

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C07K 14/52

C07K 1/00

A61K 38/18

[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 93106355.8

[45] 授权公告日 2001 年 7 月 11 日

[11] 授权公告号 CN 1068335C

[22] 申请日 1993.4.24 [24] 颁证日 2001.5.2

[21] 申请号 93106355.8

[30] 优先权

[32] 1992.4.24 [33] US [31] 07/874,308

[73] 专利权人 研究发展基金会

地址 美国内华达州

[72] 发明人 巴拉特·阿加沃

[56] 参考文献

EP0290948 1988.11.17 A61K37/02

WO9012585 1990.11.1 A61K37/02

审查员 刘素萍

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所

代理人 刘立平

权利要求书 2 页 说明书 27 页 附图页数 24 页

[54] 发明名称 新的抗肿瘤细胞激活素

[57] 摘要

本发明提供了一种新的称作瘤抑制素的人细胞激活素。该蛋白质瘤抑制素是由人成红细胞样细胞分泌的，具有约 28KDa 的分子量且发挥出各种各样的抗肿瘤活性。本发明还提供了一种制备人瘤抑制素的方法。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

权 利 要 求 书

1、一种分离纯化的人瘤抑制素蛋白质，所述蛋白质由人成红细胞样细胞 K-562 分泌，在 SDS-PAGE 上其分子量为 28kDa，在 pH2-10、温度 4-80℃的条件下是稳定的，并显示抗肿瘤活性。

2、一种制备人瘤抑制素的方法，包含以下步骤：

培养人成红细胞样细胞 K-562；

在 100ng/ml 佛波醇酯中 37℃培养 48 小时的上述细胞中诱导人瘤抑制素产生，所述瘤抑制素在 SDS-PAGE 上的分子量为 28kDa，在 pH2-10、温度 4-80℃的条件下是稳定的，并显示抗肿瘤活性；

采集条件细胞上清液；及

纯化瘤抑制素，即经 0.22 微米滤器过滤所述上清液，在 10,000 分子量切分膜上进行超滤以浓缩所述蛋白质，进行透析改变缓冲液为 20mM TrisHCl, pH8.0，用 DEAE Affigel 蓝色谱、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺电泳及反相高效液相色谱法分离所述蛋白质。

3、如权利要求 2 所述的方法，进一步包括浓缩上清液。

4、如权利要求 2 所述的方法，进一步包括用佛波醇酯提高瘤抑制素的生产。

5、如权利要求 2 所述的方法，其中所述的细胞在 RPMP1640 培养基中培养。

6、如权利要求 2 所述的方法，其中瘤抑制素的产生是在无血清培养基中诱导的。

7、一种纯化人瘤抑制素的方法，包括步骤如下：

超滤含有人瘤抑制素的条件细胞上清液；

渗析超滤的上清液；

00.12.07

进行 DEAE Affigel 蓝色谱;

进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳和反相高效液相色谱。

8、一种药用组合物, 包含权利要求 1 所述的人瘤抑制素和医药上可接受的载体。

说 明 书

新的抗肿瘤细胞激活素

本发明总地来说涉及细胞激活素。更具体地说，本发明涉及具有广泛抗肿瘤活性的新的细胞激活素。

细胞生长看来是由生长刺激和生长抑制分子之间的平衡来调节的。这些生长调节细胞激活素中的不平衡便认为是肿瘤生长的机制之一。

已有人就几种刺激肿瘤和正常细胞生长的细胞激活素作过描述。它们包括，例如，表皮生长因子 (EGF)，成纤维细胞生长因子 (FGF)，血小板衍生长因子 (PDGF)，胰岛素样生长因子 (IGF)，白介素 (IL)，菌落刺激因子 (CSF) 和转化生长因子 (TGF— α 和 TGF— β)。

相反，其它细胞激活素则选择性地抑制某些肿瘤细胞的生长。它们包括，例如，干扰素 (IFN)，淋巴细胞毒素 (LT)，肿瘤坏死因子 (TNF)，制瘤素 M，两性边条曲霉素，白介素—1 (IL—1)，白介素—6 (IL—6) 和 TGF— β 。

这些生长刺激和生长抑制细胞激活素，可以根据它们的来源，它们的抗肿瘤靶标特异性，它们的理化性质和它们的初生构造各自区分开来。因此，生长调节细胞激活素的鉴定和特征表述对理解细胞生长（包括肿瘤的生长）来说是非常重要的。

在本发明的一个实施方案中，提供了一种新的物质组合物。这种新的物质组合物，称作瘤抑制素 (Oncoinhibin)，是由人体

成红细胞样细胞分泌的，用 SDS—PAGE 测定具有约 28KDa 的分子量，并显示出多种抗肿瘤活性。

在本发明的一个实施方案中，提供了一种制备称为瘤抑制素的新的人细胞激活素的方法。该方法包含培养人体成红细胞样细胞，诱导瘤抑制素的产生和采集条件细胞上清液。

在本发明的另一个实施方案中提供了一种纯化人瘤抑制素的方法。该方法包括超滤含有人瘤抑制素的条件细胞上清液各步骤。随后在人瘤抑制素中进行并渗析该超滤上清液。依次进行 DEAE Affigel 蓝色谱，十二烷基硫酸钠—聚丙烯酰胺凝胶电泳和反相高效液相色谱以纯化人瘤抑制素。

在本发明的另一个实施方案中，提供了一种用于激活淋巴细胞，单核细胞和中性白细胞以杀死肿瘤细胞的新的免疫调节剂，该新的免疫调节剂包含人瘤抑制素。也提供了一种用于刺激正常细胞生长的新的生长因子，这种新的生长因子包含人瘤抑制素。

在本发明的其它实施方案中提供了瘤抑制素的药用组合物和包含施用有效剂量的瘤抑制素的治疗肿瘤细胞的方法。

鉴于上面叙述的本发明的种种特征，优点，目的以及其它方面（它将变得很清楚）已面面俱到，且可获详细了解，而要将上面作简要归纳，对本发明作更具体的描述，则可以参照其在附图中说明的一些具体方案而行之。这些图构成本说明书的一部分。然而，应当提到，附图说明本发明的优选实施方案，因此它们不能被理解为对其范围的限制。它们在本发明中等同于实施方案而具相等效力。

图 1 说明 K—563 细胞条件上清液抑制 MCF—7 细胞的生长。

- 图 2 描述用于瘤抑制素的标准生物测定。
- 图 3 显示在有或无血清存在下由 K—562 产生瘤抑制素。
- 图 4 描述佛波醇酯对诱导瘤抑制素的作用。
- 图 5 显示超滤对瘤抑制素活性的作用。
- 图 6 显示经过凝胶渗透色谱对瘤抑制素的特征描述。
- 图 7 显示瘤抑制素活性物从 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳上洗脱。
- 图 8 描述瘤抑制素的 SDS—PAGE 分析。
- 图 9 显示瘤抑制素活性物从 DEAE Affigel 蓝（上图）和从 Q 琼脂糖柱（下图）上结合洗脱。
- 图 10 说明瘤抑制素和 TNF 的剂量依赖性抗繁殖作用。
- 图 11 显示瘤抑制素对正常人包皮成纤维细胞的剂量依赖性繁殖作用。
- 图 12 显示瘤抑制素对放线菌素 D 处理的鼠 L—929 细胞的作用。
- 图 13 显示经用和未用佛波醇酯处理两种情况下对 K—562 细胞的 TNF 和 LT 所作 Northern 印迹分析。
- 图 14 显示瘤抑制素（图 A）和制瘤素 M（图 B）对人黑素瘤 A375 细胞的生长抑制作用的比较。
- 图 15 显示制瘤素 M 和 IL—6 对正常成纤维细胞的生长抑制作用。
- 图 16 显示 IL—6 对人乳房瘤（MCF—7）细胞的作用。
- 图 17 描述抗干扰素 γ 抗体对瘤抑制素活性在人乳房瘤细胞（MCF—7）上的影响。
- 图 18 显示在人包皮成纤维细胞上干扰素 γ 对 TNF（上图）的抑制作用而对瘤抑制素（下图）则不具抑制作用。

图 19 显示在有或无瘤抑制素存在下人乳房瘤 MCF-7 细胞的生长率。

图 20 显示 MCF-7 细胞对瘤抑制素暴露时间的效果。

图 21 显示瘤抑制素对人乳房瘤 MCF-7 细胞的形态学的作用与 TNF 的比较。

从美国典型培养物保藏中心(Rockville, MD), 获得各种细胞系包括小鼠连续组织细胞系 L929(CCL1), K-562(CCL-243), U-937(CRL-1543), HL-60(CCL-240), Raji(CCL-86), Jurkat(CRL-8163), BT20(HTB-19), MCF-7(HTB-22), SK-BR-3(HTB-30), ZR-75-1(CRL-1500), RPMI 7951(HTB-66), A375(CRL-1619), A-431(CRL-1555), ME-1 80(HTB83), OVCAR-3(HTB-161), He La(CCL-2), Hep-2(HB-8065), 和 NIH 3T3(CRL-1618)。按 K. Totpal, R. Lapushin, H.N. Ananthaswamy 和 B.B. Aggarwal, 在 *Lymphokine and Cytokine Res.* 10(1991)359-367 中所描述的方法分离 TNF 抗性 NIH 3T3 细胞。用从 Gen-Probe(San Diego, CA)购买的 DNA 基本检测药盒测试细胞的类菌质体污染。

所有的细胞培养物通过按周传代保持连续指数生长。一些细胞一周两次传代培养。细胞在 5%CO₂ 空气下, 在增湿恒温箱里, 在添加谷氨酰胺(2mM), 青霉素(100 单位/ml)链霉素(100ug/ml), 和胎牛血清(10%)的 RPMI 1640 培养基(可购自 Sigma-Aldrich Fine Chemical)中常规生长。

人成红细胞样细胞系 K-562 的条件上清液产生一种活性物, 它对人乳房瘤细胞系 MCF-7 具生长抑制作用。由于它能抑制瘤细胞生长而不抑制正常细胞生长, 这种活性物称作“瘤抑制素”。

将人成红细胞样细胞系 K—562, 在含有 10% 胎牛血清, 添加有谷氨酰胺 (2mM), 青霉素 (100 单位/ml), 和链霉素 (100 μ g/ml) 的 RPMI 1640 培养基中生长而生产和诱导瘤抑制素。当密度达到 0.8×10^6 细胞/ml 时离心采集细胞, 将该细胞用无血清的培养基冲洗一次并转移到含谷氨酰胺, 青霉素和链霉素的 RPMI—1640 培养基中的无血清条件下。为产生瘤抑制素, 将这些细胞 1×10^6 /ml 在 T175 烧瓶 (Falcon) 里, 在静止培养条件下, 于无血清 RPMI 1640 培养基中培养 48 小时, 然后在 37℃ 下用佛波醇酯 (100ng/ml) 处理 48 小时。此后, 通过离心采集条件细胞上清液。通过 0.22 微米过滤器 (Falcon) 过滤, 并在 4℃ 下保存直至进一步的鉴定。为了浓缩瘤抑制素, 将来自 K—562 细胞系的条件培养基用 PM—10 膜 (Amicon Corp.) 超滤, 然后用 20mM Tris, PH8.0 渗析。

参照图 1, 瘤抑制素对瘤细胞生长的抑制活性分别采用三种方法测定。这些方法包括 (1) 台盼蓝染色之后在血细胞计数器上计数细胞; (2) 结晶紫染料摄取 (dye—uptake) 法; 和 (3) 通过氟化的胸苷掺入法。从所有三种方法中看出, 瘤抑制素以剂量依赖性方式清楚地抑制 MCF—7 细胞的生长。由于方便和灵敏, MCF—7 细胞系被用作靶体以建立用于瘤抑制素的生物测定。已发现, 瘤抑制素的氟化胸苷掺入的抑制是一种测定该细胞激活素的极灵敏的方法。

用于瘤抑制素的生物测定包括, 在 37℃ 下 CO₂ 恒温箱里, 将 5×10^3 个细胞铺敷在盛有 0.1ml 带 10% FCS 的 RPMI 1640 培养基的 96 孔平底微孔板中过夜。然后去除培养基, 将测试样品的两倍连续稀释液加至最终总体积 0.1ml, 并在 37℃ 下连续培养 24 小时。在最后的 6 小时里, 加入氟化胸苷 (0.5 μ Cl/0.

0.5ml/孔)。24 小时培养期结束时，倒出培养基，用 0.1ml 胰蛋白酶 (0.5%) 移除细胞并用 EDTA (5.3mM) 于 37℃ 处理 30 分钟。采用 PHD Cambridge 细胞收集器采集细胞并通过 β 计数器测定细胞结合放射性。数据由相对存活率 % 表达，相对存活率被定义为瘤抑制素存在下，细胞吸收的 dpm 量除以只有培养基存在时结合的 dpm 量，再乘以 100。抑制 50% 的存活率所需的瘤抑制素的量被称作一个细胞激活素单位。如图 1 中所见，由所有三种方法表明，瘤抑制素对瘤细胞生长施加剂量依赖性抑制作用。

参照图 2，在 24 小时内可观察到 MCF-7 对瘤抑制素的清楚的剂量依赖性反应。在胸苷掺入法中要达到 50% 抑制所需的样品稀释液的倒数被定义为一个瘤抑制素单位。

参照图 3，在无血清条件下试验瘤抑制素的产生。采用无血清条件是由于纯化来源于含血清样品的蛋白质有困难。这些结果清楚地表明，甚至无血清的条件下瘤抑制素也能由 K-562 分泌。

我们试验了是否不同的药剂能诱导瘤抑制素的产生。试验了钙离子载体，伴刀豆球蛋白 A，植物凝集素，和佛波醇酯。图 4 显示了佛波醇酯能增加瘤抑制素的产生。因此，佛波醇酯能用来使由 K-562 细胞最佳化地生产瘤抑制素。当细胞暴露于佛波醇酯 (100ng/ml) 时观察到瘤抑制素的生产大约增加四倍。当细胞用佛波醇酯培养 48 小时 (表 I) 并达到每毫升培养基 1×10^6 个细胞的细胞密度 (表 II) 时，观察到瘤抑制素的最佳诱导。

表 I
用佛波醇酯从人 K—562 细胞诱导瘤抑制素的时程

<u>时间(小时)</u>	<u>非诱导</u>	<u>诱导</u>
<u>相对细胞存活率(%)</u>		
0	94	—
6	100	60
24	84	33
48	67	16
72	41	40

在 37℃ 下 CO₂ 恒温箱中将 K—562 细胞 (1×10^6 /ml) 在有或无佛波醇酯 (100ng/ml), 在无血清的培养基 (RPMI—1640) 中培养不同的时间, 然后通过离心收取条件培养基。如“材料和方法”中所示, 以 1 : 2 倍连续稀释将样品对 MCF—7 细胞进行测试。

表 II
在不同的细胞密度*, 有或无佛波醇酯
的条件下瘤抑制素产生的最佳化

<u>细胞数 (1×10^5/ml)</u>	<u>非诱导</u>	<u>诱导</u>
相对细胞存活率(%)		
0.01	76	83
0.1	89	56
0.5	65	41
1.0	37	26
1.5	50	28

* 在 37℃ 下 CO₂ 恒温箱中, 将 K—562 细胞从所示的细胞密度在无血清的培养基(RPMI—1640)中培养 72 小时。条件培养基用离心采集并如“材料和方法”中所示, 以 2 倍连续稀释液于 MCF—7 细胞上进行试验。

参照图 5, 为纯化和鉴定瘤抑制素, 采用 10,000 分子量切分(PM—10)膜超滤浓缩该细胞条件培养基。不被过滤膜保留的部份(流过的或 FT)活性物较少, 而被保留部份或浓缩物(C)的活性物成比例地高于标准缓冲液(起始物, SM)。结果表明瘤抑

制素活性物被保留并浓缩。这些结果还表明瘤抑制素的分子量高于 10,000。

在图 6, a 和 b 的凝胶渗透快速蛋白液相色谱试验中, 瘤抑制素样品于用含有 0.1% 牛血清白蛋白和 0.01% 叠氮化钠的磷酸缓冲盐水预平衡的 Superose—6 柱 (Pharmacia) 上上样。该柱在室温下以每分钟 0.5ml 的流速过柱并且每馏份的大小为 0.5ml。该柱用分子量标准物 (Schwarx/Mann, Cambridge, MA) 校准过。后者包括脱铁铁蛋白 (480KDa), α -淀粉酶 (20KDa), γ -球蛋白 (160KDa), 牛血清白蛋白 (67KDa), 卵白蛋白 (45KDa), 糜蛋白酶原 (24KDa) 和细胞色素 C (12.4KDa)。

参照图 6, 看来瘤抑制素具有大约 25KDa 的分子量。瘤抑制素的分子量在非变性条件下, 在 Superose—6 柱上, 采用凝胶渗透快速蛋白质液相色谱测定。以磷酸缓冲盐水 (PH7.4) 过柱的凝胶滤液结果显示活性物的两个主峰, 一个相当于排出体积, 而第二个峰相应于 25KDa 左右的近似分子量 (图 6, B)。

在图 7 和 8 的十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS—PAGE) 实验中, 15% 聚丙烯酰胺凝胶基本上根据 U. K. Laemmli (Nature 227 (1970) 680—685, 引入本文作为参考) 的方法操作, 并且蛋白质用银染色显影。对于活性物的制备凝胶电泳和洗脱, 在固定和染色前, 将该凝胶的一部分用一片剃刀刀片切成 40 片以上的不同的小片, 在一个试管中用 50mM 碳酸氢铵通过扩散过夜洗脱, 各馏份用 20mM Tris, PH8.0 渗析, 然后作生物活性测定。

参照图 7, 为进一步确定瘤抑制素的分子量, 进行 SDS—PAGE 分析。电泳之后, 将凝胶切成小片, 在 50mM 碳酸氢钠中过夜洗脱并测定瘤抑制素的活性物。在 30KDa 左右的分子量区

域回收到大小 50% 的上样瘤抑制素活性物, 还发现靠近染色前面的区域活性物少于 10%。

参照图 8, 将生物活性馏份于 SDS—PAGE 再过一遍, 并进行凝胶银染色, 显示 28KDa 左右分子量处为单一的大谱带。

参照图 9 的 a 和 b, 试验瘤抑制素自阴离子交换树脂上结合并洗脱。将一根柱 (1cm×5cm) 用阴离子交换树脂 Q—琼脂糖装填, 然后用 20mM Tris, PH8.0 (平衡缓冲液) 平衡。以 0.5ml/分钟 的流速将用平衡缓冲液渗析过的瘤抑制素样品装载到柱上, 将该柱用平衡缓冲液淋洗, 然后用递增的 NaCl (0—1M) 梯度液解析。将各种馏份作蛋白质浓度和生物活性分析。

DEAE Affigel 蓝色谱: 将第二根柱 (1cm×5cm) 用 DEAE Affigel 蓝树脂装填, 然后用 20mM, PH8.0 (平衡缓冲液) 平衡。以 0.5ml/分钟 的流速, 将通过渗析用平衡缓冲液预平衡的瘤抑制素样品装载到该柱上。该柱子用平衡缓冲液淋洗并用递增的 NaCl (0—1M) 梯度液解析。将各种馏份作蛋白质浓度和生物活性分析。

图 9 的 a 和 b 显示, 瘤抑制素可结合到阴离子交换树脂上并可从其上洗脱。对于 Q 琼脂糖和 DEAE Affigel 蓝两种树脂, 瘤抑制素活性物在 20mM Tris, PH8.0 中结合。而结合的瘤抑制素可以用 0.2M NaCl 的 20mM Tris 缓冲液从 DEAE Affigel 蓝上洗脱, 而用 0.5M NaCl 从 Q 琼脂糖上洗脱。

瘤抑制素抑制广泛种类肿瘤细胞的生长 (表 III), 瘤抑制素的抗繁殖活性采用氟化胸苷掺入法测定。

表 III
TNF 和瘤抑制素之间肿瘤细胞特异性差异

细胞系	相对细胞存活率(%)	
	TNF	瘤抑制素
成红细胞样细胞系(K—562)	94	2
组织细胞淋巴瘤(U—937)	54	1
组织细胞淋巴瘤(U—937—CF—1)	13	0
前髓细胞淋巴瘤(HL—60)	100	1
Burkitt 淋巴瘤(Raji)	76	0
T 细胞淋巴瘤(Jurket)	74	36
骨髓性白血病(KG—1)	43	8
骨髓性白血病(KG—1a)	60	13
骨髓性白血病(ML—1a)	59	0.1
骨髓性白血病(ML—1b)	35	0.1
单核细胞瘤(THP—1)	81	1
乳房癌(BT20)	24	2
乳房癌(BT20TNFR)	60	3
乳房癌(MCF7)	1	0
乳房癌(SK—BR3)	52	0

乳房癌(ZR—75—1)	6	1
黑素瘤(RPMI 7951)	73	0
黑素瘤(A375)	76	0
表皮样癌(A—431)	82	0
子宫颈癌(ME—180)	20	0
卵巢癌(OVCAR—3)	27	1
子宫颈癌(HeLa)	55	14
肝癌(HepG—2)	83	20
成视网膜细胞瘤(Weri—Rb—1)	60	33
成视网膜细胞瘤(Y—79)	92	46
成胶质细胞瘤(LG)	84	2.3
鼠成纤维细胞瘤(NIH 3T3)	11	35
鼠成纤维细胞瘤(LTR1000)	85	27
鼠成纤维细胞瘤(L929)	0	1
正常人包皮成纤维细胞	311	189

肿瘤细胞(5000/孔)在 37℃ 下与 TNF(0.2ng/ml)或瘤抑制素(用佛波醇酯诱导并浓缩)一起培养 72 小时,然后如前面所描述的用胸苷掺入法测定相对细胞存活率(%)。

参照图 10 中 A—D, 试验瘤抑制素对一些列在表 VII 中的细胞系的剂量反应的影响, 并与 TNF 作了比较。从表 VII 和图 10 的结果清楚地表明, 除 MCF—7 外, 瘤抑制素也可以抑制几种不同类型的白血病, 黑素瘤, 癌和肝癌的生长。鼠细胞的生长也受到抑制。因此, 它表明, 不象干扰素, 瘤抑制素没有种特异性。

参照图 11 和 12, 将细胞在 96 孔 Falcon 板的 0.1ml 培养基 (带 10% FBS 的 RPMI—1640) 中铺板培养过夜, 进行生长测定。之后, 去除培养基并将人瘤抑制素的连续稀释液按 0.1ml 的体积铺层。在 37℃ 培养 72 小时后, 去除培养基, 并根据 B. B. Aggarwal, 在 Human lymphotoxin, Meth, of Enzymol., 116 : 441—448 (1985) (列入本文作为参考) 中所描述的方法用结晶紫染色监测存活的细胞。测定细胞存活率的染料摄取法与用胰蛋白酶溶液移除并用血细胞计数器显微计数所测定的细胞数相关。相对存活率的百分率计算为: 测试样品存在时的光密度除以无测试样品存在时 (培养基) 的光密度乘以 100。对 LT 和 TNF 所进行的细胞毒性测定相似于生长抑制测定, 除了 20×10^3 L—929 细胞用放线菌素 D ($1\mu\text{g}/\text{ml}$) 和该细胞激活素一起处理 24 小时这一点有别。

细胞生长刺激测定。细胞生长刺激测定基本上根据 Vilcek 等, 在 J. Exp. Med. 163 : 632—643 (1986) (引入本文作为参考) 中所描述的方法进行。简单地说, 处于传代水平 12—16 (相应于大约群体倍增水平 24—32) 的融合人二倍体包皮成纤维细胞被用作细胞生长刺激测定。为测定人瘤抑制素的作用, 将细胞 (8×10^3 /孔) 在 96 孔 Falcon 板的 0.1ml 培养基 (RPMI—1640 + 10% FBS) 中铺板。在 37℃ CO_2 恒温箱培养过夜之后, 将培养基去除并将该细胞激活素的连续稀释液按 0.2ml 的体积铺层。培养 5

天之后,将培养基滗掉并用结晶紫将细胞染色。所有的测定重复三次。按生长抑制测定所示方法,计算相对细胞存活率百分率。

对于 $[^3\text{H}]\text{TdR}$ 掺入测定,将人成纤维细胞培养,并用该细胞激活素处理5天。在最后的24小时期间,将每孔中加入(0.5 μCi /孔)氟化胸苷(6.7 Ci/mmole , New England Nuclear, Boston, MA)。之后,去除培养基,用磷酸缓冲盐水冲洗各孔两次,并且通过添加带有EDTA(5.3 mM)的胰蛋白酶(0.5%)溶液将细胞移除。用PHD细胞收集器(Cambridge Technolog Inc. Watertown, MA)采集细胞悬浮液,并用蒸馏水洗涤而溶胞。结合到过滤器上的放射性用液体闪烁计数器(Model 1600TR; Packard Co., Meriden, CT)测量。用这种方法测定的人成纤维细胞里的胸苷掺入与细胞生长有关。在肿瘤细胞生长抑制研究中,以0.1 ml 最终总体积将细胞与细胞激活素一起培养3天,然后作胸苷掺入监测。

参照图11,瘤抑制素看来刺激正常人包皮成纤维细胞生长。瘤抑制素在抑制肿瘤细胞生长的同时,提高了正常人包表皮成纤维细胞的繁殖。

参照图12,与TNF和LT相似,瘤抑制素溶胞放线菌素D处理的L-929细胞。瘤抑制素抗L-929细胞的抗肿瘤活性既不能由抗LT抗体,又不能由抗TNF抗体所中合(表IV)。这就是说,在瘤抑制素制剂中用ELISA测定测不到显著量的TNF或LT(表V)。表III显示了几种对TNF/LT有抗性的肿瘤细胞类型(例如,SK-BR-3, HeLa, A-431, OVCAR-3, A375, 和 RPMI-7951)对瘤抑制素极为敏感。瘤抑制素也可以根据发现分离出的对TNF/LT(NIH 3T3-LTR 和 BT-20 TNFR)有抗性的细胞系对瘤抑制素很敏感来与TNF/LT区分开来(表III)。

表 IV
瘤抑制素活性不为抗肿瘤坏死因子
和淋巴细胞毒素的单克隆抗体所中和*

样品	抗体	相对细胞存活率%	
中和%			
瘤抑制素	无	58	0
	+抗 TNF	58	0
	+抗 LT	60	0
	+抗 TNF+抗 LT	56	4
TNF	无	39	0
	+抗 TNF	100	100
	+抗 LT	44	5
LT	无	35	0
	+抗 LT	90	90
	+抗 TNF	38	0

* 瘤抑制素, TNF 和 LT 与抗 TNF 或抗 LT 抗体一起在 37℃ 下培养 1 小时, 然后如前面(4)所描述的在放线菌素 D 处理的 L—929 细胞上直接作保留非中合的 TNF 或 LT 活性测定。

表 V

由 K—562 细胞衍生的瘤抑制素的
粗制备物中的各种细胞激活素的测定

细胞激活素	含量(pg/ml)
TNF— α	3 $\pm$ 6
TNF— β	2+0
IL—1 β	0
IL—6	155 $\pm$ 7
IL—8	>2000

无血清 K—562 细胞—条件培养基用作瘤抑制素源,并且各种细胞激活素的含量用标准的 ELISA 检测法(R&D 系统)测定。ND 不作测定。

TNT 和 LT 分别是单核细胞和淋巴细胞的产物,并广泛抑制各种细胞生长。与瘤抑制素相似,淋巴细胞毒素和 TNF 抑制 MCF—7 细胞的生长,但是需要高浓度的 TNT 和 LT(10,000 单位/ml)。

为进一步证实瘤抑制素既不是 TNF 也不是 LT,采用 Northern 印迹分析查找该两种细胞激活素的基因。在 Northern 印迹分析中,将经佛波醇酯处理和未处理的 K—562 细胞培养物,以 1×10^6 个细胞/ml 接种在 75cm 烧瓶里,与蛋白质激酶 C 活化剂一起培养 24 小时,然后用离心采集。总的 RNA 采用异硫氰酸苯酚胍盐—氯仿法从细胞中提取,该方法如 Chirgwin 等在 Biochem. 18 : 5294—5299 (1979) 和 Maniatis 等在 Molecular Cloning 188—209 (1982) 中所示(列入本文作为参考)。通常,获

得在 260nm 1280nm 处具有大于 1.9 吸收率的 RNA,且每 20×10^6 细胞大约 100 μ g 的产量。

对于电泳,系将 20 μ g RNA 以 75—100V,在含有 2.2M 甲醛的 0.8%琼脂糖凝胶上分级约 3 小时。之后,凝胶在 68℃下暴露于焦碳酸二乙酯处理的水 1 小时,然后将 RNA 转移到 Hybond 尼龙膜(Amersham Corp.,Arlington Heights,IL.)。转移(3 小时)后,该滤膜用 SSC(SSC:0.15M 氯化钠,15mM 乙酸钠,15mM 柠檬酸钠,PH7.0)漂洗两次,并置入微密封袋中。

65℃下,在含有 7%SDS,500mM 磷酸钠,1mM EDTA,PH7.2 的缓冲液(杂交缓冲液)中进行 1 小时预杂交。然后将该滤膜与 TNF 或 LI cDNA 探针(特异活性 2×10^8 cpm/ μ g DNA)杂交。杂交之后,将膜在 65℃下,在含有鲑鱼精子 DNA(200 μ g/ml)的杂交缓冲液中洗涤几次。将滤膜在 -70℃下于柯达 XAR—5 胶片曝光 1—3 天。按预杂交,杂交,洗涤和滤膜剥离的顺序循环操作。泳道的等装载通过溴乙啶染色后的凝胶测定,也可以通过相同滤膜与肌动蛋白或甘油醛 3—磷酸脱氢酶(GAPDH)cDNA 再杂交证明。通过采用印迹分析仪 Betascope 603(Betagen Corp.,Waltham,MA)扫描滤膜作放射性计数或通过采用扫描密度测定仪(Helena Laboratories Inc. Beaumont,TX.)作光密度扫描自动放射图谱进行谱带密度测定法。如图 13 中所示,K—562 细胞中未观察到 mRNA 表达 LT 或 TNF。再则,凝胶过滤和 SDS—PAGE 试验也确信瘤抑制素的分子量不同于 TNF 或 LT。

参照图 19,人乳房瘤细胞在培养基中培养迅速生长。然而,当瘤抑制素加入到培养物中时,未观察到这些细胞生长。为了测定抑制这些细胞生长所需的暴露时间,将细胞暴露于瘤抑制素不同的时间。参照图 20,当该细胞激活素从培养基中去除时,瘤

抑制素的生长抑制作用终止。这些结果提示需要瘤抑制素的继续存在。

参照图 21,用瘤抑制素处理后试验 MCF—7 细胞的形态学并与 TNF 比较。这些结果表明,TNF 和瘤抑制素抑制乳房瘤细胞生长的方法不同。TNF 诱导细胞收拢,而使细胞从盘上脱下,瘤抑制素则诱导细胞增大或膨胀。后者可能是由于瘤抑制素对细胞渗透性的作用所致。瘤抑制素也抑制人乳房瘤细胞的集落形成。

瘤抑制素稳定性研究。将瘤抑制素在室温下用有机溶剂(乙醇或甲醇或丙醇),酸性溶剂(HCl,三氯乙酸或乙酸),碱性溶剂(NaOH,氢氧化铵)或洗涤剂(SDS,Tween 10)处理 2 小时,然后在冷室中用 20mM Tris—HCl,PH8.0 渗析过夜并作生物活性测定(表 VI 和 VII)。

对于热稳定试验,系将瘤抑制素暴露于不同的温度保持不同的时间并直接测定生物活性。发现,瘤抑制素的生物活性于 80℃,60 分钟条件下是稳定的,但当暴露于 100℃ 30 分钟时则损失约 50%的活性(表 VI)。

表 VI
瘤抑制素在不同温度的热稳定性

温度(℃)	时间(分)	活性保留	
		<u>U/Ml</u>	<u>%</u>
4	60	256	100
80	30	210	82

	60	230	90
90	30	200	78
	60	190	74
100	30	128	50
	60	110	43

在表Ⅶ中,瘤抑制素用链霉蛋白酶 E,胰蛋白酶,糜蛋白酶和 V8 Staph 蛋白酶处理,然后分析其生物活性。结果表明瘤抑制素活性可以完全被链霉蛋白酶 E 消除,由此可见它是一种蛋白质。也发现它的活性对胰蛋白酶处理部分敏感,并且完全抗糜蛋白酶和 V8 蛋白酶。脱氧核糖核酸酶也对瘤抑制素的活性无影响。

表 Ⅶ
蛋白酶对瘤抑制素活性的影响

酶	浓度	活性保留(%)
无	10%(w/w)	100
链霉蛋白酶 E	10%(w/w)	0.2
胰蛋白酶	10%(w/w)	50
V8 Staph. 蛋白酶	10%(w/w)	100
糜蛋白酶	10%(w/w)	100
脱氧核糖核酸酶	10%(w/w)	100

瘤抑制素在 37℃ 在 20mM Tris, PH8.0 缓冲液与各种酶一起培养 24 小时, 然后添加 10% 血清停止反应并作瘤抑制素活性测定。

瘤抑制素对洗涤剂的稳定性: 瘤抑制素样品用不同浓度的 SDS(一种带阴电的洗涤剂)或者吐温 20(一种中性洗涤剂)处理 2 小时, 渗析, 然后作生物活性测定。牛血清白蛋白用相同的洗涤剂处理用作对照。这些试验的结果示于表 V 中。用 SDS 或吐温 20 处理的蛋白质均未观察到生物活性损失。在 SDS 处理中, 表现出瘤抑制素的生物活性以剂量依赖性方式显著增加。用吐温 20 处理则无显著增加。

表 VIII
洗涤剂, PH 和有机溶剂处理对瘤抑制素稳定性的影响

<u>试剂</u>	<u>浓度</u>	<u>活性保留</u>	
		U/ml	%
洗涤剂稳定性:			
十二烷基硫酸钠	无	19	100
	0.01%	23	124
	0.05%	45	243
	0.10%	61	330
	0.50%	59	319
吐温 20	0.01%	24	130
	0.05%	24	130
	0.10%	16	88

PH 稳定性:

甘氨酸	PH2.0	0.1M	240	300
乙酸	PH2.4	1.0M	256	320
乙酸钠	PH4.0	0.1M	83	104
乙酸钠	PH6.0	0.1M	76	95
Tris-HCl	PH8.0	0.02M	80	100
NaHCO ₃	PH10.0	0.1M	92	115
NH ₄ OH	PH11.4	1.0M	185	321

有机溶剂稳定性:

		S/P	
无	—	42	100
甲醇	50%	81/2	198
丙醇	50%	56/3	140
丙酮	70%	23/26	117
乙醇	70%	56/4	143
乙腈	50%	153/4	374

瘤抑制素样品在室温下, 20mM Tris PH8.0 缓冲液中用各种试剂处理 1 小时, 渗析过夜, 然后作生物活性保留测定。S 和 P 分别表示上清液和沉淀部份。

瘤抑制剂对还原剂的稳定性: 瘤抑制素用不同浓度的二硫苏糖醇处理 2 小时, 然后渗析并作生物活性测定。这些试验的结果示于表 IX。很清楚, 瘤抑制素的活性对 DTT 处理是不稳定的。观察到, 用 1mM DTT 处理损失 50% 的活性, 用 100mM DTT 处理损失 67%。

表 IX
瘤抑制素对各种处理的稳定性

<u>试剂</u>	<u>浓度</u>	<u>活性</u>	<u>百分率</u>
还原剂(DTT)	—	256	100
	1mM	128	50
	10mM	96	38
	100mM	84	33
三氯乙酸	5%上清液	11	4
	沉淀部分	256	96
硫酸铵	70%上清液	11	2
	沉淀部分	538	98

瘤抑制素样品用各种试剂处理，渗析，然后作生物活性测定。

瘤抑制素可以用三氯乙酸和硫酸铵浓缩。将瘤抑制素用不同浓度的 TCA 或 NH_4SO_4 处理，离心，再悬浮，渗析，然后作生物活性测定。示于表 IX 中的结果表明，所有的瘤抑制素活性物可以用 5% TCA 或 70% (SAS) 硫酸铵沉淀。因此，这些结果也表明瘤抑制素的蛋白性质。

两性边条曲霉素是一种糖蛋白，它是从佛波醇酯处理的 MCF—7 细胞中分离的且抑制 A431 细胞的生长。两性边条曲霉素具有 22.5KDa 的表观分子量。瘤抑制素和两性边条曲霉素都抑制肿瘤细胞的生长。然而，瘤抑制素不由佛波醇酯处理的 MCF—7 细胞产生。其次，虽然瘤抑制素和两性边条曲霉素都显示对 A431 细胞的抗繁殖活性（表 III），但与瘤抑制素相反两性

边条曲霉素，无抗下列肿瘤细胞的活性：人黑素瘤（A375），人乳腺癌（ZR—75—1 或 MCF—7），人肺腺癌（A—549），人结肠癌（H3347），人成淋巴细胞样 T 细胞（CEM），人 EBV 转换 B 细胞，人喉表皮癌（Hep 2），牛胎心内皮细胞（CRL—1395），鼠 BALB/3T3，和水貂肺（CCL—64）细胞。与瘤抑制素相似，两性边条曲霉素刺激人成纤维细胞的繁殖。除人成纤维细胞外，两性边条曲霉素也刺激某些肿瘤细胞，包括人垂体肿瘤细胞（CRL7386）人卵巢癌细胞（HTB 77），非洲猿猴肾细胞（BSC—1）和大鼠肾细胞（NRK）的生长。然而，瘤抑制素的分子量也显著不同于两性边条曲霉素的分子量，而后的成熟形成一个 84 氨基酸长度的蛋白质。

瘤抑制素对 PH2. 0—10. 0 范围的酸性和碱性条件均稳定（表Ⅷ），已经报道几种对 PH2 稳定的细胞激活素，包括 IFN— α ，IFN— β ，IL—2，IL—4，IL—8，CSF—1，GM—CSF，TGF— β ，制瘤素 M 和两性边条曲霉素。制瘤素 M，两性边条曲霉素，CSF1 和 IL—4 也发现对碱性条件（PH12）稳定。最近，脂解促进因子（LPF），一种具有约 6KDa 分子量的蛋白质，已经从 A375 黑素瘤细胞系分离出，它对热（96℃保持 10 分钟），蛋白酶 K（10 μ g/ml），胰蛋白酶，链霉蛋白酶，核糖核酸酶，脱氧核糖核酸酶和高碘酸氧化作用均稳定。LPT 可以通过三氯乙酸（10%）沉淀且不损失任何生物活性。已发现瘤抑制素对加热至 80℃保持 30 分钟是稳定的，而在 100℃只损失部分活性（表Ⅵ）。胰蛋白酶 10%（w/w）在 37℃处理瘤抑制素 24 小时导致损失部分生物活性，这与用 CSF—1，GM—CSF 和 LT 观察到的相似。还发现，瘤抑制素的生物活性对 0. 5%SDS 也是稳定的。

瘤抑制素与肿瘤杀死因子（TKF）（一种从人巨噬细胞—单

核细胞杂交瘤中鉴定出来的细胞激活素)的区别在于 TKF 是一种碱性蛋白质 (PI8—9.0), 具有 56KDa 的表观分子量通过凝胶过滤, 并且可以用 0.4M α -甲基甘露糖苷从 Concanavaline A—琼脂糖上洗脱。

制瘤素 M 是一种从用佛波醇酯处理的 U—937 细胞中分离的细胞激活素, 并且在胸苷掺入测定中抑制人黑素瘤细胞系 A375 的生长。未加以刺激的 U—937 细胞不表达该基因或分泌这种活性。植物凝集素活化的人外周血 T 淋巴细胞也表达这种基因和分泌这种细胞激活素。制瘤素 M 是一种具有 28KDa (按 SDS—PAGE 法) 和 18KDa (按凝胶过滤法) 分子量的糖蛋白。它与 TGF— β 有协同作用但与干扰素却没有。已经显示, 制瘤素 M 抑制 HTB10 成神经细胞瘤细胞, A—549 肺癌细胞, 以及 A375 和 SKMEL—28 黑素瘤细胞的繁殖; 然而, 它不抑制 L—929 细胞的繁殖。相反, 瘤抑制素是由 K562 细胞 (而非由 U—937 细胞) 在有佛波醇酯以及无佛波醇酯存在的两种情况下产生并且影响 L—929 细胞。此外, 与瘤抑制素相反, 制瘤素 M 是相对弱的 A375 细胞抑制剂 (图 14)。

转化生长因子— β (TGF— β), 是用 SDS—PAGE 测量具有分子量 25KDa 的均二聚体 (homodimer) 细胞激活素, 并且能抑制上皮和间质起源的几种细胞类型包括人血管上皮细胞, T 和 B 淋巴细胞生长。A—549, MCF—7 细胞也被 TGF— β 以自分泌 (autocrine) 方式抑制。然而不象瘤抑制素, TGF— β 由广泛的各种细胞包括血小板, 骨组织和淋巴细胞产生, 并且在它的活性可以检验之前需要酸活化。此外, TGF— β 在还原条件下用 SDS—PAGE 测量具有 12.5KDa 分子量。

细胞激活素 ELISA 测定: 采用一种从市场上可买到的

(R&D Systems) 定量“夹层”酶免疫测定技术检验瘤抑制素制剂中已知细胞激活素 (TNF, LT, IL—1, IL—6 和 IL—8) 的存在。采用由厂商提供的标准方法。简单地说, 将一种对不同细胞激活素特异性的单克隆抗体涂复在微量滴定板上并放置过夜以固定该抗体。然后用移液管将样品移入孔中, 如有细胞激活素, 它会被固定的抗体捕获。在冲洗去任何不结合的样品蛋白质后, 将对给定的细胞激活素特异性的酶连多克隆抗体加入孔中, 并使其与第一次培养期间已结合的细胞激活素结合。洗涤去除任何未结合的多克隆抗体—酶试剂之后, 接着将底物溶液加入孔中, 并且颜色显现正比于最初步骤中结合的细胞激活素的量, 在样品测试时, 采用细胞激活素标准的已知浓度配备一系列孔。将样品的光密度与该标准曲线相比较, 制出光密度对这些标准孔中的细胞激活素的浓度的曲线图。这样计算出来未知样品中细胞激活素的浓度 (表 V)。

白介素—1 是一种由激活的单核细胞和成纤维细胞产生的细胞激活素, 具有 17KDa 分子量并抑制肿瘤细胞系包括卵巢癌, A375 黑素瘤, K—562 和一些乳房瘤细胞系的生长。然而, 就其来源, 分子量和肿瘤特异性方面来说瘤抑制素不同于白介素—1。瘤抑制素的粗制备物用 ELISA 作 IL—1 的存在试验, 示于表 V 中的结果表明在我们的瘤抑制素制备物中无 IL—1 蛋白存在。

白介素—6 是一种广泛的不同细胞类型对极其多样的刺激反应产生的细胞激活素, 且以 SDS—PAGE 测定具有 26KDa 的分子量。特别是, IL—6 也由正常人成纤维细胞, U—937, 人黑素瘤细胞系 A375, RPMI—7951 等产生。IL—6 抑制髓细胞样白血病和乳房癌细胞系生长。根据来源, 诱导方法和肿瘤细胞靶

特异性，IL—6 看来是一种不同于瘤抑制素的细胞激活素。此外，通常用作瘤抑制素靶的 MCF—7 细胞对白介素 6 的作用不敏感（图 16）。也与瘤抑制素相反，发现 IL—6 抑制正常人成纤维细胞的生长（图 15）。

干扰素— γ 是一种在 SDS—PAGE 上测定具 20—25KDa 分子量的细胞激活素，当用各种促细胞分裂剂激活时由 T 淋巴细胞产生，并抑制某些肿瘤细胞系的生长。这种细胞激活素对酸性 PH 条件高度敏感。瘤抑制素在其来源，诱导方法和 PH 稳定方面不同于干扰素— γ 。干扰素— γ 在其作用于正常人成纤维细胞的方法上也不同于瘤抑制素。瘤抑制素刺激繁殖而干扰素— γ 抑制 TNF 诱导的成纤维细胞生长（但不被瘤抑制素产生）（图 18）。此外，干扰素— γ 的抗体不仅不减小瘤抑制素的活性反而提高它（图 17）。

因此，本发明提供了一种表现各种各样抗肿瘤活性的新的细胞激活素。该细胞激活素，即瘤抑制素，是由人成红细胞样细胞分泌的，并且在 SDS—PAGE 上测量具约 28KDa 的分子量。瘤抑制素的产生在有佛波醇酯存在时表现出有所提高。瘤抑制素表现出对广泛范围的物质具稳定性，并且在很宽的 PH 范围和高温均稳定。

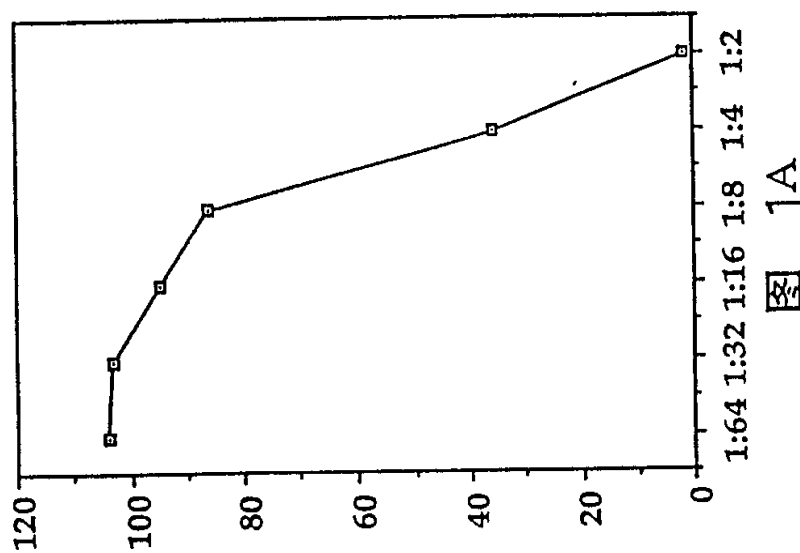
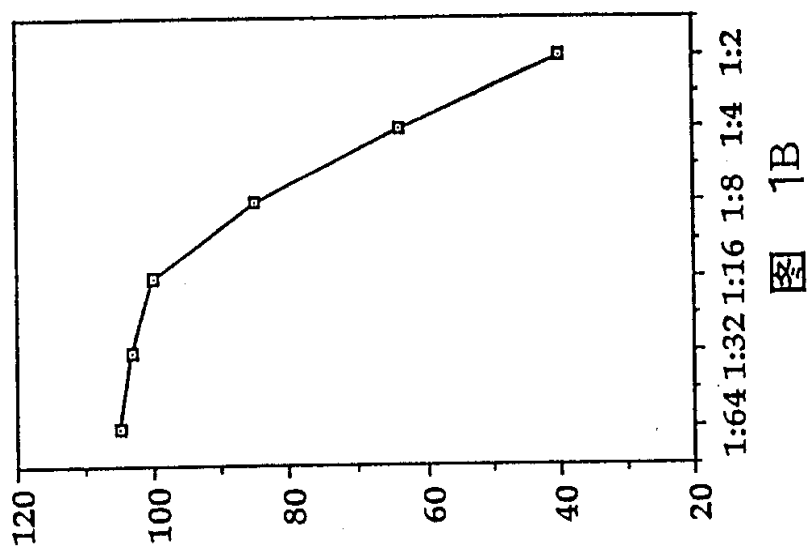
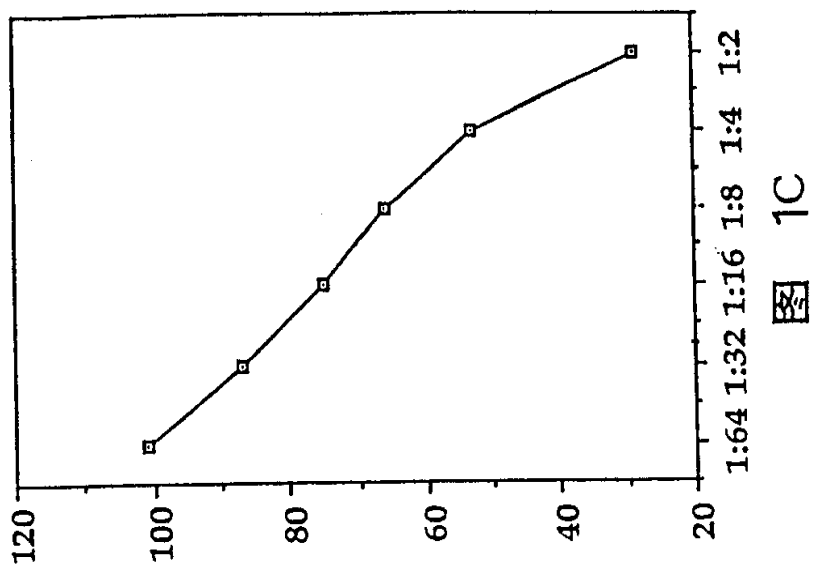
由于它的各种抗肿瘤活性，可以考虑到，瘤抑制素将会在广泛的治疗各种肿瘤病患，包括癌症和淋巴瘤上使用。瘤抑制素可以作为含有医药上可接受的载体的药用组合物的一部分施用于人或其它动物。由于它的多样性抗肿瘤活性，瘤抑制素可用在防止肿瘤疾病的复发上。此外，瘤抑制素施于带有肿瘤细胞的宿主会延长宿主的存活时间。另外，肿瘤细胞可以在离体后用瘤抑制素处理，例如，处理和清洗含肿瘤细胞的骨髓。在

本文中描述的处理肿瘤细胞的这些方法是癌症化疗行业中熟知的，因而本行业的普通技术人员可以不经过特别的试验，即可确定施用瘤抑制素的适合的剂量和途径。

瘤抑制素也可用作一种新的免疫调节剂。瘤抑制素激活淋巴细胞，单核细胞和中性白细胞去杀死肿瘤细胞。此外，瘤抑制素可以在治疗上用作生长因子，因瘤抑制素不刺激正常细胞的生长。

综上所述，可见本发明和本文中所公开的实施方案与完成各种目的相辅相成，并可达到在本申请中所提出的目标。在不偏离本发明的精神和范围的条件下可以在方法和装置上作出某些变化。应当认识到这些变化是可能的，并且应进一步强调，在申请的任一权利要求中起主导作用的各要素或步骤，应当理解为关系到以本质上相同或相等的方式完成基本上相同的结果的所有等同的要素或步骤。它旨在将本发明复盖在广泛范围里，不论什么形式其原则均可采用。因此，本发明与完成这些目的相宜，可达到所提出的目标和优点，以及本文内在的其它结果。

说明书附图



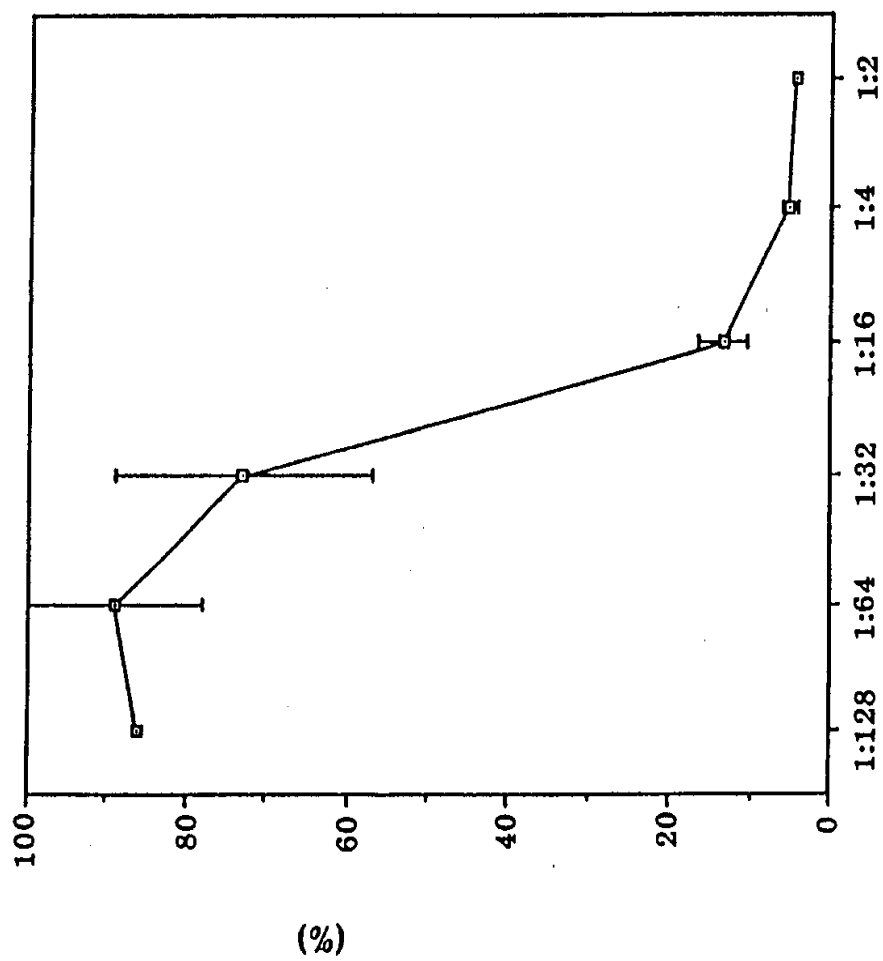


图 2

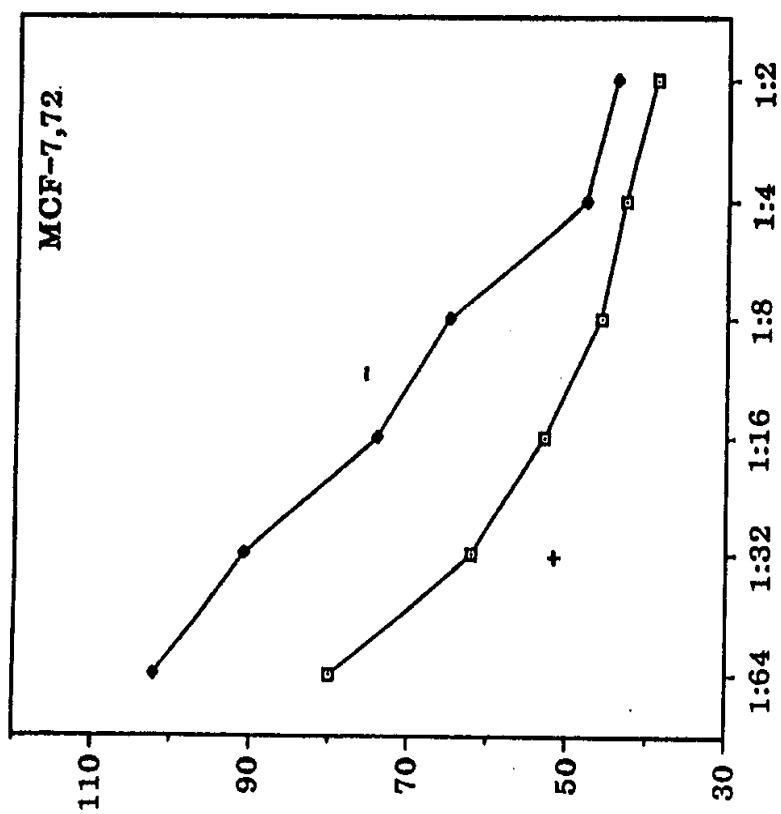


图 3

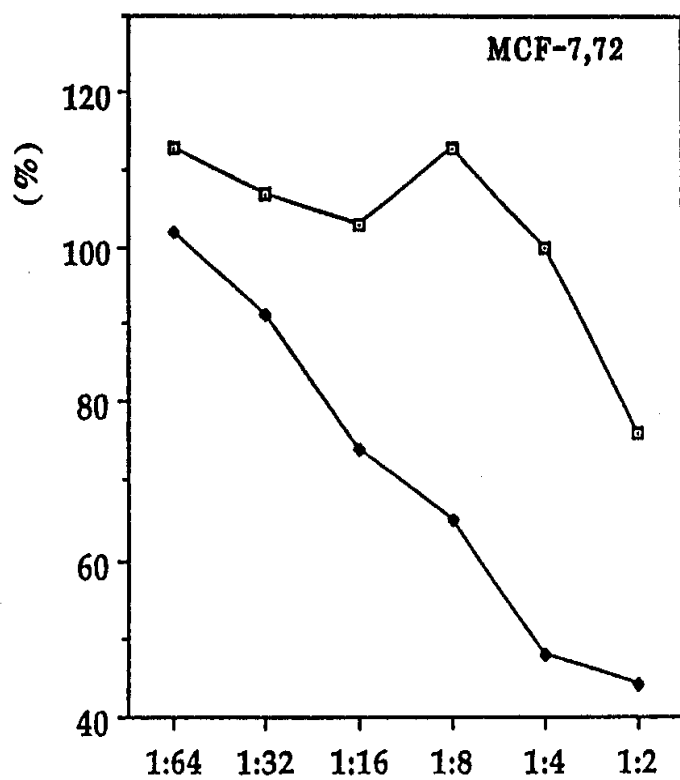


图 4A

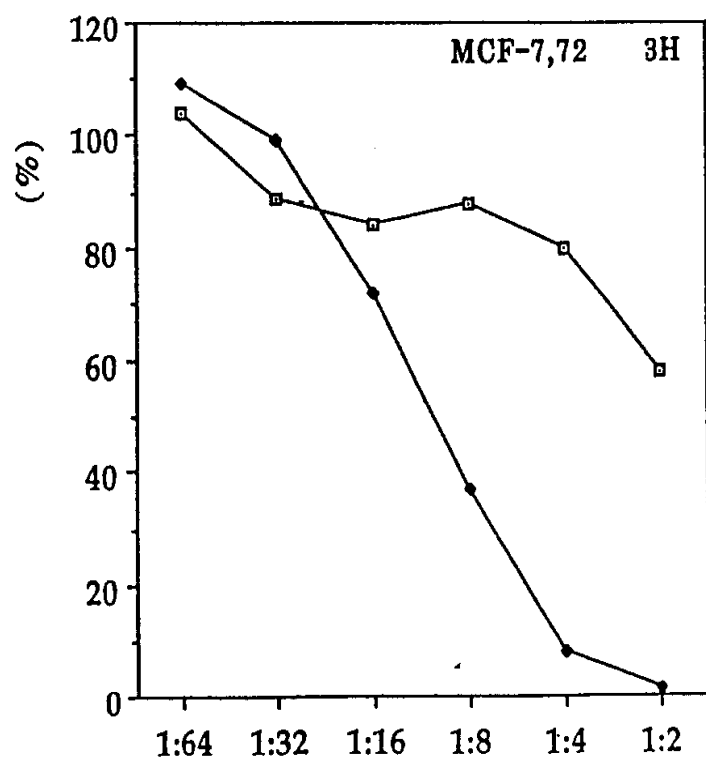


图 4B

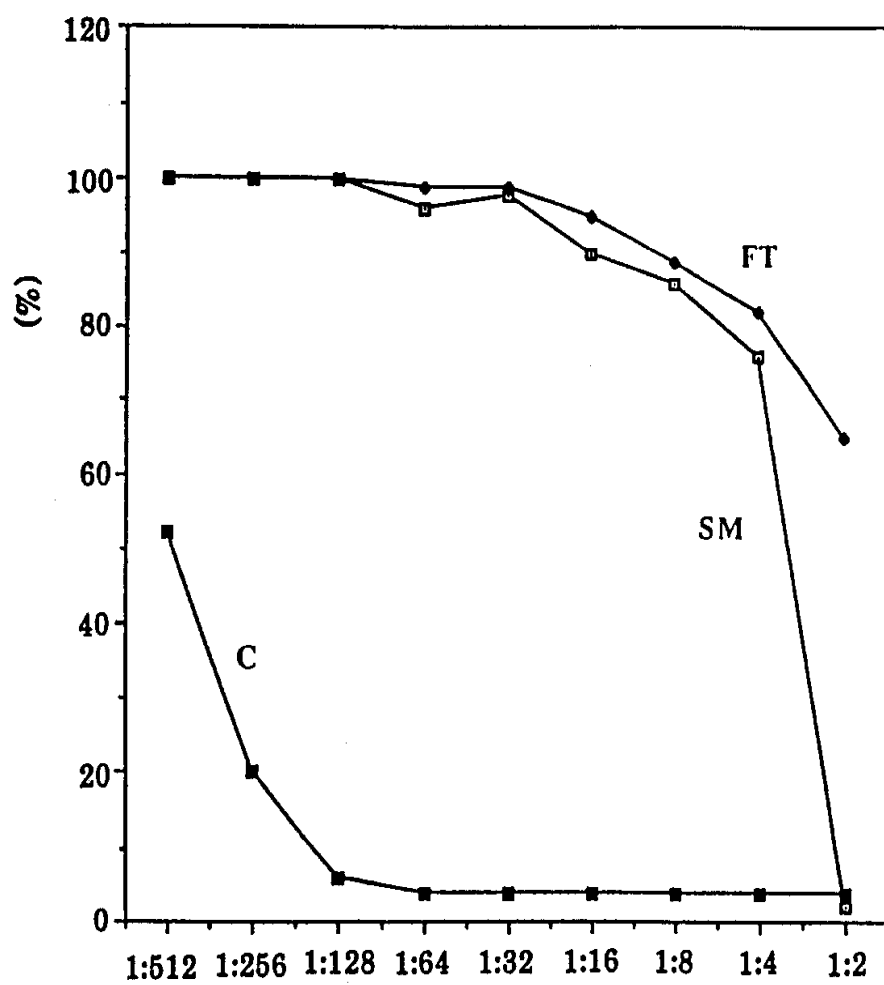


图 5

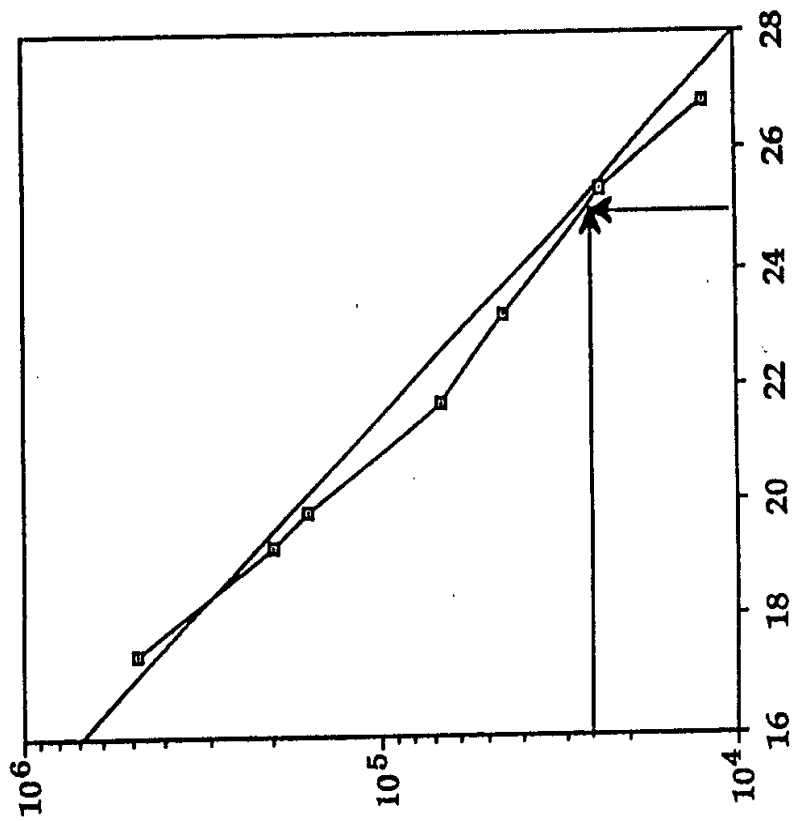


图 6B

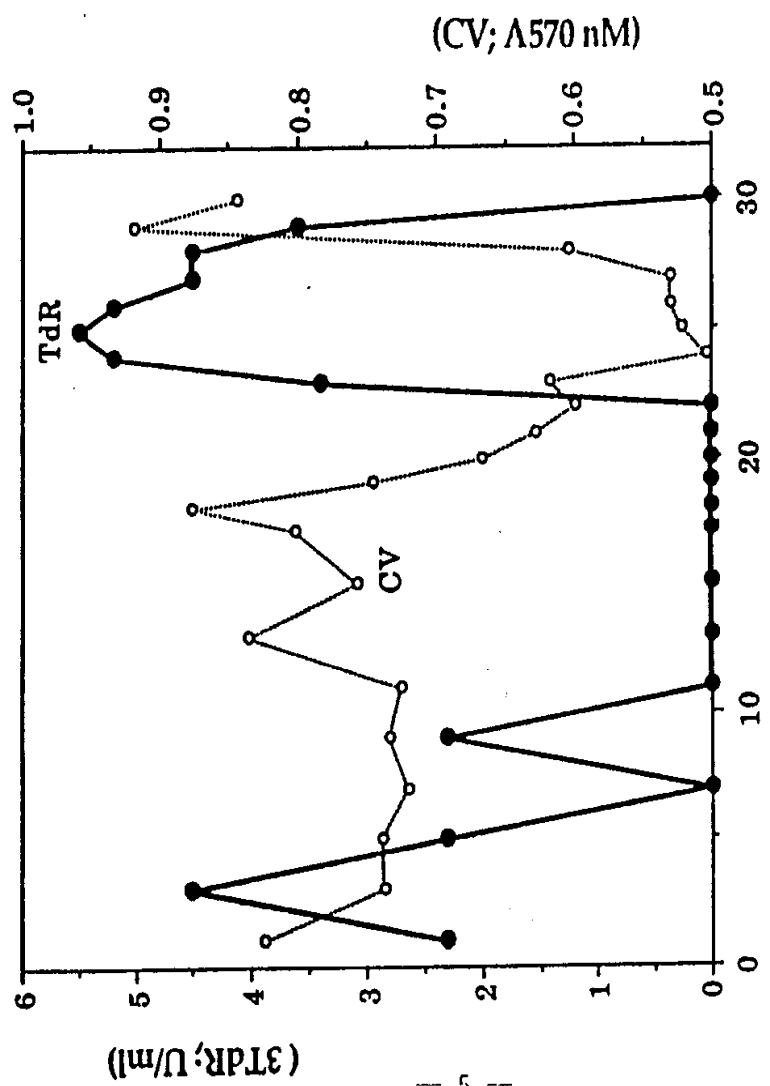


图 6A



图 7

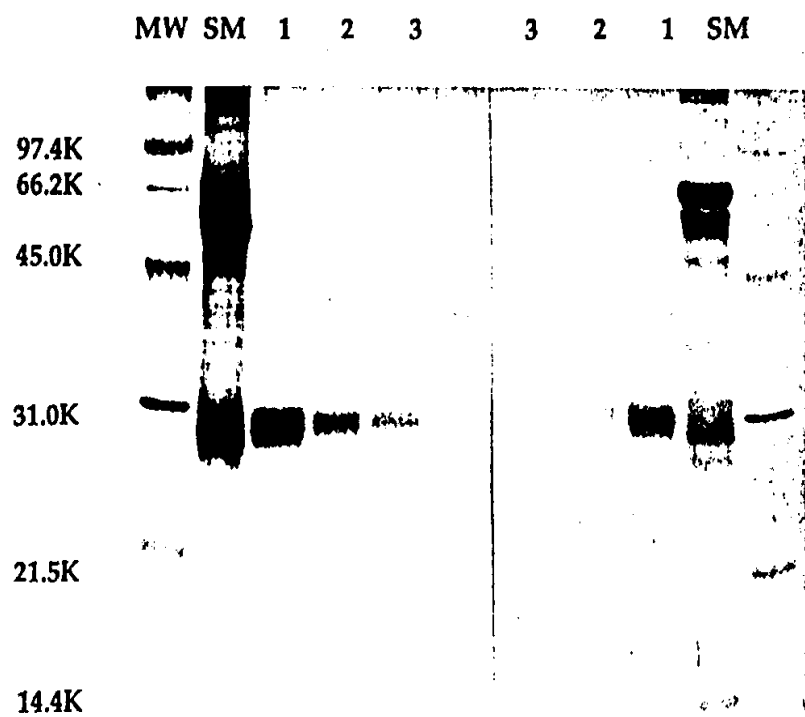


图 8

1 2 3 1 2 3 1 2 3



TNF

LT

图 13

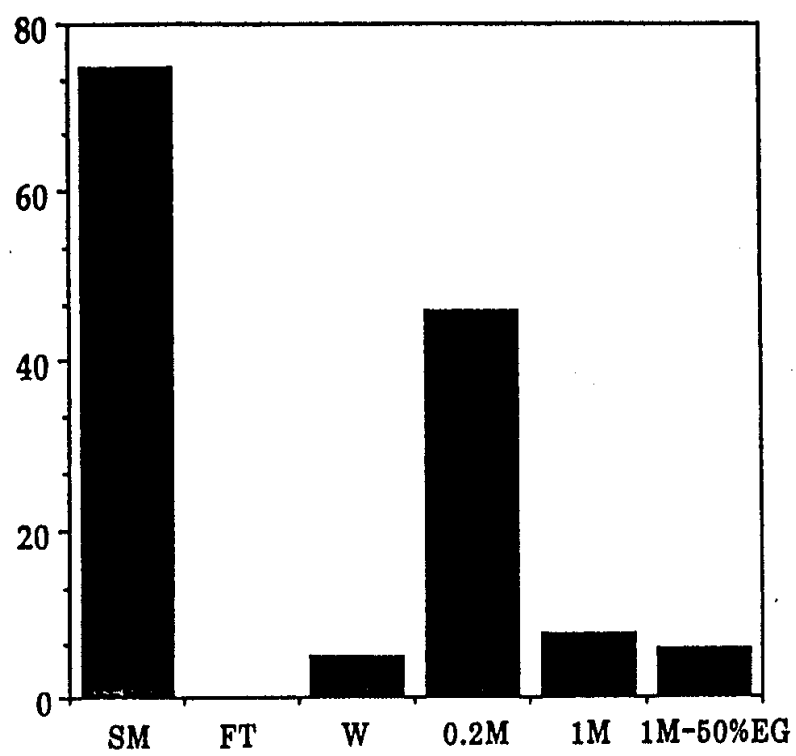


图 9A

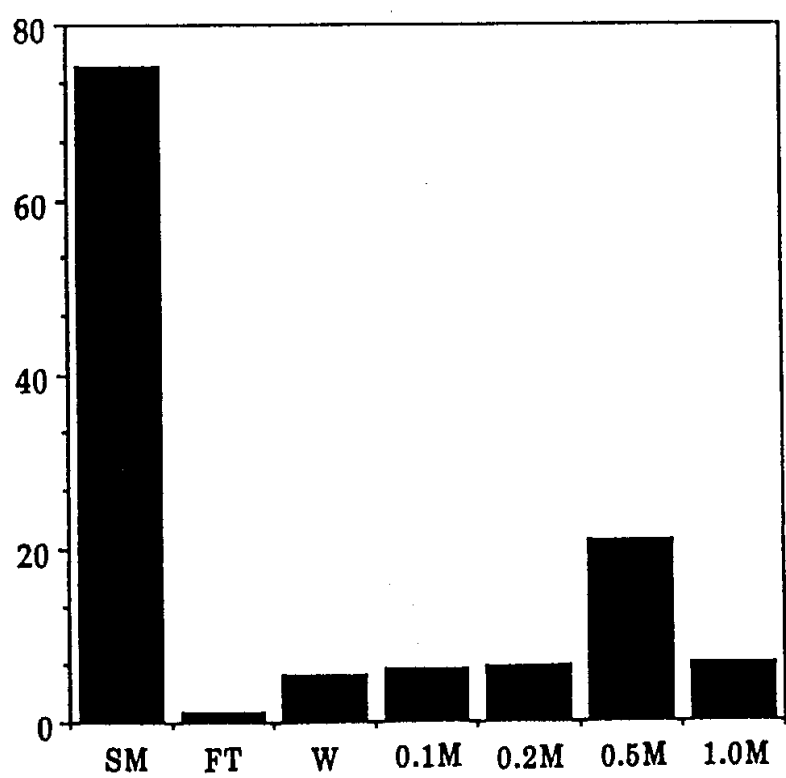


图 9B

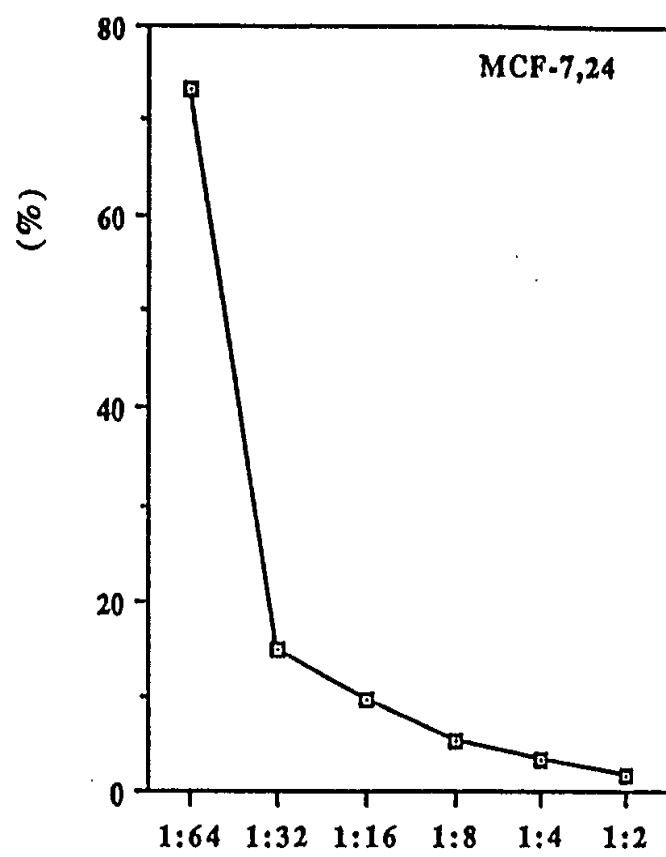
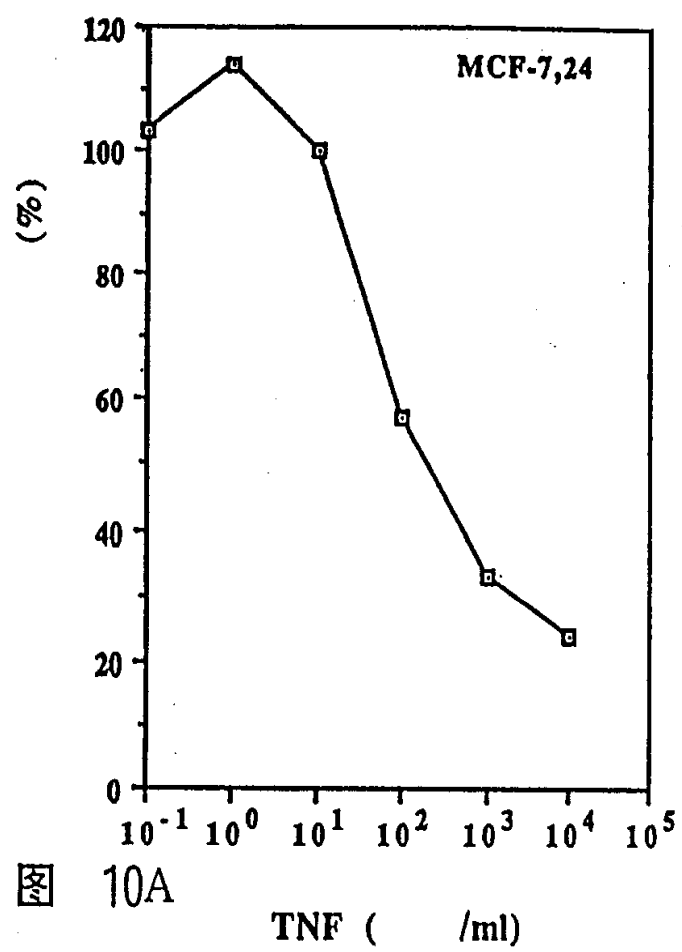


图 10B

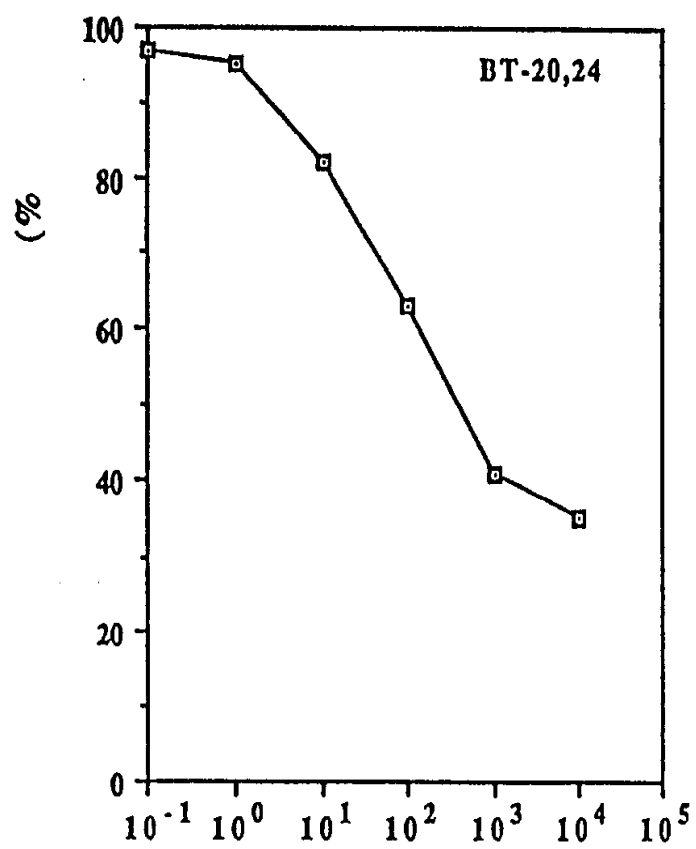


图 10C TNF

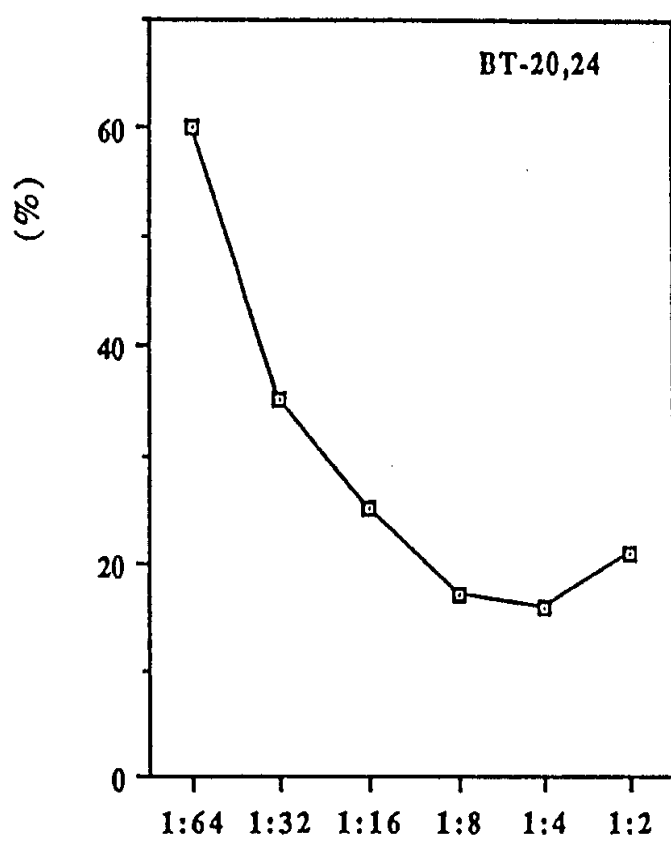


图 10D

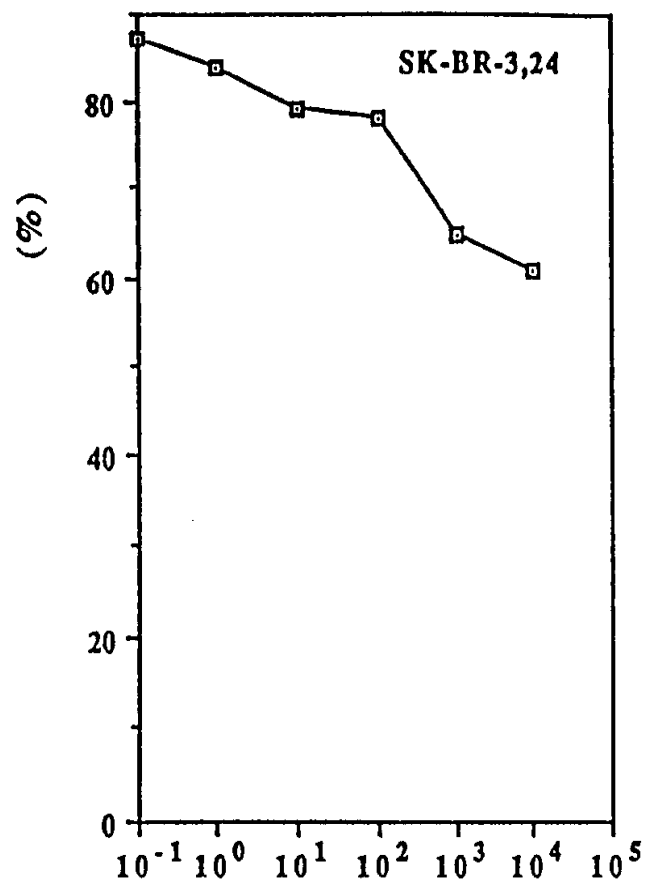


图 10E TNF

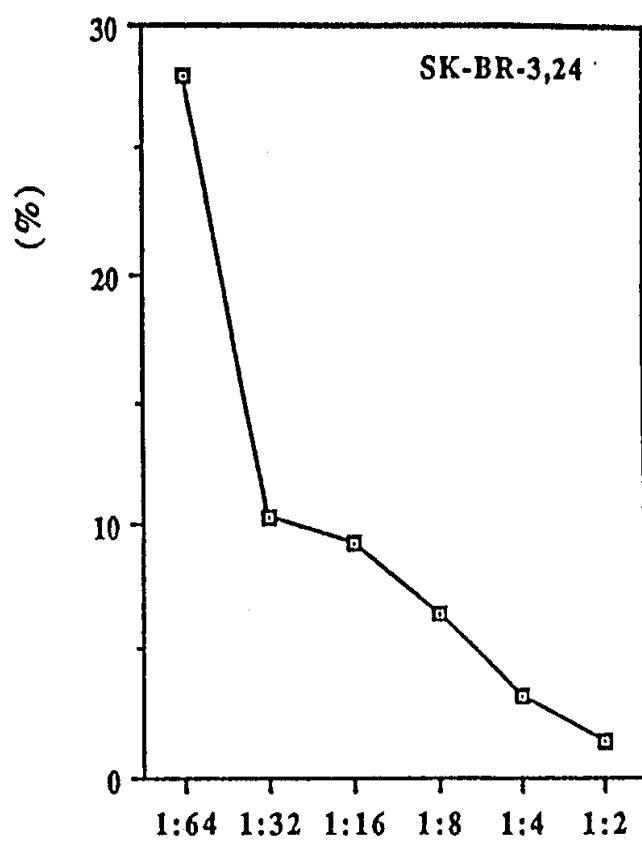


图 10F

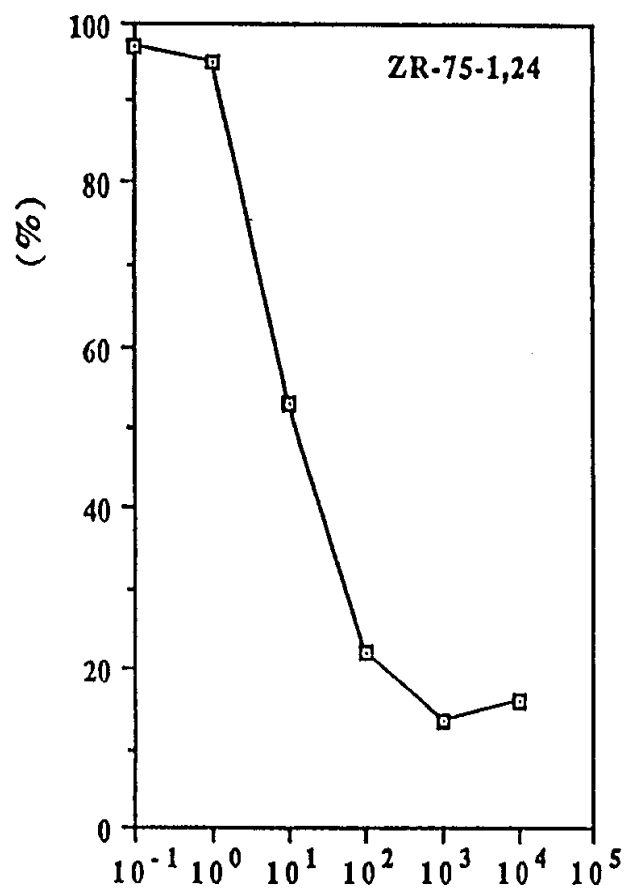


图 10G TNF

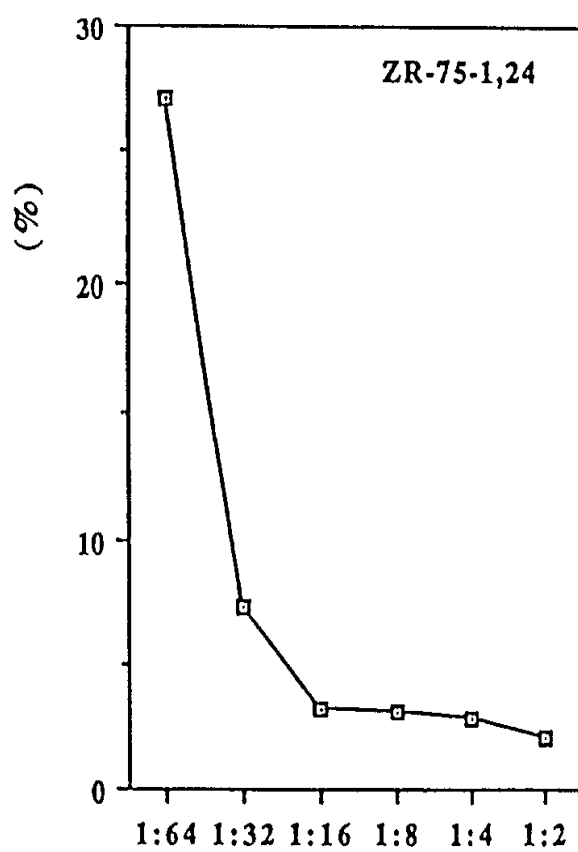


图 10H

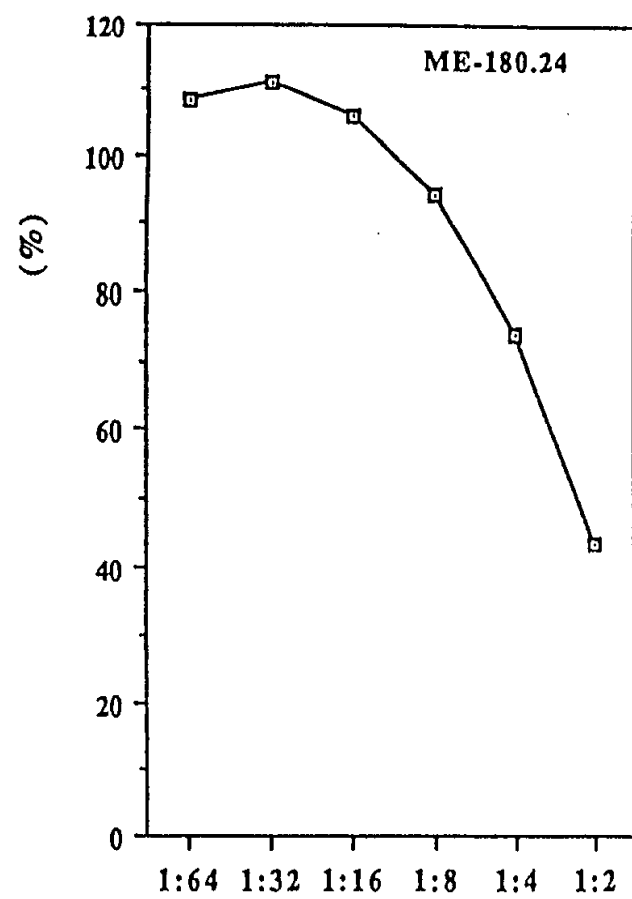
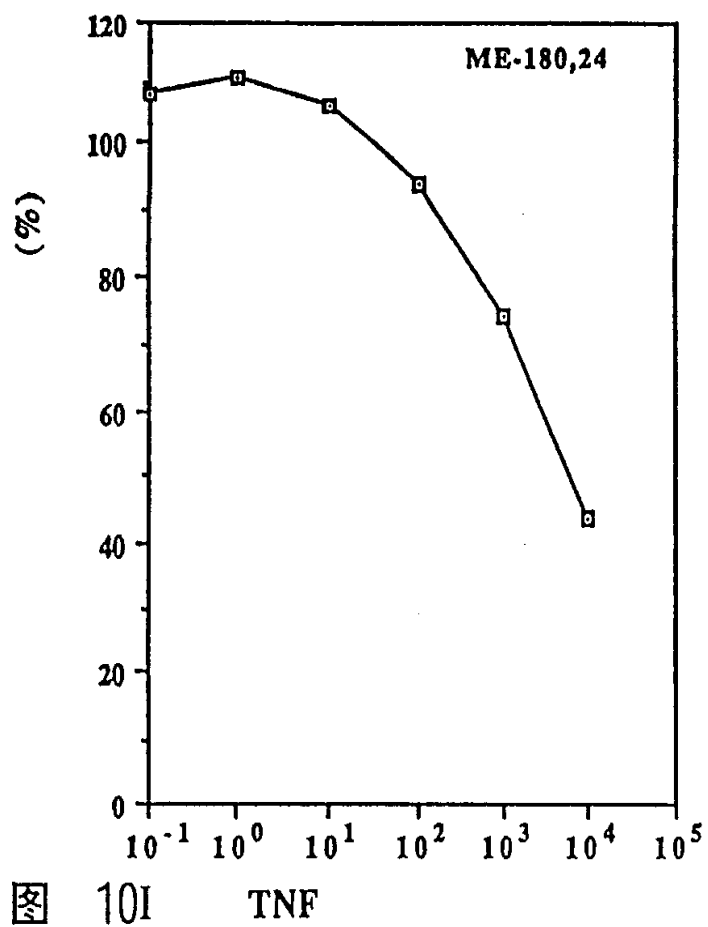


图 10J

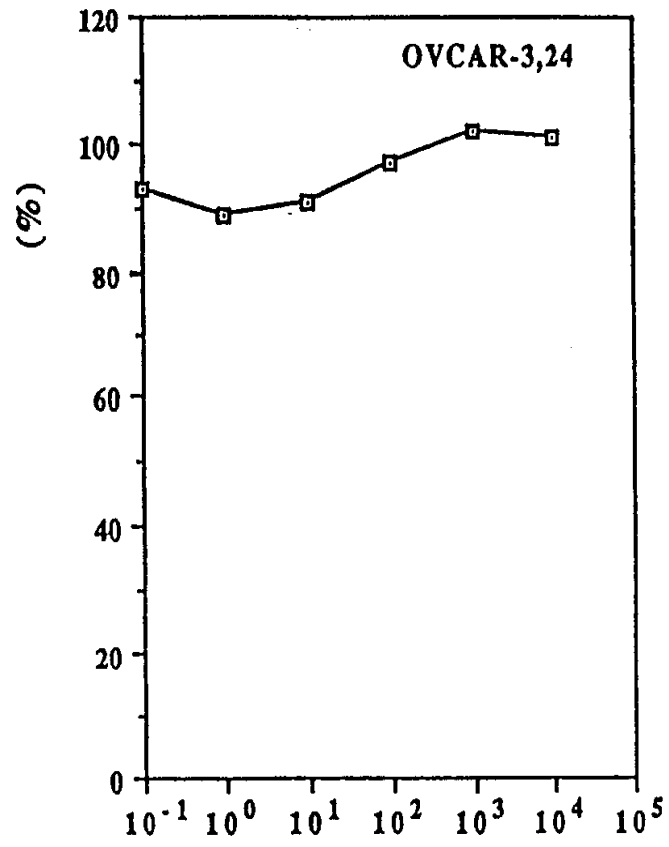


图 10K TNF

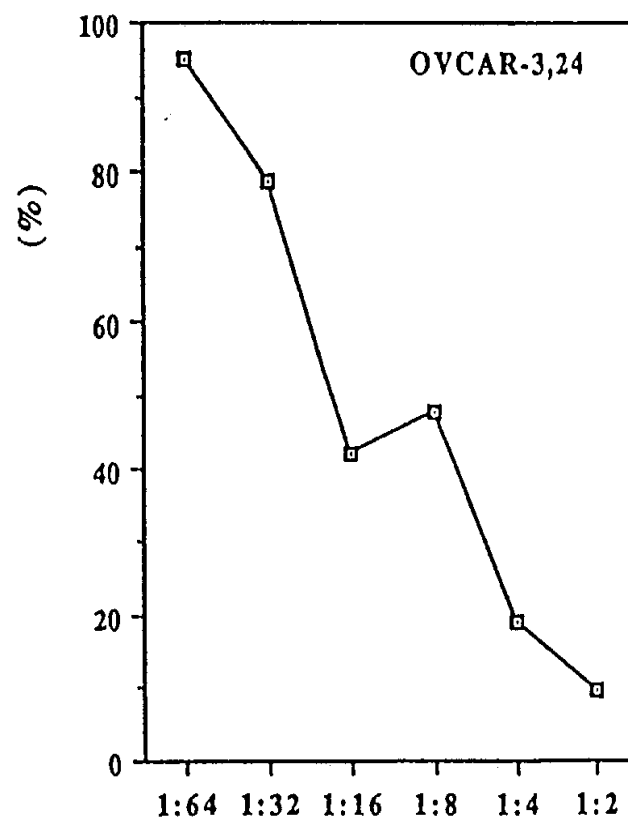


图 10L

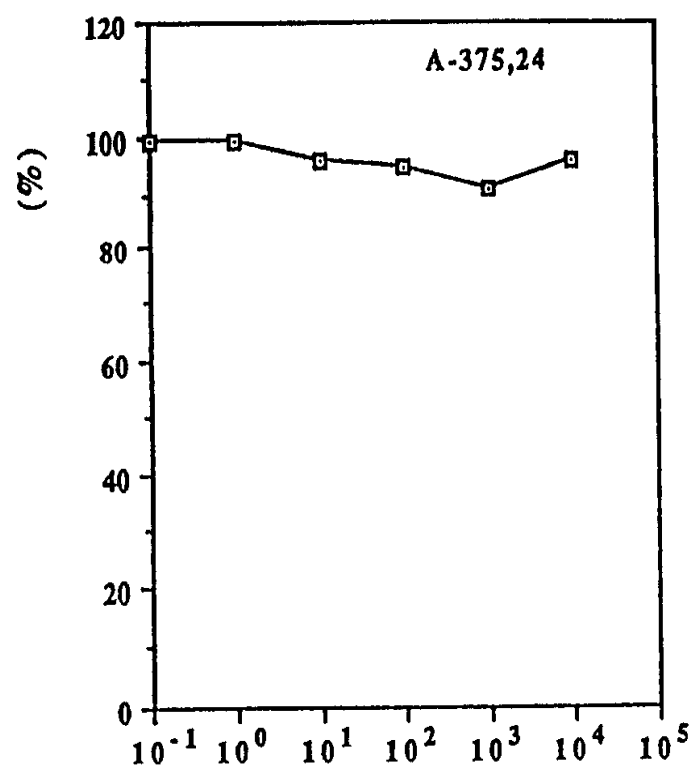


图 10M TNF

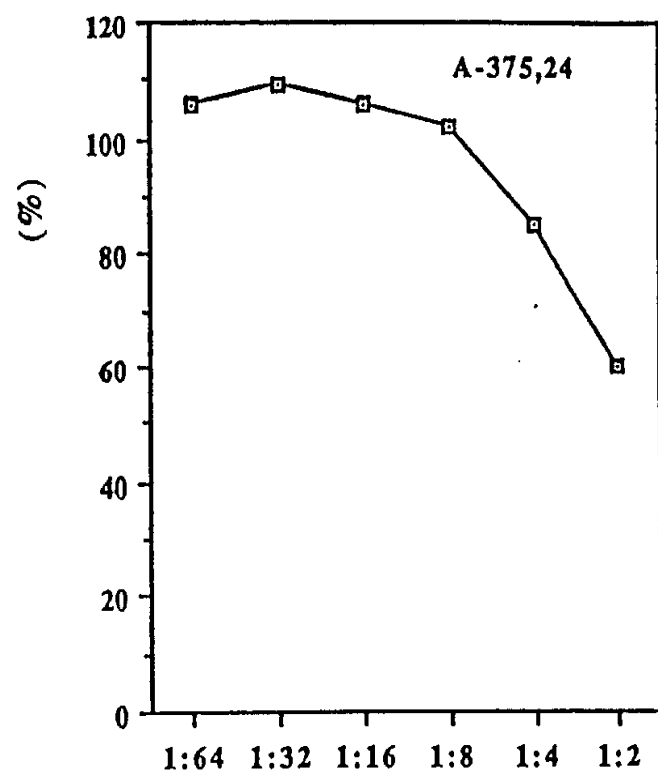


图 10N

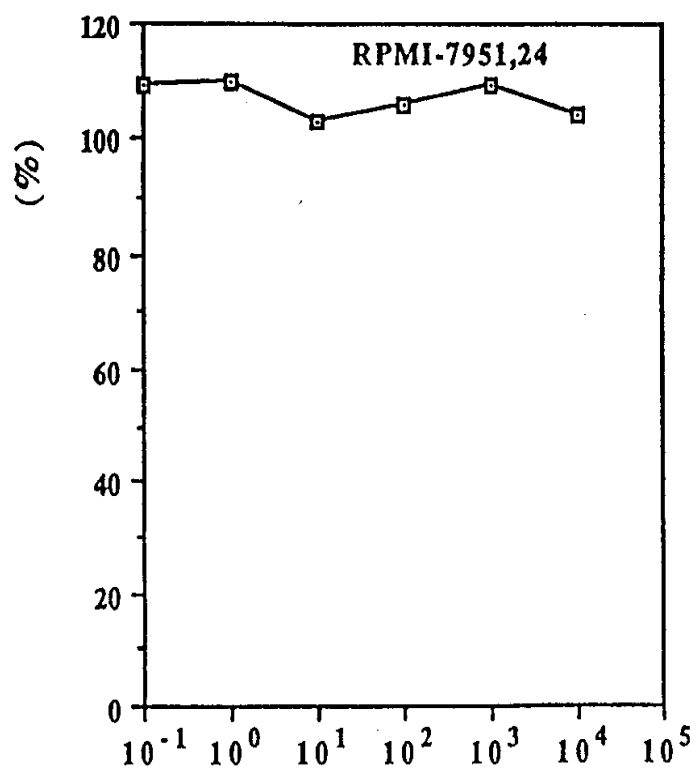


图 100 TNF

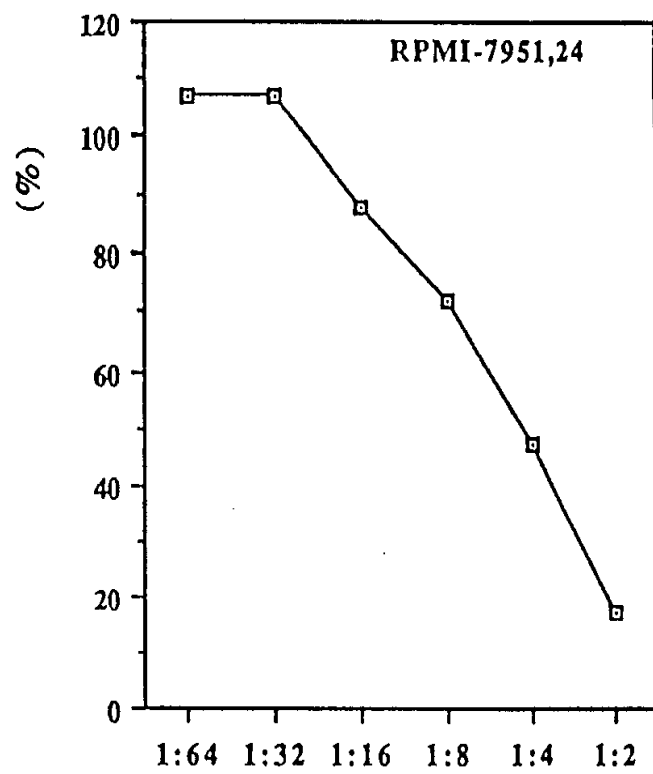


图 10P

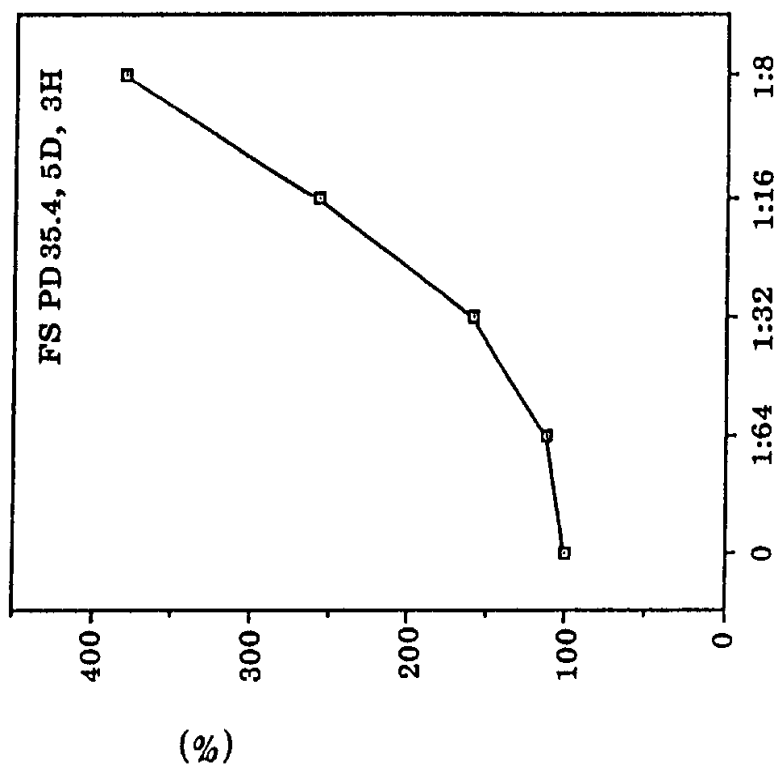


图 11

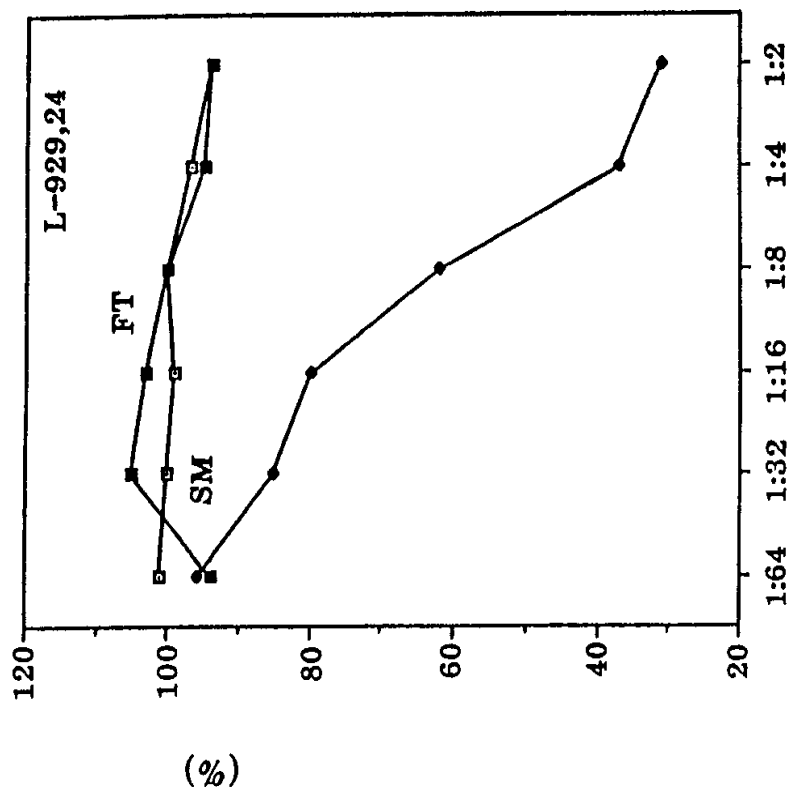


图 12

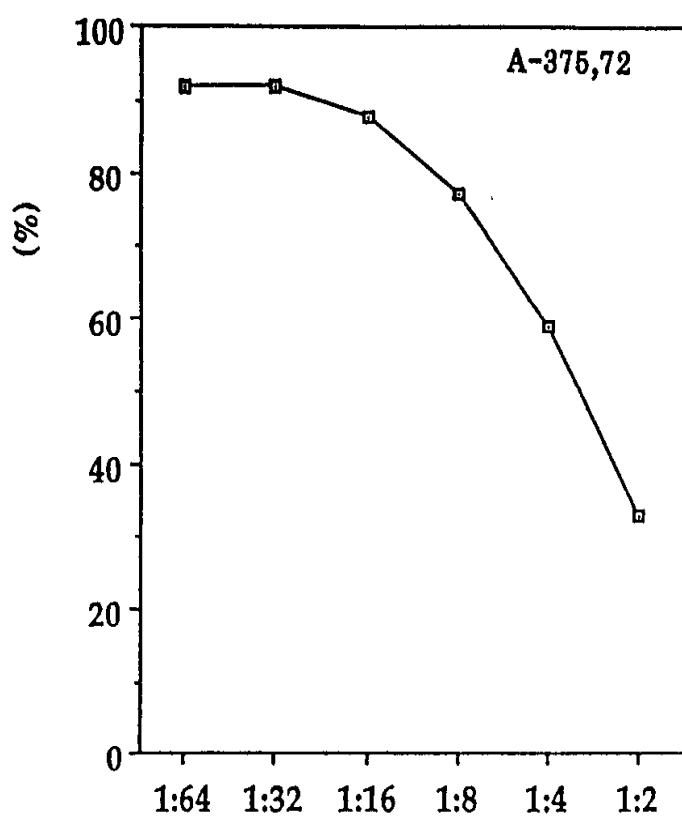


图 14A

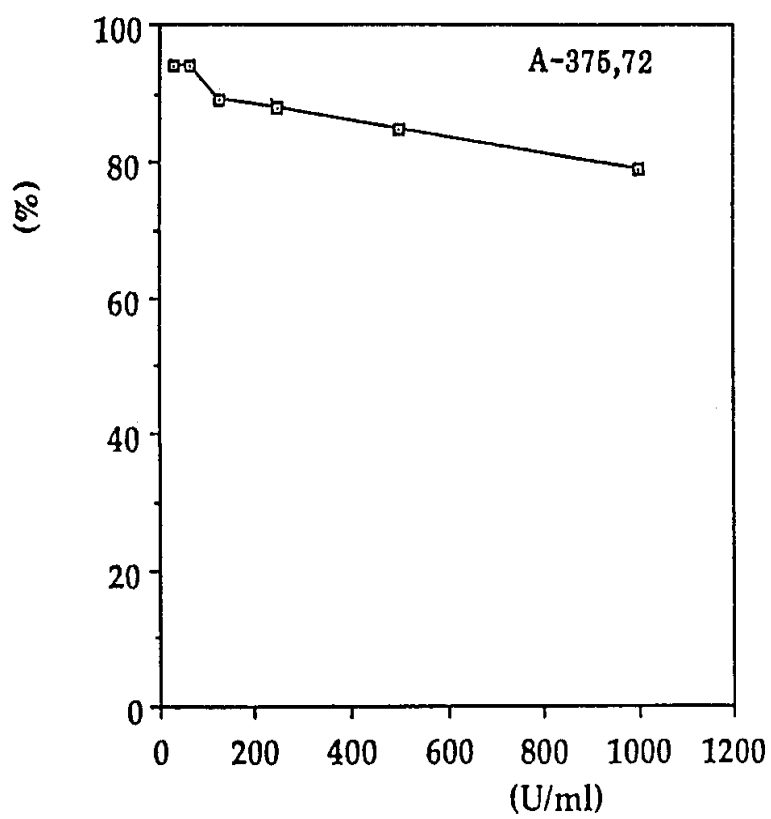


图 14B

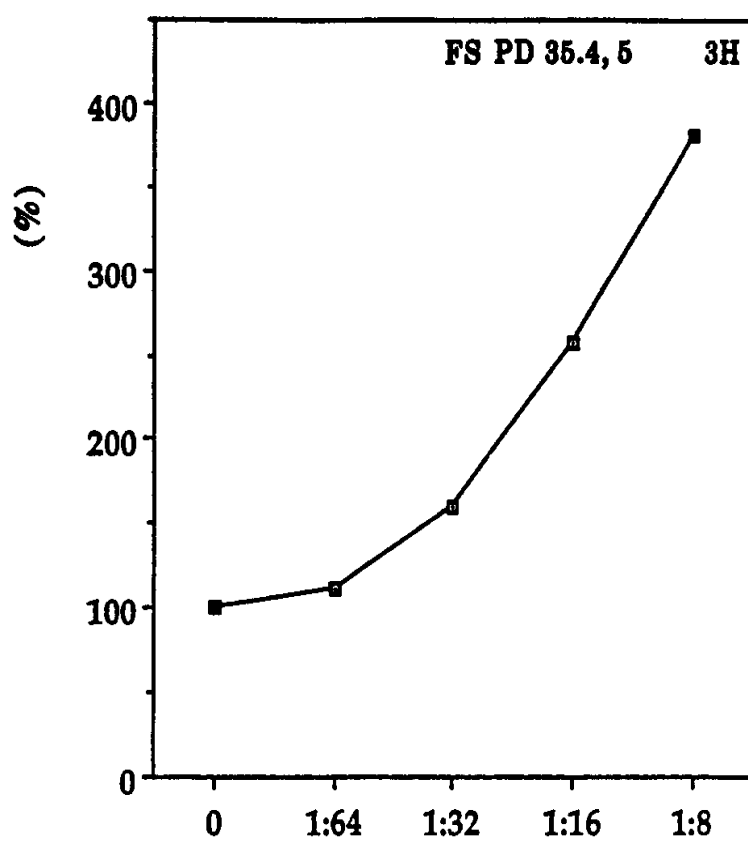


图 15A

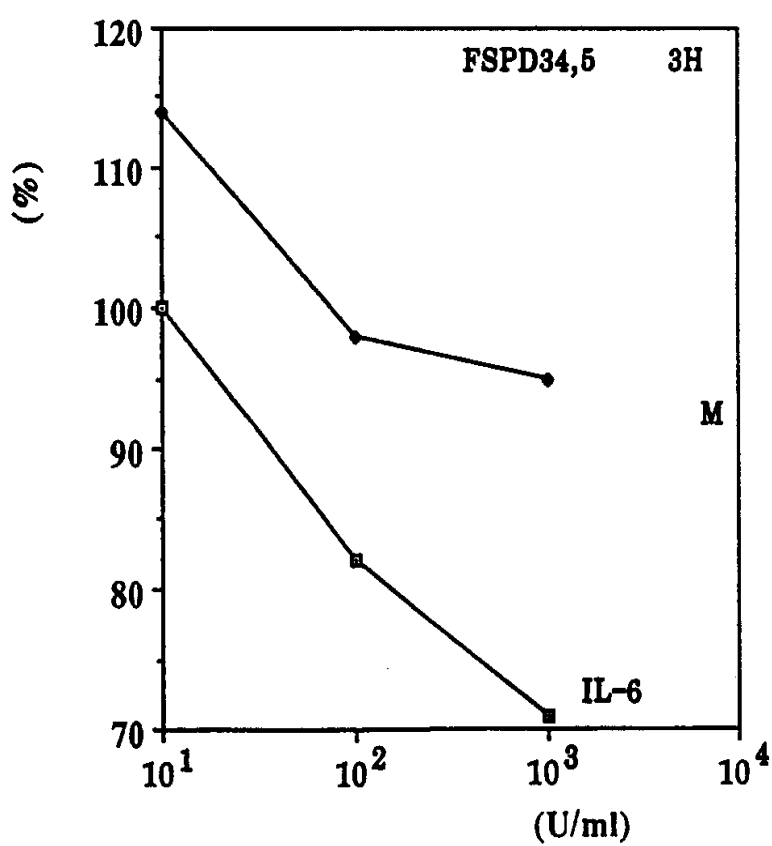


图 15B

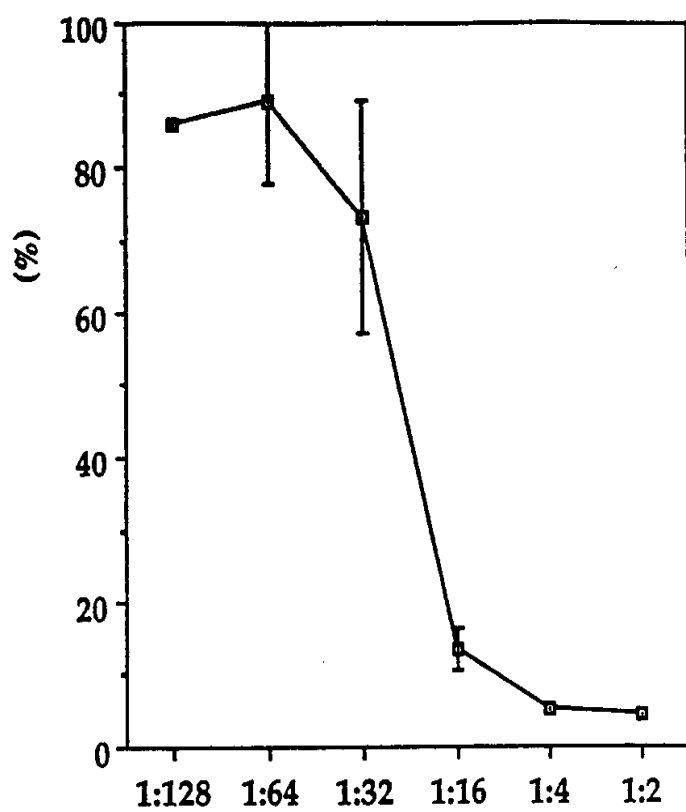


图 16A

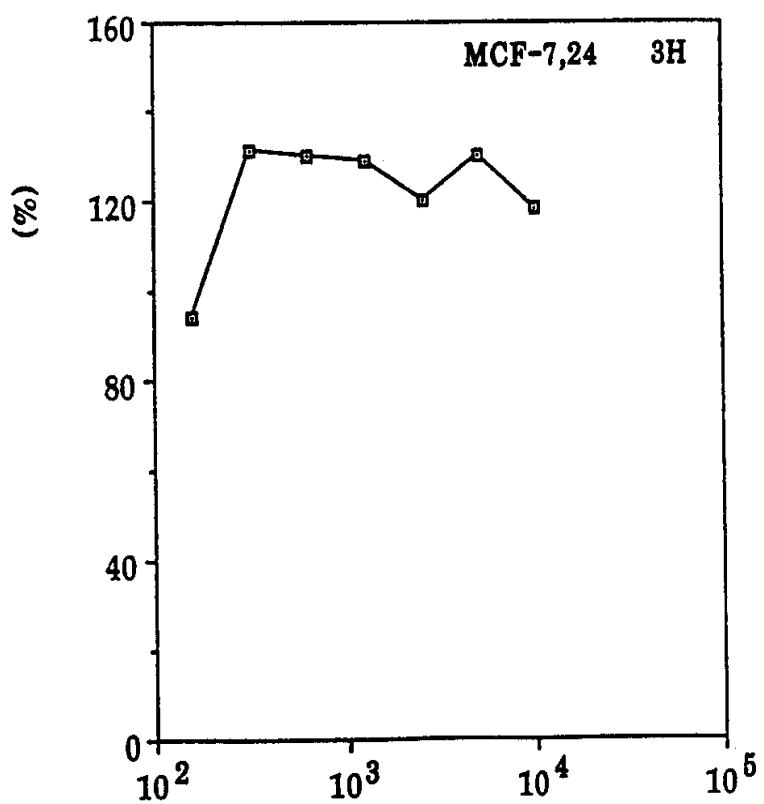


图 16B

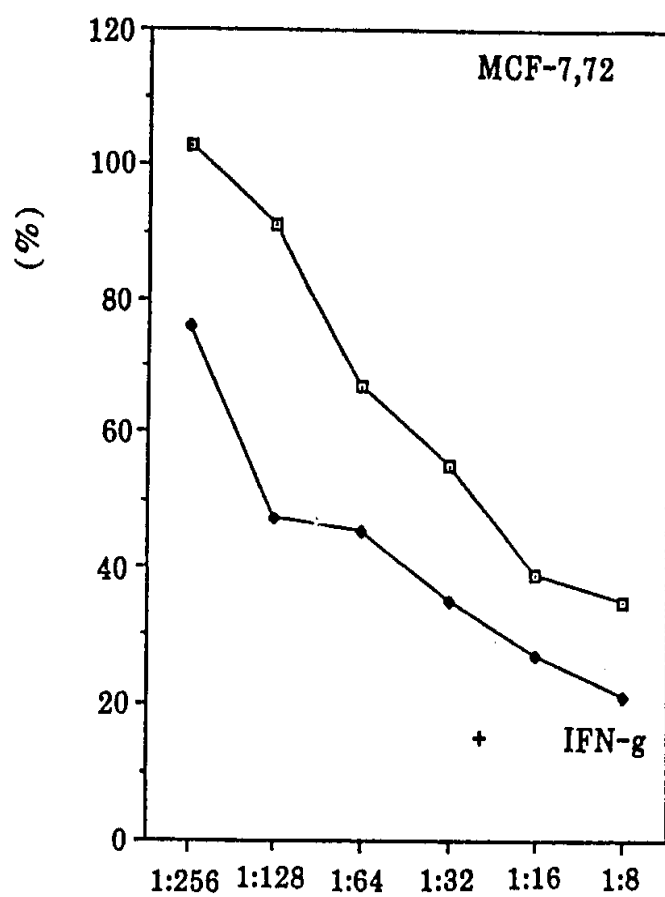


图 17

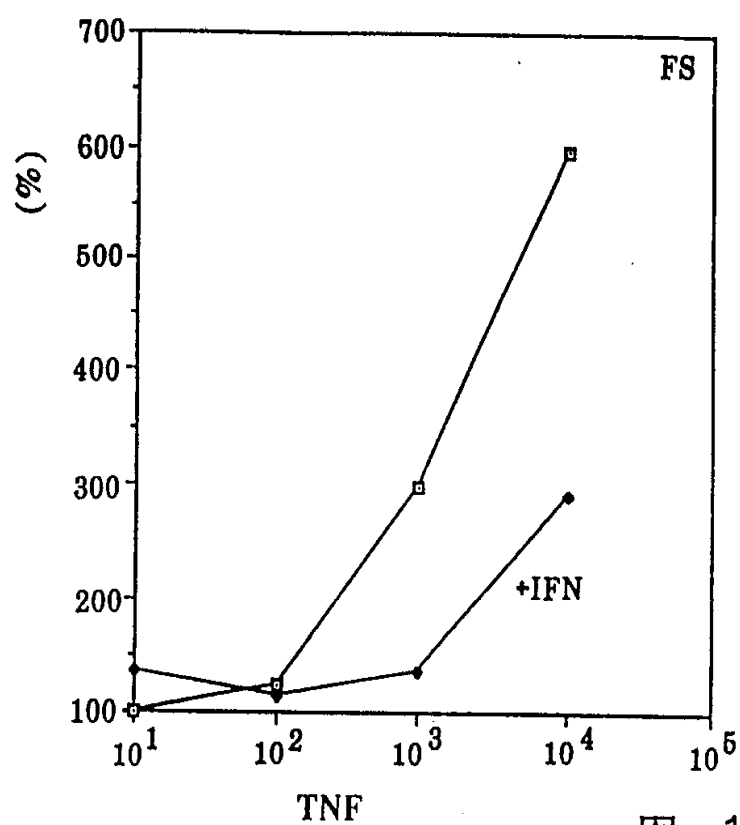


图 18A

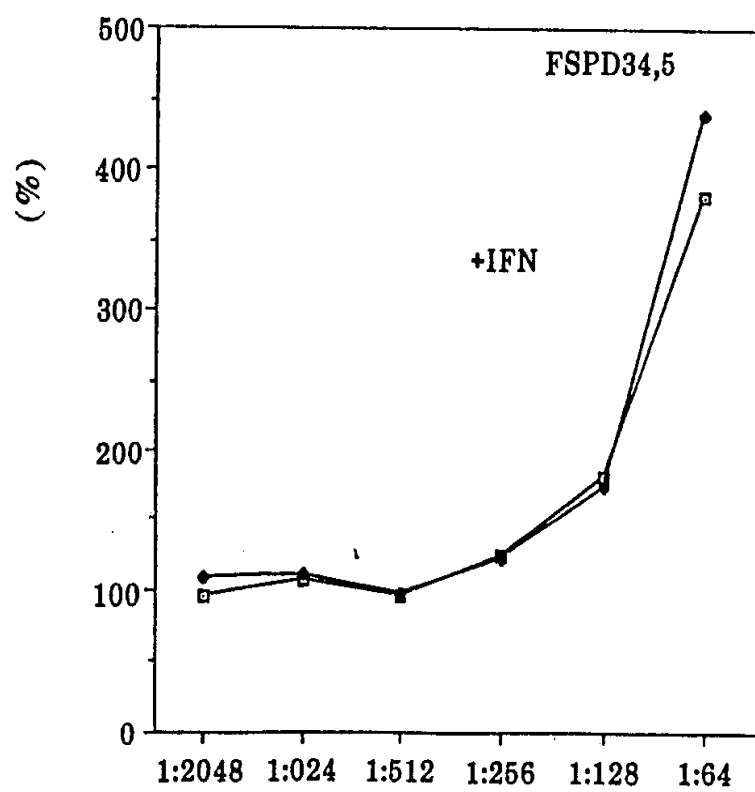


图 18B

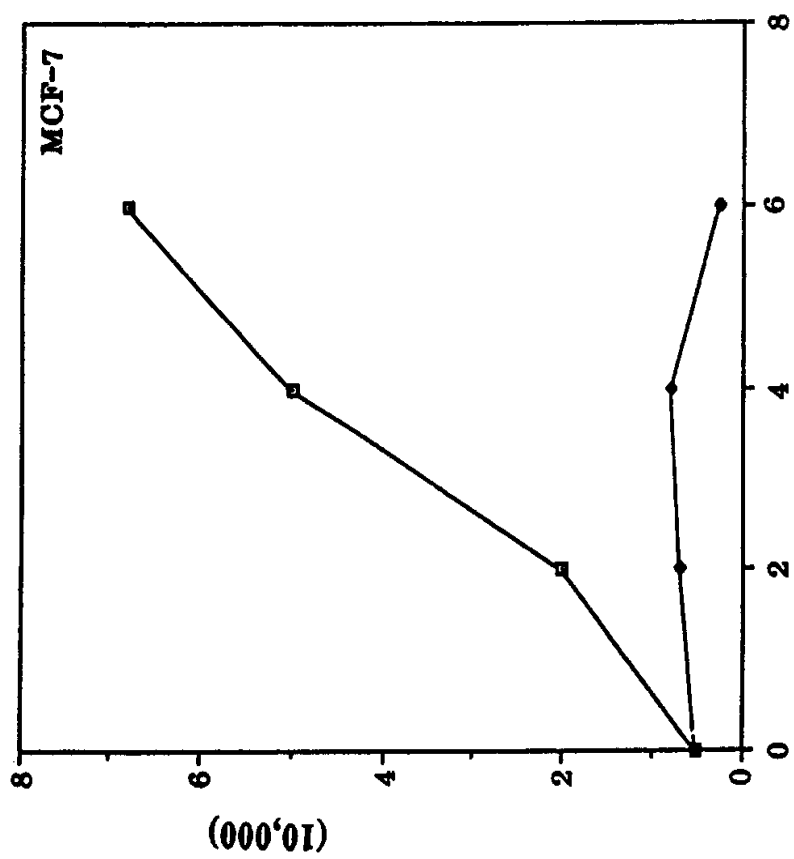


图 19

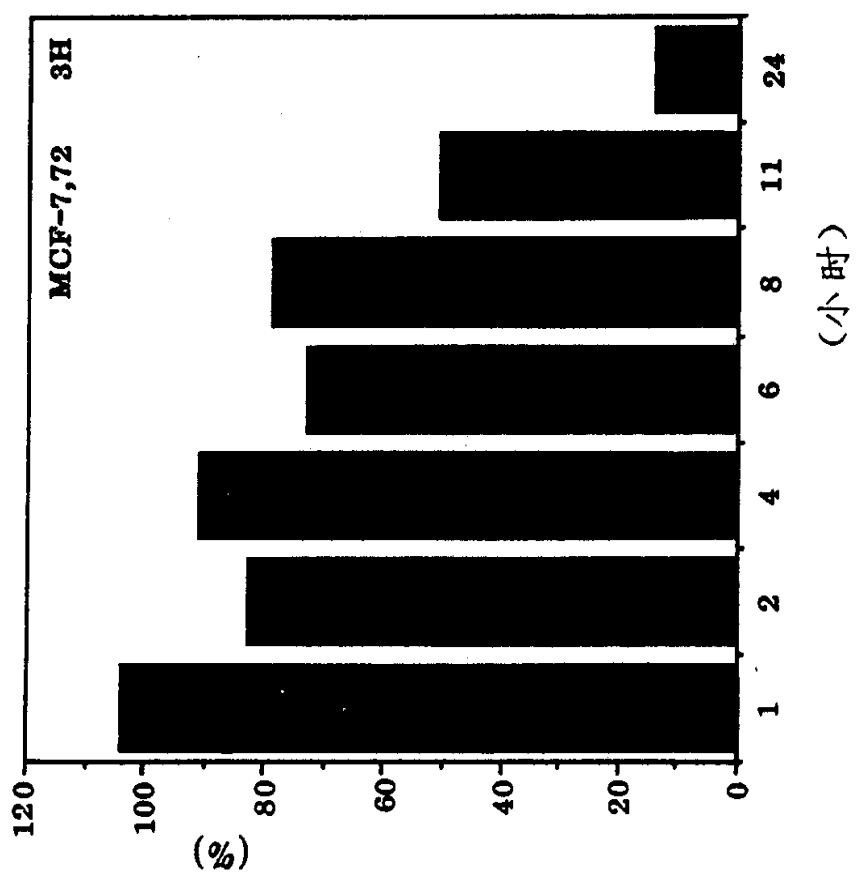
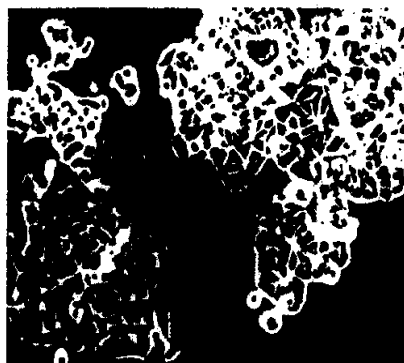


图 20

MCF-7



+TNF

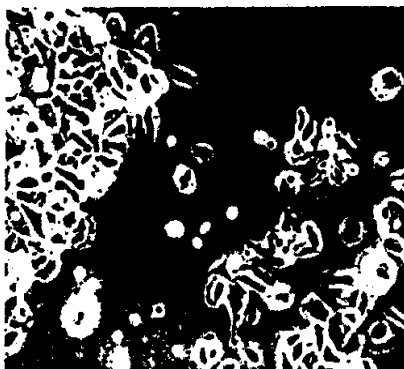


图 21