

## (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101208106 B

(45) 授权公告日 2011.07.27

(21) 申请号 200680022003.9

(22) 申请日 2006.06.20

## (30) 优先权数据

181314/2005 2005.06.21 JP

027581/2006 2006.02.03 JP

## (85) PCT申请进入国家阶段日

2007.12.19

## (86) PCT申请的申请数据

PCT/JP2006/312321 2006.06.20

## (87) PCT申请的公布数据

W02006/137398 JA 2006.12.28

## (73) 专利权人 财团法人阪大微生物病研究会

地址 日本大阪府吹田市

(72) 发明人 目加田英辅 宫本新吾

## (56) 对比文件

Oliver M. Fischer, et al. Oxidative and Osmotic Stress Signaling in Tumor Cells Is Mediated by ADAM Proteases and Heparin-Binding Epidermal Growth Factor. 《MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY》. 2004, 第24卷 (第124期), 第5181页.

Ito Y, et al. Bimodal expression of heparin-binding EGF-like growth factor in colonic neoplasms. 《Anticancer Res.》. 2001, 第21卷 (第2B期), 摘要.

Silvio Buzzi, et al. CRM197: Effects of intravenous administration to advanced cancer patients. 《Proc Amer Assoc Cancer Res》. 2004, 第45卷摘要.

审查员 康旭亮

(74) 专利代理机构 北京林达刘知识产权代理事

务所 (普通合伙) 11277

代理人 刘新宇

## (51) Int. Cl.

A61K 45/00 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/04 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 5 页

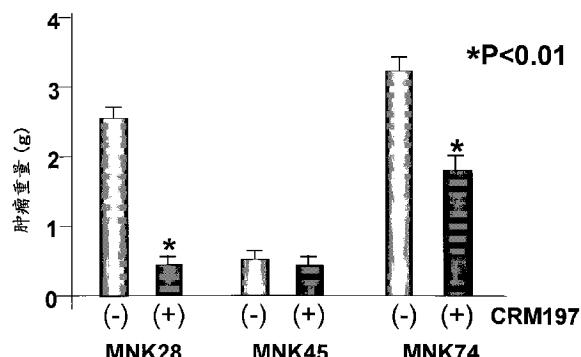
序列表 4 页 附图 3 页

## (54) 发明名称

癌症治疗剂

## (57) 摘要

癌症治疗剂, 其包含能与 HB-EGF 结合从而抑制 HB-EGF 与 EGF 受体结合的物质 (特别是 CRM197) 作为活性成分, 所述癌症选自膀胱癌、结肠癌或者胃癌及胰腺癌的弥漫性腹膜转移癌症。



1. CRM197 作为活性成分在用于生产癌症治疗药物的用途, 其中所述癌症为转移自胃癌或胰腺癌并且通过腹膜传播的腹膜转移癌症,

并且在所述癌症中 HB-EGF 的表达尤其得到了提高。

2. CRM197 作为活性成分在用于生产腹膜转移癌症治疗药物的用途, 其中所述腹膜转移癌症是转移自胃癌或胰腺癌并且通过腹膜传播的癌症。

## 癌症治疗剂

### 技术领域

[0001] 本发明涉及用于膀胱癌、结肠癌和胃癌及胰腺癌的腹膜转移的癌症治疗剂。

### 背景技术

[0002] 白喉毒素或其突变体如 CRM197 具有通过与可溶性及不溶性（锚定在膜上的）HB-EGF 中的 EGF 样结构域结合而抑制 HB-EGF 与 EGF 受体结合的活性。白喉毒素中的受体结合结构域参与这种结合。

[0003] 人们已对 CRM197 的抗癌效果进行了多种研究。例如，专利文件 1 中描述了，CRM197 对乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌和甲状腺癌有效。非专利文献 1 中公开了，对发生转移的癌症患者施用 CRM197 时，在乳腺癌和成神经细胞瘤中观察到完全应答 (complete response)，而在非小细胞肺癌、结肠癌和膀胱癌的病例中癌症则继续发展。

[0004] 对于胃癌和胰腺癌的腹膜转移而言，还没有有效的抗癌剂可供使用，公知其预后很差。没有了解到白喉毒素或其突变体如 CRM197 对这些癌症的效应。

[0005] 专利文件 1 :JP 2004-155776-A

[0006] 非专利文献 1 :S. Buzzi 等 Cancer Immunol. Immunother. (2004) 53 :1041-1048

### 发明内容

[0007] 本发明待解决的问题

[0008] 本发明的目的在于提供对膀胱癌、结肠癌和胃癌及胰腺癌的腹膜转移有效的抗癌剂。

[0009] 解决问题的手段

[0010] 由于对 CRM197 的抗肿瘤效应进行了广泛的研究，所以本发明人已发现 CRM197 对膀胱癌、结肠癌或者胃癌及胰腺癌的腹膜转移有效。

[0011] 本发明涉及以下的癌症治疗剂。

[0012] 癌症治疗剂，其包含通过与 HB-EGF 结合而抑制 HB-EGF 与 EGF 受体结合的物质作为活性成分，其中所述活性成分为白喉毒素突变体，该突变体是具有抑制 HB-EGF 与 EGF 受体结合的活性并且基本无白喉毒素毒性的多肽，并且其中所述癌症选自结肠癌、膀胱癌和腹膜转移癌。

[0013] 根据 [1] 的癌症治疗剂，其为用于膀胱癌的治疗剂。

[0014] 根据 [1] 的癌症治疗剂，其为用于结肠癌的治疗剂。

[0015] 根据 [1] 的癌症治疗剂，其为用于腹膜转移癌的治疗剂。

[0016] 根据 [4] 的癌症治疗剂，其中所述腹膜转移癌是转移自胃癌或胰腺癌并且通过腹膜传播的癌症。

[0017] 根据 [1] 至 [5] 中任一项的癌症治疗剂，其中所述活性成分为 CRM197。

[0018] 本发明的效果

[0019] 根据本发明，有效治疗膀胱癌、结肠癌和胃癌及胰腺癌的腹膜转移是可能的。

## 附图说明

[0020] 图 1 是显示腹膜传播模型的图。对裸鼠腹膜内接种  $1 \times 10^7$  个人胃癌细胞系 MKN28、MKN45 和 MKN74，并腹膜内施用 CRM197 五次 (50mg/kg/ 周)。在接种后的第六周取出整个腹膜传播病灶，测量其总重量。

[0021] 图 2 是显示 CRM197 效果的图。通过皮下注射将人膀胱癌细胞系 KK47 细胞 ( $5 \times 10^6$  个细胞) 接种至裸鼠背部。对一个组中的裸鼠，从接种细胞后第七天起以 50mg/kg/ 周的量腹膜内施用 CRM197 (箭头)。使用未施用 CRM197 的裸鼠作为对照。

[0022] 图 3. 通过皮下注射将人结肠癌细胞系 HT29 细胞或 HCT116 细胞 ( $5 \times 10^6$  个细胞) 接种至裸鼠背部。对一个组中的裸鼠，从接种细胞后第七天起以 50mg/kg/ 周的量腹膜内施用 CRM197 (箭头)。使用未施用 CRM197 的裸鼠作为对照。

[0023] 图 4 是显示腹膜传播模型的图。对裸鼠腹膜内接种  $1 \times 10^7$  个人胰腺癌细胞系 PANC1 细胞，并腹膜内施用 CRM197 五次 (50mg/kg/ 周)。在所述接种后的第六周取出整个腹膜传播病灶，测量其总重量。

## [0024] 实施本发明的模式

[0025] 本发明涉及用于治疗选自结肠癌、膀胱癌或者胃癌及胰腺癌的腹膜转移癌症中至少一种癌症的癌症治疗剂，其包含通过与 HB-EGF 结合而抑制 HB-EGF 与 EGF 受体结合的物质作为活性成分，特别是这样的多肽：其为白喉毒素突变体，具有抑制 HB-EGF 与 EGF 受体结合的活性并且基本无白喉毒素的毒性。

[0026] 作为上述物质的实例，优选包含白喉毒素受体结合结构域的多肽。特别优选的以上物质为 CRM97 或 DT52E148K。就 CRM197 中的氨基酸编号而言，通过去除 SEQ ID NO:1 中氨基酸序列的信号序列 (1 至 25 位) 而将第 26 位氨基酸 (Gly) 编号为第 1 个。

[0027] 白喉毒素中的受体结合结构域能通过与 HB-EGF 结合来抑制 HB-EGF 与 EGF 受体结合。作为上述多肽的实例，优选在白喉毒素的催化作用结构域中具有一个或多个 (例如几个至几十个) 损害其部分或全部催化作用的氨基酸缺失、替换、插入或添加的多肽，因为其毒性很低。可以包括或不包括所述 25 个氨基酸残基的信号序列。

[0028] 在本发明的一个优选实施方案中，上述物质包括以下具有抑制 HB-EGF 与 EGF 受体结合的活性的多肽 (a)、(b) 或 (c) 中任一种：

[0029] (a) 白喉毒素的部分构成的至少含有白喉毒素受体结合结构域的多肽；

[0030] (b) 由在多肽 (a) 的受体结合结构域中具有一个或多个 (例如几个或几十个) 氨基酸缺失、替换或添加的氨基酸序列构成的多肽；或者

[0031] (c) 包含蛋白质 (a) 或 (b) 的复合多肽。

[0032] 受体结合结构域通常指从第 378 位至 C 端 (535 位) 的区域，然而也有报道称 C 端侧约 53 个氨基酸残基的区域具有受体结合能力 (J. Biol. Chem., 265:7331-7337, 1990)。

[0033] 优选将白喉毒素突变体如 CRM197 和 DT52E148K 作为本发明癌症治疗剂的活性成分，因为它们具有低毒性。

[0034] 就消除副作用和增强安全性而言，本发明物质的毒性水平优选等于或低于 CRM197。然而，本发明提出，毒性有助于制癌剂的效果，因此，就增强制癌效果而言也优选毒性在与 CRM197 相同的极低水平上。为此，可以根据制剂配方适当地选择白喉毒素的毒性水

平。

[0035] 可以通过突变 ADP 核糖基化所必需的催化作用结构域或者缺失部分或全部的催化作用结构域来控制白喉毒素的毒性水平。除此以外，在催化作用结构域和受体结合结构域之间存在的跨膜结构域中具有突变的白喉毒素会变为无毒性或低毒性，因为催化结构域不能被内化至胞质中。因此，有可能能够使用在该区域中具有突变的白喉毒素作为制癌剂。

[0036] 在本发明的活性成分中，含有白喉毒素氨基酸序列中受体结合结构域相应的第 378 位至第 535 位残基所示氨基酸序列的多肽能够抑制 HB-EGF 与 EGF 受体结合。

[0037] 作为本发明活性成分的优选物质包括 (i) 保留白喉毒素的受体结合结构域并突变 (部分或全部替换、缺失、插入或添加) 催化作用结构域的白喉毒素突变体。这样的突变体的具体实例包括 CRM197、DT52E148K 和 GST-DT。这些突变体基本不具有白喉毒素的毒性，并且抑制 HG-EGF 与 EGF 受体结合。CRM197 是 52 位 (不计 25 个氨基酸残基的信号序列) 由 Gly 突变为 Glu 的突变体；DT52E148K 是除了上述突变外还在 148 位 (不计信号序列) 由谷氨酸突变为赖氨酸的突变体；GST-DT 是与 GST (谷胱甘肽-S-转移酶) 结合的包含 378 位至 535 位 (不计信号序列) 氨基酸残基的蛋白质。CRM197 的氨基酸序列 (前 25 个氨基酸残基组成信号序列) 示于 SEQ ID NO :1，编码它的碱基序列示于 SEQ ID NO :2。

[0038] 已有报道称，CRM197 不具有白喉毒素的毒性，即不具有 ADP 核糖基化活性 (T. Uchida 和 A. M. Pappenheimer Jr. (1972) Science 175, 901-903)。还已知在 148E 位置具有突变的 148K 突变体仅有极弱活性 (J. T. Barbieri 和 R. J. Collier (1987) Infect. Immun. 55, 1647-1651)。DT52E148K 优选作为更安全的突变体，它是双突变体，在 52E 突变体 CRM197 中还具有 148K 突变。

[0039] 可以通过以下步骤制备含有受体结合结构域的片段：使用引入质粒的编码 CRM197 的基因 (P<sub>B</sub> 197) 作为模板，通过 PCR 合成受体结合结构域部分的 DNA 序列；将该序列引入表达载体 (pGEX-3X、pQE-30) 的多克隆位点，以合成 GST 融合蛋白或组氨酸标签；将得到的质粒引入大肠杆菌并在大肠杆菌中合成由所述质粒编码的基因。

[0040] 可按如下制得在催化作用结构域中具有突变的突变体。使用引入质粒的编码 CRM197 的基因 (P<sub>B</sub> 197) 作为模板，使用待突变的部分作为引物进行 PCR，以合成 CRM197 区域。通过引入待突变的点突变来合成所述引物并使用。可以通过以下步骤制得所述突变体：将合成 DNA 引入用于大肠杆菌的基因表达载体 (pET-22b)、用该载体转化大肠杆菌，以在大肠杆菌中表达该突变体。

[0041] 本发明的治疗剂对于膀胱癌和结肠癌的原发病灶以及胃癌和胰腺癌的转移病灶 (腹膜转移) 的治疗有效。

[0042] 本发明的治疗剂对于癌症的治疗有效，在所述癌症中，EGF 家族的生长因子中 HB-EGF 的表达尤其得到了提高。

[0043] 本发明的治疗剂可由上述活性成分直接配制，或者可通过将所述成分与可药用载体组合而配制成药物。

[0044] 上述治疗剂可以口服给药或肠胃外给药 (例如，静脉内、肌内、腹膜内、皮下或皮内注射，或者直肠内给药、经粘膜给药、经呼吸道给药)。当应用于腹膜传播的恶性肿瘤如胃癌和胰腺癌的腹膜转移时，就直接送至癌细胞而言优选通过腹膜内注射给药。

[0045] 口服给药的药物组合物配方可以包括但不限于如片剂、颗粒剂、胶囊剂、粉剂、液

体剂、悬浮剂和糖浆剂,肠胃外给药的药物组合物配方可以包括但不限于如注射剂、输制剂、栓剂以及经皮吸收剂。

[0046] 在所述治疗剂的生产中使用的制备添加剂的类型无特别的限制,可由本领域技术人员适当地选择。例如,可以使用赋形剂、崩解剂或崩解助剂、粘合剂、润滑剂、包衣剂、碱、溶解剂或溶解助剂、分散剂、助悬剂、乳化剂、缓冲剂、抗氧化剂、防腐剂、张度剂、pH 调节剂、溶解剂和稳定剂,用于这些目的的各个具体成分是本领域技术人员熟知的。

[0047] 作为用于制备口服给药制剂的制备添加剂,可以使用赋形剂如葡萄糖、乳糖、D- 甘露醇、淀粉或结晶纤维素;崩解剂或崩解助剂如羧甲基纤维素、淀粉或羧甲基纤维素钙;粘合剂如羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮或明胶;润滑剂如硬脂酸镁或滑石粉;包衣剂如羟丙基甲基纤维素、蔗糖、聚乙二醇或氧化钛;以及碱如凡士林、液体石蜡、聚乙二醇、明胶、高岭土、甘油、纯净水和硬脂 (hard fat)。

[0048] 作为可用于制备注射或输注射剂的制备添加剂,可以使用溶解剂或溶解助剂如用于注射用蒸馏水、可组成水性注射剂或溶解使用的注射剂的盐水和丙二醇;张度剂如葡萄糖、氯化钠、D- 甘露醇和甘油;以及 pH 调节剂如无机酸、有机酸、无机碱或有机碱。

[0049] 尽管本发明治疗剂中所包含的活性成分的量根据治疗剂的剂型或给药途径而变化,不能硬性定义,但是其通常通过在最终制剂中约 0.0001% 至 70% 的范围内进行适当选择来确定。

[0050] 本发明的治疗剂可以施用于包括人的哺乳动物,特别是人。

[0051] 本发明治疗剂的给药量应该根据以下条件而提高或降低,例如患者的年龄、性别、体重和症状以及给药途径,优选以每 1kg 体重约 1 μ g 至 50mg 的范围作为每个成年人每天的活性成分量。上述给药量的药物可以每天给药一次或分成几次给药。药物可以在 6 至 8 周中每周施用一次,或者在 2 至 3 周中每隔一天施用,或者每天施用 10 至 14 天。

[0052] 作为能够与本申请的癌症治疗剂组合的制癌剂,示例有紫杉醇、泰索帝、5- 氟尿嘧啶、顺铂、卡铂、阿霉素和喜树碱等。

### [0053] 实施例

[0054] 下文将基于实施例更详细地描述本发明,但是显然本发明不限于这些实施例。

#### [0055] 实施例 1

[0056] 腹膜传播模型。对裸鼠腹膜内接种  $1 \times 10^7$  个人胃癌细胞系 MKN28、MKN45 和 MKN74 细胞,并以腹膜内方式施用 CRM197 五次 (50mg/kg/ 周)。在接种后的第 6 周取出整个腹膜扩散病灶,测量其总重量 (图 1)。

#### [0057] 实施例 2

[0058] 使用裸鼠进行了肿瘤发生实验。用 EDTA/PBS (-) 洗涤在 RPMI+10% FBS 中培养的人膀胱癌细胞系 KK47 细胞,使用 0.25% 胰酶进行收集。所述细胞用 RPMI+10% FBS 洗涤两次并用 RPMI (无血清) 洗涤两次,将该细胞以  $5 \times 10^6$  加入 250 μ L RPMI (含血清)。通过皮下注射将其接种至裸鼠背部。在一组裸鼠中,从接种细胞后的第 7 天开始以 50mg/kg/ 周的量腹膜内施用 CRM197。CRM197 在 3 周中每周施用一次。未施用 CRM197 的裸鼠用作对照。施用时间和肿瘤体积的关系示于图 2。肿瘤体积通过每周测量所产生的肿瘤的长轴和短轴并计算 (长轴) × (短轴) × (短轴) × 1/2 而获得。

#### [0059] 实施例 3

[0060] 使用裸鼠进行了肿瘤发生实验。用 EDTA/PBS (-) 洗涤在 RPMI+10% FBS 中培养的人结肠癌细胞系 HT29 或 HCT116 细胞 (可得自美国典型培养物保藏中心 (ATCC))，使用 0.25% 胰酶进行收集。所述细胞用 RPMI+10% FBS 洗涤两次并用 RPMI (无血清) 洗涤两次，将该细胞以  $5 \times 10^6$  加入 250  $\mu$  L RPMI (含血清)。通过皮下注射将其接种至裸鼠背部。在一组裸鼠中，从接种细胞后的第 7 天开始以 50mg/kg/ 周的量腹膜内施用 CRM197。CRM197 在 3 周中每周施用一次。未施用 CRM197 的裸鼠用作对照。施用时间和肿瘤体积的关系示于图 3。肿瘤体积通过每周测量所产生肿瘤的长轴和短轴并计算 (长轴)  $\times$  (短轴)  $\times$  (短轴)  $\times$  1/2 而获得。

[0061] 实施例 4

[0062] 腹膜传播模型。对裸鼠腹膜内接种  $1 \times 10^7$  个人胰腺癌细胞系 PANC1 细胞，并以腹膜内方式施用 CRM197 五次 (50mg/kg/ 周)。在接种后的第 6 周取出整个腹膜扩散病灶，测量其总重量 (图 4)。

[0063] 从这些实施例的结果中发现，施用 CRM197 在所有情况下均抑制肿瘤生长。

<110> 财团法人阪大微生物病研究会

<120> 抗癌剂

<130> P06-61

<160> 2

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 560

<212> PRT

<213> CRM197

<400> 1

Met Ser Arg Lys Leu Phe Ala Ser Ile Leu Ile Gly Ala Leu Leu Gly  
1 5 10 15  
Ile Gly Ala Pro Pro Ser Ala His Ala Gly Ala Asp Asp Val Val Asp  
20 25 30  
Ser Ser Lys Ser Phe Val Met Glu Asn Phe Ser Ser Tyr His Gly Thr  
35 40 45  
Lys Pro Gly Tyr Val Asp Ser Ile Gln Lys Gly Ile Gln Lys Pro Lys  
50 55 60  
Ser Glv Thr Gln Glv Asn Tvr Asp Asp Asp Trp Lvs Glu Phe Tvr Ser  
65 70 75 80  
Thr Asp Asn Lys Tyr Asp Ala Ala Gly Tyr Ser Val Asp Asn Glu Asn  
85 90 95  
Pro Leu Ser Gly Lys Ala Gly Gly Val Val Lys Val Thr Tyr Pro Gly  
100 105 110  
Leu Thr Lys Val Leu Ala Leu Lys Val Asp Asn Ala Glu Thr Ile Lys  
115 120 125  
Lys Glu Leu Gly Leu Ser Leu Thr Glu Pro Leu Met Glu Gln Val Gly  
130 135 140  
Thr Glu Glu Phe Ile Lys Arg Phe Gly Asp Gly Ala Ser Arg Val Val  
145 150 155 160  
Leu Ser Leu Pro Phe Ala Glu Gly Ser Ser Ser Val Glu Tyr Ile Asn

	165	170	175
Asn Trp Glu Gln Ala Lys Ala Leu Ser Val Glu Leu Glu Ile Asn Phe			
	180	185	190
Glu Thr Arg Gly Lys Arg Gly Gln Asp Ala Met Tyr Glu Tyr Met Ala			
	195	200	205
Gln Ala Cys Ala Gly Asn Arg Val Arg Arg Ser Val Gly Ser Ser Leu			
	210	215	220
Ser Cys Ile Asn Leu Asp Trp Asp Val Ile Arg Asp Lys Thr Lys Thr			
	225	230	235
Lys Ile Glu Ser Leu Lys Glu His Gly Pro Ile Lys Asn Lys Met Ser			
	245	250	255
Glu Ser Pro Asn Lys Thr Val Ser Glu Glu Lys Ala Lys Gln Tyr Leu			
	260	265	270
Glu Glu Phe His Gln Thr Ala Leu Glu His Pro Glu Leu Ser Glu Leu			
	275	280	285
Lys Thr Val Thr Gly Thr Asn Pro Val Phe Ala Gly Ala Asn Tyr Ala			
	290	295	300
Ala Trp Ala Val Asn Val Ala Gln Val Ile Asp Ser Glu Thr Ala Asp			
	305	310	315
Asn Leu Glu Lys Thr Thr Ala Ala Leu Ser Ile Leu Pro Gly Ile Gly			
	325	330	335
Ser Val Met Gly Ile Ala Asp Gly Ala Val His His Asn Thr Glu Glu			
	340	345	350
Ile Val Ala Gln Ser Ile Ala Leu Ser Ser Leu Met Val Ala Gln Ala			
	355	360	365
Ile Pro Leu Val Gly Glu Leu Val Asp Ile Gly Phe Ala Ala Tyr Asn			
	370	375	380
Phe Val Glu Ser Ile Ile Asn Leu Phe Gln Val Val His Asn Ser Tyr			
	385	390	395
Asn Arg Pro Ala Tyr Ser Pro Gly His Lys Thr Gln Pro Phe Leu His			
	405	410	415
Asp Gly Tyr Ala Val Ser Trp Asn Thr Val Glu Asp Ser Ile Ile Arg			
	420	425	430
Thr Gly Phe Gln Gly Glu Ser Gly His Asp Ile Lys Ile Thr Ala Glu			
	435	440	445
Asn Thr Pro Leu Pro Ile Ala Gly Val Leu Leu Pro Thr Ile Pro Gly			
	450	455	460
Lys Leu Asp Val Asn Lys Ser Lys Thr His Ile Ser Val Asn Gly Arg			
	465	470	475
			480

Lys Ile Arg Met Arg Cys Arg Ala Ile Asp Gly Asp Val Thr Phe Cys  
 485 490 495  
 Arg Pro Lys Ser Pro Val Tyr Val Gly Asn Gly Val His Ala Asn Leu  
 500 505 510  
 His Val Ala Phe His Arg Ser Ser Ser Glu Lys Ile His Ser Asn Glu  
 515 520 525  
 Ile Ser Ser Asp Ser Ile Gly Val Leu Gly Tyr Gln Lys Thr Val Asp  
 530 535 540  
 His Thr Lys Val Asn Ser Lys Leu Ser Leu Phe Phe Glu Ile Lys Ser  
 545 550 555 560

&lt;210&gt;2

&lt;211&gt;1683

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;CRM197

&lt;400&gt;2

gtgagcagaa aactgtttgc gtcaatctta atagggcgcc tactggggat aggggccccca	60
ccttcagccc atgcaggcgcc tggatgtt gttgattctt ctaaatctt tgtgatggaa	120
aactttctt cgtaccacgg gactaaacct gtttatgttag attccattca aaaaggata	180
caaaaaggccaa aatctggta acaaggaaat tatgacgatg attggaaaga gttttatagt	240
accgacaata aatacgaacgc tgccggatac tctgttagata atgaaaaccc gctctctgga	300
aaagctggag gcgtggtaa agtgacgtat ccaggactga cgaaggttct cgcaactaaaa	360
gtggataatg ccgaaaactat taagaaaagag ttaggtttaa gtctcactga accgttgatg	420
gagcaagtcg gaacggaaga gtttatcaaa aggttcggtg atggtgcttc gcgtgtatg	480
ctcagccttc cttcgctga gggagttct agcgttgaat atattaataa ctggaaacag	540
gcgaaagcgt taagcgtaga acttgagatt aatttgaaa cccgtggaaa acgtggccaa	600
gatgcgtatgt atgagtatat ggctcaagcc tgtgcaggaa atcgtgtcag gcgtatcaga	660
ggtagctcat tgtcatgcat aaatcttgat tggatgtca taagggataa aactaagaca	720
aagatagagt cttgaaaga gcatggccct atcaaaaata aaatgagcga aagtcccaat	780
aaaacagtat ctgaggaaaa agctaaacaa tacctagaag aatttcatca aacggcatta	840
gagcatcctg aattgtcaga actaaaacc gttactggta ccaatcctgt attcgctgg	900
gctaactatg cggcgtggc agtaaacgtt gcgcaggatc tcgatagcga aacagctgat	960
aatttgaaa agacaactgc tgctcttcg atacttcctg gtatcggtat cgtaatggc	1020
attgcagacg gtgccgttca ccacaataca gaagagatag tggcacaatc aatagcttta	1080
tctgtttaa tgggtgctca agctattcca ttggtaggat agctagttga tattggttc	1140
gctgcataata atttttaga gagtattatc aatttatttc aagtagttca taattcgat	1200
aatcgccccg cgtattctcc gggcataaaa acgcaaccat ttcttcattga cgggtatgt	1260
gtcagttgga acactgttga agattcgata atccgaactg gttttcaagg ggagagttgg	1320

cacgacataa aaattactgc tgaaaatacc ccgcttccaa tcgcgggtgt cctactaccg	1380
actattcctg gaaagctgga cgtaataag tccaagactc atattccgt aaatggtcgg	1440
aaaataagga tgcgttgcag agctatagac ggtgatgtaa cttttgtcg ccctaaatct	1500
cctgttatg ttggtaatgg tgtgcattgcg aatttcacg tggcatttca cagaaggcagc	1560
tccggaaaaa ttcattctaa tgaaattcg tcggattcca taggcgttct tgggtaccag	1620
aaaacagtag atcacaccaa ggttaattct aagctatcgc tatttttga aatcaaaagc	1680
tga	1683

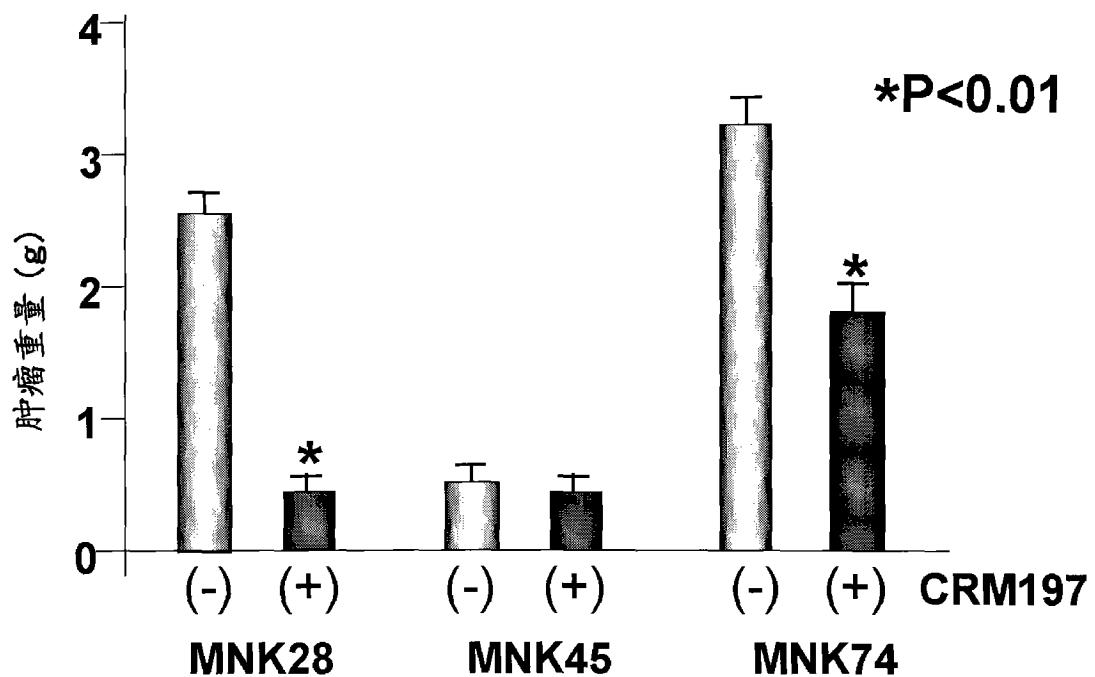


图 1

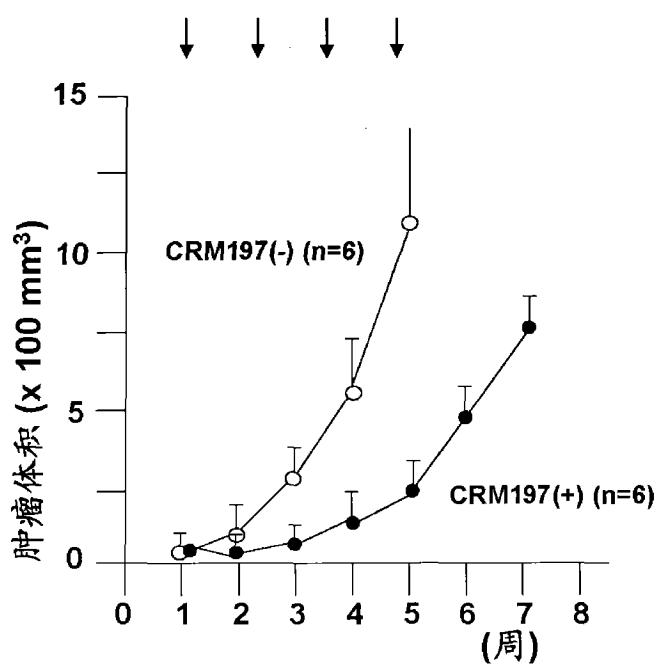
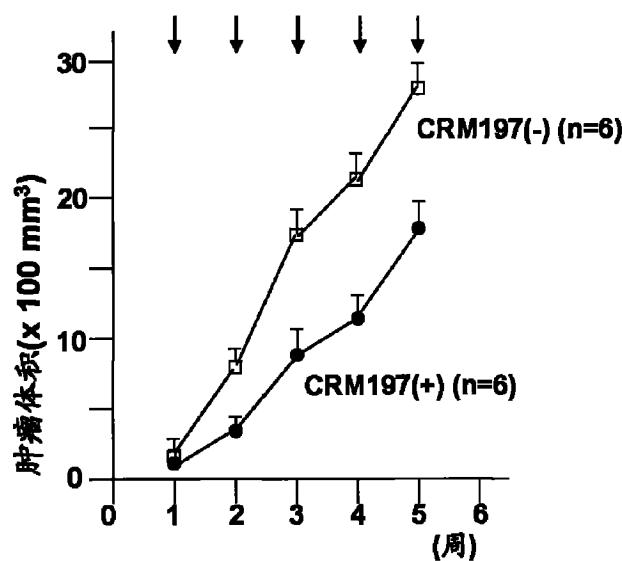


图 2

小鼠中肿瘤的生长 (HT29)



小鼠中肿瘤的生长 (HCT116)

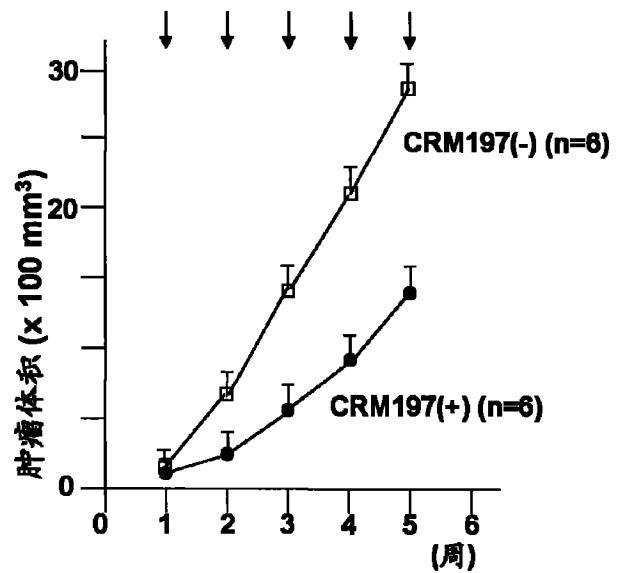


图3

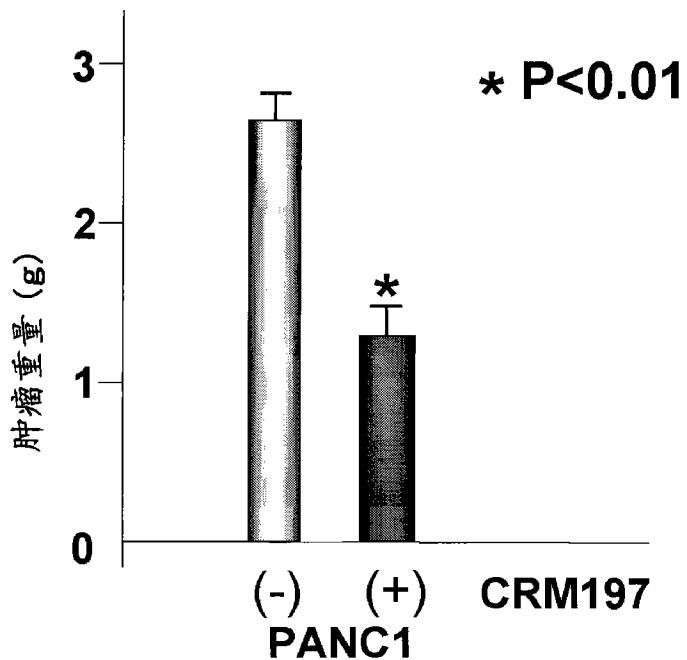


图4