

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

A61K 38/40 (2006.01)

A23L 1/305 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03816385.3

[45] 授权公告日 2009 年 3 月 11 日

[11] 授权公告号 CN 100467059C

[22] 申请日 2003.5.9 [21] 申请号 03816385.3

[30] 优先权

[32] 2002.5.10 [33] US [31] 60/379,441

[32] 2002.5.10 [33] US [31] 60/379,442

[32] 2002.5.10 [33] US [31] 60/379,474

[86] 国际申请 PCT/US2003/014789 2003.5.9

[87] 国际公布 WO2003/099323 英 2003.12.4

[85] 进入国家阶段日期 2005.1.10

[73] 专利权人 阿根廷尼克斯有限公司

地址 美国德克萨斯州

[72] 发明人 A·瓦拉哈查里 R·巴斯基

F·佩里克尔 K·佩特拉克

王燕云

[56] 参考文献

CN1047204C 1999.12.8

US6333311B1 2001.12.25

CN1262625A 2000.8.9

EP0730868A1 1996.9.11

Bovine lactoferrin and lactoferricin, a peptide derived from bovine lactoferrin, inhibit tumor metastasis in mice. Yoo YC et al. Jpn J Cancer Res., Vol. 88 No. 2. 1997

审查员 丁海

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 刘维升 孔青

权利要求书 1 页 说明书 32 页 附图 5 页

[54] 发明名称

乳铁蛋白在治疗恶性肿瘤疾病中的用途

[57] 摘要

本发明涉及一种治疗过度增生性疾病的方法，该方法是通过单独给予乳铁蛋白或给予与其它常规的抗癌治疗结合的组合物实现。

1. 人乳铁蛋白在制备用于抑制已形成肿瘤生长的口服或静脉给药的药物中的应用。

2. 如权利要求 1 所述的应用，其中已形成肿瘤选自鳞状细胞瘤、乳癌、黑色素瘤、胃癌、卵巢癌和肺癌。

3. 如权利要求 1 所述的应用，其中人乳铁蛋白的给药量为约每天 $0.1\ \mu\text{g} - 10\text{g}$ 。

4. 权利要求 1 的用途，其中人乳铁蛋白与抗癌剂的药剂联合用于制备口服或静脉给药的药物。

5. 如权利要求 4 所述的应用，其中抗癌药剂是化疗药、放射治疗剂、生物治疗剂或免疫治疗剂。

6. 如权利要求 5 所述的应用，其中化疗药是顺铂或多西紫杉醇。

乳铁蛋白在治疗恶性肿瘤疾病中的用途

[0001] 本申请要求美国临时申请 2002 年 05 月 10 日提出的 60/379,442、2002 年 05 月 10 日提出的 60/379,441 以及 2002 年 5 月 10 日提出的 60/379,474 的优先权，这些文献均全文结合于此作参考。

发明领域

[0002] 本发明涉及治疗过度增生性疾病的方法，该方法是通过单独给予乳铁蛋白的组合物或给予与其它常规的抗癌治疗结合的组合物实现。含乳铁蛋白的组合物可以口服、静脉、肿瘤内或局部给药。

背景技术

[0003] 近来，很少有关于治疗普通的各类型癌症的有效方法。对于给定个体患者的治疗过程取决于诊断、疾病发展的阶段，和其它因素，如年龄、性别以及患者通常的健康状况。最为一般的癌症治疗方法是手术治疗、放射疗法和化疗。在癌症的诊断和治疗中，手术治疗常常起主要作用。典型的是，外科手术需要进行活体检查并去除癌性生长点。然而，如果癌症已经广泛转移，外科手术就不太可能治愈癌症，且需要采取其它措施。外科手术的副作用包括降低了结构或器官的机能，增加感染、出血、血液凝固等并发症发生的机率。放射治疗、化疗、生物疗法及免疫疗法同外科手术都是治疗癌症的可选措施 (Mayer, 1998; Ohara, 1998; Ho et al., 1998)。这些治疗措施的缺点是其副作用大，能引起骨髓抑制、皮肤刺激、吞咽困难、口舌干燥、恶心、腹泻、脱发、体重减轻、精力丧失等 (Curran, 1998; Brizel, 1998)。

[0004] 乳铁蛋白是一种单链的金属配基的糖蛋白。许多细胞类型，如单核细胞、巨噬细胞、淋巴细胞及肠刷状缘细胞，都是公知的有乳铁蛋白受体的细胞。乳铁蛋白除了能够作为 B 和 T 淋巴细胞必要的生长因素外，还具有广泛的与宿主初级防御机能相关的功能。例如，乳铁蛋白能表达自然杀伤细胞(NK)的活性，包括集落刺激活性、多形核中性白细胞活性(PMN)、粒细胞生成调节、抗体依赖性细胞毒性的增强、淋巴因子激活的杀伤细胞(LAK)的兴奋活性，以及巨噬细胞毒

性的增强。

[0005] 最近，牛乳铁蛋白(bLF)被用于肿瘤形成和/或形成的肿瘤的预防。本发明则首先应用乳铁蛋白治疗而不是预防已经形成的肿瘤。

5

发明概述

[0006] 本发明披露了一种治疗过度增生性疾病的方法。该治疗方法包括口服、静脉、局部和/或在肿瘤内给予乳铁蛋白。

10 [0007] 本发明一个具体实施方式是提供一种治疗过度增生性疾病的方法，包括口服给予患者有效提供改善所述患者的过度增生性疾病的量的人类乳铁蛋白的组合物的步骤。更为特别的是，组合物的量为每天大约 1 mg - 约 100 g，更优选为每天 20 mg - 10 g。进一步的实施方式包括和人类乳铁蛋白组合物联合给予抗酸药物。

15 [0008] 在一个具体实施方式中，人类乳铁蛋白组合物可以分散在药学可接受的载体中。特别优选的是，人类乳铁蛋白是重组人类体乳铁蛋白。

[0009] 过度增生性疾病进一步定义为癌症，包含瘤。瘤选自黑素瘤、非小细胞肺部肿瘤、小细胞肺部肿瘤、肺癌及肝癌、成视网膜细胞瘤，星形细胞瘤、多形胶母细胞瘤、齿龈肿瘤、舌部肿瘤、白血病、
20 成神经细胞瘤、鳞状细胞癌、头癌、颈癌、乳癌、胰癌、前列腺癌、肾癌、骨癌、睾丸癌、卵巢癌、间皮癌、肉瘤、子宫颈癌、胃肠癌、淋巴瘤、脑癌、结肠癌、膀胱癌。更特别的是，瘤是造血系统的瘤。例如，造血系统的瘤选自急性骨髓性白血病、急性成淋巴细胞性白血病、骨髓增生异常综合征、慢性骨髓单核细胞性白血病、青少年骨髓单核细胞白血病、多发性骨髓瘤和慢性淋巴细胞性白血病。
25

[0010] 在进一步的实施方式中，过度增生性疾病选自类风湿性关节炎、肠炎、骨关节炎、平滑肌瘤、腺瘤、脂肪瘤、血管瘤、纤维瘤、血管闭塞、再狭窄、动脉粥样硬化、初级增生性损伤、原位癌、口腔毛状白斑、和牛皮癣。

30 [0011] 另一个具体实施方式是提供一种治疗过度增生性疾病的方法，包括通过胃肠道途径给患者粘膜免疫系统补充增加量的人类乳铁蛋白。人类乳铁蛋白可以口服给予，并刺激白细胞介素-18 和粒细胞

巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)的生成。

[0012] 进一步说, 另一个本发明的具体实施方式是经胃肠道途径给予患者增强粘膜免疫响应的方法, 包括口服给予患者人类乳铁蛋白的步骤。人类乳铁蛋白经胃肠道途径刺激白细胞介素-18 和 GM-CSF。白细胞介素-18 刺激免疫细胞的生成、成熟、迁移或激活, 例如 T 淋巴细胞或天然杀伤细胞。T 淋巴细胞选自 CD4⁺、CD8⁺和 CD3⁺细胞。GM-CSF 同样刺激免疫细胞的生成、成熟、迁移或激活, 例如树突细胞或其它抗原呈递细胞。进一步的具体实施方式包括治疗过度增生性疾病的方法, 包括口服给予患者人类乳铁蛋白组合物, 并联合化疗、生物治疗、免疫治疗、手术治疗或放射治疗。更为特别的是, 化疗是给予铂基试剂, 如顺铂, 紫杉烷基试剂, 如多西紫杉醇。

[0013] 另一个具体实施方式是减缓患者瘤生长的方法, 包括口服给予患者有效减缓瘤生长的量的人类乳铁蛋白组合物的步骤。进一步说, 乳铁蛋白组合物可以联合化疗、生物治疗、免疫治疗、手术治疗或放射治疗给予。

[0014] 进一步说, 另一具体实施方式是一种治疗过度增生性疾病的方法, 包括静脉给予患者有效提供改善过度增生性疾病的乳铁蛋白的量的步骤。组合物的量为每天大约 0.1 μ g - 约 10g。更为特别的是, 乳铁蛋白是哺乳动物的乳铁蛋白, 例如, 人或牛的乳铁蛋白, 并乳铁蛋白也可以是重组乳铁蛋白。

[0015] 另一个具体实施方式包括一种治疗过度增生性疾病的方法, 包括补充患者全身免疫系统增加量的乳铁蛋白进入体循环的步骤。乳铁蛋白通过静脉给药。进一步说, 乳铁蛋白组合物可以联合化疗、生物治疗、免疫治疗、手术治疗或放射治疗给予。

[0016] 进一步说, 本发明另一个具体实施方式是增强全身免疫响应的方法, 包括静脉给予患者乳铁蛋白组合物的步骤。乳铁蛋白刺激白细胞介素-18 和 GM-CSF。认为白细胞介素-18 刺激免疫细胞的生成或活性, 例如 T 淋巴细胞或天然杀伤细胞和 GM-CSF 促进包括树突细胞或其它抗原呈递细胞的免疫细胞的迁移和成熟。

[0017] 进一步说, 另一个本发明的具体实施方式是治疗过度增生性疾病的方法, 包括局部给予患者有效提供改善过度增生性疾病的量的乳铁蛋白组合物的步骤。组合物的量为大约每天 0.1 μ g - 约 10g。

该组合物可以是局部用凝胶、溶液、胶囊或片剂，所含乳铁蛋白浓度为大约 0.01 - 大约 20%。更为特别的是，乳铁蛋白是哺乳动物的乳铁蛋白，例如，人或牛的乳铁蛋白，并乳铁蛋白也可以是重组乳铁蛋白。

[0018] 另一个具体实施方式是通过局部给予乳铁蛋白并联合化疗、生物治疗、免疫治疗、手术治疗或放射治疗来治疗过度增生性疾病的方法。

[0019] 进一步说，本发明另一个具体实施方式为增强局部或全身免疫响应的方法，包括局部给予患者乳铁蛋白组合物的步骤。乳铁蛋白通过角质化刺激白细胞介素-18 和 / 或 GM-CSF 的生成。认为白细胞介素-18 刺激免疫细胞的生成或活性，例如 T 淋巴细胞或天然杀伤细胞和 GM-CSF 促进包括树突细胞或其它抗原呈递细胞的免疫细胞的迁移和成熟。

[0020] 进一步说，本发明另一个具体实施方式为一种通过给予患者乳铁蛋白组合物刺激、增强或提升白细胞介素-18 和 / 或 GM-CSF 水平的方法。

[0021] 以上所述较为宽泛地描述了本发明的特征和技术优点，据此能够更好地理解以下关于本发明的详细描述。本发明附加的技术特征和优点将在下面详细说明，并形成本发明权利要求的保护主题。应当理解对于本领域普通技术人员来说，所公开的特定具体实施方式以及概念可以容易地作为修饰或添加其它结构以实现本发明目的的基础。对于本领域普通技术人员来说，还懂得等同的构成不会违背本发明所附权利要求描述的范围和精神。作为本发明特性的新的技术特征，无论是构成还是操作方法，其进一步的主题和优点都将从以下的详细说明以及附图中得到更好的理解。以下每张附图都用于说明及详述本发明，但不对本发明起限定作用。

附图简要说明

[0022] 为了能够更加完整的理解本发明，本发明的说明书将参考以下附图。

[0023] 附图 1 描述了通过口服、静脉及肿瘤内给予或不给予重组人的乳铁蛋白的鳞状细胞瘤的生长情况。

[0024] 附图 2 描述了接受乳铁蛋白、顺铂和联用乳铁蛋白和顺铂

的动物的肿瘤抑制百分数。

[0025] 附图 3 描述了乳铁蛋白联合不同剂量的顺铂的肿瘤抑制百分数。

[0026] 附图 4 描述了用乳铁蛋白治疗后的 NK 活性。

5 [0027] 附图 5 描述了瘤内给予或不给予每天一或两次的重组乳铁蛋白的鳞状细胞瘤的生长情况。

发明详述

10 [0028] 很明显，对于本领域普通技术人员来说，各种实施方式及修改在不背离本发明的范围和精神下都属于本申请中公开的发明。

[0029] 在这里，词语“一（“a”或“an”）”在与权利要求书和说明书中的术语“包含”联用时，表示“一个（one）”，但其还可以表示“一个或多个”、“至少一个”及“一个或多于一个”。

15 [0030] 术语“过度增生性疾病”在这里指的是任何与细胞增生速率快于正常组织生长相关的疾病或病症。因此，过度增生细胞指的是增殖速率快于正常细胞的细胞。

20 [0031] 术语“非胃肠道给药”在这里包括任何形式的化合物不经胃肠道吸收而吸收入患者的给药方式。本发明中非胃肠道给药的范例包括但不限于肌肉给药、静脉给药、腹膜内给药、瘤内给药、眼内给药或关节内给药。

[0032] 在这里，术语“静脉给药”包括将乳铁蛋白组合物经静脉注射或灌输给予到体循环的各种技术。

[0033] 在这里，术语“瘤内给药”包括将乳铁蛋白组合物经注射、电穿孔、乳剂、洗剂或其它给药形式释放至肿瘤部位的各种技术。

25 [0034] 在这里，术语“口服给药”包括经口、经颊、灌肠或灌胃给药。

[0035] 在这里，术语“局部给药”包括表皮、真皮、皮下或粘膜表面的外敷。

30 [0036] 在这里，术语“药学可接受的载体”包括各种溶剂、分散介质、涂覆介质、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等等。这些介质和试剂用于药物活性物质是公知的。除了与本发明所述的菌（vector）或细胞不相容的各种常规的介质或试剂外，其在治疗组合

物中的应用可以考虑。附加的活性成分也可以与本发明的组合物联用。

[0037] 在这里，术语“乳铁蛋白”或“LF”指的是天然或重组的乳铁蛋白。天然乳铁蛋白能够通过纯化哺乳动物的奶或初乳获得，或通过其它天然来源而获得。重组乳铁蛋白 (rLF) 可以在遗传变异的动物、植物、真菌、细菌或其它原核或真核生物上重组表达或直接产生获得，或通过化学合成得到。

[0038] 在这里，术语“患者”指的是任何根据本发明所描述的方法给予乳铁蛋白组合物的哺乳动物。在一个具体实施方式中，本发明的方法是施用于人。在另一个具体实施方式中，本发明的方法是施用于患有过度增生性疾病的人。

[0039] 在这里，术语“治疗有效量”指的是对所述疾病或病症的症状产生改善或修复的量。

[0040] 在这里，术语“治疗”指的是给予患者治疗有效量的乳铁蛋白组合物，以使患者的疾病得到改善。所述改善是指任何症状的改善或修复。所述的改善是可观察的或可测定的改善。这样，本领域普通技术人员理解治疗可以改善疾病症状，而不是一定完全治愈。特别是，对于癌症患者的改善包括肿瘤的稳定、肿瘤的收缩、肿瘤扩散时间的延迟、生存时间的延长或生存质量的改善。有益的效果还反映在患者免疫系统的改善，可用循环的免疫细胞如 CD4+细胞、CD8+细胞、NK 细胞和 CD40+细胞的数目和活性来测定。

[0041] 在这里，术语“附近”指的是在肿瘤和 / 或过度增生性疾病区域内或其周边区域。例如，“肿瘤附近”指的是肿瘤内或肿瘤边际及周围。附近包括毗邻肿瘤的区域，该区域可以在肿瘤上部，肿瘤下部，肿瘤边缘区域，或毗邻肿瘤边缘的区域。

A. 药物组合物

[0042] 本发明的乳铁蛋白可以通过天然资源的分离纯化获得，例如，但不限定为，哺乳动物的奶。乳铁蛋白优选为哺乳动物的乳铁蛋白，例如牛或人的乳铁蛋白。在一个优选的实施方式中，乳铁蛋白是人的乳铁蛋白，是采用已知的基因工程技术经重组制备而得，例如在遗传变异的动物、植物或真核生物上重组表达或直接产生获得，或通

过化学合成得到。参见即：U.S.专利 Nos. 5,571, 896; 5,571, 697 和 5,571, 691, 这些文献均结合于此作为参考。

[0043] 本发明的乳铁蛋白组合物可以经任何常规路径给药，如经口、非胃肠道或局部给药。示例的途径包括但不限于口服、经鼻、经颊、直肠、阴道、肌内、腹膜内、静脉、动脉、瘤内或经皮给药。该组合物通常可以以这里所描述的药学上可接受的组合物形式给药。

[0044] 本发明的组合物可以制成中性的或盐的形式。药学上可接受的盐包括酸加成盐(与蛋白质的自由氨基基团形成)并可以与无机酸成盐，无机酸例如盐酸或磷酸，或同有机酸成盐，有机酸例如乙酸、草酸、酒石酸、扁桃酸等等。同自由羧基基团形成的盐也可以衍生自无机碱，例如氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、氢氧化钙或氢氧化铁，及相应的有机碱，例如异丙基胺、三甲胺、组氨酸、普鲁卡因等等。

[0045] 无菌注射液的制备是通过将乳铁蛋白以需要量结合在适当溶剂中，并在需要时混入各种其它以上所列的成分，过滤除菌后完成的。一般地，分散剂是将各种灭菌活性成分混入含有分散基质和所需的其它以上所列的成分的无菌载体中。在用于制备无菌注射液的无菌粉末情况下，优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥技术，它们能够使先前无菌过滤的溶液形成含有活性成分和其它所需附加成分的粉末。

[0046] 进一步根据本发明，所述的适于口服的本发明组合物在药学可接受的载体中提供，含或不含惰性稀释剂。载体应该是可被吸收的或可食用的，包括液体、半固体即糊剂，或固体载体。任何常规的介质、剂、稀释剂或载体都可以使用，只要其不对接受者或对乳铁蛋白的治疗效果不利，其在以本发明的方法施用的口服乳铁蛋白制剂中都是适用的。载体或稀释剂的例子包括脂肪、油、水盐水溶液、类脂、脂质体、树脂、粘合剂、填充剂等，或是它们的混和物。

[0047] 根据本发明，所述组合物与载体的结合可以是任何方便和实用的方式，例如，通过溶液、悬浮、乳化、混合、胶囊化、微囊化、吸收等等。它们的制备对于本领域普通技术人员是常规技术。

[0048] 在本发明的一个具体实施方式中，所述组合物是以粉末形式与半固体或固体载体彻底混合或结合的。所述混合可以以任何常规形式例如研磨完成。在混合过程中，为保护组合物的治疗活性不受损

失，比如使其不在胃中变性，还可以加入稳定剂。用于口服给药组合物的稳定剂的例子包括缓冲剂、胃酸分泌拮抗剂、氨基酸如甘氨酸和赖氨酸、碳水化合物如葡萄糖，甘露糖，半乳糖，果糖，乳糖，蔗糖，麦芽糖，山梨醇，甘露醇等、蛋白水解酶抑制剂等等。特别优选的是，
5 对于口服给药的组合物，稳定剂可以包括胃酸分泌拮抗剂。

[0049]而且，与半固体或固体载体结合的口服制剂组合物可以进一步制成硬或软的壳明胶胶囊、片剂或丸剂。特别优选的是，所述明胶胶囊、片剂或丸剂是肠溶衣剂。肠溶衣剂能防止组合物在胃中或肠的上部 pH 值酸性区域内变性。参见 U.S.专利 No. 5,629, 001。药物到
10 达小肠后，pH 值碱性环境使包衣溶解，组合物释放并被特定的细胞吸收，例如肠上皮细胞和派伊尔(氏)淋巴 M 细胞(Peyer's patch M cells)。

[0050] 在另一个具体实施方式中，粉末状的组合物与液体载体，例如水或盐水溶液结合，其中含或不含稳定剂。

15 [0051] 可用于本发明的一种特定的制剂是乳铁蛋白在低渗磷酸盐基缓冲液中的溶液剂，其中不含有钾，缓冲液的组成如下：6mM 的磷酸二氢钠(sodium phosphate monobasic)一水合物、9mM 的磷酸一氢钠(sodium phosphate dibasic)七水合物、50mM 的氯化钠，pH 值为 7.0 ± 0.1 。乳铁蛋白在低渗缓冲液中的浓度范围是 10 mg/ml-100
20 mg/ml。该制剂可以经任何途径给药，例如但不限于，瘤内给药。

[0052]进一步说，与半固体载体结合的用于局部给药的组合物还可以制成凝胶软膏剂。凝胶软膏剂优选的载体是凝胶聚合物。用于本发明制备凝胶组合物的优选的聚合物包括但不限于聚羧乙烯(carbopol)、羧甲基纤维素和普卢兰尼克聚合物。特别是，粉末状的
25 乳铁蛋白组合物与水性凝胶结合，其中水性凝胶包含聚合剂，例如聚羧乙烯 980，其浓度为 0.5% - 5% w/v，其是通过皮肤上或皮肤下施用治疗过度增生性疾病。

[0053] 对于制剂，溶液剂以与剂型相容的方式和如下量给药，该量治疗有效地对病症改善或修复。所述制剂可以容易地以各种剂型给
30 予，例如可吸收的溶液、药物释放胶囊等。剂量的部分变化取决于所治疗的患者的情况。对于不同的患者，应根据个人不同的情况确定适宜的给药剂量。此外，给人用药，制剂应有满足 FDA 生物标准局标

准的无菌、一般的安全性及纯度的特性。

B. 过度增生性疾病的治疗

[0054] 根据本发明，以上述任何所述载体形式给予的乳铁蛋白组合物给药于怀疑或患有过度增生性疾病的患者。本领域普通技术人员能够根据各种情况，如吸收度、代谢情况、给药方法、年龄、体重、疾病的严重程度以及对治疗的反应情况确定给予患者的人乳铁蛋白的治疗有效量。

[0055] 给药途径将根据病理损害部位及情况的不同而自然改变，其包括例如真皮内、透皮、非胃肠道、静脉、肌内、鼻内、皮下、经皮、气管内、腹膜内、瘤内、灌注、灌洗、直接注射及口服给药。

[0056] 乳铁蛋白组合物的口服给药包括经口腔、经颊、肠内或胃内给药。还可以构想该组合物可以用作食品添加剂。例如，该组合物喷洒在食物表面，或在摄食前与液体混和服用。

[0057] 乳铁蛋白的瘤内给药包括瘤内注射、电穿孔或者手术或内窥镜植入。瘤内注射，或肿瘤内血管系统内的注射是具体需要关注于分离的，固体的，容易接近的肿瘤。局部、区域性或全身给药均是适宜的。

[0058] 过度增生性疾病包括但不限于瘤 (neoplasm)。瘤指的是异常的组织生长，通常形成异样的团块，该团形成是因为细胞增生的速率超过正常组织细胞的生长。瘤表现出同正常组织相比，部分或全部的结构组织和功能协调的缺失。可以大致分为三个主要类型。起源于上皮组织结构的恶性肿瘤称为癌，起源于结缔组织如肌肉、软骨、脂肪或骨的恶性肿瘤称为肉瘤，影响包括免疫系统的组分在内的造血机构（与血细胞形成相关的机构）的恶性肿瘤称作白血病、淋巴瘤和骨髓瘤。肿瘤是一种赘生的癌性疾病。在这里，“瘤”亦指肿瘤，包括造血系统肿瘤和实体瘤在内。瘤的例子包括但不限于，黑素瘤、非小细胞肺部肿瘤、小细胞肺部肿瘤、肺癌、肝癌、成视网膜细胞瘤、星形细胞瘤、多形胶母细胞瘤、齿龈肿瘤、舌部肿瘤、白血病、成神经细胞瘤、头癌、颈癌、乳癌、胰癌、前列腺癌、肾癌、骨癌、睾丸癌、乳巢癌、间皮癌、肉瘤、子宫颈癌、胃肠癌、淋巴癌、脑癌、结肠癌、膀胱癌、骨髓瘤或其它恶性或者良性瘤。

[0059] 其它过度增生性疾病包括但不限于，多发性神经纤维瘤、关风湿性关节炎、华格纳氏肉芽肿病(Waginer's granulomatosis)、皮肤粘膜淋巴结综合征(Kawasaki's disease)、红斑狼疮、中线肉芽肿、炎性肠炎疾病、骨关节炎、平滑肌瘤、腺瘤、脂肪瘤、血管瘤、纤维瘤、血管闭塞、再狭窄、动脉粥样硬化、肿瘤生成前损伤、原位癌、口腔毛状白斑或牛皮癣，以及白血病前期、过剩胚细胞性贫血和骨髓增生异常综合征。

[0060] 本发明所特别感兴趣的瘤包括但不限于，造血系统的瘤。例如，造血系统的瘤包括急性骨髓性白血病、急性成淋巴细胞性白血病、骨髓增生异常综合征、慢性骨髓单核细胞性白血病、青少年骨髓单核细胞白血病、多发性骨髓瘤、慢性淋巴细胞性白血病或其它造血系统的恶性肿瘤。

[0061] 在一个本发明的优选具体实施方式中，乳铁蛋白组合物是以有效降低、减少、抑制或阻滞肿瘤生长的量给予的。所述有效量范围大约是 $0.1 \mu\text{g} - 100\text{g}$ 的乳铁蛋白组合物。优选的是，乳铁蛋白组合物以口服形式给予，剂量范围在每天 $1\text{mg} - 100\text{g}$ ，更优选是大约每天 $20\text{mg} - 10\text{g}$ ，最优选是每天 4.5g 。乳铁蛋白的静脉给药的范围为每天 $0.1 \mu\text{g} -$ 大约 10g ，更优选是大约 $0.1 \mu\text{g} - 1\text{mg}$ ，最优选是每天 250mg 。优选的是，乳铁蛋白组合物以瘤内给药方式给予，为每天 $0.1 \mu\text{g} - 10\text{g}$ ，最优选是每天 $100 \mu\text{g}$ 。就局部给药而言，乳铁蛋白的量的应用范围可以为大约 $1 \mu\text{g} - 100\text{g}$ 。优选的是，局部用的凝胶、溶液剂、胶囊或片剂包含大约 $0.01\% -$ 大约 20% 浓度的乳铁蛋白。更优选的是，局部用的凝胶、溶液剂、胶囊或片剂包含大约 $1\% - 8.5\%$ 浓度的乳铁蛋白。

[0062] 治疗方案也可以有许多变化，通常依据肿瘤类型、肿瘤部位、疾病的发展情况及患者的健康和年龄状况。很明显，特定类型的肿瘤需要更为有力的治疗，但同时，某些患者不能耐受。临床医师会依据已知的治疗制剂的药效及毒性的情况作出最适宜的决定。

[0063] 在一些具体实施方式中，被治疗的肿瘤至少在初始时不可以被切除。用乳铁蛋白组合物进行治疗则可由于肿瘤边缘的萎缩或消除了某些特定的发病部位而增加了肿瘤的可切除性。治疗之后，可以再进行切除。切除之后的附加治疗用于消除肿瘤部位的微小的残余。

[0064] 另外，本发明可以用于在外科手术时，和/或之后，治疗

肿瘤的残余或迁移。例如，切除的瘤床部位可以注射或灌注含有乳铁蛋白组合物的制剂。灌注可以在切除后持续进行，例如，将导管植入在手术部位。也可以考虑术后周期性地进行治疗。

5 [0065] 如果合适的话，也可以进行连续给药，例如，在肿瘤摘除部位及肿瘤床部位进行治疗以消除残余、微小病灶。通过注射或导管给药的释药是优选的。持续的灌注可在初次治疗后进行大约 1-2 个小时，约 6-12 个小时，约 12-24 个小时，约 1-2 天，约 1-2 星期或更长。通常，经连续灌注的治疗组合物的剂量等于通过单次或多次注射给予的药量，在灌注进行的一段时间之内调整。可以进一步考虑通过肢体
10 灌注给予本发明的治疗用组合物可特别用于治疗黑色素瘤和肉瘤。

[0066] 在一个的具体实施方式中，乳铁蛋白组合物以单剂量或多剂量形式给予。单剂量可按每日给药，或每日多次，或每周多次，或按月给药或每月多次。在进一步的具体实施方式中，乳铁蛋白组合物可以以一系列的剂量给予。这些剂量可用于按每日给药，或每日多次，
15 或按周给药，或每周多次，或按月给药或每月多次。

[0067] 在本发明进一步的具体实施方式中，提供一种治疗过度增生性疾病的方法，其包括经胃肠道途径给予粘膜免疫系统增加量的乳铁蛋白的步骤。优选的是，乳铁蛋白是以口服形式给药的。

[0068] 本发明进一步的具体实施方式还提供一种增强患者胃肠道
20 粘膜免疫反应的方法，包括经口服给予所述患者乳铁蛋白组合物的步骤，优选是给予人乳铁蛋白。可以想象乳铁蛋白在胃肠道中刺激白细胞介素-18 和 GM-CSF 的产生，以增强免疫细胞。例如，白细胞介素-18 增强 T 淋巴细胞或天然杀伤细胞及 GM-CSF，促进包括树突和其它抗原呈递细胞的免疫细胞的成熟和迁移。在一个的具体实施方式
25 中，白细胞介素-18 (IL-18)增强 CD4+、CD8+及 CD3+细胞。对于本领域普通技术人员来说，众所周知 IL-18 是一种 Th1 细胞因子，同白细胞介素-12 和白细胞介素-2 在刺激淋巴细胞 IFN- γ 生成中起协同作用。其它细胞因子也可以被增强，例如但不限于 IL-1b 或 IL-12 或 IFN- γ 。还可以想象乳铁蛋白通过口服给药刺激白细胞介素-18 抑制血管
30 生成，并因此具有对抗依赖于新血管生成的肿瘤的活性。

[0069] 本发明进一步的具体实施方式是提供一种治疗过度增生性疾病的方法，其包括在体循环中给予全身免疫系统增加量的乳铁蛋白

的步骤。优选的是，乳铁蛋白是以静脉给药的方式给予的。可以想象乳铁蛋白在组织中刺激白细胞介素-18 和 GM-CSF 的产生，以增强免疫细胞。例如，白细胞介素-18 增强 T 淋巴细胞或天然杀伤细胞及 GM-CSF 促进包括树突和其它抗原呈递细胞的免疫细胞的成熟和迁移。在一个具体实施方式中，白细胞介素-18 (IL-18)增强 CD4+、CD8+ 及 CD3+细胞。对于本领域普通技术人员来说，众所周知 IL-18 是一种 Th1 细胞因子，它同白细胞介素-12 和白细胞介素-2 在刺激淋巴细胞 IFN- γ 生成中起协同作用。其它细胞因子也可以被增强，例如但不限于 IL-1b 或 IL-12 或 IFN- γ 。还可以想象乳铁蛋白通过口服给药刺激白细胞介素-18 抑制血管生成，并因此具有对抗依赖于新血管生成的肿瘤的活性。

[0070] 本发明进一步的具体实施方式是提供一种治疗过度增生性疾病的方法，其包括在肿瘤附近给予局部或全身免疫系统增加量的乳铁蛋白的步骤。肿瘤附近指的是肿瘤的一般区域，比如乳铁蛋白可以直接给到肿瘤中，或给到肿瘤的一般区域内但不直接进入肿瘤。所谓一般区域包括肿瘤边缘或毗邻肿瘤边缘区域的区域。优选的是，乳铁蛋白组合物是瘤内给药。可以想象乳铁蛋白在局部组织中刺激白细胞介素-18 和 GM-CSF，以增强免疫细胞。例如，白细胞介素-18 增强 T 淋巴细胞或天然杀伤细胞及 GM-CSF 促进包括树突和其它抗原呈递细胞的免疫细胞的成熟和迁移。在一个具体实施方式中，白细胞介素-18 (IL-18)增强 CD4+、CD8+及 CD3+细胞。对于本领域普通技术人员来说，众所周知 IL-18 是一种 Th1 细胞因子，它同白细胞介素-12 和白细胞介素-2 在刺激淋巴细胞 IFN- γ 生成中起协同作用。其它细胞因子也可以被增强，例如但不限于 IL-1b 或 IL-12 或 IFN- γ 。还可以想象乳铁蛋白通过瘤内给药刺激白细胞介素-18 抑制血管生成，并因此具有对抗依赖于新血管生成的肿瘤的活性。

[0071] 本发明进一步的具体实施方式是提供一种治疗过度增生性疾病的方法，其包括在肿瘤附近的皮肤给予局部或全身免疫系统增加量的乳铁蛋白的步骤。优选的是，乳铁蛋白组合物是局部给药。如上所述，在肿瘤附近给药包括在肿瘤边缘或毗邻的区域，或直接在肿瘤边缘区域给药。可以想象乳铁蛋白在局部组织(例如，角质化细胞)中刺激白细胞介素-18 和 GM-CSF 的产生，以增强免疫细胞。例如，白

细胞介素-18 增强 T 淋巴细胞或天然杀伤细胞及 GM-CSF 促进包括树突和其它抗原呈递细胞的免疫细胞的成熟和迁移。在一个具体实施方式中, 白细胞介素-18 (IL-18)增强 CD4+、CD8+及 CD3+细胞。对于本领域普通技术人员来说, 众所周知 IL-18 是一种 Th1 细胞因子, 它同白细胞介素-12 和白细胞介素-2 在刺激淋巴细胞 IFN- γ 生成中起协同作用。其它细胞因子也可以被增强, 例如但不限于 IL-1b 或 IL-12 或 IFN- γ 。还可以想象乳铁蛋白通过瘤内给药刺激白细胞介素-18 抑制血管生成, 并因此具有对抗依赖于新血管生成的肿瘤的活性。

C. 联合治疗

[0072] 为了增加本发明的人乳铁蛋白组合物的疗效, 需要将本发明的组合物与其它可以有效治疗过度增生性疾病的试剂, 例如抗癌剂, 或与外科手术联合应用。“抗癌剂”是能够负面影响患者的癌症疾病, 比如杀死癌细胞, 包括令癌细胞编程性死亡, 降低癌细胞的生长速率, 降低癌细胞的产生率或迁移数量, 减小肿瘤大小, 抑制肿瘤生长, 减少肿瘤或癌细胞的血液供给, 促进对癌细胞或肿瘤的免疫响应, 阻止或抑制癌症的进展, 或增加癌症患者的寿命。抗癌剂包括生物制剂(生物疗法)、化疗剂和放射治疗剂。更为普遍的是, 这些其它的组合物会提供联用有效量的杀死或抑制细胞的增生。这样的过程可以包括在同一时间给予本发明的人乳铁蛋白组合物和其它试剂或多种疗法。这可以通过给予单一组合物或药理学上的包括两种试剂的制剂, 或通过同时或几乎同时给予产生重叠的效果的两种不同的组合物或制剂完成, 其中一种组合物包含人乳铁蛋白组合物, 而另一种包含第二种试剂。

[0073] 另外, 本发明的乳铁蛋白组合物可以先于或后于其它抗癌药的治疗, 间隔可在几分钟至几周。在具体实施方式中, 其它抗癌药和乳铁蛋白组合物分别施用于细胞, 应在每种药物给药的时间内没有大量时间到期, 这样, 这些药剂和乳铁蛋白组合物会对细胞产生很好的并用效果。在这些例子中, 认为可以接触细胞/施用两种形式的给药间隔在约 1-14 天, 优选是大约 12-24 小时。在一些情况下, 希望显著延长给药间隔, 但是分别给药的间隔在几天(2,3,4,5,6 或 7 天)至几周(2,3,4,5,6,7 或 8 周)。

1. 化疗

[0074] 癌症的治疗还可以包括各种化学治疗。一些化疗剂的例子包括但不限于抗生素化疗剂, 如阿霉素、柔红霉素、多柔比星、丝裂霉素(又称突变霉素和或丝裂霉素 C)、放线菌素 D(更生霉素)、博来霉素, Plicomycin、植物生物, 如紫杉醇、长春新碱、长春碱, 各种其它试剂, 如基于铂的试剂(例如顺铂(CDDP))、鬼白乙叉甙(VP16)、肿瘤坏死因子, 及烷化剂, 如卡氮芥、美法仑(又称爱克兰、左旋溶肉瘤素、苯丙氨酸氮芥、L-PAM 或 L-溶肉瘤素、氮芥苯丙氨酸衍生物)、环磷酰胺、苯丁酸氮芥、白消安(又称马利兰), 基于紫杉烷的剂(多西紫杉醇)和环己亚硝脲。

[0075] 其它试剂的实例包括但不限于, 卡铂、丙卡巴肼、氮芥、依立替康、托泊替康、异磷酸胺、Nitrosurea、鬼白乙叉甙(VP16)、他莫替芬、托瑞米芬、艾多昔芬、屈洛昔芬、TAT-59、秦喋昔芬, 曲沃昔芬、ICI 182,780、EM-800、雌激素受体结合剂、吉西他滨、长春瑞滨、法呢基蛋白转化酶抑制剂、Transplatinum、5-氟尿嘧啶、过氧化氢和甲氧喋呤、Temazolomide (DTIC 的含水剂形式)、Mylotarg、多拉司他汀-10、苔藓抑素、或其它以上所述的衍生物或类似物。

2. 放射治疗剂

[0076] 放射治疗剂及相关疗法包括诱导 DNA 损伤性能的辐射和波, 例如 γ -辐射、X-射线、UV-辐射、微波、电子发射, 放射线同位素等等。治疗通过用上述的射线照射局部肿瘤部位。很可能所有这些因素有很宽的影响范围, 涉及 DNA 及其前体的损伤, DNA 的复制和修复, 以及同源染色体的装配和维护。

[0077] X-射线的剂量范围为每日 50-200 伦琴, 持续一定的时间(3 至 4 星期), 高至单剂量 2000 - 6000 伦琴。放射性同位素的剂量范围变化很大, 取决于同位素的半衰期、射线的强度及类型以及瘤细胞对它们的吸收。

3. 外科手术

[0078] 大约 60% 的癌症患者都需经历一些类型的外科手术, 包括预防、诊断或肿瘤分期、治疗及减状手术。治疗性手术是一种癌症治疗方法, 常与其它治疗相结合, 例如本发明的治疗方法、化疗、放射疗法、激素疗法、基因疗法、免疫疗法和/或其它疗法。

[0079] 治疗性手术包括切除全部或部分癌变组织，属物理性分离、切断和/或销毁。肿瘤切除涉及至少部分肿瘤的物理去除。除了肿瘤切除，手术治疗还包括激光手术、冷冻手术、电外科手术和基因控制手术(Mohs'surgery)。还可进一步考虑将本发明的方法与体表癌症、初期癌或正常组织的增生的去除结合应用。

[0080] 在部分或全部癌细胞、组织或肿瘤的切除中，在体内会形成空洞。应当继续通过灌注、直接注射或局部施用附加的抗癌治疗。这样的治疗可重复进行，比如每 1,2,3,4,5,6, 或 7 天进行，或每 1,2,3,4, 及 5 星期进行，或每 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,或 12 个月进行。这些治疗也可应用不同的剂量。

4. 其它生物治疗剂

[0081] 认为其它生物治疗剂可以用于和本发明联合，以改善治疗效果。这些附加的试剂非限定性的包括影响细胞表面受体和 GAP 结点增量调节的试剂，细胞生长抑制剂和分化剂，细胞粘附抑制剂，增加过度增生细胞凋亡敏感性的诱导剂，或其它生物治疗剂，例如生物高热治疗。

[0082] 生物高热治疗是患者的组织暴露于高温下(超过 106 °C)的过程。外热或内热装置可包含在局部、区域或全身生物高热治疗中。局部高热治疗包括在小的区域如肿瘤上施予热量。热量可由外部的高频波产生并作用于肿瘤。内部的热量可采用无菌探针，包括细针、热导线或内装热水的中空管，植入的微波触角，或射频电极。

[0083] 患者的器官和四肢是区域高热治疗的部位，使用可产生高能量的装置如磁体完成。另外，一些患者的血液可以分离并在灌注到需体内热疗的区域前进行加热。当癌症遍及全身时，全身热疗也可以进行。热水毯、热蜡、感应线圈和暖房可用于该目的。

[0084] 激素疗法也可以用于本发明的结合。激素可用于特定癌症的治疗，如乳癌、前列腺癌、卵巢癌或子宫颈癌，其睾丸素或雌激素水平降低或效应被阻断，通常可减少癌转移的危险。

[0085] 辅助治疗了可以与本发明结合。所用的辅剂或免疫调节剂包括但不限于肿瘤坏死因子； α 、 β 、 γ 干扰素；IL-2 及其它细胞活素；F42K 和其它细胞因子类似物；或 MIP-1、 β MIP-1、MCP-1、RANTES 和其它化学增活素。

5. 免疫疗法

[0086] 免疫疗法通常依赖于免疫效应细胞和分子靶向及破坏癌细胞的能力。免疫效应可以是，例如特定的对肿瘤细胞表面某些标记的抗体。该抗体可单独作为效应因子起治疗作用，或修复其它细胞的细胞杀灭活性。抗体还可以与药物或毒素(化疗剂、放射性核素、蓖麻毒素 A 链、霍乱毒素、百日咳毒素等)结合，其仅仅是作为靶向剂。另外，效应因子还可以是淋巴细胞，其表面分子可直接或间接与肿瘤细胞靶相互作用。效应细胞包括 T 淋巴细胞和 NK 细胞。

[0087] 认为用于癌症治疗的疫苗可以用于本发明中的联合治疗，以改善治疗效果。所述疫苗包括肽类疫苗或树突细胞疫苗。肽类疫苗可以包含肿瘤特定抗原，能够被 T 淋巴细胞所识别。进一步说，本领域普通技术人员能够认识到树突细胞疫苗的接种包括将肽或抗原结合到树突细胞上，并将树突细胞给药于患者。

[0088] 用于疫苗的肿瘤特定抗原的例子包括但不限于 gap100 或 MAGE-3。这些抗原可作为肽类疫苗和/或树突细胞疫苗给予患者。

D. 实施例

[0089] 以下实施例是证明本发明的优选具体实施方式。其可以被本领域普通技术人员理解，实施例中所揭示的技术代表了发明人对发明的实践，并构成了本发明实践中的优选的模式。然而，本领域普通技术人员还可以根据本发明，认识到这些特定的具体实施方式中可以有許多变化，能够得到相同或相似的结果，且均不背离本发明的精神和范围。

实施例 1 rhLF 对肿瘤生长的抑制作用

[0090] 研究人类鳞状细胞癌(O12)。该细胞注射到无胸腺裸鼠的右侧齿面上。rhLF 分别以瘤内注射(49 只动物，7 剂，每剂 0.05 μ g - 125 μ g 量)、静脉注射(7 只动物，每剂 125 μ g)或口服(7 只动物，每剂 20mg)进行给药。对照组只用载体进行处理，而不给予 rhLF。rhLF 的给药为每天两次，静脉组给予 5 天，或所有组给予 8 天，均从接种肿瘤细胞后第 11 天建立肿瘤模型后算起。

[0091] 治疗效果通过在试验过程中及结束时测定固体瘤的大小进

行评估；在对肿瘤进行测定时也测定体重。如附图 1 和表 1 所示，用 rhLF 进行处理相对于对照组有 46% - 80% 的肿瘤的生长速率的降低。实际上，用 20mg 的 rhLF 口服给药最为显著地降低肿瘤生长，同对照组相比，有 80% 的下降($p=0.0073$)。

表 1. 概述 rhLF 在 O12 模型的小鼠对肿瘤生长的抑制作用

	相对于安慰剂的抑制作用		P 值	
	第 19 天*	第 28 天*	第 19 天*	第 28 天*
瘤内给药 N=19	28%	46%	0.139	0.0263**
静脉给药 N=7	55%	65%	0.0666	0.0233**
口服给药 N=7	76%	80%	0.0175**	0.0073***

* 从治疗开始时计算

** 统计学显著差异($p < 0.05$)

*** 高度统计学显著差异($p < 0.01$)

[0092] 该研究的结果显示 rhLF 通过多种途径给药显著性地抑制在小鼠的鳞状细胞癌模型的肿瘤的生长，其中口服给药效果最为显著。基于该结果，可以进一步认为口服给予乳铁蛋白是通过增强免疫细胞活性来影响肿瘤的。

实施例 2 rhLF 对肿瘤类型的评估

[0093] 很多类型肿瘤的肿瘤细胞注射到无胸腺裸鼠的右侧齿面上。分别对动物口服给予 rhLF、天然 hLF 或牛 LF。对照动物组只用载体处理，而不给予 rhLF。rhLF 的给药为每天一或两次，以第 1 天、5 天、7 天或 14 天时给予，或者以第 8 天时给予，均从接种肿瘤细胞后大约第 11 天建立肿瘤模型后算起，或按常规或公知的方案中通常选用的其它时间起。

[0094] 治疗效果通过在试验过程中及结束时测定固体瘤的大小进行评估；在对肿瘤进行测定时也测定体重。免疫响应通过测定细胞因

子、T-细胞及 NK 细胞在在循环和肠中的量来评定。

实施例 3 口服给药 rhLF 和 bLF 的效果

[0095] 重组人乳铁蛋白和牛乳铁蛋白口服给予小鼠，测定 IL-18 在小肠中的制备。

[0096] 小鼠给予三天的治疗，每天分别给予 65 mg/kg/天的 rhLF，300 mg/kg/天的 rhLF 或 300 mg/kg/天的 bLF。作为对照，小鼠仅给予药学上可接受的载体。给药 LF 或对照三天结束后 24 小时，动物称重，收集血液和血清。血清用于细胞因子 ELISA 的分析。

[0097] 并且，在这些时间点上，处死动物，分离小肠组织作进一步分析。小肠上皮细胞应用可溶的 (lysis) 含有 PBS、1% Nonidet P-40、0.5% 去氧胆酸钠和含 10 μ g/ml 苯甲磺酰基氟 (Phenyl Methetyl sulfonyl fluoride) 的 0.1% 的十二烷基硫酸钠的缓冲溶液进行均化处理。所得匀化物在 15,000 rpm 下离心 10 分钟，上清液在 -80℃ 下保存，直至用于测定 IL-18 水平。

[0098] 如表 2 和表 3 所示，rhLF 在两种剂量下给药都显著增加血清和肠内提取物的 IL-18 的量。牛 LF 对肠 IL-18 水平的增加较小，且不增加血清的 IL-18 水平。

表 2. rhLF 和 bLF 对肠和血清中的 IL-18 水平的影响

	肠提取物(pg)	血清(pg)
对照	955	141
300 mg/kg bLF	4,515	134
65 mg/kg rhLF	7,879	259
300 mg/kg rhLF	8,350	328

表 3. rhLF 和 bLF 对肠和血清中的 IL-18 水平的刺激作用

	肠提取物		血清	
	增值 %	P 值	增值 %	P 值
相对于对照组的增加				
-300 mg/kg bLF	373%	0.0086	-5%	0.5411
-65 mg/kg rhLF	725%	0.0034	84%	0.0132
-300 mg/kg rhLF	775%	0.0001	132%	0.0007
相对于 Blf 的增加				
-65 mg/kg rhLF	75%	0.1490	94%	0.0366
-300 mg/kg rhLF	85%	0.0617	145%	0.0084

实施例 4 在体内口服 rhLF 对 NK 活性的影响

[0099] 用 rhLF 或安慰剂口服治疗首次试验的 Balb/c 小鼠，每日一次，共三天(参见表 4)。

表 4. 治疗方案

	治疗*	N	剂量(mg/kg)	途径	方案
第 1 组	安慰剂	6	0		
第 2 组	RhLF	7	300 mg/kg/天	口服	3 天

[0100] 在第 4 天，处死小鼠，并收集其脾脏。应用磁珠细胞分选分析法(MACS anti-NK-DX5)分离 NK 细胞，并计数。然后在体外应用乳酸脱氢酶(LDH)释放试验测定细胞的对抗 YAC 标靶的 NK 活性。

[0101] 表 5 显示口服 rhLF 治疗具有显著的体外对抗 YAC 标靶细胞的 NK 活性的增强(10% @ 30:1 对比 2.8% 的对照组)。在安慰剂治疗的小鼠中没有 NK 活性的显著变化。

表 5. 以口服 rhLF 治疗的小鼠的 NK 活性

对照							
低	中	高					
0.056	0.09	0.407					
	安慰剂			用 RhLF 治疗的			
E:T 比率	原始数据 % 细胞毒性*			原始数据 % 细胞毒性*			
	E:T 细胞混合	E 细胞对照	结果 (Final)	E:T 细胞混合	E 细胞对照	结果 (Final)	相对于对照组的增加
30:1	0.281	0.215	2.86	0.358	0.267	9.81	7**
15:1	0.176	0.110	2.85	0.214	0.143	4.12	1.3
7.5:1	0.117	0.054	2.21	0.131	0.074	0.44	0
3.7:1	0.086	0.030	0.19	0.096	0.042	0	0

* % 细胞毒性=[(效应因子:靶细胞混合-效应因子细胞对照)]-低对照
/[(高对照-低对照)] × 100

** p < 0.05 (2-尾 p 值)((2-tailed p value))

实施例 5 口服 rhLF 在体内对 GM-CSF 的效果

[0102] 小鼠口服给予重组人乳铁蛋白或安慰剂，测量其小肠内的 GM-CSF 的产生。

[0103] 小鼠(每组 5 只动物)每日给予 rhLF 300 mg/kg/天，共给药 3 天。作为对照的小鼠仅相应给予药学可接受的载体。给药 LF 或安慰剂三天后 24 小时，处死动物，分离其小肠组织作进一步分析。小肠上皮细胞应用可溶的含有 PBS、1% Nonidet P-40、0.5% 去氧胆酸钠和含 10 μg/ml 苯甲磺酰基氟的 0.1% 的十二烷基硫酸钠的缓冲溶液进行均化处理。所得匀化物在 15,000 rpm 下离心 10 分钟，上清液在 -80℃ 下保存，直至应用 ELISA 试剂盒测定 GM-CSF 水平。

[0104] 如表 6 所示，应用 rhLF 治疗，相对于给予安慰剂的动物，在小肠中，可增加主要的免疫刺激细胞因子的产生，GM-CSF。

表 6. 在肠和血清中 rhLF 对 GM-CSF 水平的影响

	平均值(SEM) pg	相对于安慰剂的增加
安慰剂	6.48(0.32)	-
300 mg/kg rhLF	7.74(0.19)	19.4%(p<0.01)

实施例 6 hLf 与化疗的联合

[0105] 将鼠类鳞状细胞癌细胞系(SCCVII)通过颈部皮肤注射入具有免疫活性的 C3H 鼠的口腔底部(第 0 日)。肿瘤细胞植入后的 5 天(第 5 日), 在下颈部作皮肤切口, 外科解剖显示肿瘤的建立。用测径器测定肿瘤的三维大小。

[0106] 患肿瘤的小鼠随机分成对照组和 7 个接受 rhLF 和 / 或顺铂治疗的组。RhLF (4 mg; 200 mg/Kg)每天 1 次通过口腔插管给药, 共 8 天, 从第 5 天到第 12 天。顺铂以 5 mg/kg 的单剂量腹膜内给药, 分别在 rhLF 治疗的开始(第 5 日)、中间(第 8 日)和最后(第 12 日)。在植入后第 12 天上处死动物, 测定残留的肿瘤团块, 并用于以后的另外的分析。

表 7. 实验组

	说明	N	rhLF mg/kg	顺铂
组 A	安慰剂	5	0(安慰剂)	0
组 B	单用 rhLF	5	200 mg/kg	0
组 C	第 5 日用 CP	5	0	5 mg/kg, 第 5 日*
组 D	第 8 日用 CP	5	0	5 mg/kg, 第 8 日*
组 E	第 12 日用 CP	4	0	5 mg/kg, 第 12 日*
组 F	rhLF/CP-5	5	200 mg/kg	5 mg/kg, 第 5 日*
组 G	rhLF/CP-8	5	200 mg/kg	5 mg/kg, 第 8 日*
组 H	rhLF/CP-12	5	200 mg/kg	5 mg/kg, 第 12 日*

[0107] 单用 rhLF 处理的小鼠, 单用顺铂处理的小鼠, 及二者合用处理的小鼠, 显示出相对于安慰剂处理的小鼠的肿瘤生长抑制作用(TGI)。最大的抑制是在接受二者联用的组中出现的(表 7 和附图 2)。

[0108] 在所有的例子中, 接受 rhLF +顺铂治疗的动物显示出相

对于单用顺铂治疗的组来说的 TGI。在一起作分析时, 接受 rhLF + 顺铂治疗的动物显示相对于安慰剂组 77% 的 TGI($P < 0.0001$), 相对于单用 rhLF 的组 66% 的 TGI($P < 0.01$), 和相对于单用顺铂的组 63% 的 TGI($P < 0.01$)。

[0109] 顺铂在 rhLF 应用前快速给药(rhLF + CP-5)或在 rhLF 给药期间应用(rhLF + CP-8)相对于顺铂在 rhLF 给药后应用(rhLF+ CP-12)有更佳的效果。然而, 仅有的方案(RhLF + CP-8)显示出统计学意义上的显著改善($P < 0.01$), 相对于单用顺铂的方案(第 8 日用顺铂)有 77% 的 TGI。

表 8. 治疗组的肿瘤生长抑制作用(TGI)

组	生长	相对于安慰剂组*	
	(SEM)	TGI(%)	P 值
A(安慰剂)	741 (79)	-	-
B(单用 rhLF)	496 (155)	33%	0.0989
C(第 5 日 CP)	240 (137)	68%	0.0066
D(第 8 日 CP)	693 (146)	6%	0.3898
E(第 12 日 CP)	433 (175)	42%	0.0634
F(rhLF + CP-5)	14 (5)	98%	<0.0001
G(rhLF + CP-8)	159 (48)	79%	0.0001
H(rhLF + CP-12)	331 (47)	55%	0.0011
C 到 E(所有 CP)	457 (96)	38%	0.0564
F 到 H(所有 rhLF/CP)	168 (40)	77%	<0.0001

* 相对于安慰剂的抑制作用和 1-尾 P 值(1-tailed P-value)

** 相对于各自接受顺铂的组的抑制作用和 1-尾 P 值(1-tailed P-value)

实施例 7 hLF 与化疗联合的剂量依赖性

[0110] 如实施例 6 所述, 将鼠类鳞状细胞癌细胞系(SCCVII)通过颈部皮肤注射入具有免疫活性的 C3H 鼠的口腔底部(第 0 日)。肿瘤细胞最初植入后的第 5 天, 肿瘤进行基线测量, 而后单用顺铂(第 8 日, 腹膜给药, 5 mg/kg), 及顺铂与口服 rhLF 在三个剂量上的联用治疗

肿瘤(口腔管给药 7-8 日, 从第 5 天始至 11/12 天)。在第 11/12 天处死动物, 测量肿瘤。接受 rhLF 和顺铂治疗的动物比只单独接受顺铂治疗的动物存在肿瘤生长抑制的剂量依赖, 参见附图 3。

实施例 8 hLF 和多西紫杉醇的联合

[0111] 如实施例 7 所述, 将鼠类鳞状细胞癌细胞系(SCCVII)通过颈部皮肤注射入具有免疫活性的 C3H 鼠的口腔底部(第 0 日)。肿瘤细胞最初植入后的第 5 天, 肿瘤进行基线测量, 而后单独口服安慰剂(每天一次, 从第 5 日至 12 日; 6 只动物), 联用安慰剂和多西紫杉醇(在第 8 天静脉注射 31.3 mg/kg 多西紫杉醇的大丸剂; 9 只动物), 或多西紫杉醇加上口服 rhLF(200 mg/kg, 每天一次, 从第 5 天至第 12 天, 口腔管给予; 9 只动物)。在第 14 天处死动物, 测量肿瘤。单用多西紫杉醇相对于安慰剂有肿瘤生长抑制作用, 而 rhLF 和多西紫杉醇联用则导致进一步的生长抑制作用。抑制作用和 p 值(1-tailed)参见表 9。

表 9. 治疗组的肿瘤生长抑制(TGI)

组	生长	相对于安慰剂*		相对于多西紫杉醇	
	(SEM)	TGI(%)	p 值	TGI(%)	p 值
安慰剂	5,157(497)	-	-	-	-
多西紫杉醇	2,103(209)	59%	<0.0001	-	-
多西紫杉醇 +rhLF	1,288(286)	75%	<0.0001	39%	0.0175

实施例 9 hLF 与放射疗法联用

[0112] 将鼠类鳞状细胞癌细胞系(SCCVII)通过颈部皮肤注射入具有免疫活性的 C3H 鼠的口腔底部(第 0 日)。肿瘤细胞最初植入后的 5 天(第 5 天), 在颈下部作皮肤切口, 外科解剖显示肿瘤的建立。用测径器测定肿瘤的三维大小。

[0113] 患肿瘤的小鼠如下所述, 随机分成 6 个接受 rhLF 治疗(200 mg/kg)和 / 或放射治疗的组。rhLF (4 mg; 200 mg/Kg)每天 1 次通过口腔插管给药, 共 8 天, 从第 5 天到第 12 天。2 戈瑞(Gray)的单剂量放射治疗在最初给予(第 5 日), 或在 rhLF 治疗期间给予(第 8 日)。

在治疗后第 14 天上处死动物，测定残留的肿瘤团块，并用于后面的另外的分析。

表 10. 实验组

	说明	N	rhLF mg/kg*	放射
组 A	安慰剂	10	0(安慰剂)	无
组 B	单用 rhLF	10	200 mg/kg	无
组 C	第 5 日用放射疗法	8	0	2 戈瑞,第 5 日
组 D	rhLF/放射-5	10	200 mg/kg	2 戈瑞,第 5 日
组 E	第 8 日用放射疗法	10	0	2 戈瑞,第 8 日
组 F	rhLF/放射-8	10	200 mg/kg	2 戈瑞,第 8 日

* rhLF/安慰剂从第 5 日至 12 日每日口服给予。

[0114] 单独接受 rhLF 的小鼠，单独接受放射治疗的小鼠，或联合治疗的小鼠都显示相对于只用安慰剂治疗的小鼠显著的肿瘤生长抑制(TGI)。接受 rhLF 和放射的联合治疗的小鼠比较单用 rhLF(28%， $P<0.05$)和放射治疗(15%， $P=0.1207$)有适宜的 TGI 的增加。

表 11. 治疗组的肿瘤生长抑制(TGI)

组	生长 (SEM)	相对于安慰剂组	
		抑制*	P 值*
A(安慰剂)	2348(395)		-
B(单用 rhLF)	1074(163)	54%	0.0040
C(第 5 日放射)	827(105)	65%	0.0021
D(rhLF/放射 5)	750(125)	68%	0.0006
E(第 8 日放射)	977(112)	58%	0.0018
F(rhLF/放射 8)	797(119)	66%	0.0007
C/E(均用放射)	911(78)	61%	<0.0001
D/F(均用 rhLF/放射)	774(84)	67%	<0.0001

* 相对于安慰剂组的抑制作用和 1 尾的(1-tailed)p 值

[0115] 因此，乳铁蛋白刺激了免疫系统。而且，乳铁蛋白与顺铂、

多西紫杉醇和放射疗法联用具有抑制肿瘤生长的作用。

实施例 10 对人口服给药 hLF

[0116] 重组人乳铁蛋白口服给予癌已转移且常规化疗无效的患者，在四个国家的多个中心进行两种不同的研究(阿根廷、巴西、智利、美国)。rhLF 的给药剂量为每日 1.5 – 9 克，分两剂服用，间隔为 14 天的各 14 的周期。

[0117] 肿瘤大小的进展通过 CT 扫描及如可能肿瘤标记监测。在基线下完成扫描，在治疗开始后 8 周进行，并和在研究前的基线扫描研究进行比较。肿瘤标记每 4 周测定。收集血样，检测亚类的体循环中淋巴细胞和 NK 细胞的活性。血浆、血清和血细胞提取样本进行收集，并测定体循环中的 IL-18、IL-1、IL-2 和 IL-4、IL-5、IL-10、IL-12 和 IFN- γ 。

[0118] 在 19 例评估患者(进行了基线 CT 扫描及至少一次治疗后扫描)中，9 例(47%)在第一次治疗后扫描时依据 RECIST 标准病情得到稳定。多种肿瘤类型的患者都在服用乳铁蛋白后产生了有益效果。

[0119] 表 12 显示对 5 名不同肿瘤类型患者的反应。在所有的情况下，在用 rhLF 治疗前的肿瘤大小生长的百分数（相关持续时间显示在括号中），及在而后两个时间段内的肿瘤生长，用 CT 测量，均有肿瘤生长率的下降或实际皱缩。

表 12. 接受口服 rhLF 治疗的转移癌患者的肿瘤反应

患者 #	癌症	治疗前%生长(周)	1 次治疗后%生长(周)	2 次治疗后%生长(周)
# 204	乳癌	40% (8)	0% (10)	0% (6.5)
# 106	黑色素瘤	24% (19)	-18% (11)	未进行
# 104	胃癌	25% (5.5)	10% (10)	-5% (7)
# 102	卵巢癌	30% (21)	-5% (10.5)	-7% (8.5)
# 007	肺癌	160% (5.5)	13% (7.5)	12% (8.5)

实施例 11 对人口服 hLF 的联合治疗

[0120] 重组人乳铁蛋白口服单独给予或与常规抗癌治疗方案联合

给予人患者以抑制肿瘤生长。

[0121] 简言之,以实施例 10 中所述的最佳方案和剂量给药 rhLF,并在部分联合治疗中应用常规的抗癌方案治疗选择性的肿瘤类型。另外的抗癌治疗的给药途径和方案经 FDA 核准用于该适应症,或在相应同类出版物上有描述。

[0122] 肿瘤大小的进展用 CT 扫描及如可能肿瘤标记进行监测。在基线下完成扫描,在治疗开始后 8 周进行。治疗开始后肿瘤标记每 4 周测定。收集血样,检测亚类的体循环中淋巴细胞和 NK 细胞的活性。血浆、血清和血细胞提取样本进行收集,并测定体循环中的 IL-18、IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-10、IL-12 和 IFN- γ 。

实施例 12 口服给予 rhLF 后的免疫刺激作用

[0123] Balb/c 首次接受试验的小鼠每天一次口服 rhLF 或安慰剂,共 3 天。一天后(第 4 天),处死小鼠,收集其脾脏。应用磁珠细胞分选分析法(MACS anti-NK-DX5)分离 NK 细胞并计数。随后在体外应用乳酸脱氢酶(LDH)释放试验检测细胞对于 YAC 标靶的 NK 活性。

[0124] 如附图 4 所示,口服 rhLF 能产生显著的体外对于 YAC 标靶细胞的 NK 活性的增加。在 30:1 的 E:T 比率的 rhLF 给药中,产生了相对于安慰剂处理的动物的 243%的相对增加(从 2.86% 到 9.81%; $p < 0.05$)。

实施例 13 静脉给药的效果

[0125] 重组乳铁蛋白、牛乳铁蛋白和天然乳铁蛋白静脉给予动物,优选是鼠,测定血浆、血清和血细胞中的 IL-18、IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-10、IL-12 和 IFN- γ 的产生。

[0126] 简言之,对鼠在治疗持续 14 天,每剂为 0.05 - 1000 μ g。作为对照组,鼠仅给予药学可接受的载体。在 LF 或对照组给药后特定的时间点,0 天、2 天、3 天、5 天、9 天及 14 天上,对动物进行称重,并收集血和血清.计算收集的血中的 CD4+、CD8+和 NK 细胞的水平。血浆、血清和血细胞提取样本用于细胞因子 ELISA 分析。

[0127] 而且,在 24 天上,处死动物,分离其组织作进一步分析。

组织应用可溶的含有 PBS、1% Nonidet P-40、0.5%去氧胆酸钠和含 10 μ g/ml 苯甲磺酰基氟的 0.1%的十二烷基硫酸钠缓冲溶液进行均化处理。所得匀化物在 15,000 rpm 下离心 10 分钟，上清液在-80℃下保存，直至用于测定细胞因子 IL-18、IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-10、IL-12 和 IFN- γ 。

实施例 14 rhLF 和其它试剂联用进行静脉注射的化疗

[0128] 可检测的肿瘤细胞注射到胸腺裸鼠右侧齿面上。动物单独静脉给药 rhLF，以及如实施例 13 所述的与其它抗癌方案联合给药。对照动物只给予载体，而不给予 rhLF。rhLF 应用实施例 13 所述的最佳方案给药。抗癌治疗按常规或公知的方法给予。治疗从接种肿瘤细胞建立肿瘤大约 11 天开始，或按常规或公知的方案中通常选用的其它时间起。

[0129] 单独或联合治疗的效果通过测定实验过程中及结束时固体肿瘤的大小进行评估；在肿瘤测量的同时也记录体重值。

实施例 15 对人静脉给药 hLF

[0130] 重组乳铁蛋白静脉给予患者以抑制肿瘤生长。

[0131] 简言之，以每天 500mg 的量给予患有无法切除或转移的癌症的患者 rhLF。或者，按每日 0.1、1、10、100 和 1000 mg 给予患有转移的癌症患者，1 天至 8 天。该剂静脉给药。

[0132] 肿瘤大小的进展用 CT 扫描及如可能肿瘤标记进行监测。在基线下完成扫描，在治疗开始后 8 周进行。肿瘤标记每 4 周测定。收集血样，检测亚类的体循环中淋巴细胞和 NK 细胞的活性。血浆、血清和血细胞提取样本进行收集，并测定体循环中的 IL-18、IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-10、IL-12 和 IFN- γ 。

实施例 16 静脉给予 hLF 的联合治疗

[0133] 重组乳铁蛋白单独静脉给予或与常规抗癌疗法联合给予患者以抑制肿瘤生长。

[0134] 简言之，以实施例 15 中所述的最佳方案和剂量给药 rhLF，并在部分联合治疗中应用常规的抗癌方案治疗选择性的肿瘤类型。另

外的抗癌方案的给药途径和疗法经 FDA 核准用于该适应症，或在相应同类出版物上有描述。

[0135] 肿瘤大小的进展用 CT 扫描及如可能肿瘤标记进行监测。在基线下完成扫描，在治疗开始后 8 周进行。肿瘤标记每 4 周测定。收集血样，检测亚类的体循环中淋巴细胞和 NK 细胞的活性。血浆、血清和血细胞提取样本进行收集，并测定体循环中的 IL-18、IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-10、IL-12 和 IFN- γ 。

实施例 17 瘤内给药 rhLF 的活性

[0136] 012 人类口咽鳞状细胞肿瘤注射到无胸腺裸鼠的右侧齿面上。重组人乳铁蛋白和载体对照经瘤内注射给药。每只动物注射不同浓度的 50 μ l 的 rhLF，其由四种分离的大约 12.5 μ l 的注射剂组成，在不同的方向和角度上进行(大约是 S/N/E/W)，以确保药物在整个肿瘤上分布均匀(展开)。

表 13. 在 O12 人鳞状细胞癌的裸鼠瘤内注射给予重组人乳铁蛋白的治疗方案

组	方案	组中的每只动物的 rhLF 给药量					
		0	1	2	3	4	5
E.A	在第 1 天 1 次，8 日后处死(裸鼠)	0	100 μ g	250 μ g	500 μ g	250 μ g*	na
C	每天 2 次，从接种后第 11 日开始计，共 8 天，在第 20 日处死(裸鼠)	0	25 μ g	50 μ g	125 μ g	250 μ g	500 μ g

[0137] 表 13 显示每个试验组和每个组的每个动物的每剂 rhLF 注射的方案。在该研究中，rhLF 直接注入肿瘤。每日用外测径器测量每个动物的肿瘤生长情况。

[0138] 使用该模型，可明显看出，相对于对照动物组，rhLF 治疗组的肿瘤生长都显著减少。对比安慰剂样品的 A 和 C 组的中值肿

瘤大小，动物中接受单剂 rhLF(组 A)治疗的肿瘤生长率在给药 rhLF 后的第 11 天降低了 50% ($p < 0.05$)，接受每日两次(组 C)治疗的肿瘤生长率相对于对照组降低了 56% ($p < 0.01$)。参见附图 5。

实施例 18 瘤内给药 rhLF 后的免疫刺激

[0139] 正常的 C3H/HeJ 小鼠按实施例 17 所述的方法植入两种鼠类肿瘤中的一种。所用的肿瘤为 SCCVII 和 RIF 鼠类肿瘤细胞系。在鼠中肿瘤建立后，在 4 天时间内每天瘤内注射 250 或 500 μg 的 rhLF，以载体作为对照。最后的瘤注射结束 24 小时，处死动物，血检淋巴细胞总量。体循环中的淋巴细胞数量相对于安慰剂对照组有 34% - 56% 的增长(表 14)。

表 14. 瘤内给予 rhLF 后的体循环淋巴细胞的增加

	CD3+	CD4+	CD8+
细胞数			
安慰剂	2104	1800	785
rhLF 治疗	3291	2621	1054
rhLF 组的增加	56%	46%	34%

实施例 19 hLF 与其它试剂的联合化疗

[0140] 要检测的肿瘤细胞注射到胸腺裸鼠右侧齿面上。动物单独瘤内给药 rhLF，以及如实施例 1 或 17 所述的与其它抗癌疗法联合给药。对照动物只给予载体，而不给予 rhLF。抗癌治疗按常规或公知的方法给予。治疗从接种肿瘤细胞建立肿瘤大约 11 天开始，或按常规或公知的方法中通常选用的其它时间起。

[0141] 单独或联合治疗的效果通过测定实验过程中及结束时固体肿瘤的大小进行评估；在肿瘤测量的同时也记录体重值。

实施例 20 hLF 的瘤内给药

[0142] 重组乳铁蛋白瘤内给予患者以抑制肿瘤生长。

[0143] 简言之，以剂量每天 1000 μg 给予患有无法切除的或转移的癌症患者 rhLF，共 8 天。或者，rhLF 分别瘤内按每日 10、50、100、

500、1000 μg 给予患有转移的癌症患者，共 8 天。该剂是静脉内给药。

[0144] 肿瘤大小的进展用 CT 扫描及如可能肿瘤标记进行监测。在基线下完成扫描，在治疗开始后 8 周进行。肿瘤标记每 4 周测定。收集血样，检测亚类的体循环中淋巴细胞和 NK 细胞的活性。血浆、血清和血细胞提取样本进行收集，并测定体循环中的 IL-18、IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-10、IL-12 和 IFN- γ 。

实施例 21 瘤内给药 hLF 的联合治疗

[0145] 重组乳铁蛋白单独或与常规抗癌疗法联合瘤内给予患者以抑制肿瘤生长。

[0146] 简言之，以实施例 20 中所述的最佳方案和剂量给药 rhLF，并在部分联合治疗中应用常规的抗癌方案治疗选择性的肿瘤类型。常规抗癌方案的给药途径和疗法经 FDA 核准用于该适应症，或在相应同类出版物上有描述。

[0147] 肿瘤大小的进展用 CT 扫描及如可能肿瘤标记进行监测。在基线下完成扫描，在治疗开始后 8 周进行。肿瘤标记每 4 周测定。收集血样，检测亚类的体循环中淋巴细胞和 NK 细胞的活性。血浆、血清和血细胞提取样本进行收集，并测定体循环中的 IL-18、IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-10、IL-12 和 IFN- γ 。

实施例 22 对人局部给药 hLF

[0148] 凝胶剂型的重组乳铁蛋白施用于患者以抑制肿瘤的生长。

[0149] 简言之，浓度为 1%、2.5% 或 8.5% 的 rhLF 凝胶每日两次施予转移瘤患者的皮肤或皮下的癌损伤部位。rhLF 凝胶的施用持续进行至肿瘤进展。

[0150] 转移肿瘤进展的大小用 CT 扫描及如可能肿瘤标记进行监测。在基线下完成扫描，在治疗开始后 8 周进行。肿瘤标记每 4 周测定。收集血样，检测亚类的体循环中淋巴细胞和 NK 细胞的活性。血浆、血清和血细胞提取样本进行收集，并测定体循环中的 IL-18、IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-10、IL-12 和 IFN- γ 。

实施例 23 局部应用 hLF 的联合治疗

[0151] 凝胶剂型的重组乳铁蛋白单独或与常规抗癌治疗联合给予患者以抑制肿瘤的生长。

[0152] 简言之，以实施例 22 中所述的最佳方案给药 rhLF，并在部分联合治疗中应用常规的抗癌方案治疗选择性的肿瘤类型。常规抗癌方案的给药途径和疗法经 FDA 核准用于该适应症，或在相应同类出版物上有描述。

[0153] 转移肿瘤进展的大小用 CT 扫描及如可能肿瘤标记进行监测。在基线下完成扫描，在治疗开始后 8 周进行。肿瘤标记每 4 周测定。收集血样，检测亚类的体循环中淋巴细胞和 NK 细胞的活性。血浆、血清和血细胞提取样本进行收集，并测定体循环中的 IL-18、IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-10、IL-12 和 IFN- γ 。

引用的参考文献

[0154] 本说明书中所提到的所有专利文献及出版物都是本领域普通技术人员所能够知道的。所有专利文献及出版物都结合于此作参考，就象每一篇出版物都是特定地和单独地结合于此作为参考的。

U.S. 专利 No. 5,629,001

Bezault J *et al.*, *Cancer Res.* 1994, 54(9):2310-2.

Broxmeyer HE. *血 (Blood)*. 1983; 61:982-993.

Damiens E, *et al.*, *Biochim Biophys Acta*. 1998, 1402(3):277-87.

Dhennin-Duthille I, *et al.*, *J Cell Biochem*. 2000, 79(4):583-93.

Erlandsson, *Cancer Genet. Cytogenet*, 104:1-18, 1998.

Gahr M, *et al.*, *J Leukocyte Biol*. 1991;49: 427-33.

Gertig and Hunter, *Semin. Cancer Biol.*, 8(4):285-298, 1997.

Horowitz DA, *et al.*, *J Immunol*. 1984; 132: 2370-4.

Iigo M, *et al.*, *Clin Exp Metastasis*. 1999, 17(1):35-40.\

- Kolmel, *J. Neurooncol.*, 38:121-125, 1998.
- Kuhara T, *et al.*, *Nutr Cancer*. 2000, 38(2):192-9.
- Magi-Galluzzi *et al.*, *Anal. Quant. Cytol. Histol.*, 20:343-350, 1998.
- Mangray and King, *Front Biosci.*, 3:D1148-1160, 1998.
- Masuda C, *et al. Jpn J Cancer Res*. 2000, 91(6):582-8.
- Mayer, *Radiat Oncol Investig*. 6:281-8, 1998.
- Mumby and Walter, *Cell Regul.*, 2:589-598, 1991.
- Natoli *et al.*, *Biochem. Pharmacol.*, 56(8):915-920, 1998.
- Ohara, *Acta Oncol*. 37:471-4, 1998.
- Shau H, *et al.*, *J Leukocyte Biol*. 1992;51:343-9.
- Solyanik *et al.*, *细胞增生 (Cell Prolif.)*, 28:263-278, 1995.
- Spik G, *et al.*, *Adv Exp Med Biol*. 1994;357:13-9.
- Stokke *et al.*, *Cell Prolif.*, 30(5):197-218, 1997.
- Tanaka T, *et al. Jpn J Cancer Res*. 2000, 91(1):25-33.
- Tsuda H, *et al.*, *Biofactors*. 2000;12(1-4):83-8.
- Ushida Y, *et al. Jpn J Cancer Res*. 1999, 90(3):262-7.
- Wang WP, *et al.*, *Jpn J Cancer Res*. 2000, 91(10):1022-7.
- Yoo YC, *et al.*, *Adv Exp Med Biol*. 1998, 443:285-91.
- Yoo YC, *et al.*, *Jpn J Cancer Res*. 1997, 88(2):184-90.

[0155] 虽然详细说明了本发明及其优点，但应当理解在说明书中所描述的内容均会有各种变化、替换和修改，但不会背离本发明的范围和精神。而且，本申请的范围也并不会被说明书中所述的工艺、器材、制备、组合物、方式、方法及步骤的具体实施方式所限定。如果本领域普通技术人员能够容易地理解本发明的工艺、器材、制备、组合物、方式、方法及步骤的话，目前就存在或未来可能发展出根据本发明所述的相关具体实施方式的相同功能或结果的技术方案。因此，本发明的说明书的范围也包括这样的工艺、器材、制备、组合物、方式、方法或步骤。

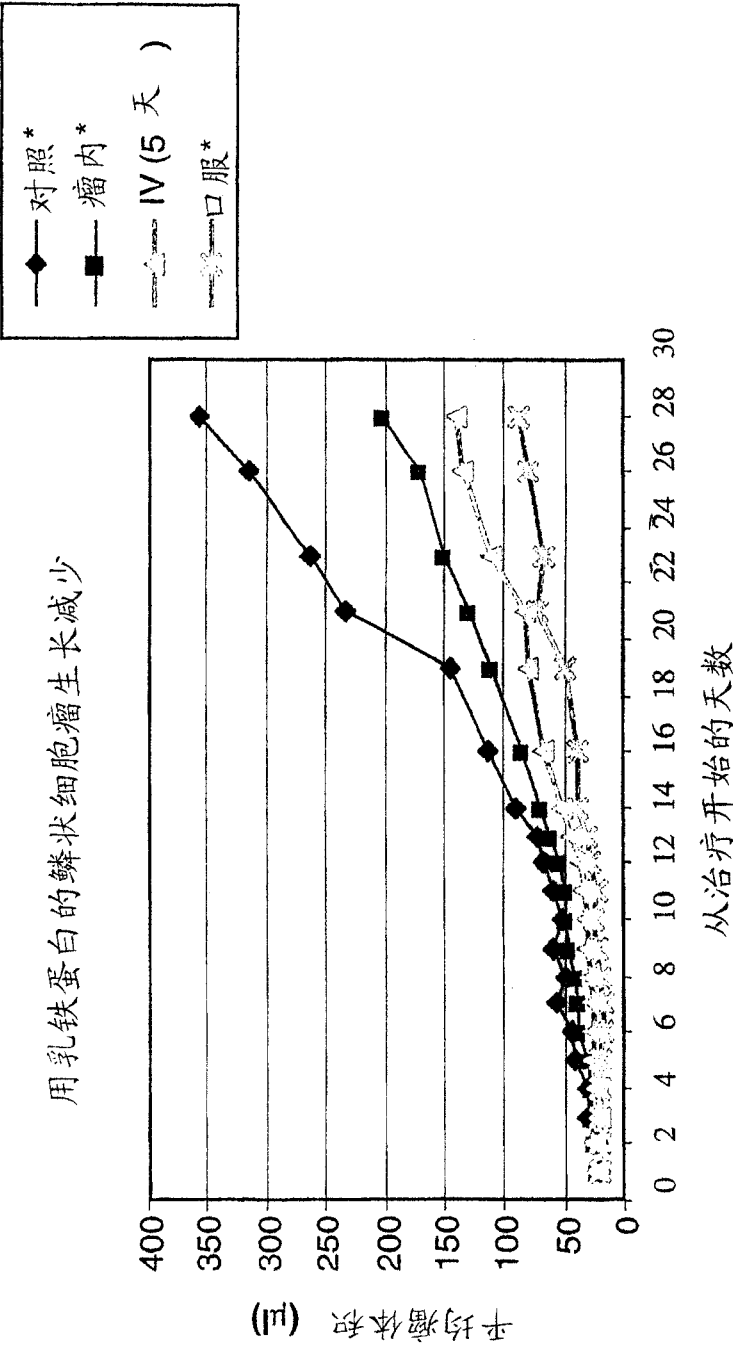


图 1

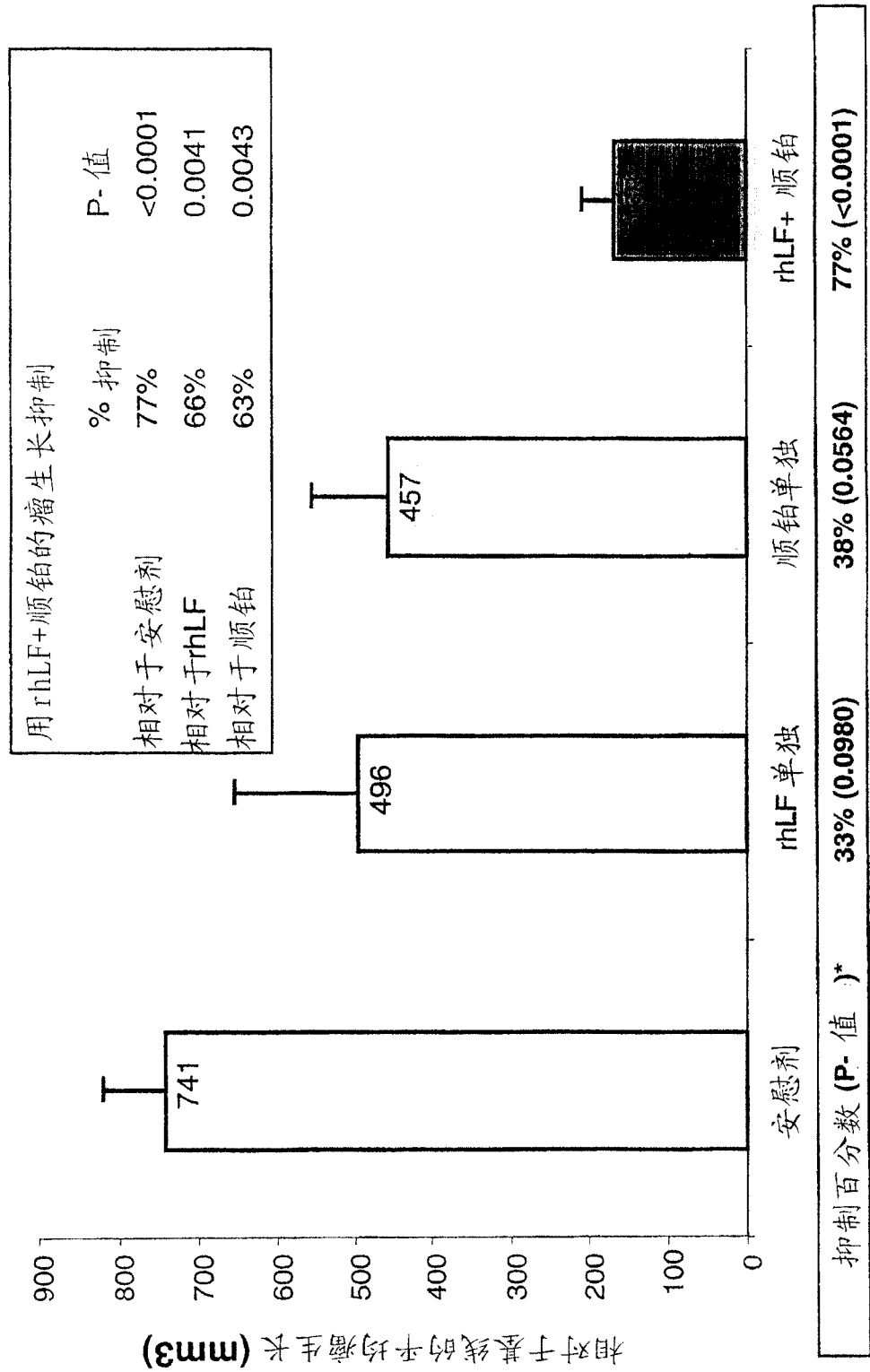


图 2

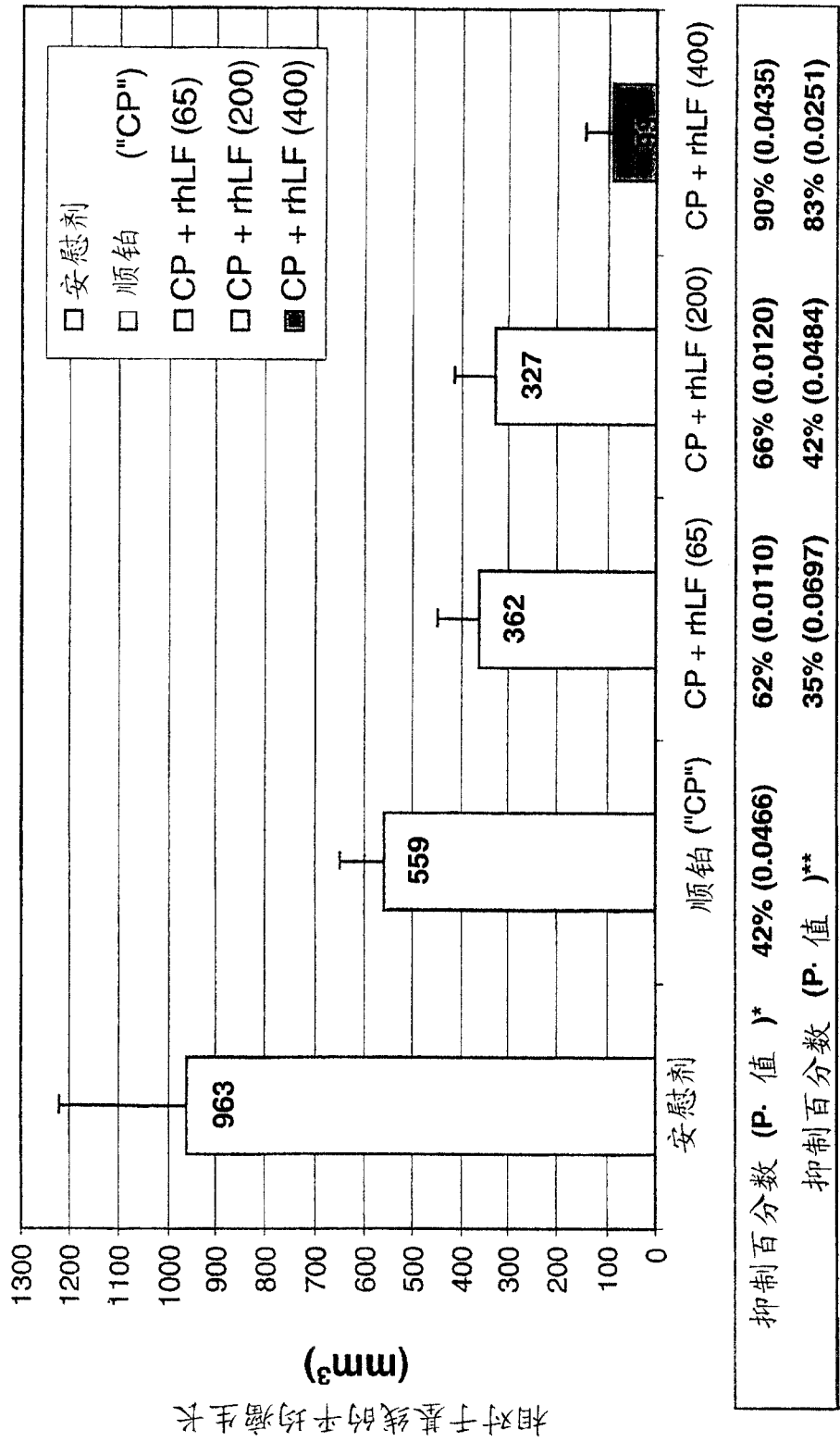


图 3

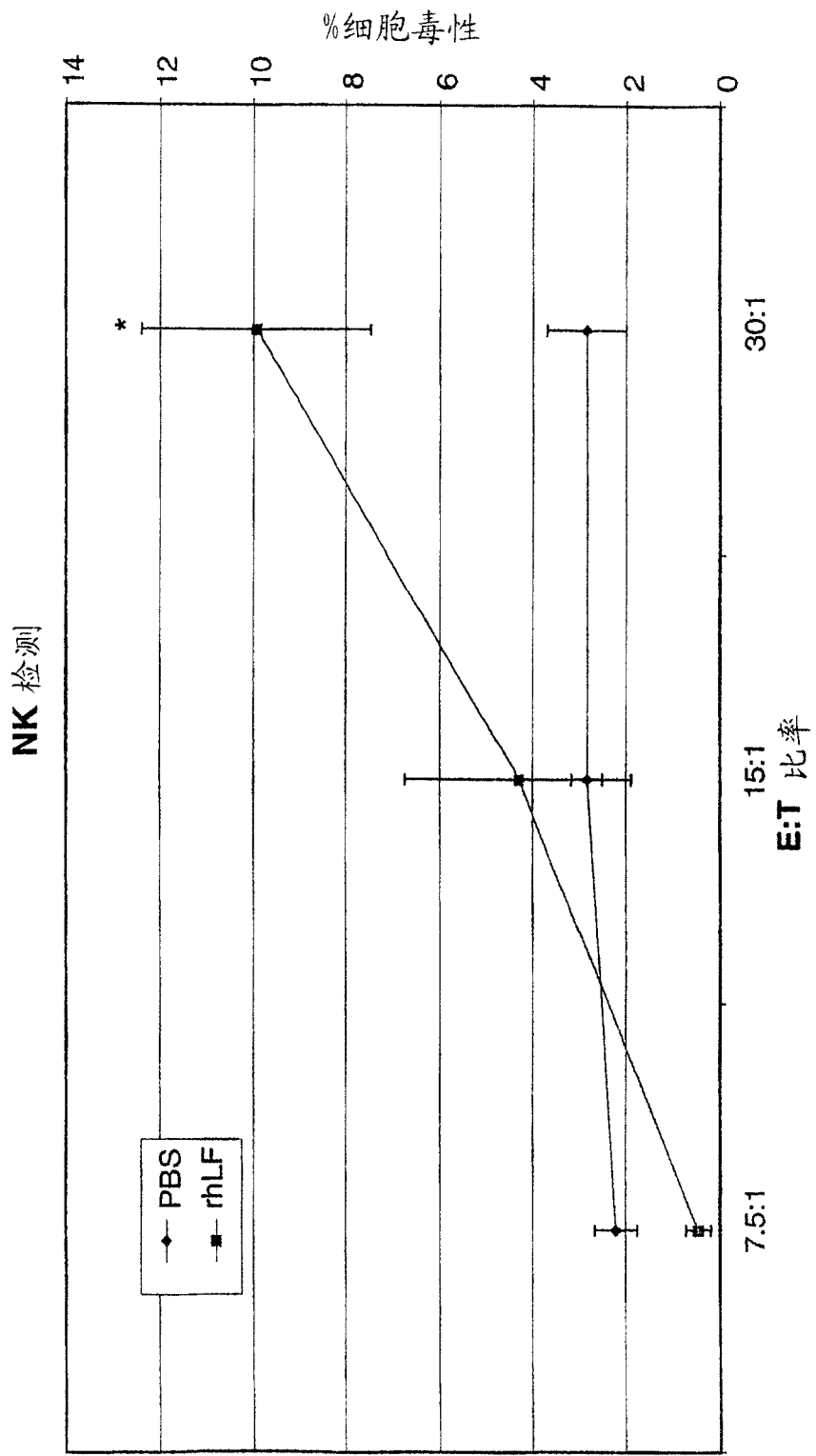


图 4

用乳铁蛋白的鳞状细胞瘤生长减少

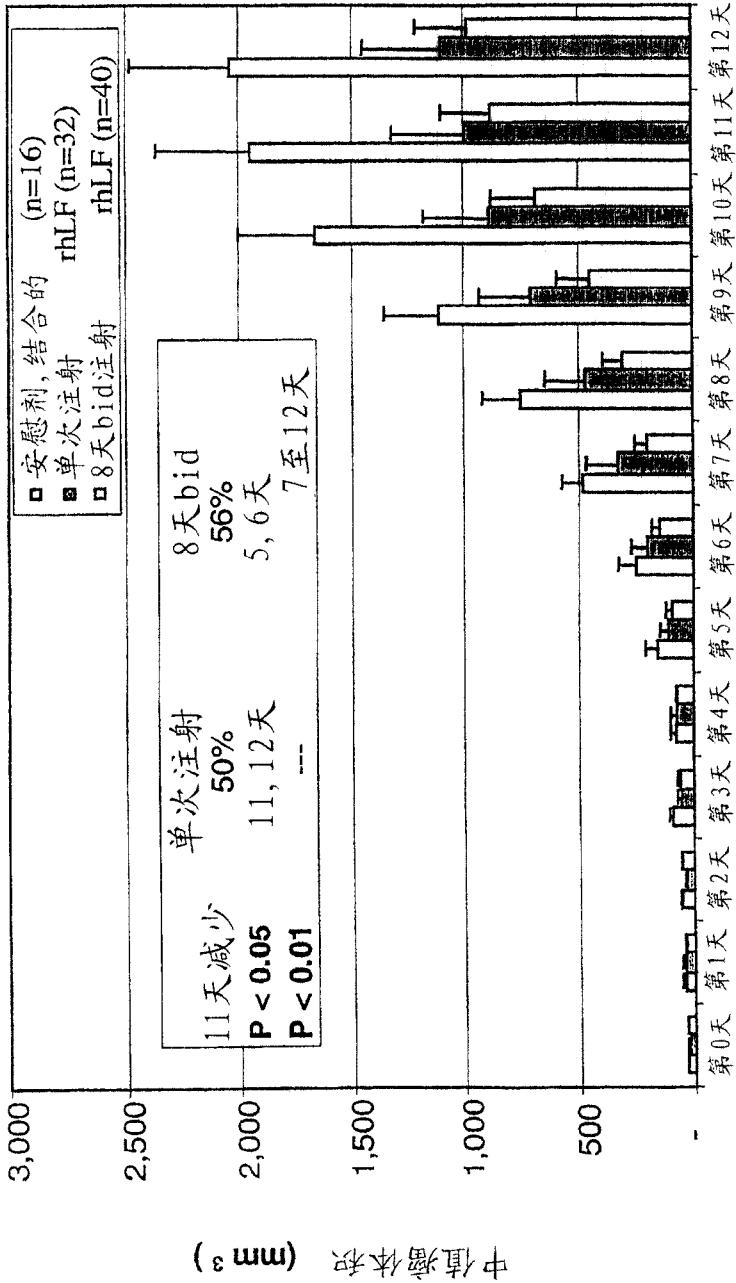


图 5