

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl<sup>6</sup>

# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 97193351.0

C07K 14/47  
C12N 15/62 C12N 15/12  
C07K 14/475 C07K 14/71  
C12Q 1/68 A61K 38/18  
A61K 31/70 G01N 33/68

[43]公开日 1999年4月21日

[11]公开号 CN 1214694A

[22]申请日 97.3.26 [21]申请号 97193351.0

[30]优先权

[32]96.3.26 [33]DE [31]19611939.1

[32]96.12.20 [33]DE [31]19653445.3

[86]国际申请 PCT/DE97/00643 97.3.26

[87]国际公布 WO97/35873 德 97.10.2

[85]进入国家阶段日期 98.9.25

[71]申请人 拉兹文·T·拉都勒斯丘

地址 联邦德国慕尼黑

[72]发明人 拉兹文·T·拉都勒斯丘

[74]专利代理机构 柳沈知识产权律师事务所

代理人 巫肖南

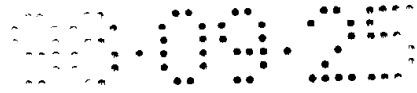
权利要求书 2 页 说明书 10 页 附图页数 15 页

[54]发明名称 具有抗增殖特性的肽

[57]摘要

本发明涉及得自肿瘤抑制蛋白并与生长因子区段或生长因子受体区段结合的抗增殖肽,本发明也涉及编码这些肽的核酸(DNA/RNA)和结构上同源的肽核酸和含有这种肽的药物组合物,本发明也可用于生物技术,分子生物学,生物信息学和过度增殖性疾病,特别是癌症和动脉粥样硬化的诊断和治疗中。

ISSN 1008-4274



## 权 利 要 求 书

1. 一种抗增殖肽 AB 或 BA，它包括：
  - A 组分，含有肿瘤抑制因子蛋白片段或其亲水同源的肽序列并结合到生长因子或生长因子受体区段，
  - B 组分，它作为辅因子，稳定 A 组分抗蛋白酶因而加强 A 组分的作用。
2. 根据权利要求 1 的肽，
  - 一种抗增殖组分 A，包含一个肿瘤抑制因子蛋白片段或其亲水同源的肽区段，它对生长因子区段或生长因子受体区段亲水互补，
  - 一种组分 B，它作为辅因子，稳定 A 组分抗蛋白酶并因而加强组分 A 的作用。
3. 根据权利要求 1 或 2 的肽，其中，生长因子区段或生长因子受体区段包含一个具有亲水性图的氨基酸序列，疏水氨基酸 X - 疏水氨基酸 - X - 亲水氨基酸，其中 X 是一个任意的氨基酸。
4. 根据权利要求 1 - 3 中之一的肽，其中，生长因子区段或生长因子受体区段，包括氨基酸序列 LXCXE，其中 X 是一个任意的氨基酸。
5. 根据权利要求 1 - 4 中之一的肽，其中，片段组分 A，是一个来自成视网膜细胞瘤蛋白(RB1)的肿瘤抑制因子蛋白。
6. 根据权利要求 1 - 5 中之一的肽，其中，组分(B)是一个聚赖氨酸核心或一个核定位的序列(NLS)。
7. 根据权利要求 1 - 6 中之一的肽，其中，包含氨基酸序列 FYKK 或一个在至少二个位置上与其亲水同源的氨基酸序列。
8. 根据权利要求 1 - 7 中之一的肽，其中，组分(A)包含氨基酸序列 LFYKKV 或一个在至少二个位置与其亲水同源的氨基酸序列。
9. 根据权利要求 1 - 8 中之一的肽的核酸(DNA/RNA)，它相当于基因密码。
10. 编码权利要求 7 的肽的核酸(DNA/RNA)，其中 DNA/RNA 包含：
  - (a)5' - UUCUAC AAG AAG - 3'(DO)或一个从中通过一个或多个核苷酸不同的 DNA/RNA，但它编码 DO 相同的肽，
  - (b)一个具有来自 a)杂交的 DNA/RNA 的 DNA/RNA，或
  - (c)一个具有来自 a)或 b)的 DNA/RNA，它通过遗传密码的简并性相关于



该 DNA/RNA。

11. 编码权利要求 8 的肽的核酸，其中 DNA/RNA 包含：

(a)以下序列

5' - CUU UUC UAC AAG AAG GUU - 3'(D1)

5 或一个由此通过一个或多个核苷酸不同的 DNA/RNA，但它编码 D1 相同的肽，

(b)一个具有来自(a)杂交的 DNA 的 DNA/RNA，或

(c)一个具有来自(a)或(b)的 DNA/RNA，它通过遗传密码的简并性相关于该 DNA。

10 12. 肽核酸，它对按权利要求 9 - 11 中之一的一个 DNA/RNA 是结构同源。

13. 药物组合物，它包含一个或多个权利要求 1 - 8 中之一的肽。

14. 根据权利要求 13 的药物组合物，它可以呈膏剂、溶液剂、分散剂、乳剂、气雾剂、泡沫剂、微粒状物质(如，粒状、块粒、粉末状、微珠状、吸  
15 附剂)、丸剂、锭剂、片剂、糖锭剂或胶囊。

15. 根据权利要求 1 - 8 中之一的肽的用途，它用于治疗 and 细胞加强增殖或过增殖有关的疾病，即治疗例如良性和恶性肿瘤以及动脉粥样硬化症。

16. 根据权利要求 1 - 8 中之一的肽的用途，它用于生物提纯生长因子和生长因子受体。

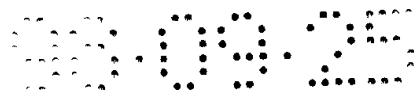
20 17. 根据权利要求 9 - 11 中之一的 DNA/RNA 的用途，它用于诊断和/或治疗过增殖疾病，如癌症或动脉粥样硬化症。

18. 根据权利要求 12 的肽核酸的用途，它用于诊断或治疗过增殖的疾病，如癌症或动脉粥样硬化症。

19. 根据权利要求 1 - 8 中之一的肽，根据权利要求 9 - 11 中之一的  
25 DNA/RNA 以及根据权利要求 12 的肽核酸的用途，它用作鉴定和克隆生长因子、生长因子受体以及肿瘤抑制因子蛋白的助剂。

20. 根据权利要求 1 - 8 中之一的肽，根据权利要求 9 - 11 中之一的 DNA/RNA 以及根据权利要求 12 的肽核酸的用途，它用作予后助剂以及用于证明生长因子和/或生长因子受体与肿瘤抑制因子蛋白的配合物形成。

30 21. 根据权利要求 13 的药物组合物的用途，它用于诊断和/或治疗过增殖的疾病，如癌症或动脉粥样硬化症。



## 说明书

### 具有抗增殖特性的肽

5 本发明涉及具有抗增殖特性的肽，编码所述肽的核酸分子(DNA/RNA)，结构上与所述核酸同源的肽核酸，以及所述肽，所述核酸，所述肽核酸和/或其药物组合物在生物技术，分子生物学，生物信息学和过度增殖性疾病，特别是癌症和动脉粥样硬化的诊断和治疗中的用途。

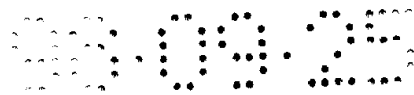
在肿瘤学中，有多种不同的治疗方式，这些方式主要基于外科方法，化学疗法或放射性疗法。然而，在癌症治疗中，这些方法并不能提供所需的结果。根据美国最新的统计学资料，每3个美国人中有1个会患癌症，每5个人中有1个将死于癌症。此数字可能也适用于全世界所有的工业化国家，在十多年的时间里此数字没有明显的变化。另外，也注意到在过去的20年时间内，治疗癌症的效力基本上没有改善，因为对大多数癌症类型而言，5年存活率基本上维持原状(R. H. Proctor “The Sciences”，3月/4月1995，p20-24)。

因此，本发明的目的是提供抑制多种不同类型的癌症生长，最终导致肿瘤消失的方法。

20 通过权利要求1的肽，权利要求13的核酸(DNA/RNA)，权利要求16的肽核酸，权利要求17的药物组合物以及通过权利要求20的所述肽的用途，权利要求22的DNA/RNA的用途，权利要求23的肽核酸的用途和权利要求21的药物组合物的用途可达到上述目的。优选的实施方案示于从属权利要求中。

25 本发明人已发现一种有希望的治疗癌症的方法，所述方法利用了可封闭导致癌症之物质，尤其是致癌蛋白质的特异性肽。本发明肽的特征在于序列长度短，这使得它们在合成方面较经济。另外，它们也能有效地穿透细胞，因而能中和促进癌症生长的细胞内蛋白质。

30 以前发现在多种癌症类型中，肿瘤抑制基因缺失或突变的结果会导致不能充足提供相应的基因产物。这最终会导致癌症的生长(A. G. Knudson，美国国家科学院院刊(Proc. Natl. Acad. Sci., USA)(1993)，vol90，p10914-10921；A. J. Levine，科学美国人，“科学与医药学”(Sci. Am. “Science &



Medicine ” ), Jan./Feb, 1995, p28-37).

5 肿瘤抑制蛋白, 如 RB1 的缺损对于其它过度增殖性疾病, 如动脉粥样硬化的病理似乎也是重要的。本发明人发现将肿瘤抑制蛋白质的一部分导入细胞以封闭加快细胞失控生长的生长因子即已足够。不可能导入完整的肿瘤抑制蛋白, 因为这种蛋白质太长, 在多数情况下会遭遇蛋白酶降解, 从而阻止蛋白质行使其作用。另一方面, 如果仅利用肿瘤抑制蛋白的一部分, 所述部分也会被很快地降解, 即它们不够稳定。

因此, 本发明的肽是合成的融合多肽, 所述多肽由组分(A)和(B)组成, 其中这些组分相互连接成 AB 或 BA, 第一组分(A)含有肿瘤抑制蛋白的有效部分(其类型为本发明人第一次发现), 或其亲水同源部分, 第二组分(B)含有稳定第一组分(A)的序列。根据本发明, 本发明的肽与生长因子或生长因子受体结合, 优选与其中的序列 LXCXE 结合, 更优选与胰岛素中的 LXCXE 结合, 即与 LVCGE 结合(Radulescu 等, 生物化学和生物物理学研究通讯, 1995, vol.206, p97-102)。由于生长因子 IGF-1 和 IGF-2 含有序列 FVCGD, 15 该序列与胰岛素中的区段 LVCGE 亲水同源(R. Radulescu & C. Wendtner, 分子识别杂志(J. Mol. Recognition), 1992, vol. 5, p133-137), 因此本发明的肽能与 IGF-1 和 IGF-2 结合。

20 本文所用术语“亲水同源”的根据是 Kyte 和 Doolittle(J. Kyte & R. F. Doolittle, 分子生物学杂志, 1982, vol.157, p105-132)和 J. E. Blalock 和 Smith, E. M.(生物化学和生物物理学研究通讯, vol.121, no.1, p203-207(1984))的教导。

25 组分(A)其它的特征在于这样一个事实, 即它分别根据互补肽理论(J. E. Blalock, 生物技术趋势(Trends in Biotechnology), vol.8, p140-144, 1990年6月)或根据三维构型与生长因子或生长因子受体的片断亲水互补。生长因子的例子是: 胰岛素, IGF-1, IGF-2, EGF, FGF, 血管生成素, NGF 和 PDGF。

30 根据本发明, 本发明肽之组分(A)的有效区域可得自下列肿瘤抑制基因产物: RB1, P107, P130, WT1, TP53, NF1, NF2, VHL, APC, NB1, MLM, MEN1, BCNS, RCC, BRCA1, BRCA2, DCC, MTS1 = p16, MTS2, p21, p27 等。在优选的实施方案中, 组分(A)含有 RB1 的一部分, 尤其是 RB1 的氨基酸 649-654, 即 LFYKKV 或其亲水同源



部分。

融合肽的组分(B)作为辅因子具有稳定所述组分(A)以使后者在细胞中不会被蛋白酶降解的特性。通过快速到达它们不易在其中被蛋白酶降解的细胞核中(R. Fahraeus 等, *Current Biology*, 1996, vol.6, no.1, p84-91)的本发明肽, 或通过使用支化的组分(B), 如聚赖氨酸支链或聚赖氨酸核心(core), 或通过使用 D-氨基酸可达到此目的。在优选的实施方案中, 组分(B)是聚赖氨酸核心(R. Radulescu 等, *生物化学和生物物理学研究通讯*, 1995, vol.206, p97-102; 和 G. Fassina, EPO 0 481 930 A2)或核定位序列(NLS), 尤其是 SV40 NLS 或 Penetratin 或二分的 NLS 或 RNP A1 NLS(M9 区域)。有关优选被导入(directed)细胞核中的肽的构建的一般性参考文献见 Sheldon 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol.92, p2056-2060(1995); Dingwall 等, *生化科学动态(Trends in Biochemical Science)*16, p478-481(1991); M. S. Moore, *当代生物学(Current Biology)*, vol.6, no.2, p137-140(1996); D. A. Jans, *欧洲分子生物学联合会杂志(FASEB Journal)*, 1994, vol.8, p841-847; J. Moroianu & J. F. Riordan, *PNAS*, 1994, vol.91, p1677-1681 和 D. Derossi 等, *生物化学杂志*, 1994, vol.269, p10444-10450。

在优选的实施方案中, 组分(A)具有下列序列或在至少两个位置上与其同源的序列:

NH<sub>2</sub>-LFYKKV-COOH (P1)

20 NH<sub>2</sub>-dLdFdYdKdKdV-COOH (P4)

NH<sub>2</sub>-KVLYFKRQIKIWFQNRRMKWKK-COOH (P8)

(线表示亲水同源)

从上述序列中可推知下列的本发明优选肽:

25 NH<sub>2</sub>-[LFYKKVGGG]<sub>4</sub>-[KRG]<sub>2</sub>-KG-COOH (P2)

此肽是序列 P1 与聚赖氨酸核心[GGG]<sub>4</sub>-[KRG]<sub>2</sub>-KG 的联合

NH<sub>2</sub>-[LFYKKVGGG]<sub>4</sub>-[K]<sub>2</sub>-KG-COOH (P2i)

此肽是序列 P1 与聚赖氨酸核心[GGG]<sub>4</sub>-[K]<sub>2</sub>-KG 的联合

NH<sub>2</sub>-[dLdFdYdKdKdV-GGG]<sub>4</sub>-[1KdRG]<sub>2</sub>-1KG-COOH (P3)

30 此肽是序列 P4 与聚赖氨酸核心[GGG]<sub>4</sub>-[1KdRG]<sub>2</sub>-1KG 的联合

NH<sub>2</sub>-[dLdFdYdKdKdVGGG]<sub>4</sub>-[1K]<sub>2</sub>-1KG-COOH (P3i)



此肽是序列 P4 与聚赖氨酸核心 $[GGG]_4-[1K]_2-1KG$  的联合

$NH_2-LFYKKVPKKRKRKV-COOH$  (P5)

肽 P5 由序列 P1 和 SV40 病毒较大 T 抗原的核定位序列组成。

$NH_2-LFYKKVRQIKIWFQNRMMKWKK-COOH$  (P6)

5 肽 P6 是序列 P1 与 Penetratin 的联合, 所述 Penetratin 是由位于 Antennapedia 同源区域内的 16 个氨基酸组成的序列, 该序列介导跨膜的转位, 因此也是核定位。

$NH_2-[dKdVdLdYdFdKGGG]_4-[1KdRG]_2-1KG-COOH$  (P7s)

10 肽 P7s 是 P1 亲水同源的序列 dKdVdLdYdFdK 与聚赖氨酸核心 $[GGG]_4-[1KdRG]_2-1KG$  的联合。

$NH_2-[dKdVdLdYdFdKGGG]_4-[1K]_2-1KG-COOH$  (P7)

肽 P7 是与 P1 亲水同源的序列 dKdVdLdYdFdK 与聚赖氨酸核心 $[GGG]_4-[1K]_2-1KG$  的联合。

$NH_2-KVLYFKRQIKIWFQNRMMKWKK-COOH$  (P8)

15 肽 P8 是与 P1 亲水同源的序列 dKdVdLdYdFdK 与 Penetratin 的联合。

“D”和“L”特指以单字母密码表示的氨基酸构型。

20 本发明的肽一般含有 L-和/或 D-氨基酸, 根据本发明, 每种氨基酸的全-L-型, 全-D-型, 逆-反异构体以及 L-和 D-型的相应变换也在本发明的范围之内。另外, 根据本发明, 每种氨基酸氧化和还原形式的所有变换, 游离形式和携有保护性基团的氨基酸也在本发明的范围之内。本发明肽的最有效的浓度范围为  $10^{-4} - 10^{-5}M$ 。根据具体的应用, 其它有效的浓度也是可以的。就涉及支链肽而言, 已显示它们以全-D 形式存在是有利的。假设含有 NLS 的线性肽进入细胞核; 支链肽可能进入细胞核, 但它们在核外也有效。

本发明的肽可被称为“SCAP”, 即“合成的辅因子-相关的抗-致癌肽”。

25 优选根据普通的固相法进行本发明肽的制备(见 G. A. Grant, “合成肽”, W. H. Freeman and Company, New York, 1992)。随后进行本发明肽的纯化, 并按所述检定(R. Radulescu 等, 生物化学和生物物理学研究通讯, 1995, vol.206, p97-102)。后一参考文献也提供了使用本发明肽以生物技术纯化如胰岛素的生长因子和生长因子受体的例子。为了用生物技术分离生长因子和生长因子受体, 可将携有 NLS 的本发明肽与含有硫酸乙酰肝素基质的层析柱偶联。

30



也可根据标准方法, 将本发明肽的组分(A)和(B)从相应的蛋白质上切割下来, 并相互连接。制备肽的其它技术是本领域技术人员熟知的(见 G. A. Grant, “合成肽”, W. H. Freeman and Company, New York, 1992)。

5 本发明另外涉及编码本发明肽的 DNA/RNA, DNA/RNA 序列衍生自遗传密码。

在优选的实施方案中, 下列 DNA/RNA 序列编码表示本发明肽之组分(A)的上述氨基酸序列(P1)和(P4):

5'-CUU UUC UAC AAG AAG GUU-3' (D1)

在优选的实施方案中, 下列 DNA/RNA 序列编码本发明的上述肽(P5):

10 5'- CUU UUC UAC AAG AAG GUU CCU AAG AAG AAG CGU AAG GUU-3' (D5)

在优选的实施方案中, 下列 DNA/RNA 序列编码本发明的上述肽(P6):

15 5'- CUU UUC UAC AAG AAG GUU CGU CAA AUA AAG AUA UGG UUC CAA AAU CGU CGU AUG AAG UGG AAG AAG-3' (D6)

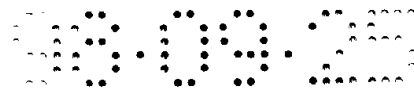
在优选的实施方案中, 下列 DNA/RNA 序列编码上述肽(P8):

20 5'-AAG GUU CUU UAC UUC AAG CGU CAA AUA AAG AUA UGG UUC CAA AAU CGU CGU AUG AAG UGG AAG AAG-3' (D8)

25 可将编码本发明肽的 DNA/RNA 序列掺入适当载体中以用于癌症的基因疗法, 方法学的综述见 R. C. Mulligan, 科学, 1993, vol.260, p926-932。

本领域技术人员应知道上述 DNA/RNA 序列含有在严紧条件下能与之杂交的 DNA/RNA 序列。这些序列具体地是在低于 DNA/RNA 解链温度约 20 °C 下与上述 DNA/RNA 序列杂交的 DNA/RNA 序列。另外, 根据遗传密码的简并性, 上述 DNA/RNA 序列含有与上述 DNA/RNA 序列相关的 DNA/RNA 序列。

30 本发明也可应用于生物信息学和分子生物学, 可使用下列策略鉴定与生长因子或其受体相互作用的肿瘤抑制蛋白。相应生长因子或其受体的 cDNA 分别得自 NCBI 数据库, 利用 DNA Strider 软件, 根据互补的肽策略可将此 cDNA 翻译成互补的 DNA 和肽。对于所得的互补肽而言, 通过利用 OWL 数据库领航员(navigator)中的 BLAST 算法规则可发现同源的蛋白质/肽(想要的



肿瘤抑制因子)。另一方面,可从肿瘤抑制基因的 cDNA 开始,以类似的方式  
分别寻找作为相互作用的伙伴的生长因子或其受体。此方法可分别加快和促  
进(新)肿瘤抑制蛋白或(新)生长因子或生长因子受体的克隆。例如,已从 NCBI  
数据库中拷贝出人 EGF 前体的 cDNA,并将其拷贝到 DNA Strider 软件中,  
5 利用所述软件,已由 EGF 前体 cDNA 得到互补的 DNA 序列,此 DNA 序列  
已被翻译成肽,翻译成所谓的与 EGF 前体蛋白互补的肽。随后,利用 OWL  
数据库领航员中的 BLAST 算法规则,寻找与这些互补的肽同源的肽/蛋白  
质,结果,几个核蛋白质显示出与 EGF 前体同源,例如结构和功能与 RB1  
相关的 p130 蛋白,尤其是 p130 的氨基酸 290-313。更具体地,如果相互之  
10 间以反平行的方式排列区域,EGF 前体氨基酸 209-213(REGSN)和 p130 氨  
基酸 305-309(IGTLS)相互之间亲水互补,因此是 EGF 前体和 p130 之间假定  
复合物的潜在结合位点。因此氨基酸序列 IG TLS 或与其亲水同源的序列可代  
表本发明抗增殖肽的组分(A)(见权利要求 1 和 2)。

就涉及治疗应用而言,本发明的肽可或单独或与几种普通的佐剂,填充  
15 剂和/或添加剂一起用于药物组合物。特别有利的实施方案分别是上述肽 P3  
和 P6 以及 P3 和 P5 的联合。就涉及药物组合物的施用形式而言,下列形式  
是合适的:软膏,溶液,分散剂,乳剂,气雾剂,泡沫,微粒物质(例如颗粒  
剂,块粒剂(agglomerate),粉末,微珠,吸附剂(adsorbate)),丸剂,软锭剂,  
20 片剂,糖锭剂或胶囊。本发明的肽也可与细胞抑制剂疗法一起使用,或与放  
射性疗法联合使用。优选局部,皮肤内或穿透皮肤地施用肽,对于全身性施  
用而言,优选静脉内,动脉内,口服和直肠施用肽,优选膜内,腹膜内或腔  
内将肽施用到腔内。

显示出显著的细胞毒效应的本发明肽, DNA/RNA 序列和药物组合物可  
用作药物以治疗癌症,并可根据本发明以此方式应用。

25 观察到抗乳腺癌细胞,骨肉瘤细胞和白血病细胞的特殊效力。归功于构  
成概念的基础,本发明的肽一般分别对显示缺损的成视网膜细胞瘤基因或蛋  
白质的所有细胞起作用。

下文将参照 15 个附图和表描述本发明,其中:

30 图 1-图 12 表示在存在或缺乏本发明不同肽时, G1-, S-和 G2/M 期中  
的 MCF-7 细胞或 SAOS-2 细胞之细胞群体的 %;

图 13 表示肽 P3 对 K562 细胞的细胞毒效应;

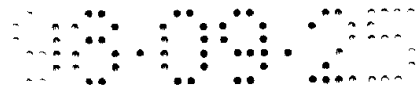


图 14 表示肽 P3 对 CCRF-CEM 细胞和 CCRF-CEM/ACT 400 细胞的细胞毒效应;

图 15 表示肽 P3 对正常的外周血单核细胞的效应;

表 1 表示在 MCF-7 细胞中由 P5-和 P-6 介导的对细胞循环渐进过程的抑制作用, 与之相比, Penetratin 不能介导这种抑制作用;

表 2 表示在 SAOS-2 细胞中由 P5-和 P-6 介导的对细胞循环连续的抑制作用, 与之相比, Penetratin 不能介导这种抑制作用。

图 1 表示在无血清的条件下, 浓度为  $10^{-5}$  M 的本发明肽 P3 在 G0/G1 期已同步的 MCF-7 细胞中缩短 G1 期而延长 S 期。用 P3 处理过的细胞形态学相当于编程死亡的细胞的形态学。

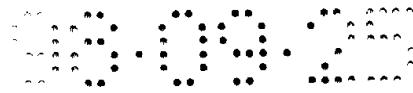
图 2 表示浓度为  $10^{-5}$  M 的本发明肽 P3 在经最适浓度为  $10^{-8}$  M 的胰岛素类生长因子 1(IGF-1)刺激的 MCF-7 细胞中导致 G1 和 G2/M 期的延长以及 S 期的缩短, 从而 P3 封闭了 IGF-1 对 MCF-7 细胞的作用。具体地说, P3 延迟了由 IGF-1 引起的细胞循环的连续, 从而延迟了细胞分裂。用 P3 处理过的细胞形态学相当于编程死亡的细胞的形态学。

图 3 表示在无血清的条件下, 浓度为  $10^{-5}$  M 的肽 P4, P5 和 P6 中的每一种在 G0/G1 期已同步的 MCF-7 细胞中缩短 G1 期而延长 S 期。所述细胞, 尤其是用 P6 处理过的那些细胞的形态学相当于编程死亡的细胞的形态学。

图 4 表示浓度为  $10^{-5}$  M 的本发明肽 P6 在经最适浓度为  $10^{-8}$  M 的 IGF-1 刺激的 MCF-7 细胞中延长 G1 期以及缩短 S 期, 从而 P6 封闭了 IGF-1 对 MCF-7 细胞的作用。具体地说, P6 延迟了由 IGF-1 引起的细胞循环的连续, 从而延迟了细胞分裂。用 P6 处理过的细胞形态学相当于编程死亡的细胞的形态学。

图 5 表示浓度各为  $10^{-5}$  M 的肽 P3 和 P5 的联合以及浓度各为  $10^{-5}$  M 的肽 P3 和 P6 的联合在经 10 % 胎牛血清(FCS)刺激的 MCF-7 细胞中导致 G1 和 G2/M 期的延长以及 S 期的缩短。用这些肽联合处理过的细胞形态学相当于编程死亡的细胞的形态学。

图 6 表示浓度为  $10^{-5}$  M 的本发明肽 P3 在经最适浓度为  $10^{-9}$  M 的雌二醇(E2)刺激或经最适浓度为  $10^{-8}$  M 表皮生长因子(EGF)刺激的 MCF-7 细胞中导致 G1-和 G2 期的延长以及 S 期的缩短。用 P3 处理过的细胞形态



学相当于编程死亡的细胞的形态学。

图 7 表示本发明肽 P3 以剂量依赖的方式封闭由 IGF-1[10 - 8 M]导致的细胞循环的连续。用 P3[5 × 10 - 6 M]处理过的细胞,尤其是用 P3[10 - 5 M]处理过的细胞形态学各相当于编程死亡的细胞的形态学。

5 图 8 表示在无血清的条件下,本发明肽 P3[10 - 5 M]在 G0/G1 期已同步的 SAOS-2 细胞中缩短 G1 期而延长 S 和 G2/M 期。用 P3 处理过的细胞形态学相当于编程死亡的细胞的形态学。

图 9 表示肽 P3[10 - 5 M]在经 10 % FCS 刺激的 SAOS-2 细胞中延长 G1 期而缩短 S 期。用 P3 处理过的细胞形态学相当于编程死亡的细胞的形态学。

10 图 10 表示本发明肽 P3[10 - 5 M]将不同步生长的 MCF-7 细胞的 G1 期缩短而延长其 S 期,所述细胞已在含有 10 % FCS 的 DMEM 细胞培养基中温育。用 P3 处理过的所述细胞的形态学相当于编程死亡的细胞的形态学。

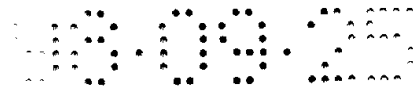
图 11 表示本发明肽 P8[10 - 5 M]在经最适浓度为 10 - 8 M 的 IGF-1 刺激的 MCF-7 细胞中延长 G1 期和 G2/M 期以及缩短 S 期,从而 P8 封闭了 IGF-1 对 MCF-7 细胞的作用。具体地说, P8 延迟了由 IGF-1 引起的细胞循环的连续,从而延迟了细胞分裂。用 P8 处理过的所述细胞的形态学相当于编程死亡的细胞的形态学。

图 12 表示本发明肽 P7s[10 - 5 M]在经最适浓度为 10 - 8 M 的 IGF-1 刺激的 MCF-7 细胞中延长 G1 期和 G2/M 期以及缩短 S 期,从而 P7s 封闭了 IGF-1 对 MCF-7 细胞的作用。具体地说, P7s 延迟了由 IGF-1 引起的细胞循环的连续,从而延迟了细胞分裂。用 P7s 处理过的所述细胞的形态学相当于编程死亡的细胞的形态学。

图 13 表示本发明肽 P3[10 - 5 M]对温育于 RPMI 细胞培养基中的不同步生长的 K562 细胞的细胞毒效应是依赖于时间的,结果已被作图为用 P3 处理过的活细胞相对于未经 P3 处理过的活细胞的百分数。活细胞的数目是根据台盼蓝方法,通过在每个时间点至少计数 200 个细胞而测定的。

图 14 表示本发明肽 P3[10 - 5 M]以细胞毒的方式对不同步生长的 CCRF-CEM 细胞和 CCRF-CEM/ACT 400 细胞起作用,所述细胞已在含有 10 % FCS 的 RPMI 培养基中温育。

30 图 15 表示本发明肽 P3[10 - 5 M]对正常的人外周血单核细胞不起作用,而不论所述细胞是静止(a)状态或激活(b)状态,从而,经 P3 处理过的细



胞未显示出任何形态学的变化，细胞与 P3 一起保温 24 小时。

表 1 表示浓度各为  $10^{-5}$  M 的本发明肽 P5 和 P6 分别在经 IGF-1 [ $10^{-8}$  M] 或胰岛素 [ $10^{-6}$  M] 刺激的 MCF-7 细胞中缩短 S 期，肽 Penetratin [ $10^{-5}$  M] 如所期望的那样未显示出任何作用。

5 表 2 表示浓度各为  $5 \times 10^{-5}$  M 的本发明肽 P5 和 P6 在经 10 % FCS 刺激的 SAOS-2 细胞中导致 G1 期的延长和 S 期的缩短。

总之，基于图 1-15 和表 1 和 2，可确证在特殊的细胞培养条件下，本发明的肽 P3，P5，P6，P7s 或 P8 单独和/或联合具有在相当程度上延迟细胞循环的连续，因而可延迟 MCF-7 乳腺癌细胞，SAOS-2 骨肉瘤细胞或白血  
10 血病细胞(K562，CCRF-CEM<sub>敏感</sub>细胞，CCRF-CEM/ACT 400<sub>抗性</sub>)之细胞分裂的特性。所示的针对 IGF-1 [ $10^{-8}$  M] 的数据也适用于胰岛素 [ $10^{-6}$  M]。

结果，这些肽具有也可成为有效的抗肿瘤剂的潜力，所述抗肿瘤剂可在人体内抵抗癌症的生长。

现通过下列实施例阐明本发明：

15 实施例

实验设置包括含完整成视网膜细胞瘤蛋白质的乳腺癌细胞系 MCF-7 的实验，和含缺损的成视网膜细胞瘤蛋白质的骨肉瘤细胞系 SAOS-2 的实验。以 100000 (= 十万) 个细胞/孔/ml 的密度将细胞接种于 12 孔培养板中的含 10 % FCS 的 RPMI 培养基或 DMEM 培养基中，并使细胞贴壁 24 小时，随后，  
20 通过在不含 FCS 的 DMEM 中温育 3 天使细胞饥饿，以使它们在 G0/G1 期同步，然后分别加入 10 % FCS 或  $10^{-8}$  M IGF-1 或  $10^{-6}$  M 胰岛素达 24 小时以刺激细胞。检测所加入的每种肽对上述每种刺激模式的效应，所述效应反映了细胞分裂的速率。在饥饿 3 天后 0 时固定对照细胞(在 G0/G1 期同步的细胞)，24 小时后固定其余的细胞(+/-肽)。随后通过 FACS 分析细胞的  
25 细胞循环分布，类似方法见于 R. Fahraeus 等，Current Biology，1996，vol.6，no.1，p84-91 和 L. Zhu 等，基因和发育(Genes & Development)，1993，vol.7，p1111-1125。

第二种实验设置涉及白血细胞系 K562 和 CCRF-CEM 和 CCRF-CEM/ACT400。在 6 孔培养板中将 100000 个不同步生长的细胞/孔/ml  
30 RPMI/10 % FCS 各与每种肽一起温育 48 小时，48 小时温育之后，根据台盼蓝方法(L. D. Attardi 等，EMBO J.，1996，vol.15，no.14，p3693-3701

和 M. K. Reeder & H. C. Isom , 细胞生长&分化, 1996 , vol.7 , p449-460) 测定死细胞/200 计数细胞的读出数目。死细胞越多, 肽更具细胞毒性, 因而肽更有效。

实施例的结果示于图 1-15 和表 1 和 2。

5

表 1

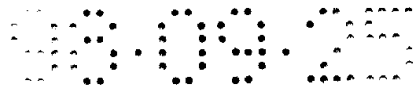
	对照	IGF-1	P5+IGF-1	P6+IGF-1	Penetratin+IGF-1
G1:	70.2	47.3	54.0	53.7	50.5
S:	17.7	45.4	32.4	27.7	39.3
G2/M	12.1	7.3	13.6	18.6	10.1

	对照	胰岛素	P6+胰岛素	Penetratin+胰岛素
G1:	70.2	38.3	48.7	39.6
S:	17.7	52.8	36.6	49.6
G2/M:	12.1	8.9	14.6	10.9

表 2

	对照	FCS	P5+FCS	P6+FCS	Penetratin+FCS
G1:	79.6	63.1	73.5	76.6	62.3
S:	12.0	32.5	13.2	12.2	29.9
G2/M	8.4	4.4	13.3	11.2	7.8

10



说明书附图

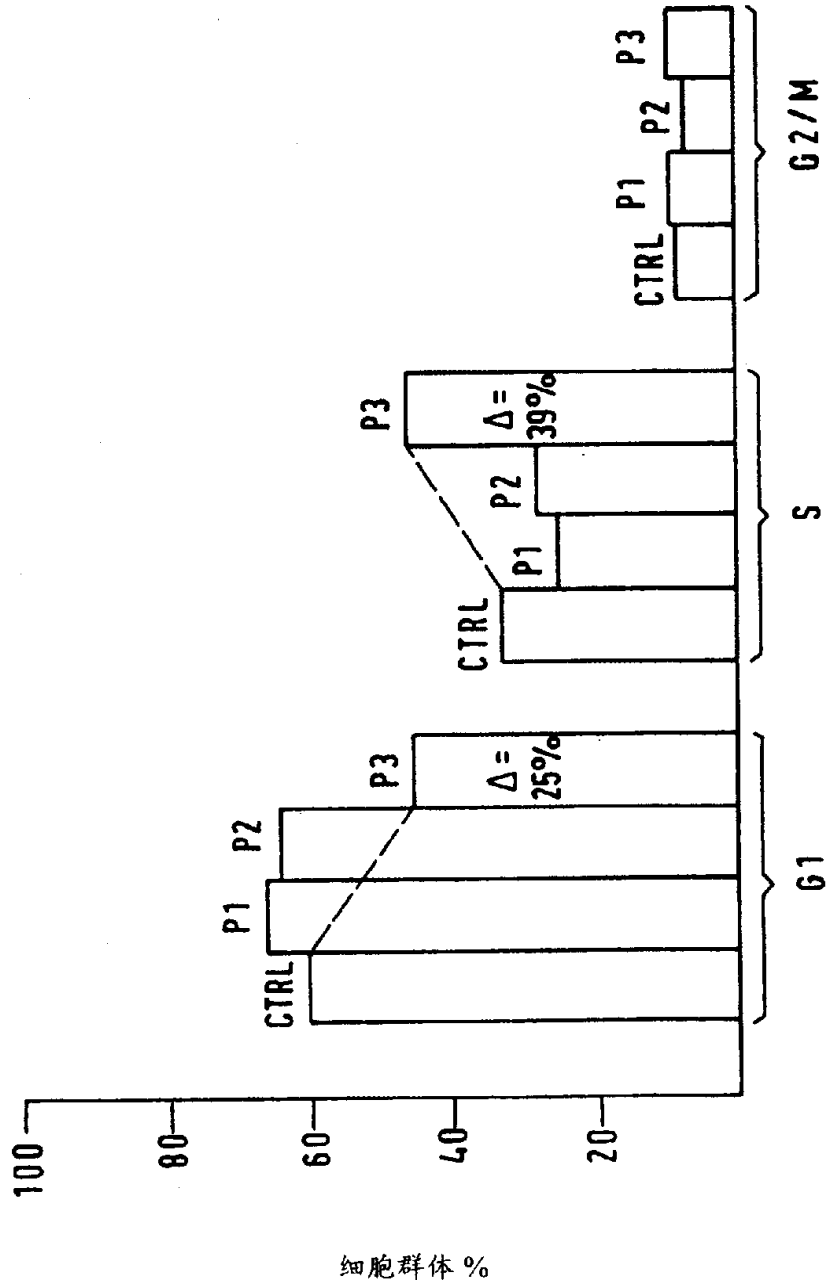


图 1





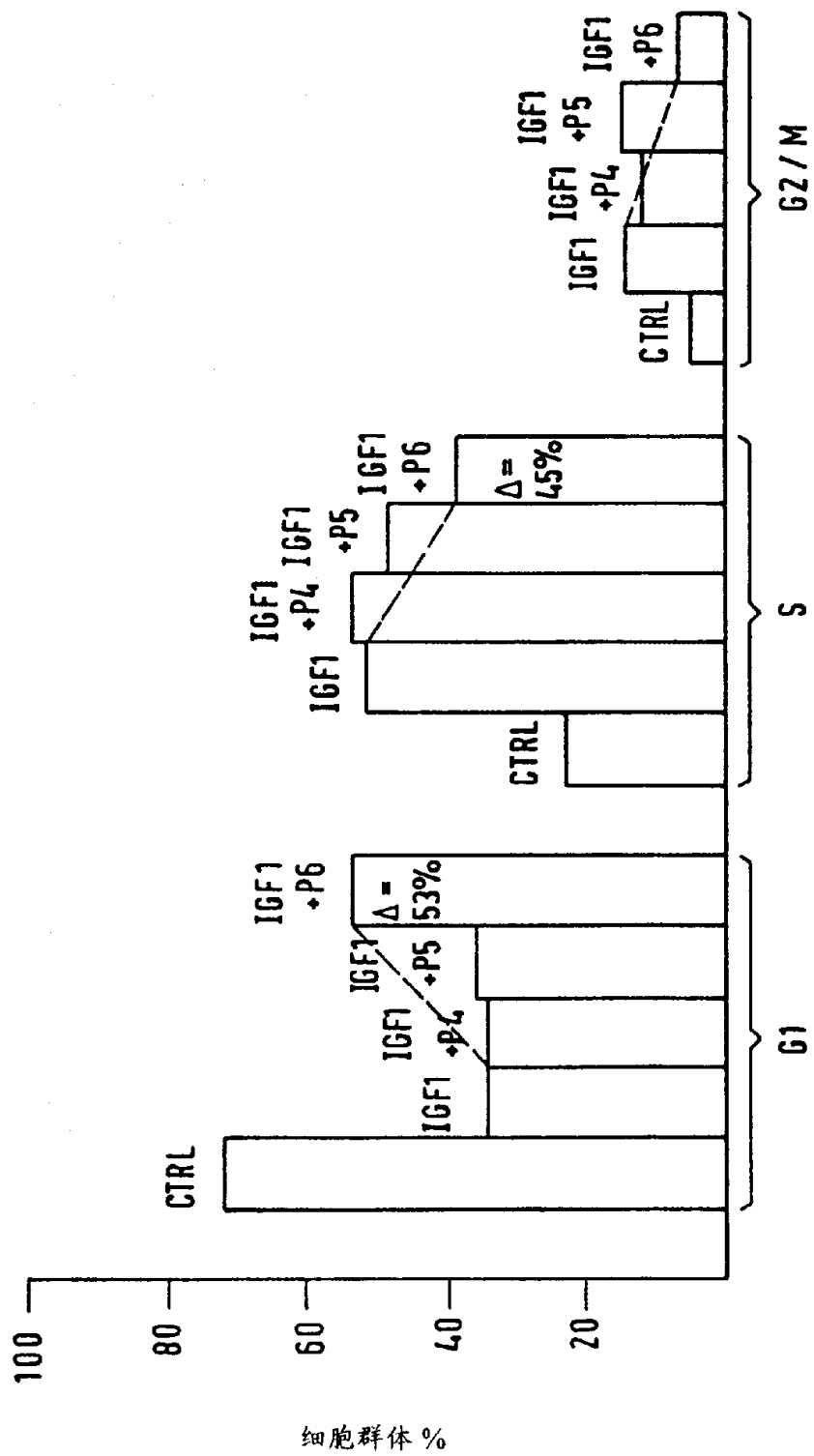


图 4

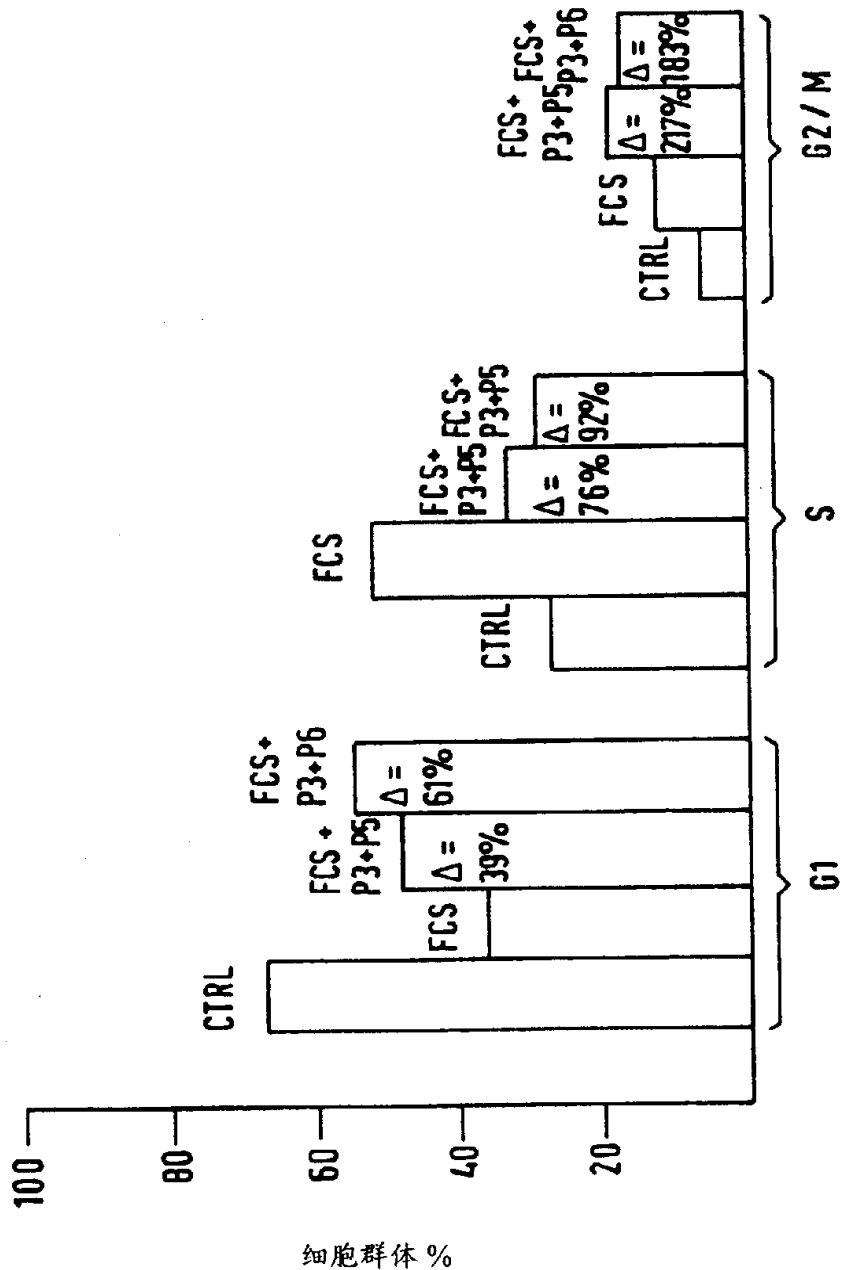


图 5

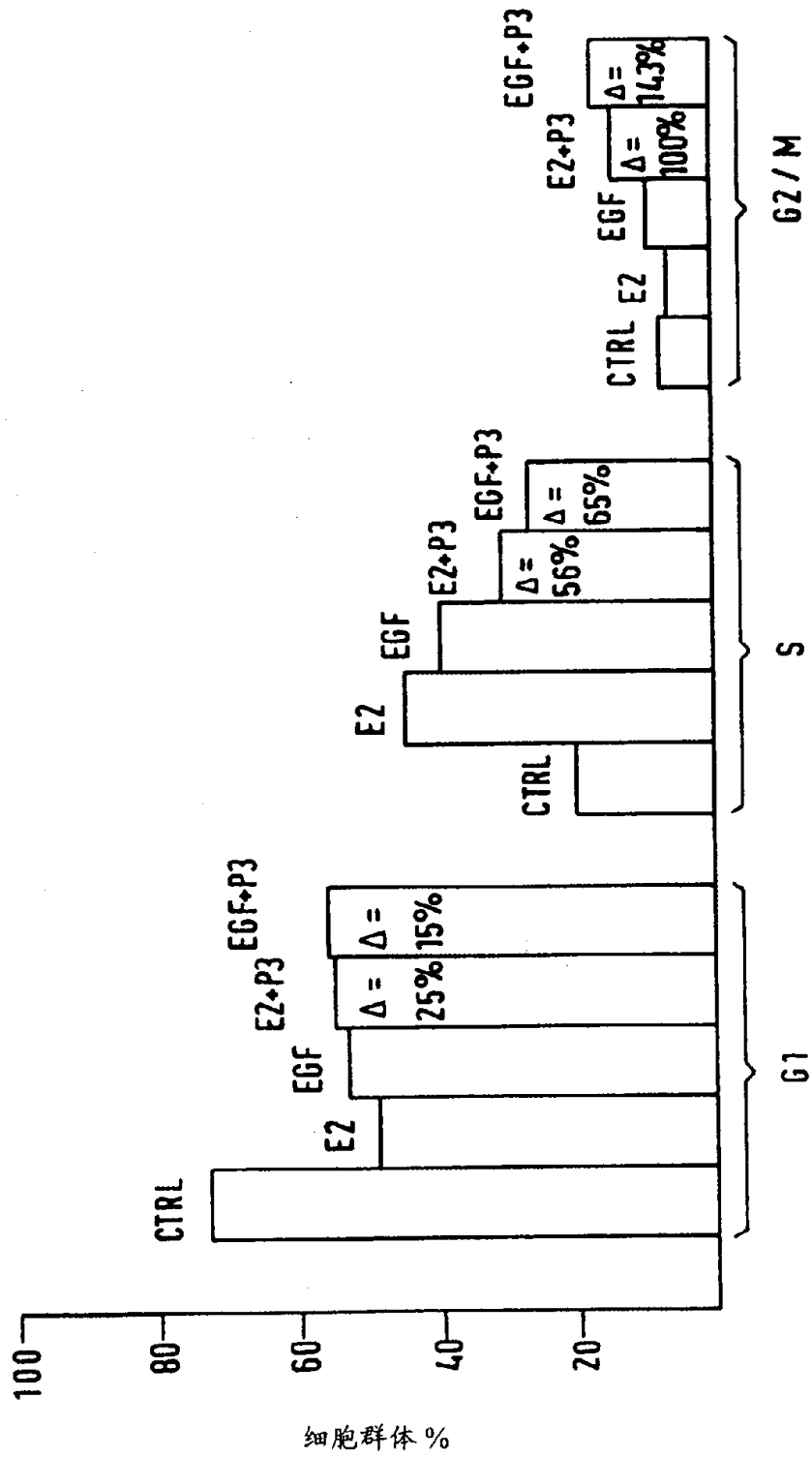


图 6

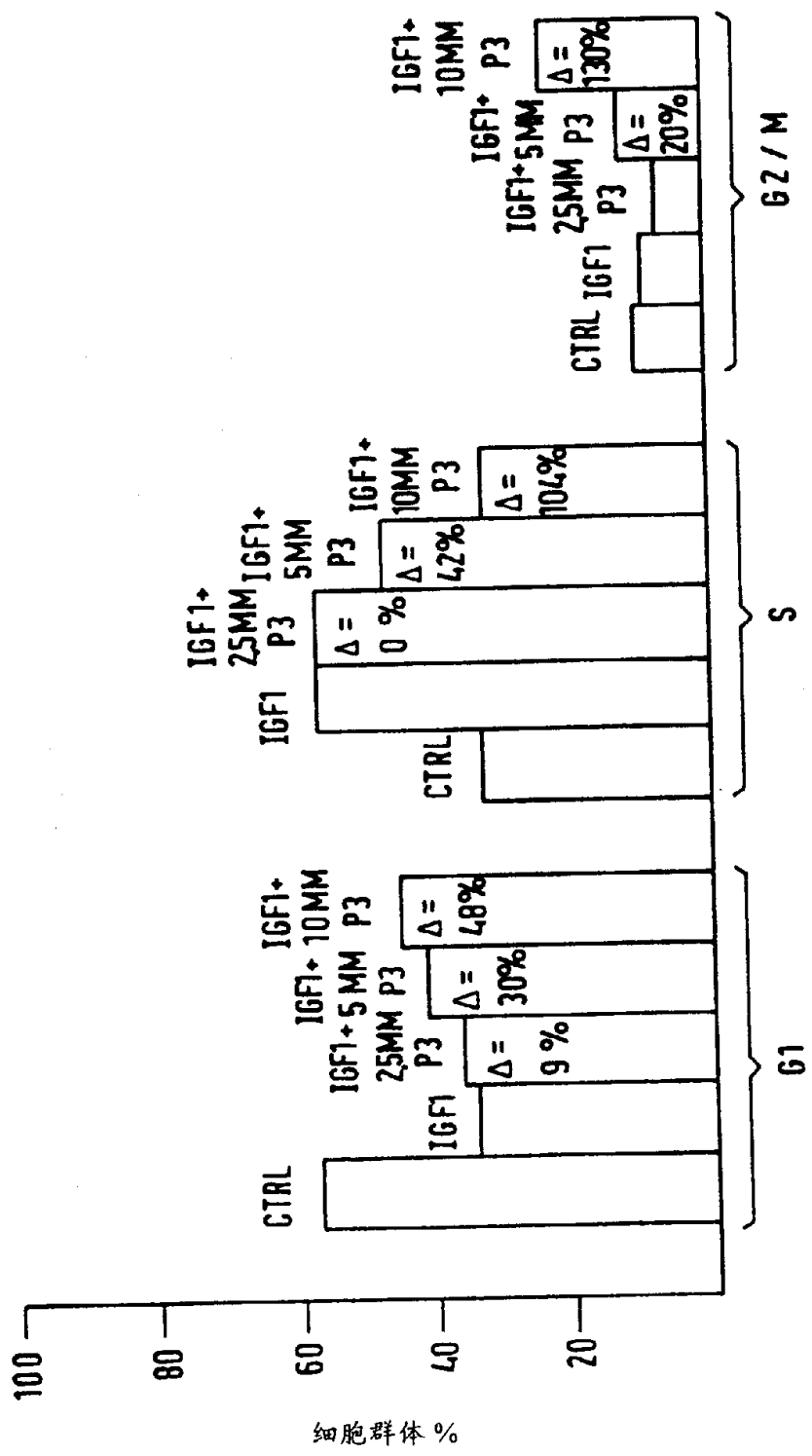


图 7







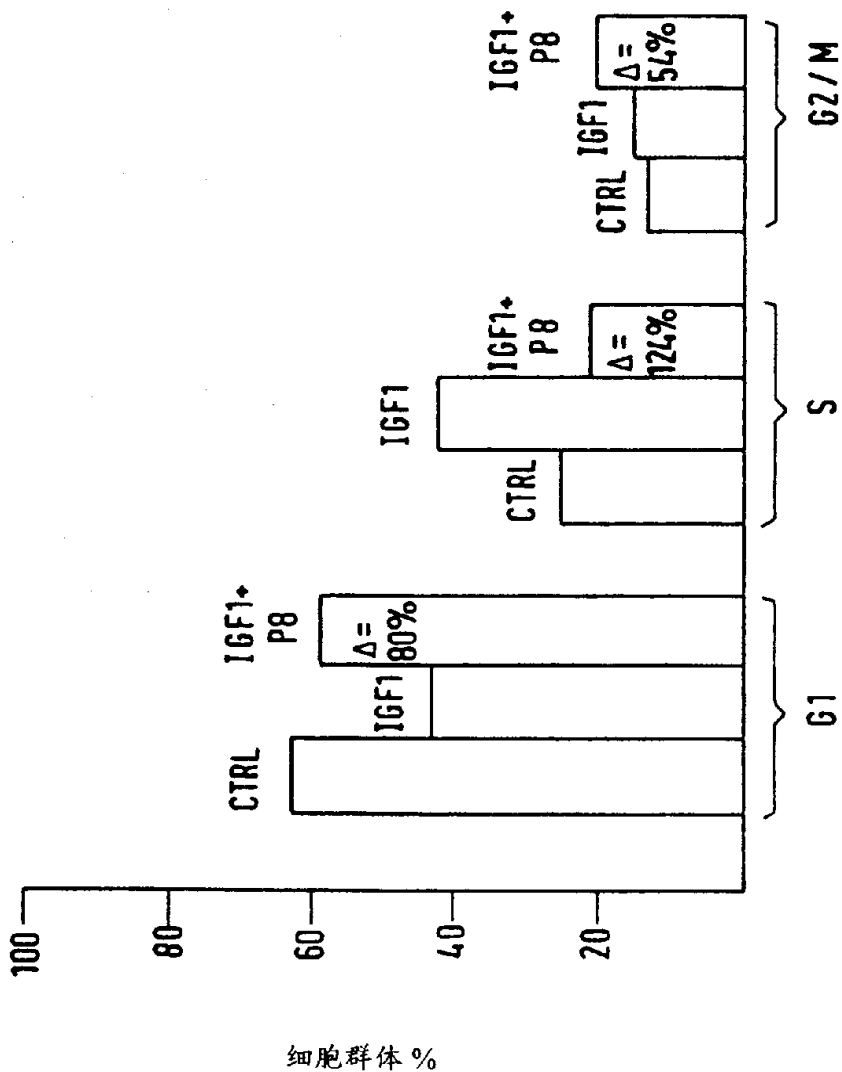


图 11



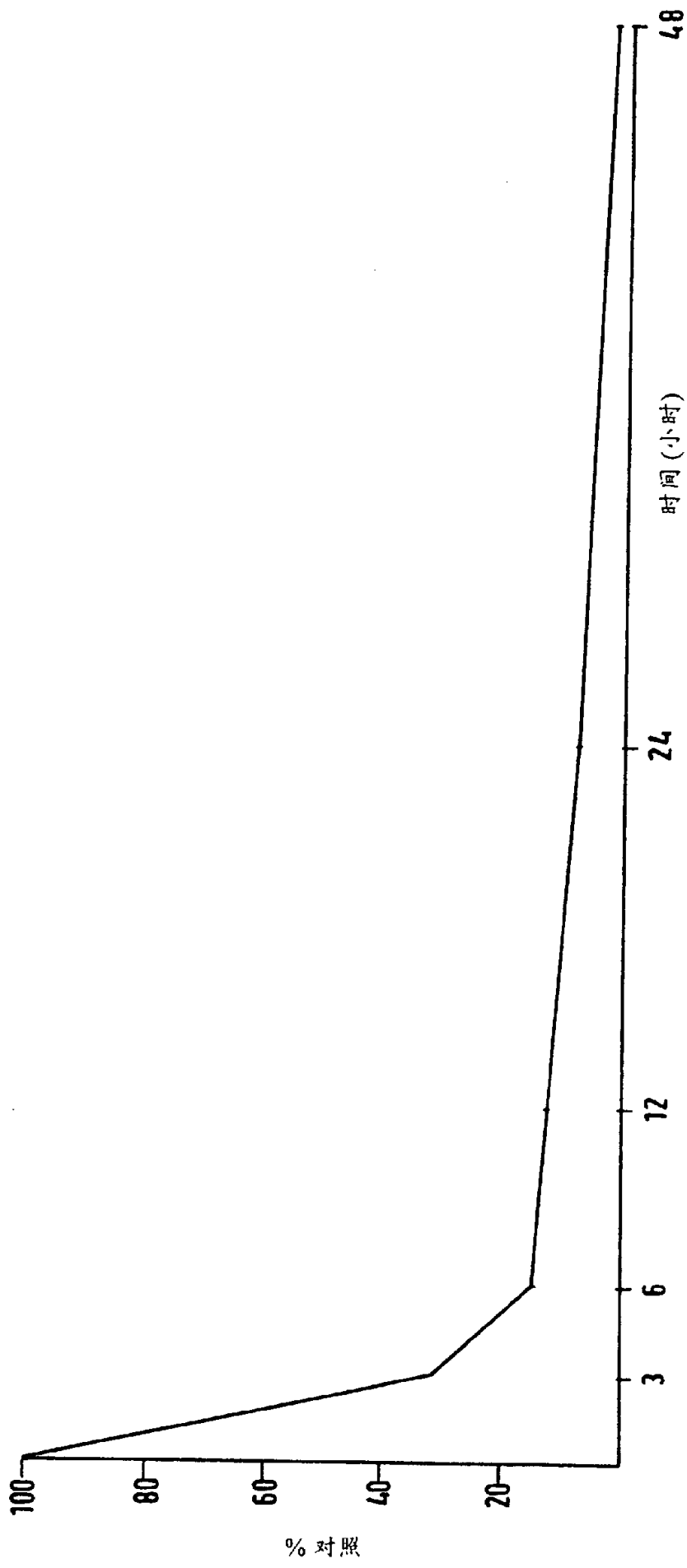


图 13

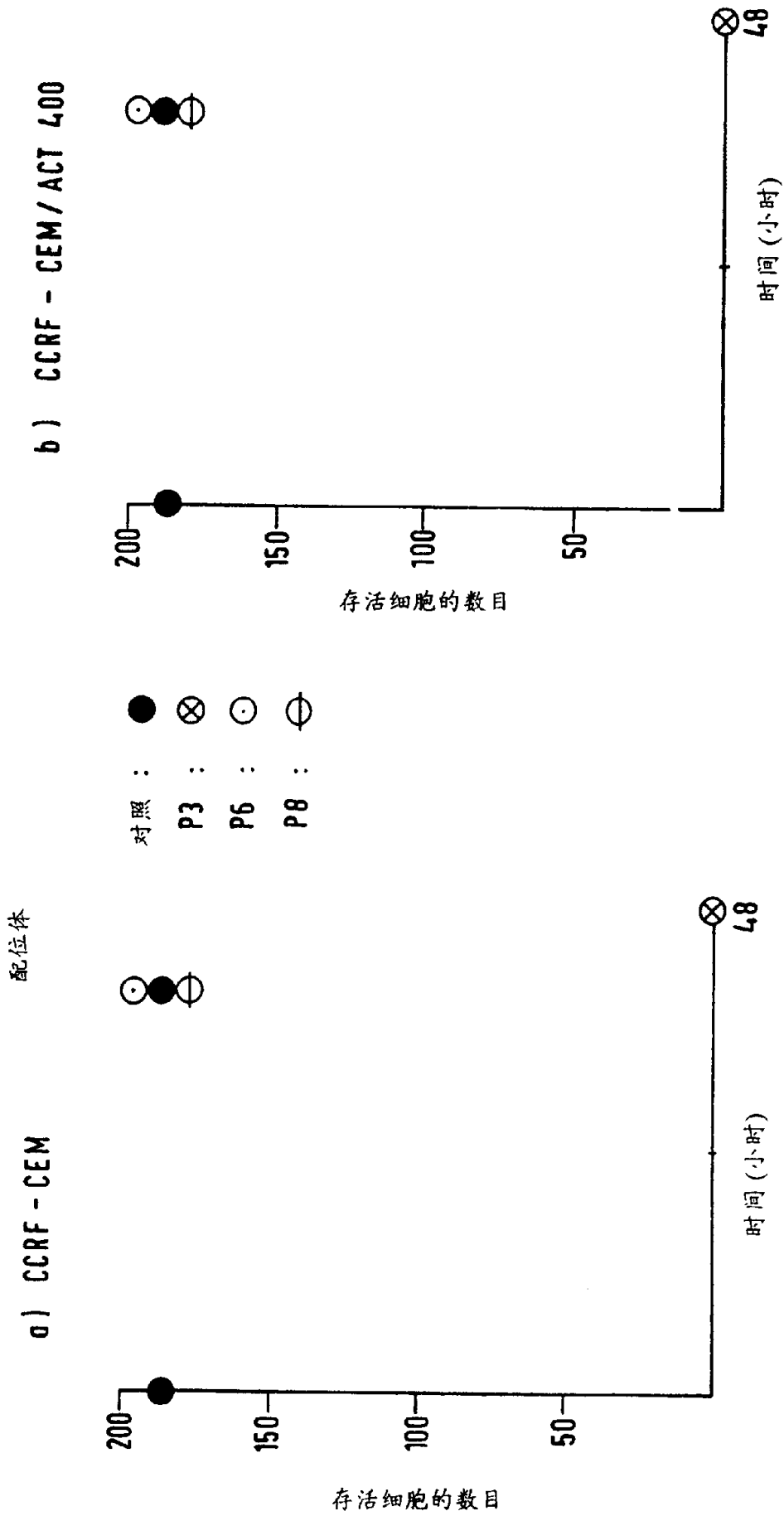


图 14

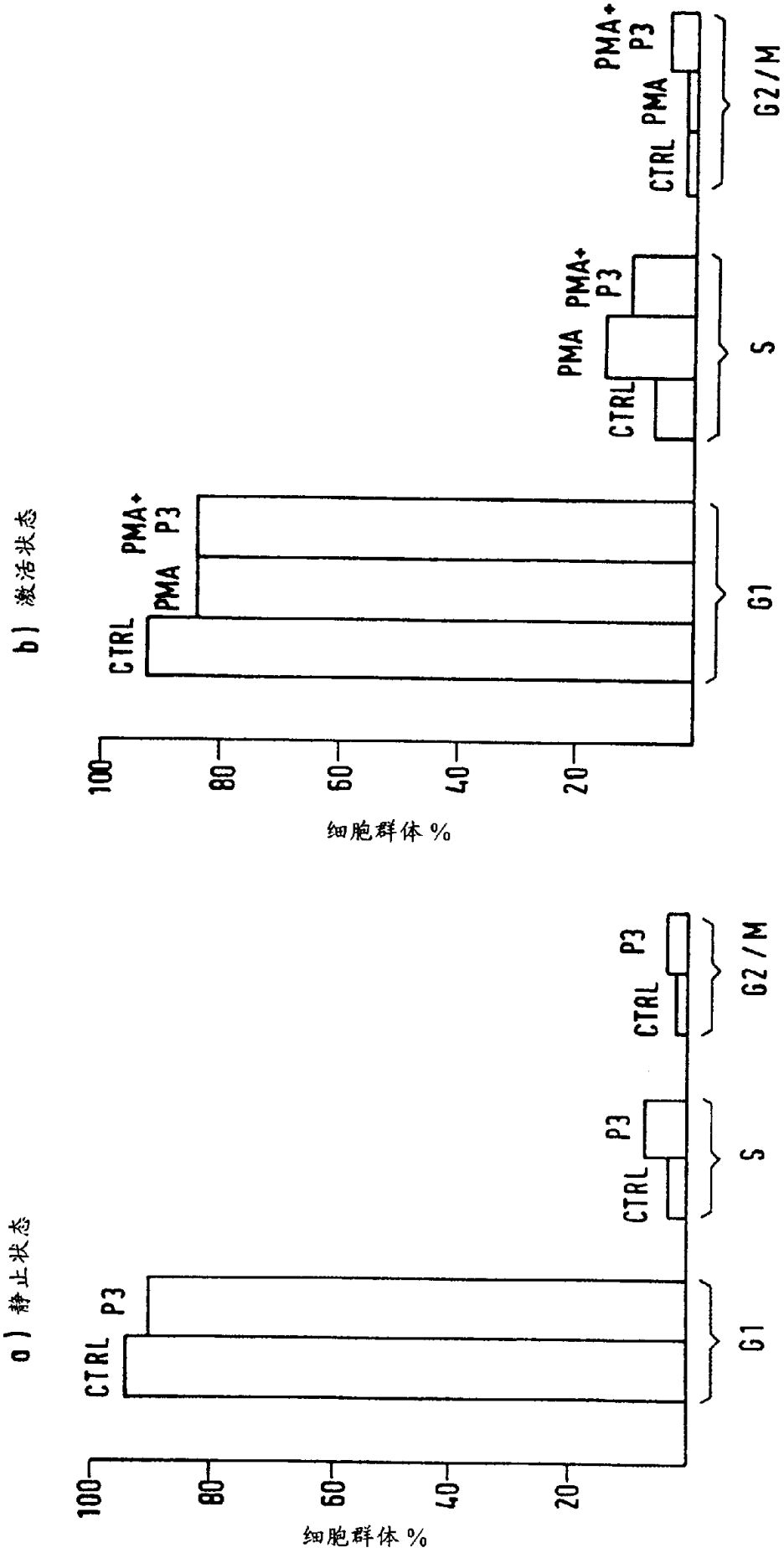


图 15