



República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior
e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0318594-0 B1

(22) Data do Depósito: 03/11/2003

(45) Data de Concessão: 26/12/2017



* B R P I 0 3 1 8 5 9 4 B 1 *

(54) Título: PROTEÍNA RECOMBINANTE QUE POSSUI UM EFEITO ANTICÂNCER, SEU GENE DE CODIFICAÇÃO, SEU USO, MEDICAMENTO PARA TRATAR CÂNCERES, VETOR DE EXPRESSÃO E MICRORGANISMO TRANSGÊNICO

(51) Int.Cl.: C07K 14/52; A61K 38/19; A61P 35/00

(73) Titular(es): BEIJING SUNBIO BIOTECH CO., LTD.

(72) Inventor(es): BING ZHU

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"PROTEÍNA RECOMBINANTE QUE POSSUI UM EFEITO ANTICÂNCER, SEU GENE DE CODIFICAÇÃO, SEU USO, MEDICAMENTO PARA TRATAR CÂNCERES, VETOR DE EXPRESSÃO E MICRORGANISMO TRANSGÊNICO"**.

Campo da Invenção

[001] A presente invenção refere-se ao campo de engenharia genética e farmacologia. A presente invenção refere-se a uma proteína recombinante, seu gene de codificação, e um medicamento de engenharia genética que contém a dita proteína recombinante como o ingrediente ativo. Em particular, a presente invenção refere-se a uma proteína recombinante que possui um efeito anticâncer, seu gene de codificação, e um medicamento para o tratamento de cânceres que contém a dita proteína recombinante como o ingrediente ativo.

Antecedentes da Invenção

[002] Durante a evolução, os mamíferos estabeleceram gradualmente um conjunto de mecanismos de sinalização de apoptose que pode provocar a morte programada de células individuais. A teoria básica é que os ligantes de células letais interagem com os receptores de morte sobre as superfícies de célula, que provoca a apoptose de células. Tal apoptose benéfica desenvolve uma função fisiológica crucial na eliminação de linfócitos ativados no final de uma resposta imune e na eliminação de células infectadas por vírus e células onco-genicamente transformadas. Os exemplos destas incluem a interação entre TNF e receptor TNFR, e a interação entre FasL e receptor Fas/Apo1/CD95.

[003] Os receptores de morte estão diretamente envolvidos nas reações em cascata de apoptose celular. Estas podem provocar a apoptose de várias células cancerígenas, e são fatores potenciais anticâncer. Embora TNF e FasL possam provocar a apoptose de células

cancerígenas, estas causam severos efeitos tóxicos e colaterais em terapia anticâncer. A injeção de TNF pode resultar em respostas inflamatórias fatais similares a choques sépticos. Esta resposta é principalmente mediada por NF- κ B, um fator pré-transcricional, que está localizado em células endoteliais vasculares e macrófagos e que é ativado por TNF. O anticorpo Anti-Fas pode provocar a apoptose de célula dependente de Fas em tecidos do fígado, e causa danos no fígado fatais.

[004] Willey e outros descobriram o ligante de indução de apoptose relacionada a TNF (TRAIL) baseado na identidade de sequência com TNF e FasL em 1995. TRAIL pode provocar a apoptose ao interagir com o receptor de morte DR4 ou DR5. Diferente de TNF e FasL, mRNA de TRAIL é essencialmente expresso em muitos tecidos humanos normais. Isto indica um mecanismo fisiológico pelo qual TRAIL provoca a apoptose de células cancerígenas e ao mesmo tempo liberta as células normais. Estes mecanismos incluem: expressão de receptores inibidores, capacidade de competir com DR4 e DR5 para se aglutinar aos ligantes, capacidade de TRAIL interagir com três receptores DcR1, DcR2 e DPG. Portanto, a toxicidade de TRAIL é menor do que TNF e FasL.

Sumário da Invenção

[005] O objetivo da presente invenção é proporcionar uma proteína recombinante com um efeito anticâncer, e um medicamento para tratar efetivamente os cânceres contendo a proteína recombinante como o ingrediente ativo.

[006] A proteína recombinante que possui um efeito anticâncer de acordo com a presente invenção é uma selecionada do grupo que consiste em:

1) uma proteína que possui a sequência de aminoácido de SEQ ID N.º 2 mostrada na listagem de sequência;

2) uma proteína derivada de SEQ ID N° 2, que possui uma homologia de sequência de mais que 90% com SEQ ID N° 2 e que possui a mesma atividade daquela de SEQ ID N° 2;

3) uma proteína derivada de SEQ ID N° 2, que é obtida ao adicionar ou remover 15 ou menos resíduos de aminoácidos na terminação-N da sequência de aminoácido de SEQ ID N° 2, e que possui a mesma atividade daquela de SEQ ID N° 2;

4) uma proteína derivada de SEQ ID N° 2, que é obtida ao adicionar ou remover 15 ou menos resíduos de aminoácidos na terminação-C da sequência de aminoácido de SEQ ID N° 2, e que possui a mesma atividade daquela de SEQ ID N° 2;

5) uma proteína derivada de SEQ ID N° 2, que é obtida por substituição, anulação, ou adição de um ou diversos resíduos de aminoácido na sequência de aminoácido de SEQ ID N° 2, e que possui a mesma atividade daquela de SEQ ID N° 2.

[007] A proteína de SEQ ID N° 2 como mostrado na li stage de sequência é TRAIL circularmente trocada recombinante humano (CPT), que consiste em 166 resíduos de aminoácido.

[008] O ingrediente ativo do medicamento para tratamento de cânceres proporcionado pela presente invenção (CPT) e uma das proteínas supramencionadas.

[009] Se desejado, um ou mais transportadores farmacêuticamente aceitáveis pode ser adicionado dentro do medicamento acima. O transportador inclui um diluente, excipiente, carga, aglutinante, umificador, desintegrador, aumentador de absorção, tensoativo, transportador adsorvente, lubrificante comumente usado no campo de produtos farmacêuticos. Se necessário, um aromatizante, adoçante e similares também podem ser adicionados.

[0010] O medicamento de acordo com a presente invenção pode ser formulado de várias formas, incluindo solução injetável, tablete, pó,

grânulo, cápsula, fluido oralmente administrado, pomada e creme, etc. Quaisquer formas de dosagem mencionadas acima do medicamento podem ser preparadas por métodos de rotina no campo de produtos farmacêuticos.

[0011] A sequência de codificação do ingrediente ativo (proteína) do medicamento para tratar cânceres (CPT) proporcionada pela presente invenção é uma selecionada do grupo que consiste em:

- 1) SEQ ID N° 1 mostrada na listagem de sequência;
- 2) um polinucleotídeo que codifica a sequência de aminoácido de SEQ ID N° 2 mostrado na sequência de listagem;
- 3) uma sequência de DNA que possui mais que 90% de homologia de sequência com a sequência de DNA definida por SEQ ID N° 1 mostrada na listagem de sequência e que codifica uma proteína que possui a mesma atividade daquela de uma proteína codificada por SEQ ID N° 1;
- 4) uma sequência de DNA que codifica uma proteína derivada de SEQ ID N° 2, onde a dita proteína derivada de SEQ ID N° 2 é obtida ao adicionar ou remover 15 ou menos resíduos de aminoácido na terminação-N da sequência de aminoácido de SEQ ID N° 2, e possui a mesma atividade daquela de SEQ ID N° 2;
- 5) uma sequência de DNA que codifica uma proteína derivada de SEQ ID N° 2, onde a dita proteína derivada de SEQ ID N° 2 é obtida ao adicionar ou remover 15 ou menos resíduos de aminoácido na terminação-C da sequência de aminoácido de SEQ ID N° 2, e possui a mesma atividade daquela de SEQ ID N° 2;
- 6) uma sequência de DNA que codifica uma proteína derivada de SEQ ID N° 2, onde a dita proteína derivada de SEQ ID N° 2 é obtida por substituição, anulação, ou adição de um ou diversos resíduos de aminoácido na sequência de aminoácido de SEQ ID N° 2, e possui a mesma atividade daquela de SEQ ID N° 2.

SEQ ID N° 1 na listagem de sequência consiste em 501 pares de base. A estrutura de leitura desta é 1-498 nucleotídeos a partir de extremidade 5'.

[0012] Os vetores de expressão e linhas celulares (tais como *Escherichia coli* e sistemas de expressão de levedura, etc) que contêm o gene da presente invenção estão dentro do escopo da presente invenção.

Breve Descrição das Figuras

[0013] A Figura 1 mostra as curvas de volume de tumor de glioma humano U251 sob condições de tratamento diferentes.

[0014] A Figura 2 mostra os tamanhos de tumor de glioma humano U251 sob condições de tratamento diferentes.

[0015] A Figura 3 mostra as curvas de volume de tumor de câncer de pulmão humano NCI-H460 sob condições de tratamento diferentes.

[0016] A Figura 4-1 a Figura 4-6 mostram as seções histopatológicas de câncer de pulmão humano NCI-H460 sob condições de tratamento diferentes (coloração HE x 100).

[0017] A Figura 5 mostra os tamanhos de tumor de câncer de pulmão humano NCI-H460 sob condições de tratamento diferentes.

[0018] A Figura 6 mostra as curvas de volume de tumor de câncer de cólon humano COLO 205 sob condições de tratamento diferentes.

[0019] A Figura 7-1 a Figura 7-5 mostram camundongos nus BALB/c-nu que foram inoculados com câncer de cólon humano COLO 205 seguidos por tratamentos diferentes.

Melhores Modos para Realizar a Invenção

Exemplo 1

Construção e expressão do gene de codificação de TRAIL circularmente trocado humano recombinante

[0020] A sequência de gene que codifica resíduos de aminoácido em posições 121-281 de TRAIL humano foi obtida a partir de biblioteca

de DNAC de baço humano. O gene que codifica resíduos de aminoácido em posições 135-281 de TRAIL humano foi gerado por método de PCR de rotina utilizando gene de TRAIL humano como o padrão. Então a sequência de DNA que codifica os resíduos de aminoácido 122-135 de TRAIL foi ligada à extremidade 3' da sequência de DNA que codifica os resíduos de aminoácido em posições 135-281 de TRAIL por método de PCR. Uma sequência de DNA que codifica cinco resíduos de glicina foi inserida entre a sequência de DNA que codifica os resíduos de aminoácido 135-281 de TRAIL e a sequência de DNA que codifica os resíduos de aminoácido 122-135 de TRAIL. A flexibilidade de glicina pode facilitar a dobradura de proteína apropriada. O gene de codificação de CPT desta maneira obtido foi ligado dentro de plasmídeo vetorial pet28b (ou outro plasmídeo vetorial) utilizando NcoI e BamHI, resultando em um plasmídeo de expressão. A sequência de DNA deste foi confirmada como correta por sequenciamento.

[0021] O plasmídeo de expressão foi transformado em cepa *E. coli* BL21 (DE3). *E. coli* transformado foi inoculado dentro de 10 ml de meio líquido LB que contém 20 µg/ml de canamicina. As células foram incubadas sobre um sacudidor a 37°C por 12 horas. Então 10 ml da cultura foi inoculada dentro de 1 L de meio líquido LB que contém 20 µg/ml de canamicina e a cultura adicional foi conduzida. Quando OD₆₀₀ atingiu 0,6, 0,2 ml de 1 M IPTG foi adicionado dentro de 1 L de cultura para induzir a expressão de proteína. As células foram colhidas através de centrifugação após três horas de indução. Os péletes foram suspensos em 100 ml de tampão que contém 100 mM de Tris (pH 7,9) e 150 mM de NaCl.

[0022] As células foram fragmentadas por sonicação a 4°C e foram centrifugadas em 15.000 rpm utilizando um rotor Beckman JA20. Uma vez que a proteína expressa é capaz de se aglutinar com uma resina de quelato de metal, esta pode ser purificada por uma cromato-

grafia de quelação de metal. Após a centrifugação, o sobrenadante foi bombeado dentro de uma coluna de cromatografia de quelato-Ni²⁺. A coluna foi lavada por um tampão que contém 50 mM de Tris (pH 7,9), 0,5 M de NaCl e 50 mM de imidazol para remover proteínas contaminantes contidas nesta. A proteína envolvida foi então eluída por um tampão que contém 50 mM de Tris (pH 7,9), 0,5 M de NaCl e 200 mM de imidazol. A proteína eluída foi dialisada contra tampão PBS.

[0023] Por fim, a proteína foi purificada por uma coluna de troca de íon e uma coluna de filtração de gel Superdex 200 (Pharmacia) montada em um sistema AKTA HPLC (Pharmacia). A análise da proteína indicou que a proteína obtida desta maneira possuía uma sequência de aminoácido de SEQ ID N° 2, que é o medicamento anticâncer da presente invenção. O produto final era um pó branco e era solúvel em água.

Exemplo 2

Determinação dos efeitos citotóxicos do medicamento da presente invenção sobre células cancerígenas utilizando o método de redução de tetrazólio (MTT)

[0024] Reagentes: RPMI1640 a partir de GIBCO; MTT a partir de Bebcos. O soro bovino fetal é adquirido a partir de Hangzhou SiJiQing Bioengineering Material Co. Ltd (P.R. China).

[0025] Linhas de célula: COLO 205 (célula de câncer de cólon humano), NCI-H460 (célula de câncer de pulmão humano), RPMI 8226 (célula de mieloma múltiplo humano), U251 (célula de glioma de cérebro humano) são a partir de ATCC, USA. HL-60 (célula de leucemia promielocítica humana), MDA-MB-231, MDA-MB-435 (célula cancerígena de mama humana), SCLC (célula cancerígena de pulmão de célula pequena humana), H125 (célula cancerígena de pulmão humano) e PC-3 (célula cancerígena de pâncreas humano).

[0026] As células de tumor bem desenvolvidas foram coletadas para preparar uma suspensão celular ($1 \times 10^4/\text{ml}$) com meio RPMI 1640 que contém 10% de soro bovino fetal. A suspensão celular foi inoculada dentro de uma placa de 96 cavidades, 100 μl (que contém 1000 células com tumor) por cavidade. A placa foi cultivada em um incubador com 5% de CO_2 a 37°C por 24 horas, seguido por adição de medicamento.

[0027] Um controle de matéria-prima e um controle positivo que utilizam 5-fluorouracil ou adriamicina são empregados no experimento. As amostras de CPT possuem cinco concentrações, três cavidades paralelas para cada concentração. As células foram cultivadas em um incubador com 5% de CO_2 a 37°C por 4 dias. Então o meio de cultura foi removido e 100 μl de solução de MTT (0,4 mg/ml em RPMI 1640) foram adicionados em cada cavidade. A placa foi incubada a 37°C por quatro horas adicionais.

[0028] O sobrenadante foi descartado. 150 μl de DMSO foram adicionados dentro de cada cavidade para solubilizar grânulos de Fomazan. Após sacudir gentilmente, os valores de OD foram medidos por um analisador de enzima BIORAD 550, com o comprimento de onda de detecção que é 540 nm e o comprimento de onda de referência que é 450 nm.

[0029] As curvas de resposta à dose foram geradas por meio de plotagem com as taxas de inibição de célula e concentrações diferentes de medicamento, e as meias concentrações inibidoras (IC_{50}) foram calculadas. Os resultados foram mostrados na Tabela 1. Pode ser visto que o CPT possui um efeito mortal extremamente forte sobre células com tumor humanas U251, COLO205, NCI-H460, MDA-MB-435, onde $\text{IC}_{50} < 0,01 \mu\text{g/ml}$. CPT também possui um efeito mortal muito forte sobre células HL-60, MDA-MB-231, PC-3 e HL125, onde $\text{IC}_{50} < 0,1 \mu\text{g/ml}$. CPT possui um bom efeito sobre célula RPMI 8226, onde

$IC_{50} < 1 \mu\text{g/ml}$. Também mostra algum efeito inibidor sobre o crescimento de célula SCLC. A atividade de CPT para provocar a apoptose de células cancerígenas é seis a onze vezes tão forte quanto de tipo selvagem de TRAIL.

Tabela 1. Os efeitos mortais de CPT sobre linhas de células com tumor humanas

($\bar{x} \pm SD$)

Linha de célula com tumor	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)		
	CPT	Fu	Adr
U251	<0,001	0,981 $\pm$ 0,077	
COLO 205	0,006 $\pm$ 0	0,826 $\pm$ 0,051	
MDA-MB-435	0,008 $\pm$ 0,002	0,199 $\pm$ 0,138	
HL-60	0,014 $\pm$ 0,013		0,006 $\pm$ 0
NCI-H460	0,002 $\pm$ 0,001	0,566 $\pm$ 0,016	
MDA-MB-231	0,043 $\pm$ 0,0131	0,318 $\pm$ 0,055	
PC-3	0,067 $\pm$ 0,002	4,928 $\pm$ 0,753	
H125	0,085 $\pm$ 0,006	0,138 $\pm$ 0,031	
RPMI 8226	0,824 $\pm$ 0,093	<0,1	
SCLC	10 $\pm$ 0	0,617 $\pm$ 0,0257	

Nota: FU indica controle 5-fluorouracil; Adr indica controle de Adriamicina.

Exemplo 3

Os efeitos de inibição do medicamento da presente invenção sobre o crescimento de xenoinxerto de câncer humano em camundongos nus

[0030] Neste exemplo, os animais usados eram camundongos nus BALB/c-nu, com 6-8 semanas. Para cada experimento, todos os animais eram do mesmo sexo,

[0031] Linhas de célula com tumor: glioma de cérebro humano U251, linha de célula com câncer de pulmão humano NCI-H460, linha

de célula com câncer de cólon humano COLO 205 foram inoculadas a partir de cultura *in vitro* dentro de camundongos nus de forma subcutânea, os tumores foram subcultivados e mantidos.

[0032] Procedimentos Experimentais: camundongos nus bem desenvolvidos que conduzem tumores bem desenvolvidos foram selecionados e sacrificados ao separar a vértebra do pescoço. Os tumores foram removidos de forma asséptica e foram cortados em pedaços possuindo um diâmetro de 2-3 mm por um escalpelo. As partes foram inoculadas dentro da axila de camundongos nus de forma subcutânea por uma agulha. Os tumores poderiam ser encontrados na axila dos animais após cerca de 7-10 dias. O comprimento e a largura de tumores foram medidos por um calibre Vernier. Os animais foram então agrupados baseados em seus tamanhos de tumor. Cada grupo incluiu sete a oito animais.

[0033] O comprimento, largura do tumor e o peso de corpo dos camundongos foram medidos duas vezes por semana. O volume de tumor (TV) e volume de tumor relativo (RTV) foram calculados. Um gráfico que indica as alterações de tamanho de tumor foi plotado. No fim deste experimento, os tumores foram retirados e pesados após os camundongos serem sacrificados, e as taxas de inibição do medicamento sobre o crescimento de tumor foram calculadas.

[0034] A fórmula para calcular o volume de tumor (TV) é: comprimento x largura² +2.

[0035] A fórmula para calcular o volume de tumor relativo (RTV) é: V_t/V_o (onde V_o é o valor de TV medido quando a administração for iniciada, V_t é o valor de TV medido após isto).

[0036] O teste T foi usado para determinar a diferença estatística de pesos de tumor, volumes de tumor e RTV, etc entre grupos diferentes de animais. O índice usado para avaliar a atividade antitumoral é a taxa de crescimento de tumor relativo T/C (%), a fórmula para tal é:

$$T/C(\%) = \frac{\text{RTV do grupo que recebe medicamento (T)}}{\text{RTV do controle negativo (C)}} \times 100$$

O padrão de avaliação para eficácia:

$T/C (\%) > 60$ é ineficaz;

$T/C (\%) \leq 60$ e $P < 0,05$ após análise estatística é eficaz.

1. O efeito inibidor sobre glioma cerebral humano U251

[0037] A Carmustina (Renmin Pharmaceuticals, Amino Acid Inc, Tianjin, P. R. China) foi usada como o controle positivo, 40 mg/kg, administrada por injeção intraperitoneal uma vez. CPT foi fornecido para quatro grupos nas doses de 0,6 mg/kg, 1,7 mg/kg, 5,0 mg/kg, 15,0 mg/kg respectivamente, administrado por injeção intraperitoneal. O tratamento incluiu dez injeções.

[0038] Os resultados experimentais são mostrados na Tabela 1 e 2 e Figura 1 e 2. Pode ser visto que o CPT apresentou um efeito inibidor significativo sobre o crescimento de tumores transplantados (glioma cerebral humano U251) em camundongos nus. As taxas de inibição de tumor calculadas por peso para os quatro grupos de tratamento eram 30,5%, 44,5%, 64,8% e 87,5% respectivamente. Comparado com o grupo de controle, os pesos de tumor dos grupos de tratamento mostraram uma diferença estatística significativa ou muito significativa. O efeito anti-tumor de CPT era significativamente dependente de dose. Os valores de taxa de crescimento de tumor relativo T/C (%) para os grupos de 5,0 mg/kg e 15 mg/kg eram < 60 . O volume de tumor relativo (RTV) para o grupo de 15 mg/kg era significativamente diferente em estatística comparado com aquele do grupo de controle.

Tabela 2. O efeito de inibição de CPT sobre o crescimento de glioma humano U251 ($x \pm SD$)

Grupo	Número de Animal		Peso de Corpo (g)		Peso de Tumor (g)	Taxa de Inibição (%)
	Começo	Fim	Começo	Fim		
Controle Negativo	8	8	21,9±1,1	22,3±2,6	1,28±0,50	
Controle de Carmustina	8	7	22,8±0,7	19,4±2,1	0,09±0,06**	93,0
CPT 0,6mg/kg	8	8	21,0±0,8	21,0±1,4	0,89±0,49	30,5
CPT 1,7mg/kg	8	8	21,6±1,2	21,5±2,0	0,71±0,22*	44,5
CPT 5,0mg/kg	8	8	22,0±1,1	21,9±3,2	0,45±0,26**	64,8
CPT 15mg/kg	8	8	21,6±1,1	21,1±1,7	0,16±0,15**	87,5

Tabela 3. O efeito de inibição de CPT sobre o crescimento de glioma humano U251 ($x \pm SD$)

Grupo	Volume de Tumor (mm ³)		RTV	T/C (%)
	Começo	Fim		
Controle negativo	165±72	1238±244	3,34±2,28	
Controle de carmustina	153±35	109±78**	0,54±0,29**	16,0
CPT 0,6mg/kg	141±40	961±582	2,77±1,97	82,9
CPT 1,7mg/kg	131±34	588±215**	2,12±1,29	63,5
CPT 5,0mg/kg	133±57	510±333**	1,32±1,24*	39,5
CPT 15mg/kg	148±58	261±238**	0,71±0,57**	21,3

*P<0,05 **P<0,01 comparado com o grupo de controle negativo

2. O efeito de inibição sobre câncer de pulmão humano HCl-H460

[0039] Ciclofosfamida (Shanghai Hualian Pharma Inc, P.R. China) foi usada como o controle positivo, administrada por injeção intraperitoneal na dose de 100 mg/kg. Uma injeção adicional foi fornecida em 80 mg/kg duas semanas depois. CPT foi fornecido para três grupos de tratamento nas doses de 1,7 mg/kg, 5,0 mg/kg, 15,0 mg/kg respecti-

vamente, administrada por injeção intraperitoneal uma vez por dia. O tratamento continha um total de dez injeções.

[0040] Os resultados experimentais são mostrados na Tabela 4 e 5 e Figuras 3 e 5. Pode ser visto que CPT apresentou um efeito de inibição significativo sobre o crescimento de tumores transplantados (câncer de pulmão humano NCI-H460) em camundongos nus. As taxas de inibição de tumor calculadas por peso para os três grupos de tratamento eram 52,2%, 74,5% e 87,0% respectivamente. Comparado com o grupo de controle, os pesos de tumor dos grupos de tratamento possuíam uma diferença estatística significativa ou muito significativa. Os valores de taxa de crescimento de tumor relativo (%) para os grupos de 5,0 mg/kg e 15 mg/kg eram < 60, os volumes de tumor relativos (RTV) eram significativamente diferentes em estatística comparados com aqueles do grupo de controle.

Tabela 4. O efeito de inibição de CPT sobre o crescimento de câncer de pulmão humano NCI-H460

Grupo	Número de Animal		Peso de corpo (g)		Peso de Tumor (g)	Taxa de Inibição (%)
	Começo	Fim	Começo	Fim		
Controle Negativo	8	7	21,4±0,9	19,3±1,0	1,61±0,65	
Controle de ciclofosfamida	8	7	20,0±1,3	16,1±2,2	0,96±0,35*	40,4
CPT 1,7mg/kg	8	7	20,1±1,9	19,8±1,6	0,77±0,19**	52,2
CPT 5,0mg/kg	8	8	20,4±1,9	18,5±2,5	0,41±0,28**	74,5
CPT 15mg/kg	8	8	20,9±1,1	21,1±1,7	0,21±0,10**	87,0

Tabela 5. O efeito de inibição de CPT sobre o crescimento de câncer de pulmão humano NCI-H460

Grupo	Volume de Tumor (mm ³)		RTV	T/C (%)
	Começo	Fim		
Controle Negativo	169±58	1874±637	5,98±4,05	
Controle de ciclofosfamida	179±52	1121±434	3,67±2,15	61,4
CPT 1,7mg/kg	200±103	706±170*	2,27±1,13*	38,0

Grupo	Volume de Tumor (mm ³)		RTV	T/C (%)
	Começo	Fim		
CPT 5,0mg/kg	187±51	469±359**	1,49±0,76**	24,9
CPT 15mg/kg	192±63	189±102**	0,79±0,25**	13,2

*P<0.05 **P<0.01 comparado com os controles negativos.

[0041] Os resultados de testes histopatológicos foram mostrados na Figura 4-1 a Figura 4-6, Figura 4-1, 4-3 e 4-5 eram de grupo de controle negativo. A figura 4-1 mostrou que os tecidos de tumor se difundiram e eram tipo fascículo. Havia uma grande necrose liquefativa no centro do tumor. O tumor era cercado por uma membrana de tecido conectiva fina e foi insatisfatoriamente infiltrada por linfócitos. A Figura 4 - 3 as células de tumor foram dispostas em estruturas tipo fascículo e cordão. O tecido de tumor possuía capilares ricos e não foi infiltrado por linfócitos. A Figura 4-5 mostrou que as células de tumor eram redondas ou multianguladas, possuíam núcleos extensos, e possuíam citoplasma pequeno. A cromatina foi perdida, os nucléolos eram aparentes, e havia 2-3 nucléolos, que mostraram múltiplos sinais de mitose. As Figuras 4-2, 4-4 e 4-6 eram para o grupo tratado com 15 mg/kg de CPT. A Figura 4-2 mostrou que os tecidos de tumor eram fascículos sólidos, e a folha necrosada surgiu no centro. Havia muito tecido conectivo proliferado no tumor, e o invólucro de tecido conectivo fino em torno do tumor. O tumor foi insatisfatoriamente infiltrado por linfócitos. A Figura 4-4 mostrou que as células de tumor foram dispostas em estruturas tipo cordão. O tecido de tumor possuía poucos capilares e possuía necrose no centro. Este foi cercado por invólucro de tecido conectivo e infiltrado por alguns linfócitos. A Figura 4-6 mostrou que as células de tumor eram redondas ou multianguladas, os nucléolos eram grandes e pouco citoplasma estava contido nestes. A cromatina foi perdida, com sinais de mitose. O tumor possuía poucos capilares e possuía pequenas necroses com múltiplos focos em forma de ponto.

[0042] É claro que o medicamento da presente invenção possui forte efeito inibidor sobre célula de câncer de pulmão humano NCI-H460.

3. O efeito de inibição sobre o crescimento de câncer de cólon humano COLO 205

[0043] Hidroxicamptotecina injetável (marca: Xi Su, Wuhan Lishizhen Pharmaceuticals Inc., Huangshi Lishizhen Pharmaceuticals Group, P. R. China) foi usada como controle positivo, administrada por injeção intraperitoneal na dose de 1 mg/kg, uma vez ao dia. A administração terminou após 15 dias consecutivos de administração. Foi observado que o crescimento dos tumores era significativo; portanto, uma administração adicional de uma semana de hidroxicamptotecina foi fornecida por injeção intraperitoneal na dose de 100 mg/kg após 8 dias. Uma única administração de 80 mg/kg de hidroxicamptotecina foi adicionalmente fornecida após duas semanas. CPT foi fornecido para três grupos de tratamento nas doses de 1,7 mg/kg, 5,0 mg/kg, 15,0 mg/kg respectivamente por injeção intraperitoneal, uma vez ao dia. O tratamento continha um total de 15 injeções.

[0044] Os resultados experimentais foram mostrados na Tabela 6 e 7 e Figura 6 e 7-1 a 7-5, onde a Figura 7-1 serve para o grupo de controle negativo; Figura 7-2 serve para o grupo tratado por 15,0 mg/kg de CPT; Figura 7-3 serve para o grupo tratado por 5,0 mg/kg de CPT; Figura 7-4 serve para o grupo tratado por 1,7 mg/kg de CPT; Figura 7-5 serve para o grupo de controle positivo de hidroxicamptotecina. Os resultados mostraram que CPT apresentou um efeito de inibição significativo sobre o crescimento de tumor transplantado (câncer de cólon humano COLO 205) em camundongos nus. Os tumores reduziram em tamanho de forma significativa no grupo tratado por alta dosagem de CPT após cinco dias de tratamento. Alguns tumores desapareceram ainda com o aumento do número de administração. A

observação daqueles camundongos foi conduzida por quatro semanas após a administração ser interrompida, e nenhum tumor foi encontrado em 1/3 dos animais. A análise anatômica macroscópica destes camundongos apenas encontrou alguns sinais de inoculação sob a pele. As taxas de inibição de tumores por peso para os três grupos tratados eram 79,6%, 90,8% e 97,4% respectivamente. Comparado com o grupo de controle, os pesos de tumor de todos os grupos tratados mostraram uma diferença estatística significativa ou muito significativa. Os valores de taxa de crescimento de tumor relativo T/C (%) para todos os grupos eram < 60; os volumes de tumor relativos (RTV) eram significativamente diferentes em estatística comparados com aqueles do grupo de controle. Particularmente, o valor de T/C (%) para o grupo tratado por alta dosagem de CPT era < 10, que indica que CPT possui uma alta atividade sobre este tipo de tumor.

Tabela 6. O efeito de inibição de CPT sobre o crescimento de câncer de cólon COLO 205

Grupo	Número de Animal		Peso de Corpo (g)		Peso de Tumor (g)	Taxa de inibição (%)
	Começo	Fim	Começo	Fim		
Controle Negativo	8	8	19,5±0,8	21,9±1,9	1,96±0,73	
Controle de hidróxicamptotecina	8	8	20,4±0,9	21,0±2,5	0,66±0,26**	66,3
CPT 1,7mg/kg	8	8	20,6±1,1	20,6±3,0	0,40±0,33**	79,6
CPT 5,0mg/kg	8	7	20,2±0,8	21,4±1,2	0,18±0,15**	90,9
CPT 15mg/kg	8	8	20,0±0,5	21,1±2,4	0,05±0,05**	97,4

Tabela 7. O efeito de inibição de CPT sobre o crescimento de câncer de cólon humano COLO 205

Grupo	Volume de Tumor (mm ³)		RTV	T/C (%)
	Começo	Fim		
Controle Negativo	151±79	2532±1190	8,30±5,53	
Controle de hidroxycamptotecina	150±34	845±66**	3,92±1,91*	47,2
CPT 1,7mg/kg	205±47	582±408**	1,62±0,62**	19,5

Grupo	Volume de Tumor (mm ³)		RTV	T/C (%)
	Começo	Fim		
CPT 5,0mg/kg	180±63	314±175**	0,91±0,35**	11,0
CPT 15mg/kg	192±81	52±53**	0,33±0,27**	4,0

*P<0.05 **P<0.01 comparado com o controle negativo

Aplicações Industriais

[0045] A análise de método de redução de tetrazólio (MTT) foi usada para determinar o efeito anticâncer do medicamento. As curvas de resposta de dosagem foram geradas por plotagem com as taxas de inibição celular e diferentes concentrações de medicamento, e as metades de concentrações inibidoras (IC₅₀) foram calculadas. As observações de muitas linhas de célula com tumor humana provaram que a formulação de CPT possui um efeito de inibição muito significativo sobre o crescimento de células de tumor. CPT exerce uma atividade mortal *in vitro* significativa sobre mais de 10 células com tumor, incluindo câncer de pulmão humano, câncer de cólon, câncer de mama, câncer de estômago, câncer de pâncreas, glioma, câncer de célula sanguínea, câncer de bexiga, câncer de próstata, câncer colorretal, câncer cervical e células de tumor cerebral. As metades de concentrações inibidoras (IC₅₀) de CPT para U251 (célula de glioma cerebral humano), COLO 205 (célula de câncer de cólon humano), NCI-H460 (célula de câncer de pulmão humana), MDA-MB-435 (célula de câncer de mama humana) são < 0,01 µg/ml. Os valores de IC₅₀ para HL-60 (célula de leucemia promielocítica humana), MDA-MB-231 (célula de câncer de mama humana), PC-3 (célula de câncer de pâncreas humana) e H125 (célula de câncer de pulmão humana) são < 0,1 µg/ml. IC₅₀ de CPT para RPMI 8226 (célula de mieloma múltipla humana) é < 1 µg/ml. CPT também mostra algum efeito de inibição sobre o crescimento de SCLC (célula de câncer de pulmão de célula pequena humana).

[0046] Os resultados experimentais *in vivo* mostram que a administração intraperitoneal de CPT em uma dose de 15 mg/kg/dia durante 10-15 dias consecutivos apresentou um efeito de inibição muito significativo sobre o crescimento de células de tumor, incluindo câncer de cólon humano COLO 205, câncer de pulmão humano NCI-H460, glioma humano U251 etc.

[0047] Comparado com o grupo de controle negativo que não recebeu nenhum medicamento, CPT pode reduzir significativamente o crescimento de tumores em animais, e uma alta dosagem de administração em uma etapa antecipada do crescimento de tumor transplantado pode fazer com que o tumor diminua o volume ou ainda desapareça. O efeito de CPT é claramente dependente de dose. Ademais, a eficácia é associada com o curso de tratamento para alguma extensão. Foi observado em modelos de camundongo nu que foram transplantados com câncer de cólon humano COLO 205 que os tamanhos de tumor eram ainda menores do que aqueles antes da administração mesmo quatro semanas após a administração ser parada, onde os camundongos receberam 15 injeções consecutivas de CPT em uma dose de 15 mg/kg/dia. A presença de tumores não poderia ser confirmada em locais de inoculação em 1/3 dos animais, e apenas sinais causados por inoculação foram observados durante a análise anatômica.

[0048] Todos os dados indicaram que a administração de CPT mostrou um efeito de inibição significativo sobre o crescimento de tumores humanos transplantados em camundongos nus. Comparado com o grupo de controle, para U251, as taxas de inibição de 15 mg/kg de CPT baseadas em peso de tumor eram 87,5% e 87,7% respectivamente; para NCI-H460, as taxas de inibição eram 87,0% e 88,8% respectivamente; para COLO 205, as taxas de inibição eram 97,4% e 97,8% respectivamente, indicando uma diferença muito significativa

em estatística. Três modelos foram empregados para conduzir o experimento nesta invenção. Os resultados indicaram que os volumes de tumor relativos (RTV) dos três modelos de animais mostraram diferença estatisticamente significativa do grupo de controle negativo, onde os animais foram continuamente administrados com CPT em uma dose de 5,0 mg/kg durante 10-15 dias. Os dados que se referem ao grupo tratado por 15 mg/kg de CPT eram significativamente muito diferentes daqueles do grupo de controle negativo, onde todos os valores de T/C (%) são menores do que 25, às vezes ainda abaixo de 10, que indicaram que CPT possuía uma alta atividade antitumoral e os experimentos possuíam boa capacidade de repetição.

[0049] CPT não apresentou quaisquer efeitos colaterais ou tóxicos visíveis em animais. Nenhuma diferença substancial nos parâmetros que se referem ao status de vida de camundongos, tais como peso de corpo e viabilidade dos grupos tratados foi observada comparada com aquela do grupo de controle negativo, exceto que os tamanhos de tumor nos camundongos tratados eram menores. A partir da descrição acima, foi demonstrado que CPT possuía um efeito seletivo significativo sobre células de tumor, e CPT não provoca a apoptose das células em tecidos normais. Portanto, CPT pode ser usado como um medicamento eficaz e seguro para tratar cânceres. CPT tanto é teórica como industrialmente importante e possuía um futuro brilhante no mercado.

REIVINDICAÇÕES

1. Proteína recombinante que possui um efeito anticâncer, caracterizada pelo fato de que possui a sequência de aminoácido SEQ ID No:2 mostrada na listagem de sequência.

2. Gene que codifica uma proteína recombinante que possui um efeito anticâncer, caracterizado pelo fato de que é selecionado do grupo que consiste em:

1) SEQ ID No:1 mostrada na listagem de sequência; e

2) um polinucleotídeo degenerado de SEQ ID NO: 1 que codifica a sequência de aminoácido SEQ ID No:2 mostrada na listagem de sequência.

3. Gene de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que o dito gene é de SEQ ID No:1 mostrada na listagem de sequência.

4. Medicamento para tratar cânceres, caracterizado pelo fato de que compreende a proteína recombinante como definida na reivindicação 1 como o ingrediente ativo, e um ou mais ingredientes farmacêuticamente aceitáveis.

5. Vetor de expressão, caracterizado pelo fato de que compreende o gene como definido na reivindicação 2 ou 3.

6. Microrganismo transgênico, caracterizado pelo fato de que compreende o gene como definido na reivindicação 2 ou 3.

7. Uso da proteína recombinante como definida na reivindicação 1, caracterizado pelo fato de ser na preparação de um medicamento para tratar cânceres.

8. Uso de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o dito câncer é selecionado do grupo consistindo em câncer de cólon, câncer de pulmão, mieloma múltiplo, glioma cerebral, leucemia, câncer de mama, câncer de pulmão de célula pequena e câncer do pâncreas.

9. Uso de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que o dito câncer é mieloma múltiplo.

10. Uso de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que o dito câncer é leucemia.

11. Uso de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que o dito câncer é glioma cerebral.

12. Uso de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que o dito câncer é câncer de pulmão.

13. Uso de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que o dito câncer é câncer de cólon.

1/4

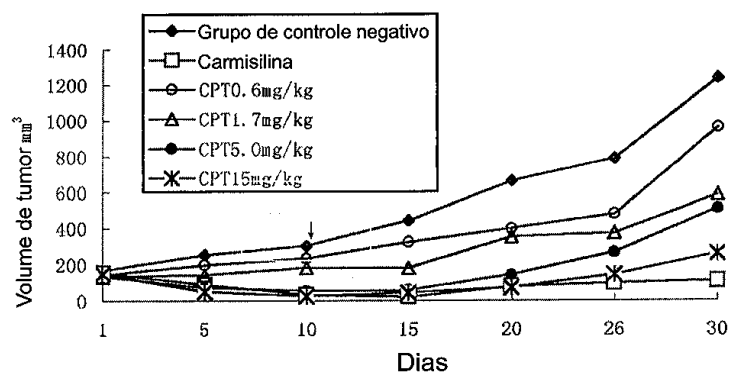


FIG. 1

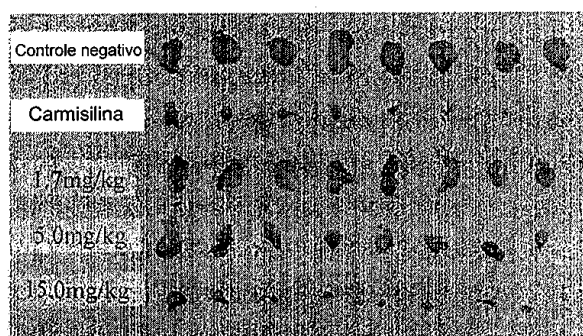


FIG. 2

2/4

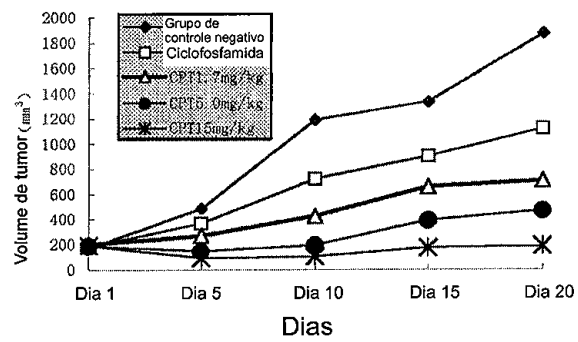


FIG. 3

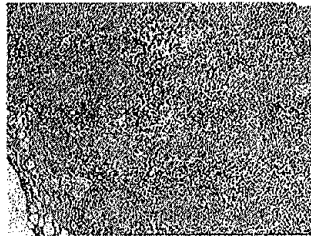


FIG. 4-1

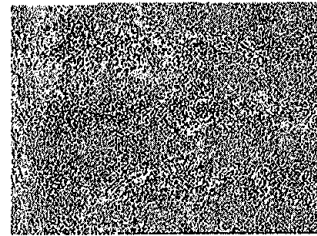


FIG. 4-2

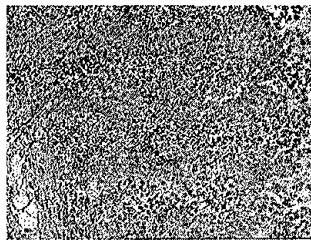


FIG. 4-3

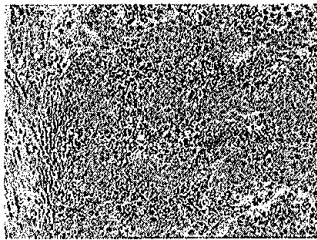


FIG. 4-4

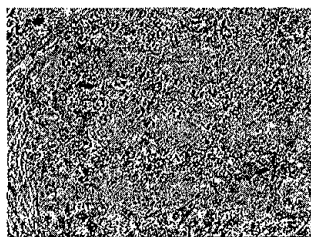


FIG. 4-5

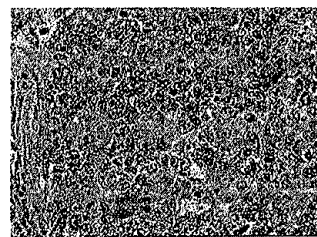


FIG. 4-6

3/4

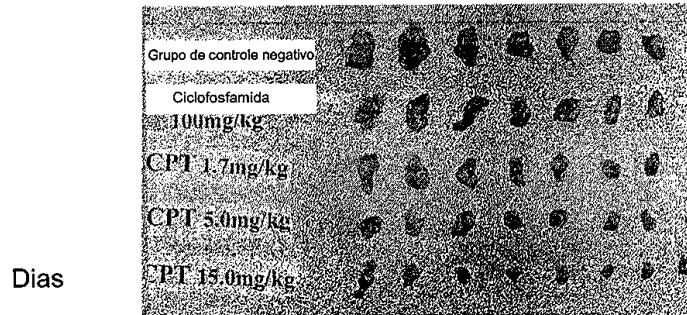


FIG. 5

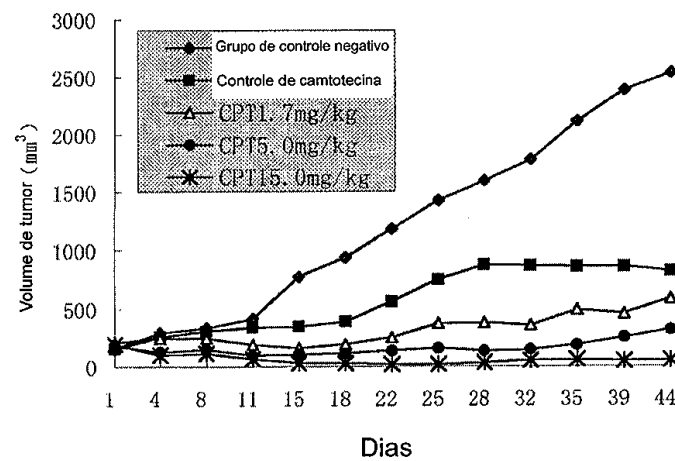


FIG. 6

4/4

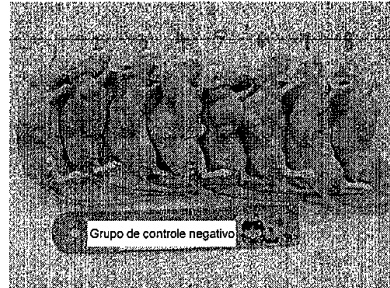


FIG. 7-1

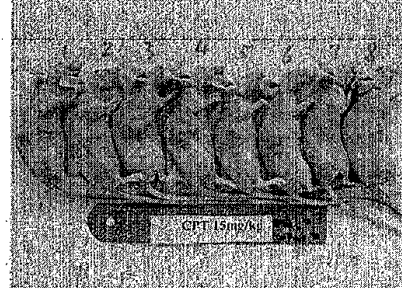


FIG. 7-2

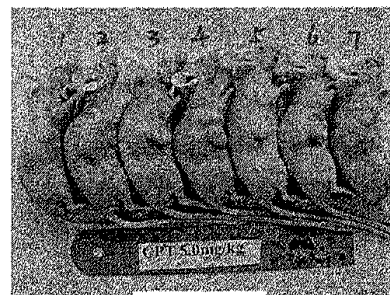


FIG. 7-3

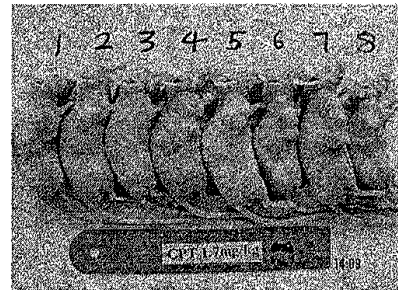


FIG. 7-4

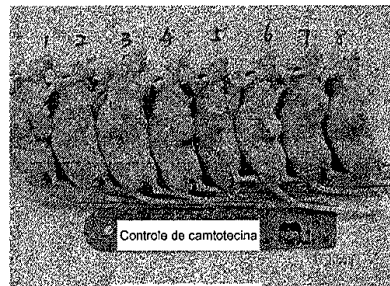


FIG. 7-5