连续 10 天。每日称重，观察小鼠体重变化程度，作体重增长曲线。

3. 实验结果

30 H22 皮下抑瘤实验结果：由表 7 可以看出，3 个剂量的 rLZ-8 均能抑制 S180 的生长，抑瘤率分别为 16.7%、30.0%、42.5%。rLZ-8 治疗组瘤重与阴性对照组比较，均有极显著差异 (P < 0.01)。

表 7. rLZ-8 对小鼠移植性肿瘤 H22 的抑制作用 (x±s, n=10)

分组	剂量 (mg · kg ⁻¹)	瘤重 (g)	抑瘤率 (%)
阴性对照组	—	1.20±0.02	—
CTX 组	20	0.45±0.02*	62.5
rLZ-8 低剂量组	0.25	1.00±0.03*	16.7
rLZ-8 中剂量组	0.5	0.84±0.02*	30.0
rLZ-8 高剂量组	1	0.69±0.03*	42.5

* 与阴性对照组比较， P < 0.01

35

由表 8 看出，给药前，各组小鼠白细胞数均在同一水平上，与阴性对照组比较无差异 (P > 0.05)。治疗 10 天后，阴性对照组白细胞数较正常对照组高，rLZ-8 低剂量组和中剂量组白细胞数与阴性对照组比较无差异 (P > 0.05)，

高剂量组与正常对照组比较无差异 ($P > 0.05$), 阳性对照组白细胞数明显降低, 与正常对照组及阴性对照组比较均有显著差异 ($P < 0.01$)。

表 8. rLZ-8 对小鼠移植性肿瘤 H22 白细胞影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

分组	剂量 ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	白细胞数	
		给药前	给药 10d
正常对照组	—	9.65±0.28	9.69±0.26
阴性对照组	—	9.76±0.31	10.49±0.33
CTX 组	20	9.67±0.43*	4.49±0.21*
rLZ-8 低剂量组	0.25	9.65±0.33*	10.53±0.24**
rLZ-8 中剂量组	0.5	9.65±0.38*	10.43±0.27**
rLZ-8 高剂量组	1	9.63±0.41*	9.86±0.27**

*与阴性对照组比较, $P < 0.01$; **与阴性对照组比较, $P > 0.05$

5 **H22 腹水抑瘤实验结果:** 实验结果显示 rLZ-8 组小鼠生存时间比阴性对照组延长, 阴性对照组小鼠食欲减退, 但体重增长迅速, 活动减少。由图 7 可见, rLZ-8 组小鼠平均体重增长趋势比正常组大, 但比阴性对照组比较小。说明 rLZ-8 能够在一定程度上抑制小鼠腹腔 H22 肿瘤细胞的生长。

实施例 7: rLZ-8 荧光标记及其对正常组织细胞和 HL-60 细胞的影响

10 1. rLZ-8 的 FITC 荧光素标记

(1) 试剂与仪器

15 荧光色素 (Fluorescein-5-Isothiocyanate, FITC), 吉尔生化 (上海); 二甲基亚砷; 碳酸盐缓冲液 (pH 8~9.5) (Na_2CO_3 4.3g, NaHCO_3 8.6g 加 ddH₂O 至 500ml); 磷酸盐缓冲液 (PBS); Desalting Hiprep 26/10 脱盐柱; AKTA purifier; 日立分光光度计等。

(2) 实验方法

20 将纯化的 rLZ-8 ($7.5 \text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) 20ml 对碳酸盐缓冲液 (pH8.3) 透析过夜, 称取 3.75mg FITC, 加入二甲亚砷(DMSO)3.75ml 配制成 FITC-DMSO 溶液。在 50ml 小烧杯中先放入 rLZ-8 按 FITC-DMSO 溶液逐滴加入 rLZ-8 溶液中, 用 PBS 加至 30ml, 磁力搅拌器室温下避光搅拌 4h, 用 Desalting Hiprep 26/10 脱盐柱于 AKTA purifier 系统上除去游离荧光素, 75ml PBS 洗脱, 280nm、495nm 检测, 峰收集。

(3) 实验结果

25 将制备的 FITC-rLZ-8 (10 倍稀释) 于 220nm~520nm 扫描, $A_{495}=0.445$, $A_{280}=0.67$, 计算标记效率 (F/P) 为 3.80。

2. 对大鼠心肌组织的标记作用

(1) 试剂与仪器

30 Leica CM1850 冷冻切片机; wistar 大鼠; 荧光显微镜 80i (Nikon); 等渗 PBS 缓冲液 (pH7.2); 胎牛血清 (FBS, Gibco); FITC-rLZ-8 本室制备。

(2) 实验方法

将大鼠脱颈处死, 取心脏, 置于冷冻切片机, 待温度降至 -20°C 进行切片, 将心肌组织切片与 PBS 配制的 FITC-rLZ-8 溶液 ($100 \text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$) 37°C 孵育 1h 后, 荧光显微镜下观察, 并设空白对照组。

(3) 实验结果

35 荧光显微镜下观察心肌组织无可见荧光, 与空白对照组无差异, 见图 8。

3. 对原代培养兔软骨细胞的标记作用

(1) 试剂与仪器

日本大耳白兔（雄性，2.5kg）4只；手术器械；0.25%胰酶+0.02% EDTA；0.2%Ⅱ型胶原酶；D-Hanks；IMDM培养基（50mg·ml⁻¹维生素C、双抗）；0.025mg·ml⁻¹多聚赖氨酸；无菌水（WFI）。

(2) 实验方法

固定实验动物，空气栓塞处死，腹正中剥皮暴露四肢，大剪刀剪开肌肉筋膜，由骨干断开长骨后，小心取下整个膝、髌和肩部骨，粗略修剪后浸入D-Hanks。将装有组织的烧杯移进入超净台，组织清洗修剪后移入第二杯无菌D-Hanks。组装手术刀，用刀片轻轻削下一薄层软骨，弯镊移植入6cm培养皿，然后D-Hanks洗三次，弃去大部分D-Hanks，眼科剪剪碎软骨片至1mm。弃去多余D-Hanks，小勺转移碎骨片至10cm²培养瓶，加胰酶-EDTA消化，37℃、30min；弃去胰酶更换为胶原酶，摇匀后置37℃孵箱，每1h取出振摇5min，经4-4.5h，结束消化。制细胞悬液并加入3ml含15%FBS的IMDM，以5×10⁴·ml⁻¹接种于培养瓶。

细胞接种于24孔板，每孔0.5ml，设空白对照组，以终浓度为0.25μg·ml⁻¹的FITC-rLZ-8 0.5ml，37℃孵育1h。将细胞移入1.5ml EP管离心（1000r·min⁻¹，7min），以等渗PBS洗3次，向EP管中加入0.1ml PBS，重悬细胞。取悬液于荧光显微镜观察。

(3) 实验结果

荧光显微镜下观察，兔软骨细胞形态完好，无绿色荧光，与对照组相比无显著差异。各实验组照片如图9所示。

4. 对HL-60细胞的标记作用

(1) 试剂与仪器

荧光显微镜80i（Nikon），IMDM细胞培养液（Hyclone），胎牛血清（FBS, Gibco），FITC-rLZ-8和等渗PBS缓冲液（pH7.2）本室制备。

(2) 实验方法

将HL-60以2×10⁶·ml⁻¹接种于24孔培养板中，每孔0.5ml，以IMDM（2%FBS）培养液配制FITC-rLZ-8为100ng·ml⁻¹，每孔0.5ml孵育（37℃），设空白对照组、1h实验组和6h实验组。分别于1h和6h取出细胞加入至1.5ml EP管中，1000r·min⁻¹离心，弃上清，以PBS清洗3次，洗净重悬。

(3) 实验结果

如图10，荧光显微镜下观察，经FITC-rLZ-8孵育1h和6h的HL-60细胞绿色荧光强，其中6h组细胞出现凝集，空白对照组无绿色荧光，与前者具显著差异。

实施例8：环磷酰胺所致小鼠白细胞减少症的治疗实验

1. 药物配制

重组灵芝免疫调节蛋白（rLZ-8）无菌生理盐水配制成5μg·kg⁻¹、2.5μg·kg⁻¹、1.25μg·kg⁻¹、0.625μg·kg⁻¹剂量组，0.2ml/只。

金磊赛强（重组人粒细胞集落刺激因子注射液（rhG-CSF）），生产批号：20060403；150μg/支。用无菌生理盐水配制成3.2μg·kg⁻¹，0.2ml/只。

注射用环磷酰胺（CTX），生产批号07121821；200mg/支。用无菌生理盐水配制成12.5mg·kg⁻¹，0.2ml/只。

3%乙酸溶液配制：即取冰乙酸3ml，加蒸馏水至100ml混合，过滤。

452. 2. 实验方法

实验动物分成 7 组，每组 10 只，雌雄各半。除正常对照组（给予等体积生理盐水）外，每组小鼠均给予环磷酰胺腹腔注射， $12.5\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ， $0.2\text{ml}/\text{只}$ ，连续 3 天。于第 3 天，小鼠尾静脉取血，显微镜下白细胞计数。造模成功后按上述分组分别给予相应剂量 rLZ-8 及阳性药（金磊赛强）治疗，正常对照组和环磷酰胺（CTX）组给予等体积生理盐水，于治疗第 3d 和第 7d、14d 分别小鼠尾静脉取血，对比治疗前后白细胞数变化，分析药物疗效。

白细胞计数方法：用 3%稀乙酸将血液稀释 20 倍，使红细胞全部溶解，滴入白细胞计数池中，在显微镜下计数，求得每立方毫米血液中的白细胞数。

10 **3.实验结果**

由表 9 可以看出，与 CTX 模型组比较，在给药第 3 天 rLZ-8 药物组白细胞已明显升高，在给药第 7 天基本达到正常，且有显著性差异($P < 0.05$)。

表 9. rLZ-8 对小鼠白细胞减少症模型治疗作用的结果 ($\bar{x} \pm S$, $n=10$)

组别	造模前	造模后	给药第 3 天	给药第 7 天	给药第 14 天
正常对照组	10.5 ± 0.20	11.0 ± 0.25	10.8 ± 0.51	10.2 ± 0.11	11.2 ± 0.31
模型组 (CTX 组)	10.7 ± 0.50	1.5 ± 0.71	4.6 ± 0.34	8.3 ± 0.34	12.0 ± 0.32
金磊赛强组 ($3.2 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	10.8 ± 0.20	1.5 ± 0.35	$5.5 \pm 0.12^*$	$22.7 \pm 0.12^*$	$13.0 \pm 0.19^*$
rLZ-8 ($5 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	9.92 ± 0.20	1.3 ± 0.32	$5.0 \pm 0.12^*$	$20.3 \pm 0.11^*$	$14.3 \pm 0.21^*$
rLZ-8 ($2.5 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	10.25 ± 0.30	1.5 ± 0.54	$6.6 \pm 0.77^*$	$22.8 \pm 0.15^*$	$15.2 \pm 0.11^*$
Z-8 ($1.25 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	10.4 ± 0.30	1.7 ± 0.45	$8.1 \pm 0.17^*$	$19.7 \pm 0.17^*$	$13.9 \pm 0.14^*$
Z-8 ($0.62 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	10.4 ± 0.90	1.4 ± 0.45	$6.4 \pm 0.41^*$	$27.2 \pm 0.10^*$	$13.9 \pm 0.17^*$

*与模型组比较， $p < 0.05$

15 **实施例 9：环磷酰胺所致大鼠白细胞减少症的治疗实验**

1. 药物配制

重组灵芝免疫调节蛋白 (rLZ-8) 无菌生理盐水配制成 $20\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、 $10\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、 $5\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、 $2.5\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、 $1.25\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、 $0.625 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、 $0.31 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组， $0.2\text{ml}/\text{只}$ 。

金磊赛强（重组人粒细胞集落刺激因子注射液 (rhG-CSF)），生产批号：20071104； $150\mu\text{g}/\text{支}$ 。用无菌生理盐水配制成 $9.45\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ， $0.2\text{ml}/\text{只}$ 。

注射用环磷酰胺(CTX)，生产批号 07121821； $200\text{mg}/\text{支}$ 。用无菌生理盐水配制成 $49\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ， $0.2\text{ml}/\text{只}$ 。

3%乙酸溶液配制：即取冰乙酸 3ml，加蒸馏水至 100ml 混合，过滤。

2. 实验方法

实验动物分成 10 组，每组 10 只，雌雄各半。除正常对照组（给予等体积生理盐水）外，每组大鼠均给予环磷酰胺腹腔注射， $49\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ， $0.2\text{ml}/\text{只}$ ，连续 3 天。于第 3 天，大鼠尾静脉取血，显微镜下白细胞计数。造模成功后按上述分组分别给予相应剂量 rLZ-8 及阳性药（金磊赛强）治疗，正常对照组和环磷酰胺（CTX）组给予等体积生理盐水，于治疗第 3d 和第 7d、14d 分别小鼠尾静脉取血，对比治疗前后白细胞数变化，分析药物疗效。

白细胞计数方法：用 3%稀乙酸将血液稀释 20 倍，使红细胞全部溶解，滴入白细胞计数池中，在显微镜下计数，求得每立方毫米血液中的白细胞数。

3. 实验结果

由表 10 可以看出, 与 CTX 模型组比较, 在给药第 3 天 rLZ-8 药物组白细胞已明显升高, 在给药第 7 天基本达到正常, 且有显著性差异($P < 0.05$)。

5 表 10. rLZ-8 对大鼠白细胞减少症模型治疗作用的结果 ($\bar{x} \pm S$, $n=10$)

组别	造模前	造模后	rLZ-8 第 3 天	rLZ-8 第 7 天	rLZ-8 第 14 天
正常对照组	11.8±0.21	11.2±0.41	10.5±0.29	11.0±0.85	12.0±0.11
阴性对照组	11.56±0.89	0.8±0.71	0.6±0.32	11.2±0.12	11.5±0.12
金磊赛强 9.45 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	11.7±0.14	0.6±0.23	1.4±0.11*	13.1±0.21*	10.3±0.14
rLZ-8 20 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	11.2±0.11	0.7±0.34	1.6±0.33*	15.8±0.13*	9.8±0.19*
rLZ-8 10 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	11.1±0.34	0.6±0.56	1.6±0.71*	15.8±0.33*	10.9±0.21*
rLZ-8 5 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	11.4±0.22	0.8±0.79	2.6±0.64*	17.6±0.23*	11.2±0.26
rLZ-8 2.5 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	11.0±0.98	0.8±0.12	1.7±0.18*	12.8±0.11*	10.6±0.29*
rLZ-8 1.25 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	12.0±0.24	0.7±0.11	2.8±0.12*	11.0±0.47*	10.3±0.45*
rLZ-8 0.62 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	11.7±0.45	0.8±0.74	5.2±0.14*	12.8±0.74*	12.1±0.24*
rLZ-8 0.31 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	14.2±0.11	0.9±0.12	1.9±0.17*	13.5±0.13*	11.0±0.31

*与模型组比较, $p < 0.05$

实施例 10: γ 辐射所致小鼠白细胞减少症的预防实验

1. 药物配制

10 重组灵芝免疫调节蛋白 (rLZ-8) 无菌生理盐水配制成 5 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、2.5 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、1.25 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、0.625 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组, 0.2ml/只。金磊赛强(重组人粒细胞集落刺激因子注射液(rhG-CSF)), 生产批号: 20060403; 150 μg /支。用无菌生理盐水配制成 3.2 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 0.2ml/只。

注射用环磷酰胺(CTX), 生产批号 07121821; 200mg/支。用无菌生理盐水配制成 12.5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 0.2ml/只。

15 2. 实验方法

20 实验动物分成 7 组, 每组 10 只, 雌雄各半。除正常对照组 (给予等体积的生理盐水) 外, 每组分别给予阳性药物 (金磊赛强)、不同剂量的 rLZ-8, 每日 1 次, 连续 5 天, 于第 5 天进行辐射。照射条件为 7.50 Gy, 180 mV, 15 mA, 剂量率为 450 伦/分。各组于给药前、给药第 5 天、辐射后第 5 天、第 7 天分别尾静脉采血计白细胞数。计数方法同上。后称体重脱臼处死, 取脾脏称重, 计算脾脏系数。然后固定于 Bouin 氏液, 6h 后计脾脏表面造血灶 (CFU-S) 数。

3. 实验结果

由表 11 可以看出, 与 CTX 模型组比较, 各药物浓度组在给药第 5 天白

细胞已明显升高，且有显著性差异($P < 0.05$)，照射第 5 天细胞数最低，第 7 天开始恢复。给药组与模型组有显著性差异($P < 0.05$)。

表 11. rLZ-8 对 γ 射线辐射所致小鼠白细胞减少症模型预防作用的结果 ($\bar{x} \pm S$, $n=10$)

组别	给药前	给药第 5 天	辐射后第 5 天	辐射后第 7 天
正常对照组	11.5 ± 0.20	11.0 ± 0.25	10.8 ± 0.21	9.8 ± 0.11
模型组	11.5 ± 0.56	14.4 ± 0.71	0.30 ± 0.33	0.26 ± 0.33
金磊赛强组 3.2 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	11.4 ± 0.22	21.8 ± 0.35*	0.26 ± 0.20	0.22 ± 0.12
rLZ-8 5 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	10.3 ± 0.21	19.5 ± 0.32*	0.32 ± 0.18	0.53 ± 0.35*
rLZ-8 2.5 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	11.7 ± 0.39	12.8 ± 0.54*	0.32 ± 0.15	0.45 ± 0.20*
rLZ-8 1.25 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	10.4 ± 0.31	12.5 ± 0.45*	0.25 ± 0.11	0.46 ± 0.11*
rLZ-8 0.62 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	11.2 ± 0.91	10.7 ± 0.45*	0.16 ± 0.31	0.40 ± 0.12*

*与模型组比较, $p < 0.05$

5 实施例 11: γ 辐射所致小鼠白细胞减少症的治疗实验

1. 药物配制

重组灵芝免疫调节蛋白(rLZ-8)无菌生理盐水配制成 5 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、2.5 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、1.25 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、0.625 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量组, 0.2ml/只。

10 金磊赛强 (重组人粒细胞集落刺激因子注射液 (rhG-CSF)), 生产批号: 20060403; 150 μg /支。用无菌生理盐水配制成 3.2 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 0.2ml/只。

注射用环磷酰胺(CTX), 生产批号 07121821; 200mg/支。用无菌生理水配制成 12.5mg $\cdot\text{kg}^{-1}$, 0.2ml/只。

2. 实验方法:

15 实验动物分成 7 组, 每组 10 只, 雌雄各半。除正常对照组外, 每组小鼠于辐射的同一天开始腹腔注射等体积的生理盐水、阳性药物 (金磊赛强)、不同剂量的 rLZ-8。照射条件为 7.50 Gy, 180 mV, 15 mA, 剂量率为 450 伦/分。各组动物分别于给药前、照射第 5、7、9 天尾静脉采血计白细胞数。照射后 7 天称体重脱臼处死, 取脾脏称重, 计算脾脏系数。然后固定于 Bouin 氏液, 20 6h 后计脾脏表面造血灶 (CFU-S) 数。

3. 实验结果:

由表 12 可以看出, 照射后第 7 天白细胞数最低, 第 9 天开始恢复, 且给药组与模型组有显著性差异($P < 0.05$)。

25 由表 13 可以看出, 各药物组均能促进脾脏增生, 脾脏系数、脾结节生成单位(CFU-S)明显高于模型组($P < 0.05$)。

表 12 rLZ-8 对 γ 射线辐射所致小鼠白细胞减少症模型治疗作用的结果. ($\bar{x} \pm S$, $n=10$)

组别	照射前	照射第 5 天	照射第 7 天	照射第 9 天
正常对照组	10.5 ± 0.20	11.0 ± 0.25	10.0 ± 0.25	12.8 ± 0.51
模型组	11.0 ± 0.56	0.7 ± 0.71	0.2 ± 0.71	0.61 ± 0.01
金磊赛强组	11.9 ± 0.22	0.68 ± 0.35	0.58 ± 0.35*	0.80 ± 0.11*

3.2 μg · kg ⁻¹				
rLZ-8 5 μg · kg ⁻¹	11.2 ± 0.21	0.84 ± 0.32*	0.31 ± 0.32*	0.90 ± 0.14*
rLZ-8 2.5 μg · kg ⁻¹	12.9 ± 0.39	0.69 ± 0.54	0.56 ± 0.54*	0.54 ± 0.13*
rLZ-8 1.25 μg · kg ⁻¹	9.6 ± 0.31	0.82 ± 0.45*	0.65 ± 0.45*	0.70 ± 0.12*
rLZ-8 0.62 μg · kg ⁻¹	10.4 ± 0.91	0.73 ± 0.43*	0.26 ± 0.43*	0.64 ± 0.01

*与模型组比较, p<0.05

表 13. rLZ-8 对 γ 射线辐射所致小鼠白细胞减少症模型脾脏结节数的影响 (x̄ ± S, n=10)

5

组别	脾结节数	脾脏系数	增长率
模型组	4.4 ± 0.10	0.17 ± 0.11	
金磊赛强组	6.0 ± 0.11*	0.20 ± 0.10*	26%
3.2 μg · kg ⁻¹			
rLZ-8 5 μg · kg ⁻¹	9.7 ± 0.16*	0.22 ± 0.09	54%
rLZ-8 2.5 μg · kg ⁻¹	14.3 ± 0.03*	0.52 ± 0.12*	69%
rLZ-8 1.25 μg · kg ⁻¹	6.3 ± 0.21*	0.24 ± 0.13	30%
rLZ-8 0.62 μg · kg ⁻¹	8.9 ± 0.41*	0.50 ± 0.10*	50%

*与模型组比较, p<0.01

实施例 12: rLZ-8 的系统性过敏反应实验

1. 试剂

10 rLZ-8 用生理盐水配制成 700 μg · ml⁻¹, 氢氧化铝悬液(佐剂)用 PBS 配成 15mg · ml⁻¹, 牛血清白蛋白(BSA), 卵白蛋白(OA)。

2. 实验方法

15 15 周龄雄性小鼠 18—22g, 40 只, 放置于无热源环境。将实验对象分为正常对照组, rLZ-8 药物组 1, rLZ-8 药物组 2, 阳性对照组。rLZ-8 药物组 1, 给予 rLZ-8 0.1ml/10g 体重, 腹腔注射, 2 次/周, 共给药 6 次。在给药 2 次后致敏: 将 1mg BSA 与 15mg · ml⁻¹氢氧化铝悬液 0.2ml 混合, 腹腔注射致敏小鼠。致敏后第 17 天以 1mg BSA 加入 0.2ml PBS, 尾静脉注射小鼠, 观察过敏反应。正常对照组给予等量生理盐水代替 rLZ-8。rLZ-8 药物组 2, 在致敏后第 17 天给予 BSA- rLZ-8 混合液(rLZ-8 70 μg · ml⁻¹ 与 BSA 5mg · ml⁻¹, 用 PBS 配制)静脉注射 0.1ml · 10g⁻¹ 体重。阳性对照组, 致敏后第 17 天用 1mg OA 代替 BSA 尾静脉注射小鼠。观察标准: 小鼠给予静脉注射 BSA 30min 后观察全身过敏反应。阳性反应标准: 小鼠抽搐、活动减少或死亡; 阴性反应, 小鼠活动正常。

3. 实验结果

25 表 14 所示: rLZ-8 能够抑制牛血清白蛋白 (BSA) 诱导的小鼠的系统性过敏反应; rLZ-8 与休克剂量的 BSA 同时注射则不能阻止系统性过敏反应的发生。

表 14 rLZ-8 对 BSA 诱导小鼠系统性过敏反应影响的实验结果

分组	致敏注射	休克注射	灵芝蛋白	结果
----	------	------	------	----

			治疗	过敏只数/总只数	死亡只数/总只数
正常对照组	BSA 腹腔注射(i.p.)	BSA 静脉注射(i.v.)	-	10/10	1/10
阳性对照组	BSA 腹腔注射(i.p.)	OA 静脉注射(i.v.)	-	0/10	0/10
rLZ-8 药物组 1	BSA 腹腔注射(i.p.)	BSA 静脉注射(i.v.)	+	5/10	0/10
rLZ-8 药物组 2	BSA 腹腔注射(i.p.)	BSA-rLZ-8 静脉注射(i.v.)	+	9/10	0/10

实施例 13: rLZ-8 的溶血实验

1. 试剂

rLZ-8 用 5% 葡萄糖溶液配制成 $1\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$; 血细胞悬液配制: 人血 4ml, 1000r/min 离心 10min, 去上清。将红细胞沉淀加入 5% 葡萄糖溶液约 10 倍量, 摇匀, 1000r/min 离心 20min, 去上清, 重复洗涤 2-3 次, 至上清液不显红色为止。将所得红细胞用 5% 葡萄糖溶液配成 2% 的混悬液, 供实验用。

2. 实验方法

取洁净的试管 28 只, 进行编号。1-5 号为 rLZ-8 药物组, 6 号管为阴性对照组 (5% 葡萄糖溶液), 7 号管为阳性对照管 (蒸馏水)。共设 4 组平行对照管。依次加入 2% 红细胞悬液、5% 葡萄糖或蒸馏水, 混匀后, 立即置 $37^{\circ}\text{C}\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 的恒温箱中温育。开始每隔 15min 观察 1 次, 1h 后每隔 1h 观察 1 次, 共 3 小时。结束后将各管中的溶液置入干燥离心管中离心, 1500r/min, 25min。取上清, 在分光光度计 545nm 处, 以蒸馏水为空白读取各管 OD 值, 计算溶血率。

3. 实验结果

由表 15 可以看出, 1-5 组 rLZ-8 药物组溶血率均小于 5%, 可以说明未出现溶血反应。

表 15 rLZ-8 对人红细胞致溶作用的实验结果 ($\bar{x}\pm s$, n=4)

试管编号	1	2	3	4	5	6	7
溶血率 (%)	0.70 ± 0.03	0.74 ± 0.04	0.63 ± 0.04	0.65 ± 0.04	0.59 ± 0.07	0.52 ± 0.08	100 ± 0.00

实施例 14: rLZ-8 对大鼠骨髓像的影响

1. 实验材料

Wister 大鼠 9 只, 100g 左右。rLZ-8 用无菌生理盐水配制。分为 $60\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、 $30\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、 $15\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组。

2. 实验方法

正常对照组 3 只, 蛋白低剂量组 2 只, 蛋白中剂量组 2 只, 蛋白高剂量组 2 只。rLZ-8 药物组大鼠, 分别给予不同剂量的 rLZ-8 尾静脉注射, 1 次/日; 对照组给予等量生理盐水。给药第七天, 取右侧大腿骨髓涂片。

3. 实验结果

图 11 表明, 大鼠骨髓像涂片与正常对照组比较未见异常。

实施例 15: rLZ-8 对人红细胞凝聚作用的影响

1. 试剂

A 型、B 型、O 型和 AB 型血各 2ml 分别来源于健康志愿者；绵羊红细胞(sheep red cell)2ml。将上述红细胞 $1200\text{ g}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10min，弃上清，用 5ml PBS 洗涤，重复上述操作 3-5 次，然后用 0.01 mol/L PBS 配制成 1.5% 悬液。rLZ-8 用生理盐水配置，使其终浓度分别为 $50\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ， $25\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ， $12.5\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ， $6.25\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ， $3.13\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ， $1.56\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ， $0.78\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ， $0.39\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ， $0.20\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ， $0.10\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ， $0.05\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ， $0.03\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 。植物凝集素(PHA)配制同上。

2. 实验方法

将实验对象分为 rLZ-8 各浓度组、阳性药对照组，正常对照组。96 孔微量血凝板中加入 A 型 1.5% 红细胞 $25\mu\text{l}$ /孔，再加入 0.2% 明胶， $75\mu\text{l}$ /孔。药物组分别加不同浓度 rLZ-8，其终浓度如上所述；阳性药对照组 PHA $25\mu\text{l}$ /孔；正常对照组 PBS $25\mu\text{l}$ /孔。每组设 6 个平行对照。室温下振荡 30s， 37°C 培养箱，1 小时后开始观察。B 型、AB 型、O 型及绵羊红细胞实验方法同上。

3. 试验结果

由表 16 所示，阳性对照药 PHA 对人四种红细胞及绵羊红细胞均具有凝集作用；rLZ-8 对人四种红细胞无凝集作用，而在 $12.5\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ - $50\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 浓度时对绵羊红细胞表现出凝集活性。

表 16 rLZ-8 对人四种型别红细胞凝集作用实验结果

分组	正常组	rLZ-8 药物组 ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)											
		50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	0.20	0.10	0.05	0.03
A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
绵羊红细胞	-	+++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

实施例 16: 重组灵芝免疫调节蛋白抗肿瘤组合物制剂

- 通过上述药理实验证明，重组灵芝免疫调节蛋白 rLZ-8 的抗肿瘤作用和提高白细胞水平的效果是显著的，而且无毒副作用，因此。可以认为重组灵芝免疫调节蛋白 rLZ-8 适于药物使用而且是安全的。
- 本发明的重组灵芝免疫调节蛋白 rLZ-8 作为抗肿瘤药物的应用可以通过口服和非肠道给药。服用的剂量由症状、年龄、体重等因素决定。对成年人来说，口服，每人每剂 10-1000mg，每日数次；非肠道给药 10-100mg，每日数次。
- 本发明口服药包片剂、丸剂胶囊（包括硬胶囊和软胶囊），这些剂型包括重组灵芝免疫调节蛋白 rLZ-8 和至少一种惰性稀释剂（例如乳糖、甘露

糖醇、葡萄糖、淀粉、聚乙烯吡咯烷酮)也可以加入惰性稀释剂以外的药
物学上可以接受的添加物如润滑剂、崩解剂、稳定剂。如果需要,片剂或
丸剂可用胃溶或肠溶材料涂敷上一层或一层以上的膜。非肠道用注射剂包
括重组灵芝免疫调节蛋白 rLZ-8 和至少一种惰性水稀释剂(如注射用蒸馏
5 水、生理盐水),也可以将重组灵芝免疫调节蛋白 rLZ-8 制成冻干粉,使
用前将其溶解于惰性水稀释剂供注射用。

(1) 制剂例 1

取重组灵芝免疫调节蛋白 rLZ-8 1000mg,溶于 100ml 无菌生理盐水中,
混合均匀后,分装成 rLZ-8 10mg/ml/支浓度的注射液于药瓶中,密封,灭菌
10 制成产品。其他项目应符合中华人民共和国药典 2005 年版注射液项下要求。

(2) 制剂例 2

取重组灵芝免疫调节蛋白 rLZ-8 100g,,药用淀粉 0.5kg 按公知的胶囊制
备技术和设备制成胶囊,rlz8 10mg/粒。其他项目应符合中华人民共和国药典
15 2005 年版胶囊项下要求。

(3) 制剂例 3

取重组灵芝免疫调节蛋白 rLZ-8 100g,微晶纤维素 560g,无水乳糖
380g,硬脂酸镁 200g,按公知的制片技术和设备制成片剂,rLZ-8 10mg/片。
其他项目应符合中华人民共和国药典 2005 年版片剂项下要求。

(4) 制剂例 4

20 取重组灵芝免疫调节蛋白 rLZ-8 适量,中华人民共和国药典 2005 年口
服液项下要求,按公知的制片技术和设备制口服液。

工业应用性

25 本发明结果表明,基因重组灵芝免疫调节蛋白具有明显的治疗及预防
由多种原因导致的白细胞减少症,在临床应用剂量、治疗效果及临床不适
症等方面均优于现有的临床应用药物。动物实验表明,基因重组灵芝免疫
调节蛋白的副作用远低于重组集落细胞刺激因子。

30 发明人利用毕赤酵母真核表达系统表达了灵芝免疫调节蛋白;在国际
同类研究中,我们第一次实现了 100 升 rLZ-8 的发酵生产,并且建立了完
整的生产及纯化工艺方案;第一次完成了 rLZ-8 空间结构的测定工作,为
深入研究 rLZ-8 抗肿瘤机制打下了坚实的基础。

35 发明人创新性发现 rLZ-8 可以提升实验动物淋巴细胞低下模型的白
细胞数量,且药效学作用明显强于集落刺激因子;rLZ-8 可以诱导白血病细
胞 NB4、K562 和 HL-60 发生细胞凋亡,这也是我们第一次阐明了真菌免
疫调节蛋白杀伤肿瘤细胞的另一可能途径。荷瘤小鼠治疗实验进一步表明,
rLZ-8 可以有效的抑制移植性肿瘤在体内的生长;安全性实验表明,rLZ-8
对大鼠血细胞无明显毒性;对主动脉、主静脉血管壁未见病理性破坏作用;
骨髓涂片结果表明对造血机能也无病变作用。本发明首次公开了 LZ-8 的
40 晶体空间结构;公开了 LZ-8 可以直接杀伤肿瘤细胞而对正常细胞没有破
坏作用;公开了 LZ-8 对预防及治疗多种原因导致的白细胞减少症的新用
途。

权利要求

1. 一种由核苷酸序列 (SEQ1) 所编码的具有特定空间结构的重组灵芝免疫调节蛋白 (rLZ-8), 该蛋白在制备用于抗肿瘤、升高白细胞和抑制免疫排斥反应等药物中的用途。
- 5
2. 根据权利要求 1 所述的用途, 所述重组灵芝免疫调节蛋白 (rLZ-8) 的核苷酸序列(SEQ1)是: ATGTCTGATACTGCTTTGATCTTCAGAT
TGGCTTGGGATGTTAAGAAGTTGTCTTTTGATTACACTCCAACTG
GGTAGAGGTAACCCAAACAACCTTCATTGATACTGTTACTTTTCCT
10 AAGGTTTTGACTGATAAGGCTTACACTTACAGAGTTGCTGTTTCTG
GTAGAACTTGGGTGTTAAGCCATCTTACGCTGTTGAATCTGATGG
TTCTCAAAGGTTAACTTCTTGAATACAACCTCTGGTTACGGTATT
GCTGATACTAACACTATTCAAGTTTTTCGTTGTTGATCCAGATACTAA
CAACGATTCATTATCGCTCAATGGAAGTAGTAA;
- 15 所述重组灵芝免疫调节蛋白(rLZ-8)的蛋白序列是:
MSDTALIFRLAWDVKKLSFDYTPNWGRGNPNNFIDTVTFPKVLTDK
AYTYRVAVSGRNLGVKPSYAVESDGSQKVNFLYNSGYGIADTNTIQ
VF VVDPDTNNDFIIAQWN;
- 所述重组灵芝免疫调节蛋白(rLZ-8)的高级结构是: rLZ-8 的蛋白结
20 构包括一个 N-端的形成二聚体所需的重要结构域和一个 C 端的 FNIII
结构域, rLZ-8 的 N-端结构域由一个 α -helix (序列为 2-SDTALIFRLA
WDVK- 15, 14 个氨基酸组成) 和 β -strand (序列为 16-KLSFD-20, 5 个
氨基酸组成), 其中在 α -helix 上的 Ser 的残基被乙酰化封闭, Lz-8 单体
上的 N 端 α -helix 和 β -strand 与另一单体上相同的结构域通过空间交换
25 形成了重要的二聚体结合结构域, 呈哑铃状, C-端的 FNIII 结构域属于
免疫球蛋白三明治结构, 包含 β -sheet I 和 β - sheet II 两个结构, 二者
分别由 β -strands A-B-E 和 β -strands G-F -C-D 形成, 其中的 β -strand 序
列为: A. 21-TPNW GRG-27; B. 34-IDTVTFP-39; C. 48-YTYRVAV-54; D.
57-RNLGVK P-63; E. 72 -SQKVN-76; F. 91-TIQVFV VD PD-100; G.
30 102-NNDFIIAQW-110。
3. 根据权利要求 1 所述的用途, 所述的肿瘤是: 血癌, 肺癌, 胰腺癌, 肝癌, 肠癌, 淋巴瘤, 前列腺癌, 子宫癌, 骨癌, 乳腺癌等肿瘤。
4. 根据权利要求 1 所述的用途, 升高白细胞作用相关适应症可以是癌症化疗、放疗等原因导致中性粒细胞减少症。
- 35 5. 根据权利要求 4 所述的用途, 升高白细胞作用相关适应症可以是骨髓移

植后的中性粒细胞减少症或骨髓发育不良综合征引起的中性粒细胞减少症或骨髓增生异常综合征伴中性粒细胞减少症。

6. 根据权利要求 4 所述的用途, 升高白细胞作用相关适应症可以是再生障碍性贫血引起的中性粒细胞减少症或先天性、特发性中性粒细胞减少症或周期性中性粒细胞减少症。
7. 根据权利要求 4 所述的用途, 升高白细胞作用相关适应症可以是化学中毒、受辐射所导致的白细胞减少症。
8. 根据权利要求 4 所述的用途, 升高白细胞作用相关适应症可以是由传染病引起的白细胞减少症, 包括伤害、病毒感染、支原体肺炎、传染性肺炎、粟粒性肺结核等。
9. 根据权利要求 4 所述的用途, 升高白细胞作用相关适应症可以是由常规用药引起的白细胞减少症, 所述常规用药包括使用青霉素类、头孢菌素类、氨基糖苷类、大环内酯类、氯霉素类、林可酰胺类、多肽类等抗生素药物及治疗甲亢的药物、治疗糖尿病的药物。
10. 根据权利要求 1 所述的用途, 其中预防白细胞减少作用适用于在癌症化疗、放疗或骨髓移植前使用, 并且预防由这些治疗手段导致的白细胞减少症。
11. 根据权利要求 1 所述的用途, 其中抑制免疫排斥反应, 其特征为抑制由器官移植引起的免疫排斥反应, 可以有效的进行抗原覆盖, 抑制整个抗原递呈过程。
12. 根据权利要求 10 所述的用途, 抑制免疫排斥反应的适应症可以是肝移植、肾移植后引起的免疫排斥反应症或肝移植、肾移植后引起的免疫排斥反应对传统免疫抑制剂的耐药症。
13. 一种包含权利要求 1 所述的重组灵芝免疫调节蛋白(rLZ-8)和任选的药学可接受的辅剂的药物组合物。
14. 根据权利要求 13 所述的药物组合物, 其可以通过口服和非肠道给药。
15. 根据权利要求 13 所述的药物组合物, 其中口服药包括口服药、片剂丸剂和胶囊。
16. 根据权利要求 13 所述的药物组合物, 其中非肠道给药包括外用和注射剂。
17. 根据权利要求 13 所述的药物组合物, 其中注射剂型包括冻干粉针剂和水针剂。

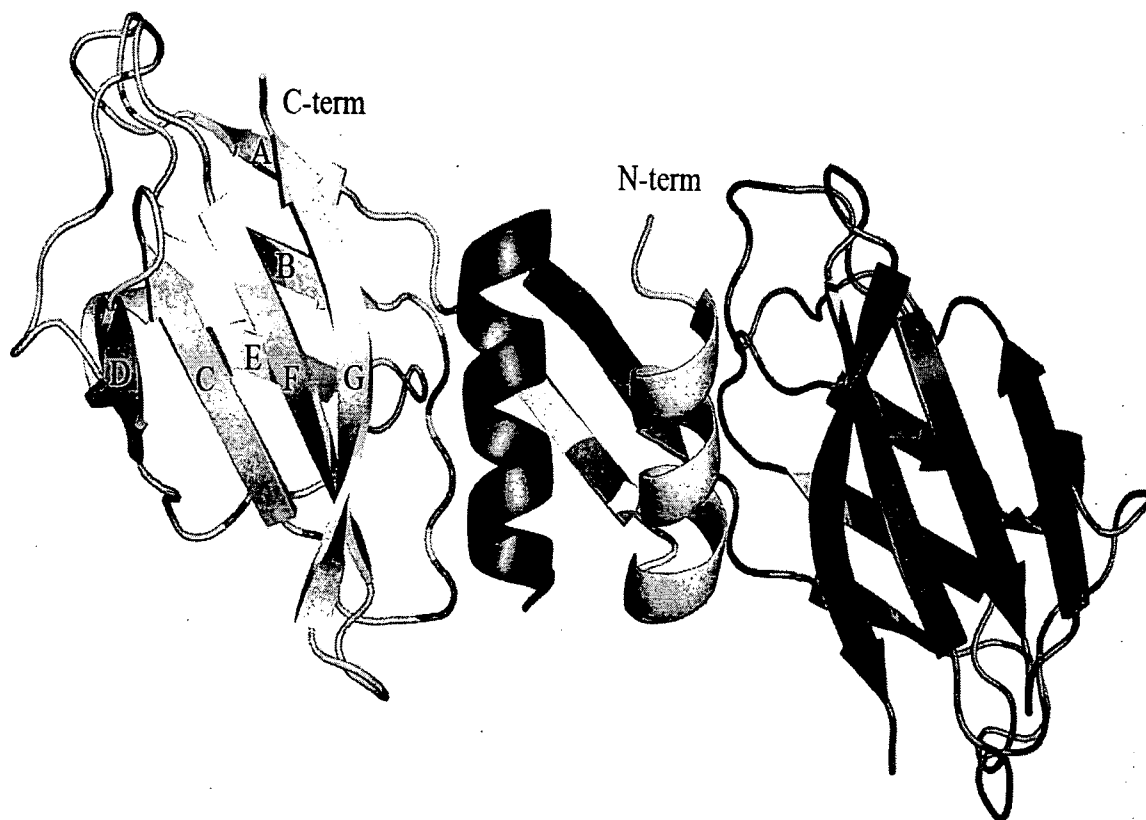


图 1. rLZ-8 的晶体结构示意图

图注 1: 蓝、黄两种颜色各表示一个 rLZ-8 单体

图注 2: A、B、C、D、E、F、G 分别表示七条 β -strand

图注 3: C-term 和 N-term 分别表示 rLZ-8 的 C-末端和 N-末端

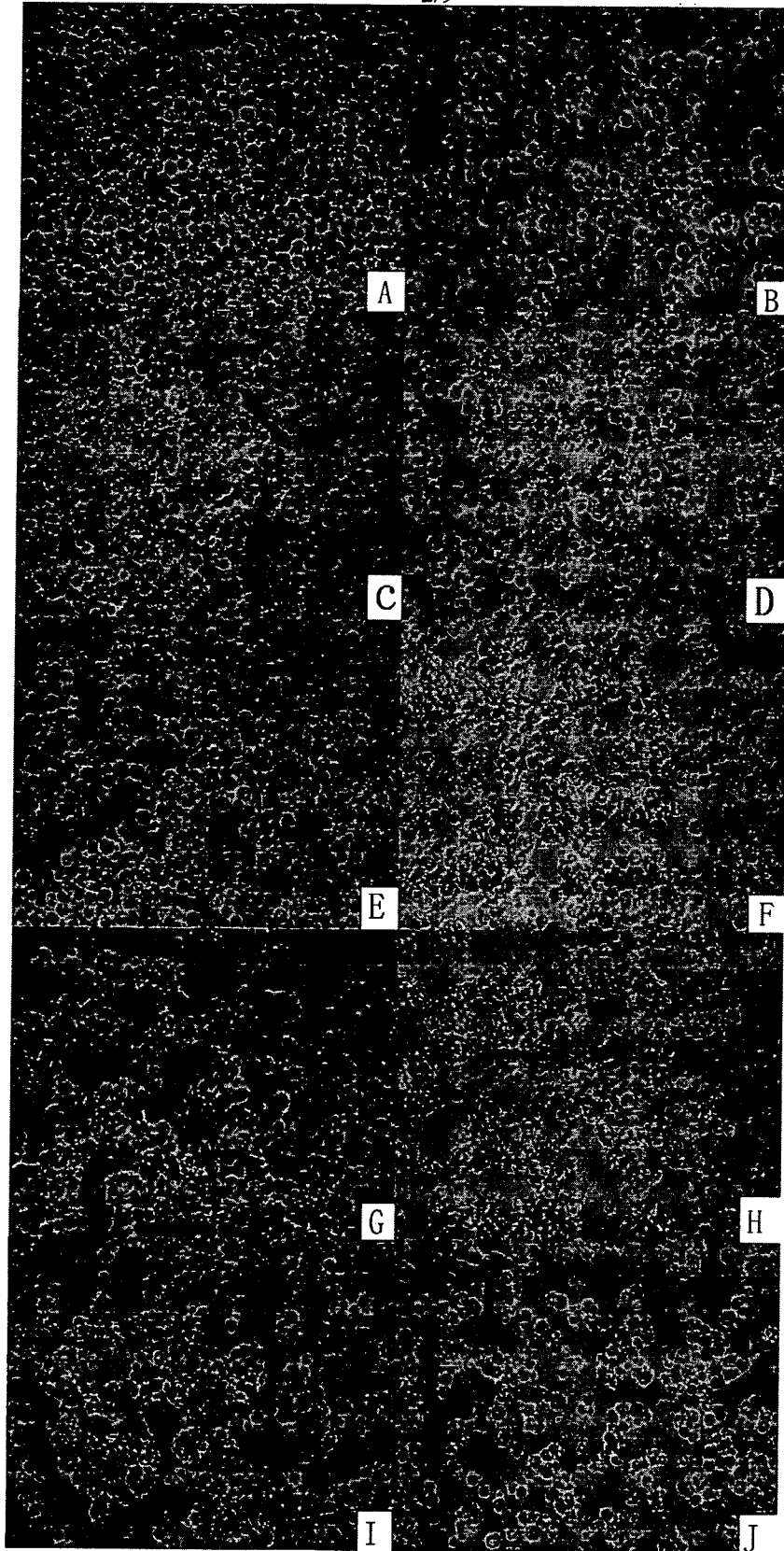


图 2. rLZ-8 对 NB4 肿瘤细胞体外杀伤实验结果

图注: A: 正常对照组; B: 阳性药物对照组; C-J: 依次为 rLZ-8 给药组, 剂量分别为 $0.78\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $1.56\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $3.125\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $6.25\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $12.5\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $25\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $50\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $100\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$

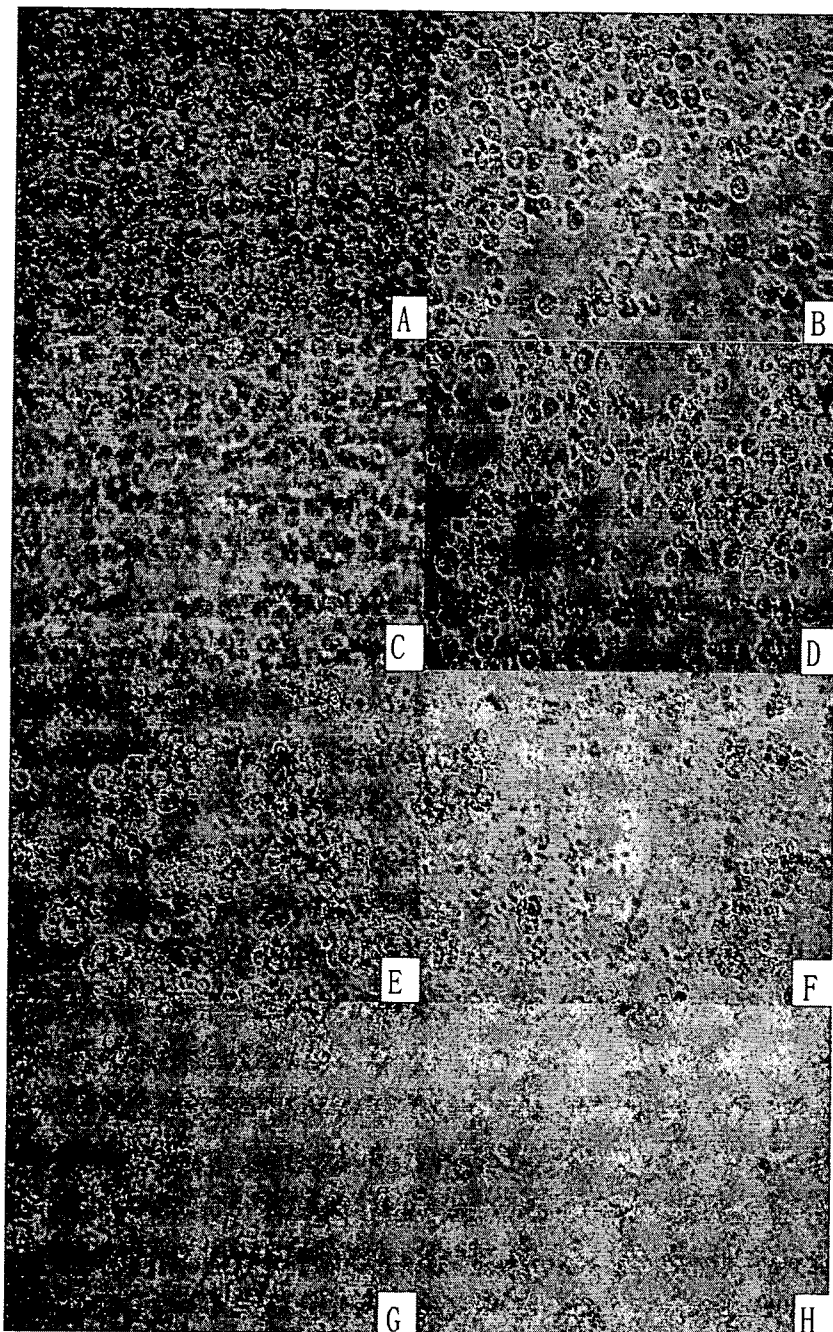
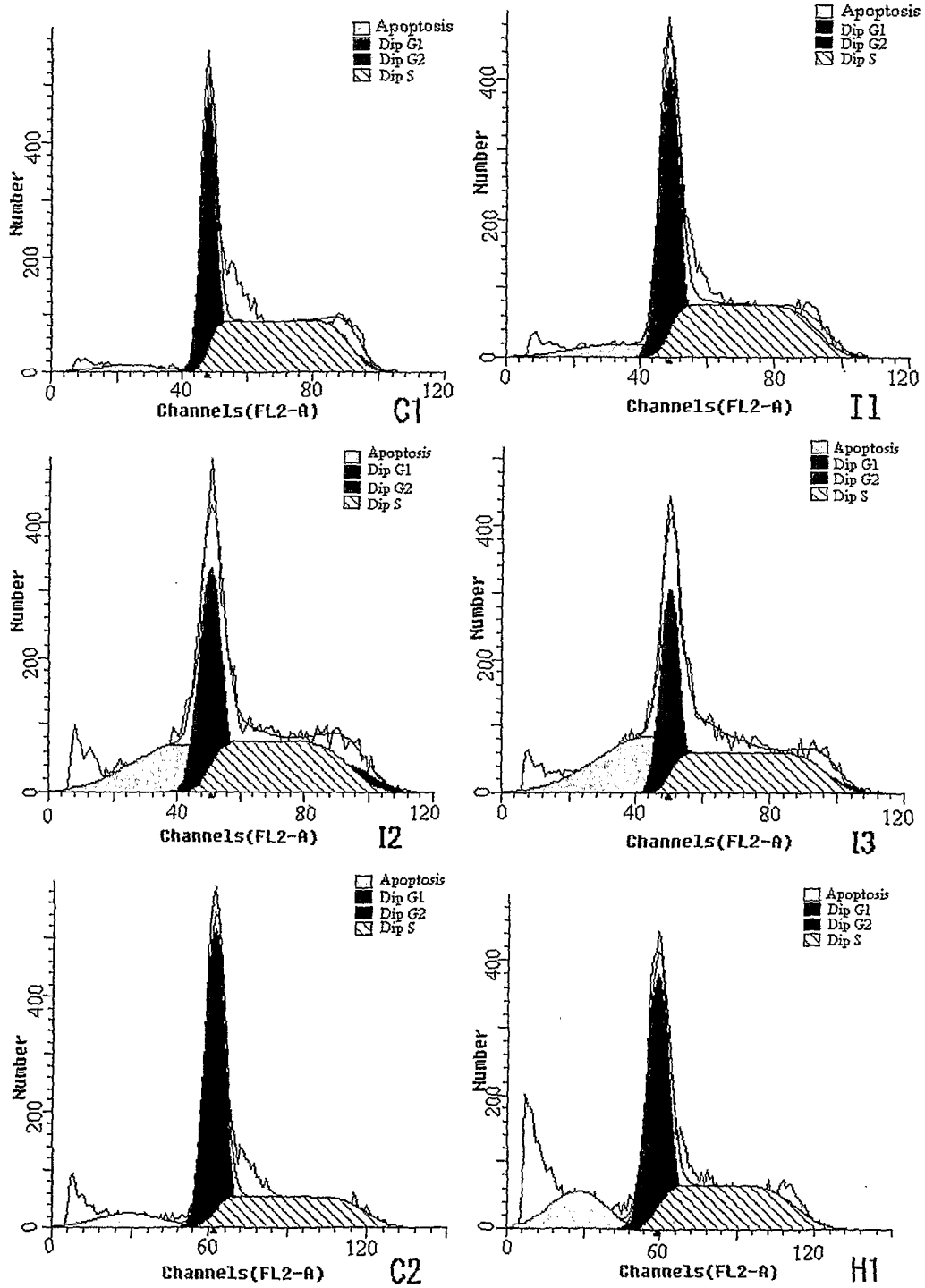


图 3. rLZ-8 对 K562 肿瘤细胞体外杀伤实验结果

图注: A: 正常对照组; B: 阳性药物对照组; C-H: 依次为各 rLZ-8 给药组, $3.125\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $6.25\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $12.5\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $25\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $50\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $100\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$



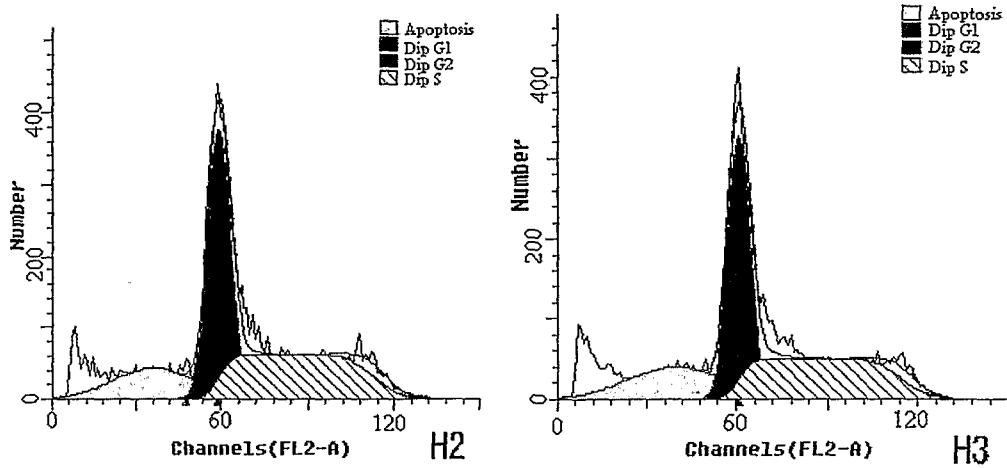
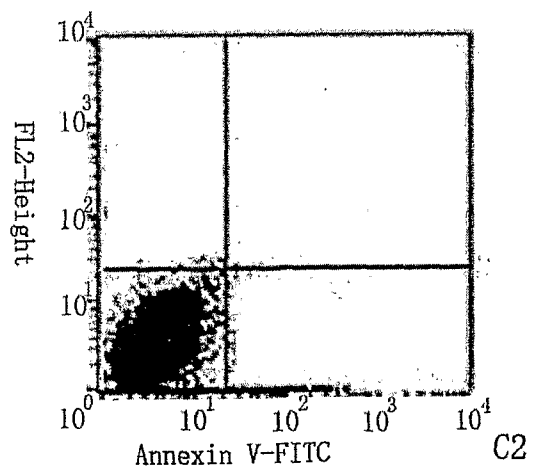
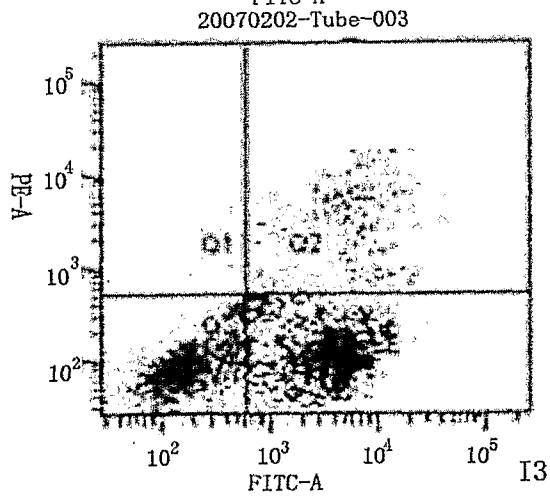
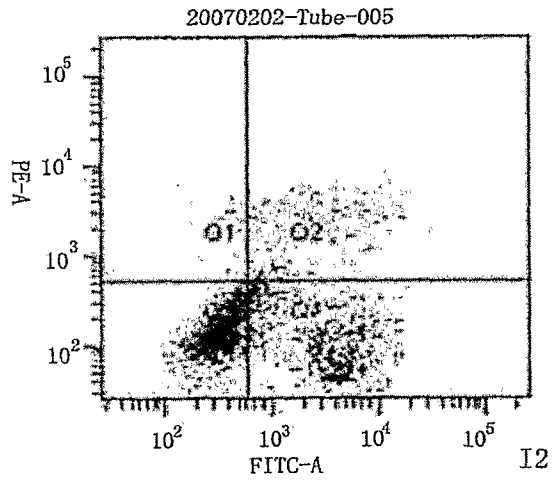
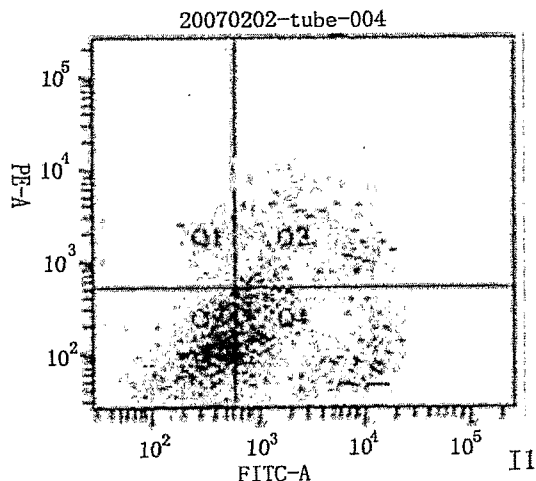
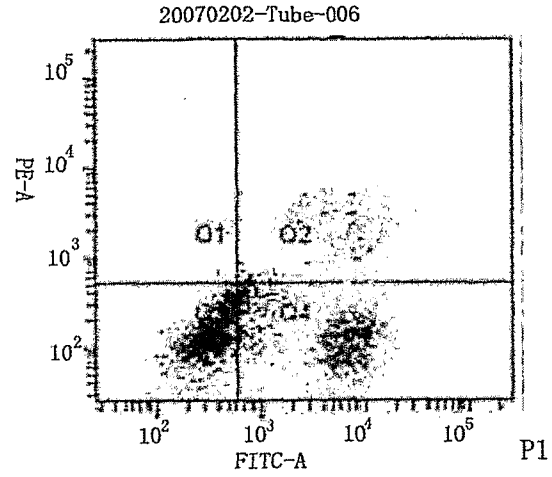
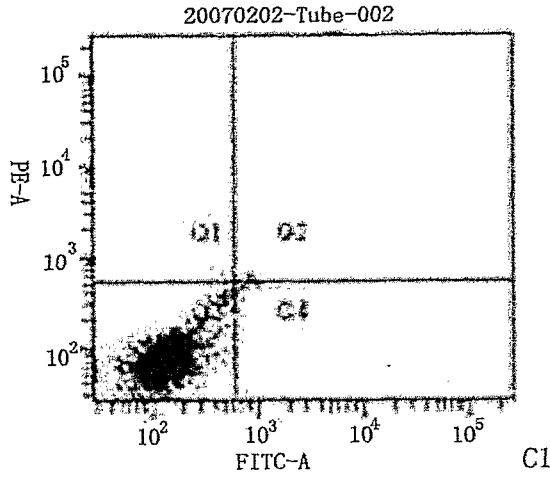


图4 rLZ-8 诱导 K562 和 NB4 细胞凋亡的 PI 单染检测结果

图注 1: C1: K562 正常对照组; I1: rLZ-8 给药剂量组 (K562, 0.1 μ g/ml); I2: rLZ-8 给药剂量组 (K562, 0.5 μ g/ml); I3: rLZ-8 给药剂量组 (K562, 2.5 μ g/ml)

图注 2: C2: NB4 正常对照组; I1: rLZ-8 给药剂量组 (NB4, 0.1 μ g/ml); I2: rLZ-8 给药剂量组 (NB4, 0.5 μ g/ml); I3: rLZ-8 给药剂量组 (NB4, 2.5 μ g/ml)



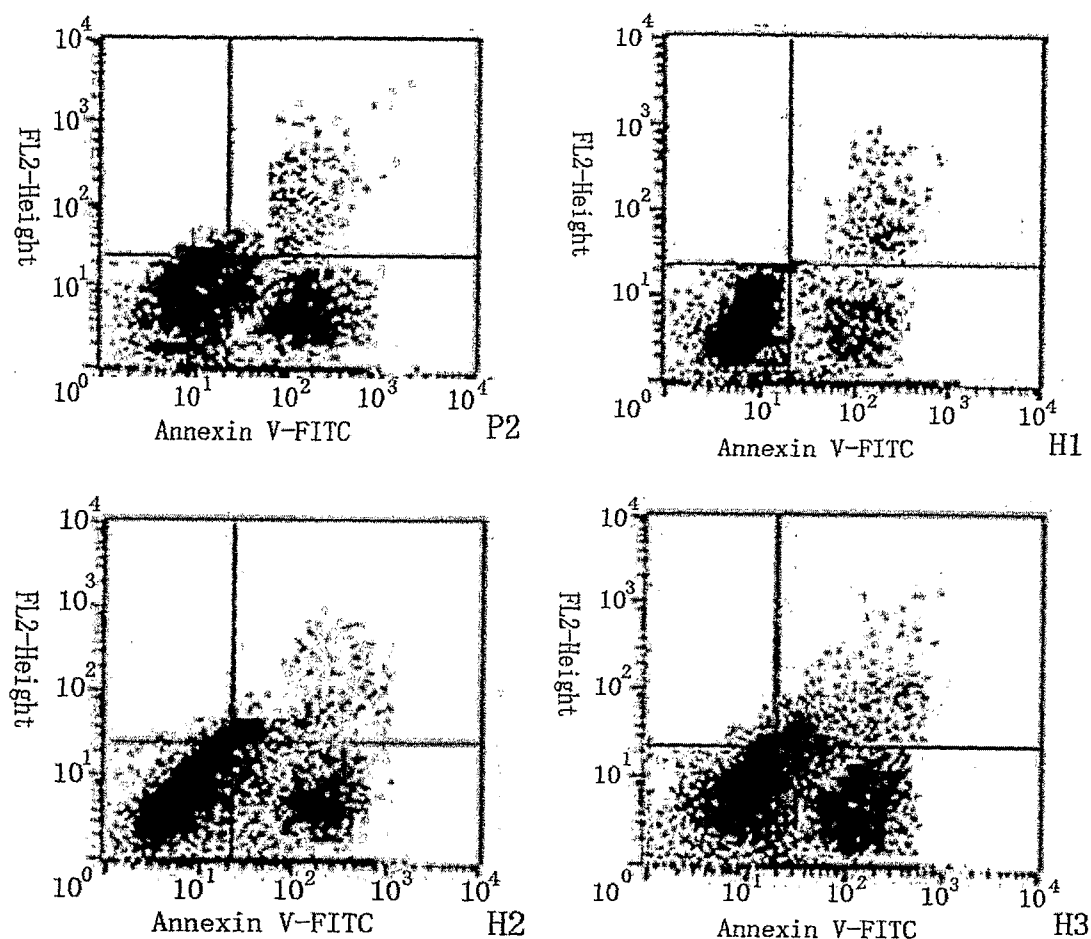


图 5. rLZ-8 诱导 NB4 和 HL-60 细胞凋亡的 Annexin V/PI 双染检测结果

图注 1: C1: NB4 正常对照组; P1: 阳性药物组; I1: rLZ-8 给药剂量组 (NB4, 0.1 μ g/ml); I2: rLZ-8 给药剂量组 (NB4, 0.5 μ g/ml); I3: rLZ-8 给药剂量组 (NB4, 2.5 μ g/ml)

图注 2: C2: HL-60 正常对照组; P2: 阳性药物组; H1: rLZ-8 给药剂量组 (HL-60, 0.1 μ g/ml); H2: rLZ-8 给药剂量组 (HL-60, 0.5 μ g/ml); H3: rLZ-8 给药剂量组 (HL-60, 2.5 μ g/ml)

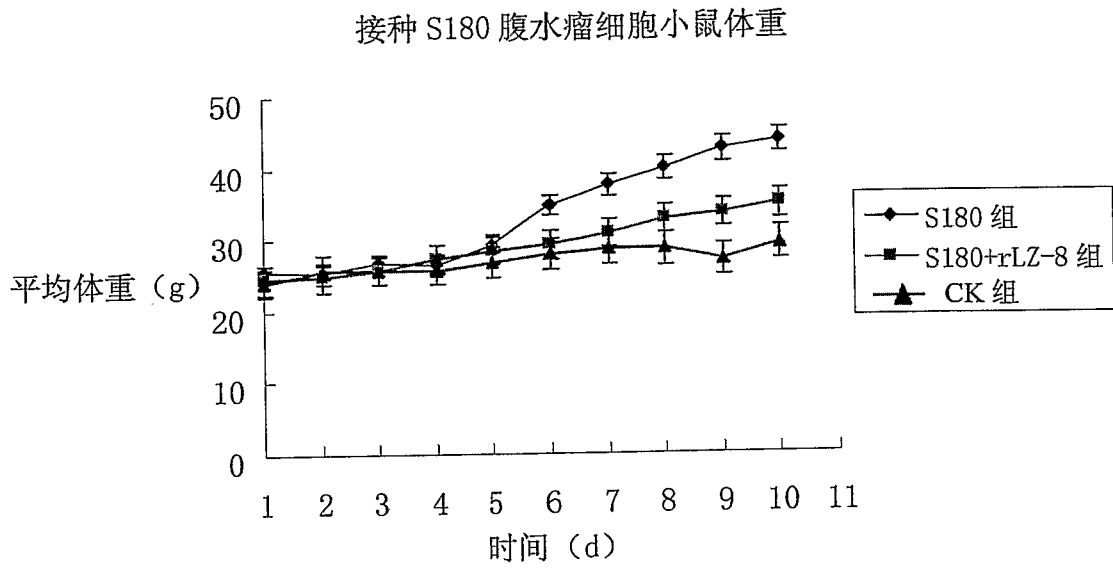


图 6 接种 S180 艾氏腹水瘤细胞小鼠的体重变化实验结果

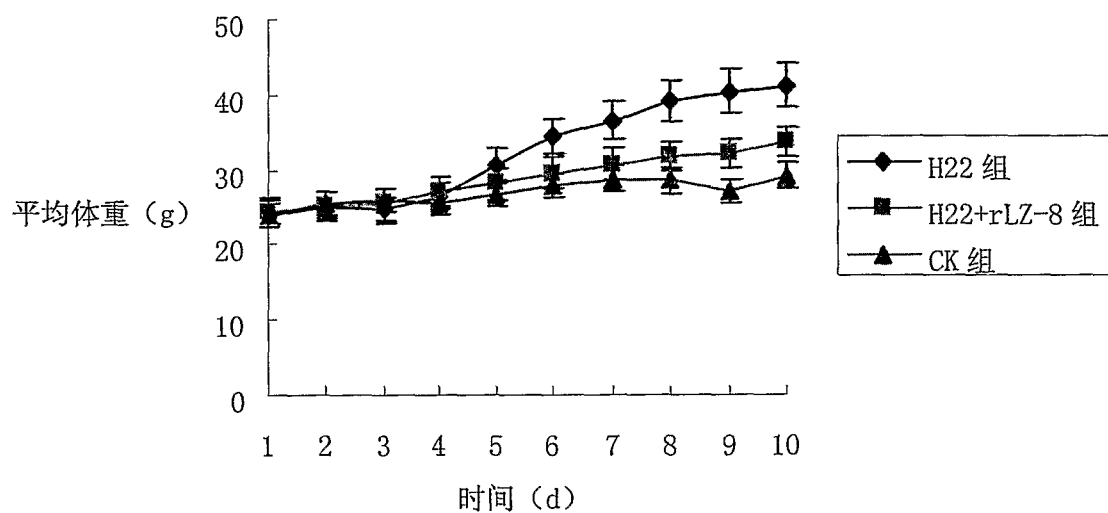


图 7 接种 H22 移植性肿瘤细胞小鼠体重变化实验结果

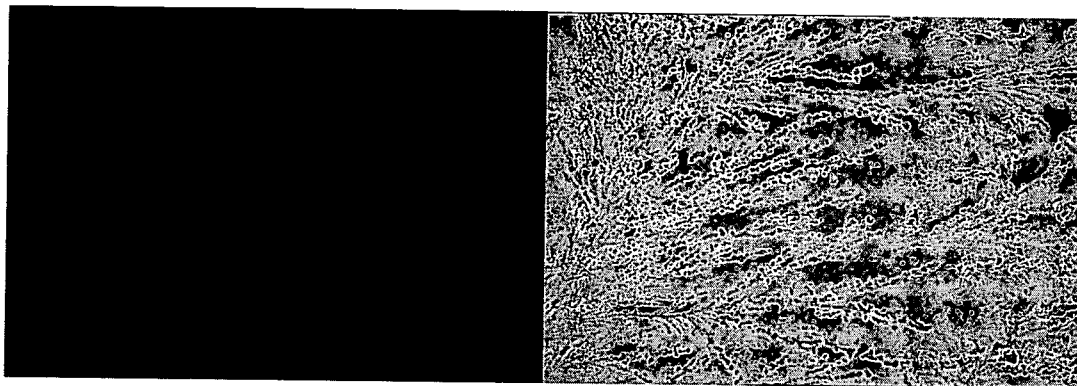


图 8. FITC-rLZ-8 对大鼠心肌组织标记的实验结果 (暗、明场)

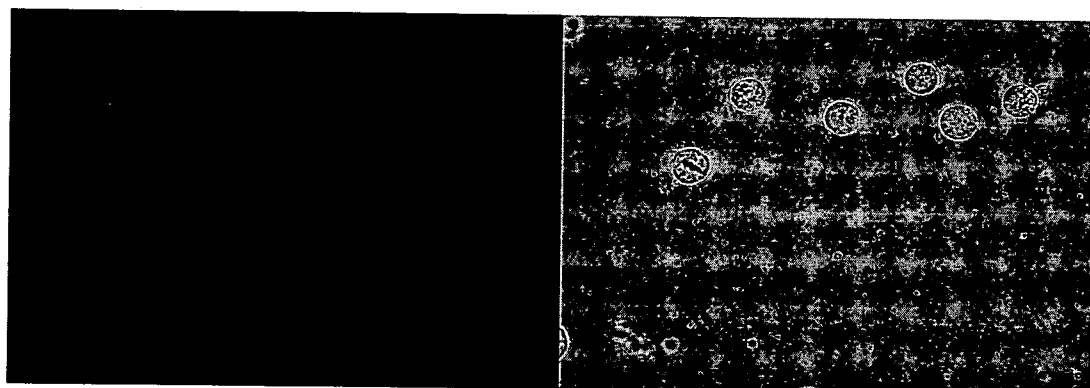


图 9. FITC-rLZ-8 对兔软骨细胞标记的实验结果 (暗、明场)

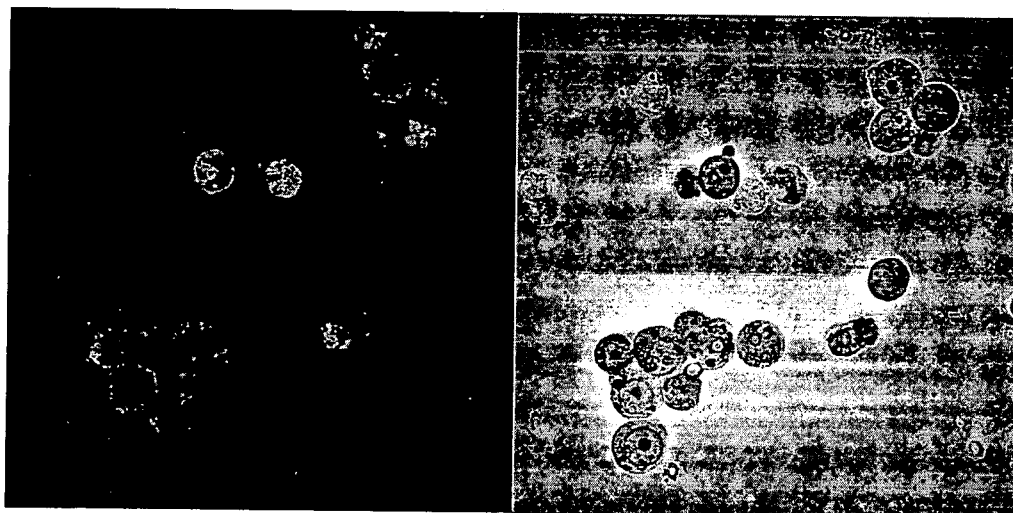


图 10. FITC-rLZ-8 对 HL-60 细胞标记的实验结果 (暗、明场)

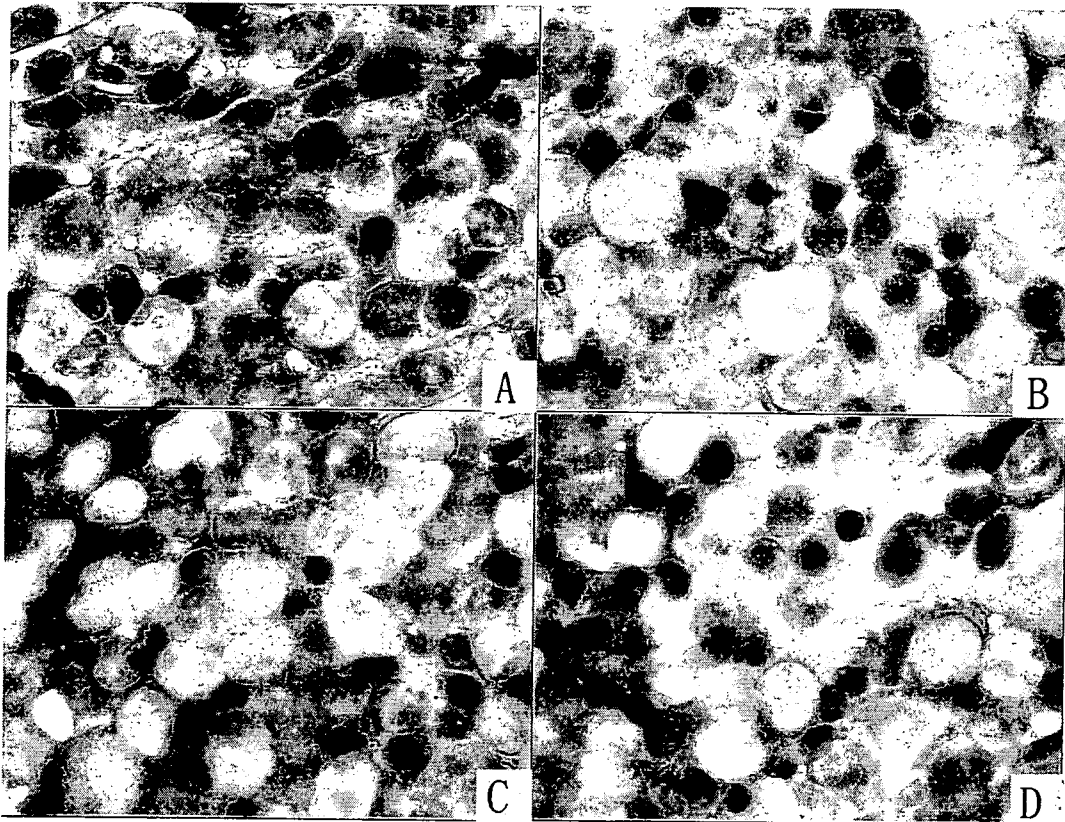


图 11. 大鼠骨髓涂片结果

图注: A: 正常对照组; B: rLZ-8 给药组 ($15 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$); C: rLZ-8 给药组 ($30 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$); D: rLZ-8 给药组 ($60 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2008/002142

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <p style="text-align: center;">See extra sheet</p> <p>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>		
B. FIELDS SEARCHED <p>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)</p> <p style="text-align: center;">IPC: A61K; A61P; C07K</p> <p>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched</p> <p>Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)</p> <p>CPRS; CNKI; WPI; EPODOC; PAJ; MEDLINE and keywords: fungal, Ganoderma, immunomodulatory protein, LZ-8, Ling Zhi 8, FIP-gts etc.</p> <p style="text-align: center;">EMBL; GenBank: Sequence search on amino acid sequence of rLZ-8.</p>		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LIN, Z. P. et al. Structure and function study of fungal immunomodulatory protein (FIP). Journal of Liaoning Normal University (Natural Science Edition). March 2006, vol. 29, No. 1, pages 84-87, ISSN 1000-1735 table 1 and figure 1, page 85, paragraph 4	1-2, 7-17
Y	table 1 and figure 1, page 85, paragraph 4	1-12
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:	“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention “X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone “Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art “&” document member of the same patent family	
“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date “L” document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
24 Mar. 2009(24.03.2009)	09 Apr. 2009 (09.04.2009)	
Name and mailing address of the ISA/CN The State Intellectual Property Office, the P.R.China 6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing, China 100088 Facsimile No. 86-10-62019451	Authorized officer LIN, Junkai Telephone No. (86-10)62411095	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2008/002142

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	CN 1939532 A (YISHENG BIO TECH DEV CO LTD) 04 Apr. 2007(04.04.2007)	
X	claims 1-10, page 5, line 26-page 8, line 29 of the description	13-17
Y	claims 1-10, page 5, line 26-page 8, line 29 and examples 9, 11 of the description	1-12
	JIN, B. Q. Cellular and Molecular Immunology. Second edition. Beijing: Science Press, 2001, ISBN 7-03-009578-2	
Y	pages 165-167	4-10
	JP 2124899 A (MEIJI MILK PROD CO LTD) 14 May 1990(14.05.1990)	
X	claims 1-2, 7	13-17
Y	claims 1-2, 7	1-12
	GUO, Q. et al. The progress of fungal immunomodulatory protein pharmacology. Anhui Medical and Pharmaceutical Journal. May 2007, vol. 11, No. 5, pages 385-387, ISSN 1009-6469	
X	page 385, left column, paragraph 2- page 386, left column, paragraph 2	1-2, 7-17
Y	page 385, left column, paragraph 2- page 386, left column, paragraph 2	1-12
	LIN, J. W. et al. The progress of fungal immunomodulatory protein. Chinese Journal of Immunology. 2005, vol. 21, No. 6, pages 477-480, ISSN 1000-484X	
X	figure 1 and table 2, page 478, right column, the last paragraph-page 479, left column, paragraph 1	1-2, 7-17
Y	figure 1 and table 2, page 478, right column, the last paragraph-page 479, left column, paragraph 1	1-12
	KINO, K. et al. Isolation and characterization of a new immunomodulatory protein, Ling Zhi-8 (LZ-8), from <i>Ganoderma lucidium</i> . The Journal of Biological Chemistry. 1989, vol. 264, No. 1, pages 472-478, ISSN 0021-9258	
X	abstract, page 473, left column, lines 18-19	13-17
Y	abstract	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2008/002142

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See extra sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

- Remark on protest**
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
 - The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
 - No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2008/002142

Continuation of: **Box No. III**

This Authority considers that there are 2 groups of inventions covered by the claims indicated as follows:

I: claims 1-12, directed to the use of the recombinant *Ganoderma lucidium* immunomodulatory protein (rLZ-8) for the manufacturing of a medicament for antitumor, increasing leukocyte and inhibiting immunological rejection;

II: claims 13-17, directed to the pharmaceutical composition comprising the recombinant *Ganoderma lucidium* immunomodulatory protein (rLZ-8).

The reasons for which the inventions are not so linked as to form a single general inventive concept, as required by Rule 13.1 PCT, are as follows: the common or corresponding technical feature of inventions I-II is the use of the recombinant *Ganoderma lucidium* immunomodulatory protein (rLZ-8) as medicament for treatment of diseases, however, the said technical feature has been disclosed by CN 1939532A (see claims 1-10 of the document). In conclusion, the two groups of claims are not linked by common or corresponding special technical features and define 2 groups of different inventions not linked by a single general inventive concept. The application, hence does not meet the requirements of unity of invention as defined in Rules 13.1 and 13.2 PCT.

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 38/16 (2006.01) i

A61P 35/00 (2006.01) i

A61P 37/02 (2006.01) i

A61P 37/06 (2006.01) i

C07K 14/375 (2006.01) n

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2008/002142

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 1939532 A	04.04.2007	US 2007071766 A1	29.03.2007
		EP 1800690 A2	27.06.2007
		JP 2007084547 A	05.04.2007
JP 2124899 A	14.05.1990	None	

A. 主题的分类		
参见附加页		
按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类		
B. 检索领域		
检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)		
IPC: A61K; A61P; C07K		
包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献		
在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))		
CPRS; CNKI 和关键词: 真菌, 灵芝, 免疫调节蛋白, LZ-8, FIP-gts 等; WPI; EPODOC; PAJ; MEDLINE 和关键词: fungal, Ganoderma, immunomodulatory protein, LZ-8, Ling Zhi 8, FIP-gts 等; EMBL; GenBank: 关于 rLZ-8 的氨基酸序列检索。		
C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	林忠平等, 真菌免疫调节蛋白(FIP)结构与功能研究, 辽宁师范大学学报(自然科学版), 3 月 2006, 第 29 卷, 第 1 期, 第 84-87 页, ISSN 1000-1735 表 1 和图 1, 第 85 页第 4 段	1-2, 7-17
Y	表 1 和图 1, 第 85 页第 4 段	1-12
X	CN 1939532 A (益生生技开发股份有限公司) 04.4 月 2007(04.04.2007) 权利要求 1-10, 说明书第 5 页第 26 行-第 8 页第 29 行	13-17
Y	权利要求 1-10, 说明书第 5 页第 26 行-第 8 页第 29 行和实施例 9 和 11	1-12
<input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在 C 栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期 24.3 月 2009(24.03.2009)		国际检索报告邮寄日期 09.4 月 2009 (09.04.2009)
中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088 传真号: (86-10)62019451		受权官员 林峻凯 电话号码: (86-10) 62411095

C(续). 相关文件		
类 型	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
Y	金伯泉, 细胞和分子免疫学, 第 2 版, 北京: 科学出版社, 2001 年, ISBN 7-03-009578-2 第 165-167 页	4-10
X	JP 2124899 A (MEIJI MILK PROD CO LTD) 14.5 月 1990(14.05.1990) 权利要求 1-2, 7	13-17
Y	权利要求 1-2, 7	1-12
X	郭琦等, 真菌免疫调节蛋白药理学研究进展, 安徽医药, 5 月 2007, 第 11 卷, 第 5 期, 第 385-387 页, ISSN 1009-6469 第 385 页左栏第 2 段-第 386 页左栏第 2 段	1-2, 7-17
Y	第 385 页左栏第 2 段-第 386 页左栏第 2 段	1-12
X	林景卫等, 真菌免疫调节蛋白的研究进展, 中国免疫学杂志, 2005, 第 21 卷, 第 6 期, 第 477-480 页, ISSN 1000-484X 图 1 和表 2, 第 478 页右栏最后一段-第 479 页左栏第 1 段	1-2, 7-17
Y	图 1 和表 2, 第 478 页右栏最后一段-第 479 页左栏第 1 段	1-12
X	KINO, K. 等, Isolation and characterization of a new immunomodulatory protein, Ling Zhi-8 (LZ-8), from <i>Ganoderma lucidum</i> . The Journal of Biological Chemistry. 1989, 第 264 卷, 第 1 期, 第 472-478 页, ISSN 0021-9258 摘要, 第 473 页左栏第 18-19 行	13-17
Y	摘要	1-12

第II栏 关于某些权利要求不能作为检索主题的意见(接第1页第2项)

按条约 17(2)(a)对某些权利要求未作国际检索报告的理由如下:

1. 权利要求:

因为它们涉及到不要求本国际检索单位进行检索的主题, 即:

2. 权利要求:

因为它们涉及到国际申请中不符合规定的要求的部分, 以致不能进行任何有意义的国际检索, 具体地说:

3. 权利要求:

因为它们是从属权利要求, 并且没有按照细则 6.4(a)第 2 句和第 3 句的要求撰写。

第III栏 关于缺乏发明单一性时的意见(接第1页第3项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明, 即:

参见附加页

1. 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费, 本国际检索报告针对全部可作检索的权利要求。

2. 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索, 本国际检索单位未通知缴纳任何附加费。

3. 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费, 本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求。具体地说, 是权利要求:

4. 申请人未按时缴纳被要求的附加检索费。因此, 本国际检索报告仅涉及权利要求中首次提及的发明; 包含该发明的权利要求是:

关于异议的说明: 申请人缴纳了附加检索费, 同时提交了异议书, 缴纳了异议费。

申请人缴纳了附加检索费, 同时提交了异议书, 但未缴纳异议费。

缴纳附加检索费时未提交异议书。

续：第 III 栏

本国际单位认为权利要求书包括 2 组发明，如下所示：

I：权利要求 1-12，涉及重组灵芝免疫调节蛋白（rLZ-8）在制备用于抗肿瘤、升高白细胞和抑制免疫排斥反应的药物中的应用；

II：权利要求 13-17，涉及包含重组灵芝免疫调节蛋白（rLZ-8）的药物组合物；

这些发明不能相互关联，从而不能形成一个总的发明构思，因此不符合 PCT 实施细则 13.1 的规定，理由如下：发明 I-II 之间相同或相应的技术特征是重组灵芝免疫调节蛋白（rLZ-8）作为药物用于治疗疾病的应用，然而，该技术特征已为文献 CN 1939532A 所公开（参见该文献的权利要求 1-10）。总之，这 2 组权利要求没有通过相同或者相应的特定技术特征相互关联，其定义了 2 组不同的发明，而这些发明没有通过一个总的发明构思相互联系。因此，本申请不具备 PCT 实施细则 13.1 和 13.2 规定的发明单一性。

主题的分类

A61K 38/16 (2006.01) i

A61P 35/00 (2006.01) i

A61P 37/02 (2006.01) i

A61P 37/06 (2006.01) i

C07K 14/375 (2006.01) n

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2008/002142

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN 1939532 A	04.04.2007	US 2007071766 A1 EP 1800690 A2 JP 2007084547 A	29.03.2007 27.06.2007 05.04.2007
JP 2124899 A	14.05.1990	无	