



# (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109069584 A

(43)申请公布日 2018.12.21

(21)申请号 201780009434.X

(51)Int.Cl.

(22)申请日 2017.06.29

A61K 38/17(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日  
2018.08.07

A61P 35/00(2006.01)

A61P 35/02(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/CN2017/090826 2017.06.29

(71)申请人 成都华创生物技术有限公司

地址 610000 四川省成都市高新区科园南路88号12栋4层409号

(72)发明人 陈守春 闫娟 徐琦 胡海洋  
黄先洲 魏利佳

(74)专利代理机构 北京联瑞联丰知识产权代理  
事务所(普通合伙) 11411  
代理人 黄冠华

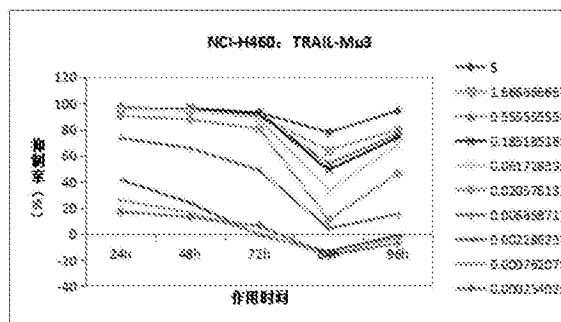
权利要求书2页 说明书42页 附图9页

(54)发明名称

一种TRAIL类蛋白持续抑制肿瘤细胞生长的  
给药方法

(57)摘要

提供了一种TRAIL类蛋白持续抑制肿瘤细胞生长的给药方法,具体方法是间隔、重复及全疗程药物暴露的给药,通过延长给药间隔,增加肿瘤细胞在全疗程的药物暴露时间,使药物在全疗程的作用不衰减,从而持续抑制肿瘤生长。



1. 一种TRAIL类蛋白持续抑制肿瘤细胞生长的给药方法,其特征在于,其是间隔、重复及全疗程药物暴露的给药,即是延长给药间隔,增加肿瘤细胞在全疗程的药物暴露时间,使药物在全疗程的作用不衰减,从而持续抑制肿瘤生长。

2. 根据权利要求1所述的TRAIL类蛋白持续抑制肿瘤细胞生长的给药方法,其特征在于,所述TRAIL类蛋白包括天然或重组的Apo2L/TRAIL蛋白胞膜外段第114-281aa、TRAIL受体选择性突变体、TRAIL穿膜肽样突变体TRAIL-Mu3、TRAIL-MuR5和TRAIL-MuR6、TRAIL穿膜肽突变蛋白TRAIL-MuR5S4TR和TRAIL-MuR6S4TR以及其它突变体中的一种或几种,其中所述其他突变体的氨基酸序列与野生型蛋白的相似度在75%以上。

3. 根据权利要求1所述的TRAIL类蛋白持续抑制肿瘤细胞生长的给药方法,其特征在于,所述肿瘤细胞为实体瘤或骨髓来源肿瘤,所述实体瘤包括肺癌、结直肠癌、乳腺癌、胰腺癌、肝癌、胃癌、卵巢癌、肾癌、脑瘤、骨软骨瘤、前列腺癌中的一种或几种;所述骨髓来源肿瘤包括白血病、非何杰金淋巴瘤中的一种或几种。

4. 根据权利要求1所述的TRAIL类蛋白持续抑制肿瘤细胞生长的给药方法,其特征在于,持续抑制肿瘤细胞生长包括体外细胞水平抑瘤作用和动物体内实验抑瘤作用;在体外实验中,TRAIL类蛋白在有效剂量范围内与细胞作用,观察24-96小时药物对肿瘤细胞的抑制率;在不同敏感性的肿瘤细胞中,TRAIL类蛋白对肿瘤细胞生长在24-72小时均处于抑制的高峰,对于高度敏感的细胞株或较高的作用浓度,其抑瘤的高峰时间持续到96小时;在体内实验中,不同间隔给药方法的动物移植瘤在21天内均呈明显生长抑制状态,其相对肿瘤生长率T/C均 $\leq 40\%$ 。

5. 根据权利要求1所述的TRAIL类蛋白持续抑制肿瘤细胞生长的给药方法,其特征在于,与每天用药一次、连续用药五天的疗法相比,在肿瘤细胞裸鼠移植瘤模型上抑瘤率至少提高20%以上,作用持续时间在一个疗程21天内延长5天以上。

6. 根据权利要求1所述的TRAIL类蛋白持续抑制肿瘤细胞生长的给药方法,其特征在于,间隔、重复及全疗程药物暴露的给药方案包括如下的任意一个:

(1) TRAIL类蛋白静脉注射,隔日一次,从疗程0日起,给药时间分别为0,2,4,6,8,10,12,14,16,18或分别为0,2,4,6,8,10,12,14,16,18,20,每21天为一个疗程;

(2) TRAIL类蛋白静脉注射,每周三次,从疗程0日起,给药时间分别为0,2,4,7,9,11,14,16,18,每21天为一个疗程;

(3) TRAIL类蛋白静脉注射,每三天给药一次,从疗程0日起,给药时间分别为0,3,6,9,12,15,18,每21天为一个疗程;

(4) TRAIL类蛋白静脉注射,每四天给药一次,从疗程0日起,给药时间分别为0,4,8,12,16,20,每21天为一个疗程。

7. 根据权利要求1所述的TRAIL类蛋白持续抑制肿瘤细胞生长的给药方法,其特征在于,采用高于其体内外起效的最低作用浓度,延长其给药间隔。

8. 根据权利要求2所述的TRAIL类蛋白持续抑制肿瘤细胞生长的给药方法,其特征在于,TRAIL-Mu3组和MuR5S4TR各组,对人肺癌NCI-H460裸鼠异种移植瘤有一定的抑制作用,给药后,抑瘤率均出现显著性差异,其中TRAIL-Mu3和MuR5S4TR两药隔日给药组和每周三次,三周给药组的抑瘤作用优越于每日给药,连续5天,共两周组;TRAIL-Mu3和MuR5S4TR两药隔日给药组和每周三次,三周给药组的抑瘤作用疗效相当。

9. 根据权利要求2所述的TRAIL类蛋白持续抑制肿瘤细胞生长的给药方法,其特征在于,TRAIL-Mu3 72mg/kg每周三次给药组,TRAIL-Mu3 93mg/kg每三天给药一次组,TRAIL-Mu3 108mg/kg每四天给药一次组,MuR5S4TR 105mg/kg每周三次给药组,MuR5S4TR 135mg/kg每三天给药一次组,MuR5S4TR 158mg/kg每四天给药一次组对人结肠癌细胞HT-29裸鼠异种移植瘤有均有一定的抑制作用,给药后,抑瘤率均出现显著性差异;TRAIL-Mu3及TRAIL-MuR5S4TR每三天给药一次组和每四天给药一次组的肿瘤抑制效应明显优越于每周三次给药组,而每三天给药一次组和每四天给药一次组的肿瘤抑制效应无显著性差异。

10. 根据权利要求2所述的TRAIL类蛋白持续抑制肿瘤细胞生长的给药方法,其特征在于,TRAIL-Mu3 72mg/kg每周三次、连续三周组,TRAIL-Mu393mg/kg每三天一次、连续三周组,TRAIL-Mu3 108mg/kg每四天一次、连续三周组,MuR5S4TR 105mg/kg每周三次、连续三周组,MuR5S4TR 135mg/kg每三天一次、连续三周组,MuR5S4TR 158mg/kg每四天一次、连续三周组对人胰腺癌细胞PANC-1裸鼠异种移植瘤有均有明显的抑制作用,给药后,抑瘤率均出现显著性差异;TRAIL-Mu3 72mg/kg每周三次、连续三周组,TRAIL-Mu393mg/kg每三天一次、连续三周组,TRAIL-Mu3 108mg/kg每四天一次、连续三周组各组之间疗效没有差异;MuR5S4TR 105mg/kg每周三次、连续三周组,MuR5S4TR 135mg/kg每三天一次、连续三周组,MuR5S4TR 158mg/kg每四天一次、连续三周组各组之间疗效没有差异。

## 一种TRAIL类蛋白持续抑制肿瘤细胞生长的给药方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及医药领域,具体涉及一种TRAIL类蛋白持续抑制肿瘤细胞生长的给药方法。

### 背景技术

[0002] TRAIL为肿瘤坏死因子(Tumor necrosis factor, TNF)超家族的成员,其基因序列分别于1995年由Wiley等人 and 1996年由Pitti等人独立克隆获得,后者将其命名为凋亡素2配体(Apo2ligand, Apo2L)。后来的研究证实,Apo2L与TRAIL实质上是同一种蛋白质,因此,习惯上可将其称为Apo2L/TRAIL。TRAIL的功能首先是作为生物体先天性或获得性免疫的调节剂,其次在细胞外源性凋亡途径中作为免疫监视发挥抗肿瘤的作用。TRAIL的最大优点是可以选择性地诱导多种肿瘤细胞凋亡而对正常细胞基本没有毒性。研究资料表明,无论在体外还是体内,Apo2L/TRAIL对于多种来源的人肿瘤细胞系,包括结(直)肠癌、肺癌、乳腺癌、前列腺癌、胰腺癌、肾癌、中枢神经系统肿瘤、甲状腺癌、淋巴瘤、白血病以及多发性骨髓瘤等都具有诱导凋亡的作用。

[0003] 在肿瘤患者体内,细胞凋亡平衡的破坏—即促凋亡信号的减弱和抗凋亡信号的增强非常常见,因此修复细胞失控的凋亡平衡是一种重要的肿瘤治疗方法。对于抗肿瘤药物认识的深入使人们了解到,无论细胞毒性药物、分子靶向药物还是单克隆抗体,其发挥作用的过程中均涉及到肿瘤细胞凋亡途径的激活,诱导肿瘤细胞凋亡的信号通路途径是这些药物发挥作用的枢纽和中心环节,而凋亡逃避正是肿瘤发生发展以及耐药的重要机制。

[0004] 从发现至今的20年时间里,TRAIL一直被作为一种重要的潜在抗肿瘤药物开发,TRAIL的临床实验在国外已进入II期,在国内已完成III期。大量体内外试验均证实,TRAIL具有肿瘤特异性细胞毒性,尤其当它与小剂量化疗药物联用时即表现出明显的协同和增效作用。相反,研究发现机体中凋亡机制的缺失导致的TRAIL耐受与肿瘤细胞的快速生长和转移明确相关。

[0005] 最近的研究进展显示,仅依赖Apo2L/TRAIL治疗多种不同类型的肿瘤仍是远远不够的。尽管重组人Apo2L/TRAIL或TRAIL受体DR4/DR5的激动性单克隆抗体在I期临床治疗中取得令人鼓舞的结果,但在随后进行的II期临床研究中却没有显示出明确的临床受益。临床研究提示,Apo2L/TRAIL类药物对多种肿瘤表现为较有限的治疗反应(Limited tumor responses),总体中等略显失望(Disappointingly modest overall),部分患者无临床受益(Lack of therapeutic benefit)。

[0006] 大量研究表明,正常细胞以及大约一半(甚至高达60%)以上的传代肿瘤细胞株对TRAIL表现出耐药。根据Roberta Di Pietro和Giorgio Zauli的综述,Apo2L/TRAIL对已经研究的92株原代或传代肿瘤细胞中的61株敏感,敏感率为66.3%,而对其余的31株耐药,耐药率为33.7%。大量的研究文献集中在TRAIL的耐药上,总括起来研究内容集中在以下方面:(1)恶性程度高的肿瘤细胞更倾向于耐药(Malignant tumors are resistant), (2)来源于体内的原代肿瘤细胞基本耐药(Resistance in primary tumor cells), (3)先天性和

获得性耐药两种情况的并存 (Congenital and acquired resistance), (4) 多靶点和多途径的耐药机制已经阐明 (Resistance mechanisms to TRAIL), (5) 有效规避耐药的方法探索呈异常活跃 (Resistance and effective therapies)。

[0007] 几乎所有的TRAIL敏感肿瘤细胞在其凋亡信号通路中的各个环节和因素均具有相似的完整和功能,而每一种TRAIL耐药肿瘤细胞均在凋亡信号通路中的一些环节和因素存在缺陷和变异,这些缺陷和变异使得这些耐药的肿瘤细胞凋亡阈值异常升高,较易逃避凋亡清除,从而持续生长增殖。

[0008] 制约Apo2L/TRAIL发挥较好临床疗效的因素还包括rshTRAIL蛋白本身,由于三聚体是TRAIL的稳定活性形式,而TRAIL三聚体的制备贮存困难和结构高度异质 (Trimer has low stability),TRAIL的体内生物半衰期较短 (Inherent short-half-life),不具备较好的药代动力学特性。

[0009] 大量研究证实,单用Apo2L/TRAIL对于许多肿瘤细胞并不产生高效的抑制和杀伤作用。究其原因,肿瘤细胞凋亡信号通路是一个十分复杂庞大的系统,其中既包含许多促凋亡因素,又包含大量的凋亡抑制因子,这两方面因素的相互作用决定了肿瘤细胞的最后归宿。凋亡信号通路的健全和功能是肿瘤细胞凋亡的必要条件,但并不是充分条件。肿瘤凋亡信号通路的多样性表现在:(1) 外源性和内源性凋亡信号通路,包括促凋亡因子和抗凋亡因子。促凋亡因子包括Caspases、DRs、FADD、Smac、Bax、Bak等,抗凋亡因子包括c-FLIP、XIAP、Bcl-2、Mcl-1等。(2) 促存活信号通路,包括NF $\kappa$ B、PI3K、Akt、MAPK等。(3) 肿瘤细胞凋亡缺陷的异质性,肿瘤细胞的凋亡缺陷可以发生在凋亡信号通路的不同环节。研究发现,TRAIL本身生物学功能具有多样性。TRAIL受体激动剂与TRAIL受体结合,通过经典信号通路,形成死亡诱导复合物,启动细胞凋亡。TRAIL受体激动剂还与TRAIL受体结合,形成二级复合体,通过非经典信号通路,活化包括I $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B、MAPKs、PKC、PI3K/Akt、Src等不同的激酶,直接或间接诱导非凋亡反应。这些信号通路的激活与肿瘤的增殖和转移相关。

[0010] TRAIL受体激动剂需要通过一些物质的调控方能定向发挥并增强抗肿瘤的作用。多种不同类型的药物、分子或基因干预均可增强TRAIL对肿瘤细胞的敏感性,这些药物包括不同类型的化疗药物、天然产物、小分子激酶抑制剂等。它们分别通过强化细胞外凋亡信号通路或线粒体凋亡信号通路或抑制其它细胞生存信号通路或几条通路的联合而增强TRAIL诱导的肿瘤细胞凋亡活性。外源性凋亡信号通路的作用环节包括上调DRs,促进DRs向脂筏微区域的移动和聚集,促进FADD、DISC向受体-配体复合物的募集,增强Caspases的活性,抑制凋亡拮抗因子FLIP、XIAP、IAPs的活性等。线粒体凋亡信号通路的环节包括增强线粒体膜电势去极化,促使线粒体释放Cyt<sub>c</sub>、Smac或ARTS,促使Bid裂解为tBid,促使Bax、Bad寡聚化,抑制凋亡拮抗Bcl-2、Bcl-xL、Bcl-w、Mcl-1、Survivin等因子等。抑制其它细胞生存信号通路包括ERK/PI3K/Akt、MEK、Jak-STAT3、MAPK、NF- $\kappa$ B等。

[0011] Genentech Inc最早在多种动物模型上对ApoL/TRAIL的药代动力学进行了研究。啮齿动物单次静脉注射Apo2L/TRAIL的血浆半衰期为3~5分钟,而在灵长类动物则为23~31分钟。在食蟹猴1小时静脉注射Apo2L/TRAIL (0, 10, 30或100mg/kg),药物快速清除,多次给药(最高剂量为100mg/kg)的血浆半衰期为28~30分钟,多次给药并不改变药物的半衰期,也不引起药物蓄积。Apo2L/TRAIL在研究的剂量范围内呈线性药代动力学特性,血清药物浓度的曲线下面积(AUC)与最大血药浓度的增加(C<sub>max</sub>)与剂量呈比例增加。在黑猩猩的

体内研究中(给药剂量为1,5,50mg/kg)也符合上述规律。

[0012] Apo2L/TRAIL给药途径的选择。在一组裸鼠移植瘤模型上证明,Apo2L/TRAIL静脉注射对于肿瘤的生长抑制作用优于腹腔注射。在多种裸鼠移植瘤模型上,Apo2L/TRAIL短时间静脉注射(1小时/天或3小时/天)或持续静脉注射(24小时/天)均能明显抑制肿瘤的生长,但短时间静脉注射的疗效优越于长时间持续给药。结果显示,短时间维持相对较高的血药浓度比持续暴露于较低药物浓度下的抗肿瘤作用更强。1小时/天与3小时/天静脉注射给药的直接比较显示,1小时/天的给药方式与3小时/天的给药方式至少具有相同的活性,因此临床上选择1小时/天的给药方法。

[0013] Apo2L/TRAIL量效关系的确定。在一组裸鼠移植瘤模型上证明,Apo2L/TRAIL短时间静脉注射(1小时/天或3小时/天)的高峰药效剂量为30~90mg/kg,此外采用5天的短时间连续静脉注射(每日一次)的疗效优于相同剂量下3天的短时间连续静脉注射(每日一次),而5天的静脉注射足以抑制肿瘤的生长。结合Apo2L/TRAIL较短的药物代谢半衰期(21~31分钟),因此最后确定的给药方案为每日一次(1小时/天),连续静脉注射5天,每三周重复一次,这也与临床上多种化疗药物的使用疗程保持一致。

[0014] 尽管如此,Genentech Inc公开的实验数据显示,每日一次(1小时/天),连续静脉注射5天,每三周重复一次给药方案的临床前药效并不理想,这也是导致Apo2L/TRAIL临床疗效不理想的重要原因之一。临床前实验数据显示,对于Apo2L/TRAIL高度敏感细胞(如结肠癌细胞COLO205、非小细胞肺癌细胞NCI-H2122等)裸鼠异种移植瘤模型,每日一次(1小时/天),连续静脉注射5天的给药方案,肿瘤在第0~5(7)天明显缩小,10天以后肿瘤又继续增长。对于中度敏感细胞(如非小细胞肺癌NCI-H460)裸鼠异种移植瘤模型,每日一次(1小时/天),连续静脉注射5天的给药方案,肿瘤在第0~5天增长缓慢,而5天以后肿瘤却增长迅速,与阴性对照组无差异。上述实验结果表明,每日一次(1小时/天),连续静脉注射5天的给药方案并不能持续(在21天的一个治疗周期内)抑制肿瘤生长,这种给药方案并不是Apo2L/TRAIL的最佳给药方案。

[0015] Genentech Inc确定的给药方案至少存在4个方面的缺陷:(1)不同敏感程度的肿瘤细胞对于Apo2L/TRAIL的治疗反应不同,Apo2L/TRAIL给药方案确定的数据来源主要基于其对于高度敏感和中度敏感肿瘤细胞的抑制作用,而并不能完全代表其对相对耐药肿瘤细胞的实际作用,因此给药方案确定的实验依据不够全面,适用性受到限制。(2)即便对于高度敏感和中度敏感的肿瘤细胞,Apo2L/TRAIL静脉注射、每日一次、连续5天的给药方案仍不能持续抑制肿瘤细胞的生长。Apo2L/TRAIL在给药期间对肿瘤生长的抑制作用明显,而停药后对肿瘤生长的抑制作用迅速消失,疗程的后半段实际上处于无药物效应的作用之下。(3)Genentech Inc并未探索延长Apo2L/TRAIL给药时间(静脉注射、每日一次、连续10天或15天)与静脉注射、每日一次、连续5天给药方案疗效的差异。根据我们的研究数据,静脉注射、每日一次、连续10天或15天给药方案的抑瘤作用优于静脉注射、每日一次、连续5天给药方案。(4)Genentech Inc并未探索Apo2L/TRAIL静脉注射、间隔、重复、多次给药与静脉注射、每日一次、连续5天给药方案疗效的差异。

## 发明内容

[0016] 而采用间隔、重复、全疗程药物暴露的给药方案正是本发明大幅度提高TRAIL类蛋

白持续抑制肿瘤生长作用的关键所在。

[0017] 因此,针对现有技术的缺陷,本发明的目的是提供一种TRAIL类蛋白持续抑制肿瘤细胞生长的给药方法,其能大幅度提高TRAIL类蛋白持续抑制多种肿瘤细胞生长。

[0018] 本发明的技术方案是这样实现的:

[0019] 一种TRAIL类蛋白持续抑制肿瘤细胞生长的给药方法,其是间隔、重复及全疗程药物暴露的给药,即是延长给药间隔,增加肿瘤细胞在全疗程的药物暴露时间,使药物在全疗程的作用不衰减,从而持续抑制肿瘤生长。

[0020] 进一步地,所述TRAIL类蛋白包括天然或重组的Apo2L/TRAIL蛋白胞膜114-281aa外段、TRAIL受体选择性突变体、TRAIL穿膜肽样突变体的TRAIL-Mu3、TRAIL-MuR5和TRAIL-MuR6、TRAIL穿膜肽突变蛋白的TRAIL-MuR5S4TR和TRAIL-MuR6S4TR以及其它突变体中的一种或几种,其中所述其他突变体的氨基酸序列与野生型蛋白的相似度在75%以上。

[0021] 进一步地,所述肿瘤细胞为实体瘤或骨髓来源肿瘤,所述实体瘤包括肺癌、结直肠癌、乳腺癌、胰腺癌、肝癌、胃癌、卵巢癌、肾癌、脑瘤、骨软骨瘤、前列腺癌中的一种或几种;所述骨髓来源肿瘤包括白血病、非何杰金淋巴瘤中的一种或几种。

[0022] 进一步地,持续抑制肿瘤细胞生长包括体外细胞水平抑瘤作用和动物体内实验抑瘤作用;在体外实验中,TRAIL类蛋白在有效剂量范围内与细胞作用,观察24-96小时药物对肿瘤细胞的抑制率;在不同敏感性的肿瘤细胞中,TRAIL类蛋白对肿瘤细胞生长在24-72小时均处于抑制的高峰,对于高度敏感的细胞株或较高的作用浓度,其抑瘤的高峰时间持续到96小时;在体内实验中,不同间隔给药方法的动物移植瘤在21天内均呈明显生长抑制状态,其相对肿瘤生长率T/C均 $\leq$ 40%。

[0023] 进一步地,与每天用药一次、连续用药五天的疗法相比,在肿瘤细胞裸鼠移植瘤模型上抑瘤率至少提高20%以上,作用持续时间在一个疗程21天内延长5天以上。

[0024] 进一步地,间隔、重复及全疗程药物暴露的给药方案包括如下的任意一个:

[0025] (1) TRAIL类蛋白静脉注射,隔日一次,从疗程0日起,给药时间分别为0,2,4,6,8,10,12,14,16,18或分别为0,2,4,6,8,10,12,14,16,18,20,每21天为一个疗程;

[0026] (2) TRAIL类蛋白静脉注射,每周三次,从疗程0日起,给药时间分别为0,2,4,7,9,11,14,16,18,每21天为一个疗程;

[0027] (3) TRAIL类蛋白静脉注射,每三天给药一次,从疗程0日起,给药时间分别为0,3,6,9,12,15,18,每21天为一个疗程;

[0028] (4) TRAIL类蛋白静脉注射,每四天给药一次,从疗程0日起,给药时间分别为0,4,8,12,16,20,每21天为一个疗程。

[0029] 进一步地,由于单次给予Apo2L/TRAIL药物的最大耐受量超过1500mg/kg,采用高于其体内外起效的最低作用浓度,延长其给药间隔。

[0030] 合理用药是临床药理学多年来一个经久不衰的课题,为此许多药学家为此做了大量的卓有成效的工作,对于疾病确诊后,正确选择治疗药物,合理确定给药间隔,是病人早期康复的关键所在。

[0031] 药物代谢半衰期( $t_{1/2}$ )又称生物半衰期与生物半效期,指血浆药物浓度由最大值下降一半时所需的时间,通常用 $t_{1/2}$ 表示。药物半衰期长表示在体内消除慢,滞留时间长。因此注意药物半衰期,对于掌握药物在体内停留时间,积蓄程度,特别是确定反复用药治疗的

给药间隔时间,调整给药方案具有很大的价值。药物半衰期确定给药间隔,对于保障反复用药的药物安全,避免药物蓄积导致的药物毒副作用具有重要作用。但药物半衰期与药物作用持续时间往往不一致,药物半衰期不等同于药物作用持续时间。传统上,用药间隔时间主要参考药物半衰期(药物消除速度)是一种更考虑用药安全的做法。实际上,根据药物半衰期确定给药间隔是有其适应范围。一些给药间隔时间适当值,与其药物 $t_{1/2}$ 数值基本吻合的药物,适用于根据 $t_{1/2}$ 来确定给药间隔。例如中效消除类药物( $t_{1/2}=4\sim 8h$ ),如环丙沙星、诺氧沙星、阿托品。甲氧氯普胺(胃复安)、氨苯喋呤等,可给药3次或4次/d。慢效消除类药物( $t_{1/2}=8\sim 12h$ ),如磺胺甲基异噁唑、格列齐特(达美康)、酮康唑(里素芬)、二性霉素等,每日给药2次。超慢速消除类药物( $t_{1/2}>24h$ ),如吡罗昔康(炎痛喜康)、硝基西泮、地高辛、氯磺丙脲等,每日给药1次即可。药物半衰期特别短的超快速清除类药物( $t_{1/2}\leq 1h$ )和快速清除类药物( $t_{1/2}=1\sim 4h$ ),因其在体内消除快,欲维持所需的血药浓度,依据 $t_{1/2}$ 安排给药间隔时间,必须增加给药次数,频繁给药,这样不仅患者不能接受,临床也做不到。例如青霉素在体内代谢及排泄都非常快,其半衰期仅0.5h。若按 $t_{1/2}$ 频繁给药以维持所需的血药浓度显然是不可取的。临床实际上青霉素给药间隔比其 $t_{1/2}$ 长得多。这是由于给药量大,它所达到的血药浓度大大超过对大多数微生物的最小抑菌浓度。换言之,青霉素的安全性好,治疗指数高,给药次数可适当减少,给药剂量越大给药间隔就越长。对于 $t_{1/2}$ 特别长的药物,如超慢速消除类药物( $t_{1/2}=200h$ )中的洋地黄毒苷,若按 $t_{1/2}$ 每隔9天给药一次,血药浓度波动大,不良反应大,临床上常采取小剂量每日给药一次,这样血药浓度的波动小,安全范围扩大。总之 $t_{1/2}$ 反映药物从体内消除速度的快慢,对于消除快, $t_{1/2}$ 短的药物给药次数要比 $t_{1/2}$ 长的药物频繁,对于治疗指数高的药物可适当延长给药间隔。Apo2L/TRAIL在啮齿类动物的生物半衰期为3~5分钟,在非人灵长类的动物的生物半衰期为23~31分钟,属于超快速清除类药物。Apo2L/TRAIL的快速清除主要通过肾脏完成,其清除与肾小球滤过率高度相关。单次给予Apo2L/TRAIL药物的最大耐受量超过1500mg/kg,其安全性非常高,治疗指数特别大。Apo2L/TRAIL并不适合严格按照其药物代谢半衰期确定用药间隔,因此采用高于其体内外起效的最低作用浓度,从而延长其给药间隔是可行的。

[0032] 越来越多的研究揭示,许多药物的代谢指标与其生物学作用持续时间并不完全一致,一些药物存在药物后效应。如许多抗生素类药物即存在停药后效应(Post antibiotic effect, PAE)。PAE是指细菌与抗生素短暂接触后,当药物浓度降低于最低抑菌浓度(MIC)或消除后,细菌生长受持续抑制的效应。近二十年来国内外对PAE的研究逐渐广泛和深入,并将PAE作为评价抗生素的重要参数和设计临床给药方案的重要依据,用于指导感染性疾病的治疗。长期以来人们认为抗菌药物必须达到并维持有效血药浓度才能发挥良好的抗菌效果。故先前抗生素的使用多根据细菌的药物敏感程度和药物有效血药浓度、半衰期清除率等药代动力学参数确定给药剂量和给药间隔,而忽略了药物对细菌的生长繁殖规律的影响以及人体免疫机制在杀灭细菌过程中所起的作用。人们观察到细菌与抗生素作用后,当药物清除后,可使细菌产生多种可检测到的变化:如酶与非酶蛋白的活性、细胞形态等改变。细菌代谢及生长抑制细菌受体改变、对吞噬作用的敏感性的改变以及对抗生素再接触的敏感性的改变等,这样改变就是抗生素的抗菌后效应。Apo2L/TRAIL对于肿瘤细胞的抑制亦存在明确的抑瘤后效应。我们通过研究发现, Apo2L/TRAIL对于不同肿瘤细胞具有不同的敏感性,对于高度敏感的肿瘤细胞,当Apo2L/TRAIL一定浓度范围与肿瘤细胞作用5分钟,然



后用培养基将Apo2L/TRAIL洗脱,在37℃培养24~72小时,经洗脱的培养孔与正常作用对照孔比较,其对肿瘤的抑制作用在24~72小时没有差异。对于相对耐药的肿瘤细胞,当Apo2L/TRAIL在较高的浓度范围内与肿瘤细胞作用1小时,然后用培养基将Apo2L/TRAIL洗脱,在37℃培养24~72小时,经洗脱的培养孔与正常作用对照孔比较,其对肿瘤的抑制作用在24~72小时没有差异。上述实验表明,Apo2L/TRAIL能快速结合于敏感肿瘤细胞膜上的死亡受体而引起凋亡信号通路的转导,上述过程一旦启动,其后续过程不再依赖于细胞外游离Apo2L/TRAIL的存在,而对于耐药的肿瘤细胞,上述过程所需的接触启动时间更长。当Apo2L/TRAIL在一定浓度范围内与肿瘤细胞作用,观察24~96小时药物对肿瘤细胞的抑制率,结果发现,在敏感度不同的多种肿瘤细胞中,Apo2L/TRAIL使用浓度越高,其持续抑制肿瘤细胞增殖的时间越快。对于较高的作用浓度,Apo2L/TRAIL对肿瘤细胞的抑制在24~96小时均维持药效高峰,对于较低的作用浓度,Apo2L/TRAIL对肿瘤细胞的抑制在24小时达到高峰药效,48~72小时逐渐下降,84小时和96小时作用完全消失。上述实验表明,Apo2L/TRAIL与肿瘤细胞的作用,起效迅速,作用持久。Apo2L/TRAIL与肿瘤细胞膜上的死亡受体的结合是严格浓度依赖和亲和依赖的,而与初始的肿瘤细胞上受体数目并无相关性,这种结合依肿瘤细胞的药物敏感程度而存在差异,敏感细胞的结合非常迅速(5分钟),而耐药细胞结合较慢(1小时)。当Apo2L/TRAIL与细胞膜上的死亡受体(DR4、DR5)结合后使受体多聚化,迅速引起配体/受体复合物在细胞膜脂筏微区域的聚集和重分布,接着配体/受体复合物募集受体分子Fas相关死亡结构域(Adaptor molecule Fas-associated death domain,FADD)以及前Caspase-8;形成死亡诱导信号复合体(Death-inducing signaling complex,DISC)。随后Caspase-8活化经线粒体依赖途径和非线粒体依赖途径引发凋亡的生物效应。非线粒体依赖途径主要是起始阶段Caspases,如Caspase8、9、10活化,引起Caspases蛋白酶级联反应,进一步链式水解激活下游的同源酶效应阶段Caspases,如Caspase6、7,最后激活Caspase-3。线粒体依赖途径通过各种凋亡促发因素改变线粒体跨膜电位,增加线粒体通透性,导致粗凋亡细胞色素c(Cytochrome c,Cyt c)和Smac/DIABLO等的释放及caspase活化,凋亡蛋白bc1-2家族是其中重要的调节因素。两条凋亡信号通路最终汇合于Caspase-3,再由Caspase-3催化诸多凋亡相关靶向分子分解导致细胞凋亡。凋亡信号通路的转导和传递过程复杂冗长,经历的环节繁多耗时,这是Apo2L/TRAIL诱导肿瘤细胞凋亡抑瘤后效应的分子解释。

[0033] 在体外实验中,TRAIL类蛋白(TRAIL-Mu3及TRAIL-MuR5S4TR)在一定浓度(剂量)范围内与细胞作用,观察24~96小时药物对肿瘤细胞的抑制率。在不同敏感性的肿瘤细胞中,TRAIL类蛋白对肿瘤细胞生长在24~72小时均处于抑制的高峰,对于高度敏感的细胞株(或较高的作用浓度),其抑瘤的高峰时间持续到96小时。

[0034] 不同给药次数动物体内实验显示,相比生理盐水组,紫杉醇组,TRAIL(每日一次,连续给药5天、每日一次,连续给药5天,间隔2天,再连续给药5天及每日一次,连续给药5天后间隔2天再次连续给药5天,再次间隔2天后再次连续给药5天三个不同给药时间)组对人肺癌NCI-H460裸鼠异种移植瘤有一定的抑制作用,其中静脉注射,每日一次,连续给药5天,间隔2天,再连续给药5天组及每日一次,连续给药5天后间隔2天再次连续给药5天,再次间隔2天后再次连续给药5天组的疗效明显优越于单独每日一次,连续给药5天组,给药后,抑瘤率均出现显著性差异。但方案3与方案2相比抑瘤作用的提高无统计学意义( $P>0.05$ )。实

验表明,增加给药次数(延长给药时间)可明显提高药物对裸鼠移植瘤模型的抑瘤率,但给药次数在15次与10次相比,抑瘤率的提高不明显。

[0035] 不同给药间隔动物体内实验显示,相比生理盐水组,紫杉醇组,TRAIL-Mu3组和MuR5S4TR各组,对人肺癌NCI-H460裸鼠异种移植瘤有一定的抑制作用,给药后,抑瘤率均出现显著性差异,其中TRAIL-Mu3和MuR5S4TR两药隔日给药组和每周三次,三周给药组的抑瘤作用优越于每日给药,连续5天,共两周组。TRAIL-Mu3和MuR5S4TR两药隔日给药组和每周三次,三周给药组的抑瘤作用疗效相当。

[0036] 不同给药间隔动物体内实验显示,相比溶媒组,CPT-11组,TRAIL-Mu3 72mg/kg每周三次给药组,TRAIL-Mu3 93mg/kg每三天给药一次组,TRAIL-Mu3 108mg/kg每四天给药一次组,MuR5S4TR 105mg/kg每周三次给药组,MuR5S4TR 135mg/kg每三天给药一次组,MuR5S4TR 158mg/kg每四天给药一次组对人结肠癌细胞HT-29裸鼠异种移植瘤有均有一定的抑制作用,给药后,抑瘤率均出现显著性差异;TRAIL-Mu3及TRAIL-MuR5S4TR每三天给药一次组和每四天给药一次组的肿瘤抑制效应明显优越于每周三次给药组,而每三天给药一次组和每四天给药一次组的肿瘤抑制效应无显著性差异。

[0037] 不同给药间隔动物体内实验显示,相比溶媒组,吉西他滨组,TRAIL-Mu3 72mg/kg每周三次、连续三周组,TRAIL-Mu3 93mg/kg每三天一次、连续三周组,TRAIL-Mu3 108mg/kg每四天一次、连续三周组,MuR5S4TR 105mg/kg每周三次、连续三周组,MuR5S4TR 135mg/kg每三天一次、连续三周组,MuR5S4TR 158mg/kg每四天一次、连续三周组对人胰腺癌细胞PANC-1裸鼠异种移植瘤有均有明显的抑制作用,给药后,抑瘤率均出现显著性差异;TRAIL-Mu3 72mg/kg每周三次、连续三周组,TRAIL-Mu3 93mg/kg每三天一次、连续三周组,TRAIL-Mu3 108mg/kg每四天一次、连续三周组各组之间疗效没有差异;MuR5S4TR 105mg/kg每周三次、连续三周组,MuR5S4TR 135mg/kg每三天一次、连续三周组,MuR5S4TR 158mg/kg每四天一次、连续三周组各组之间疗效没有差异。

[0038] 本发明所述的TRAIL类蛋白持续抑制肿瘤细胞生长的给药方法,可理解为是一种TRAIL类蛋白在制备用于持续抑制肿瘤细胞生长的药物中的用途。并可在必要的时候,做等同理解或修改。

[0039] 本发明的有益效果在于:

[0040] 该发明方案的设计不拘泥于药物代谢半衰期,而是充分研究了药物体内外作用的持续时间和抑瘤后效应,将其用于指导设计合理的给药间隔,最后得到的给药方法为间隔、重复、全疗程药物暴露的新型给药方案。该方案与先前文献报道的方法相比延长了给药间隔,增加了肿瘤细胞在全疗程中药物作用时间,从而具有更强的抑制肿瘤生长活性,且在全疗程中作用不衰减,具有持续抑制肿瘤生长的作用。间隔、重复、全疗程药物暴露的给药方案是优化TRAIL类蛋白给药方法,大幅度提高TRAIL类蛋白持续抑制多种肿瘤细胞生长的更为优良的给药方案。在提高疗效和作用持续时间的同时,减少患者的治疗痛苦,提高患者的依从性,符合临床应用实际,具有极大的可操作性,便于临床推广。

## 附图说明

[0041] 图1为TRAIL-Mu3对NCI-H460细胞生长抑制效应随时间变化关系图。

[0042] TRAIL-Mu3以不同浓度(剂量)与肺癌细胞NCI-H460共培养,分别观察24、48、72、84

或96小时,测定各时间点不同药物浓度(剂量)的肿瘤生长抑制率。结果显示,药物浓度(剂量)在0.02~5ug/ml时,肿瘤生长抑制率在24~72小时之间处于抑瘤效应的高峰平台期(最低浓度抑瘤率为80.33%),肿瘤生长抑制率在96小时衰减仍不明显(最低浓度抑瘤率为46.30%)。

[0043] 图2为TRAIL-MuR5S4TR对NCI-H460细胞生长抑制效应随时间变化关系图。

[0044] TRAIL-MuR5S4TR以不同浓度(剂量)与肺癌细胞NCI-H460共培养,分别观察24、48、72、84或96小时,测定各时间点不同药物浓度(剂量)的肿瘤生长抑制率。结果显示,药物浓度(剂量)在0.04~10ug/ml时,肿瘤生长抑制率在24~72小时之间处于抑瘤效应的高峰平台期(最低浓度抑瘤率为88.93%),肿瘤生长抑制率在96小时衰减仍不明显(最低浓度抑瘤率为68.76%)。

[0045] 图3为TRAIL-Mu3对Calu-1细胞生长抑制效应随时间变化关系图。

[0046] TRAIL-Mu3以不同浓度(剂量)与肺癌细胞Calu-1共培养,分别观察24、48、72、84或96小时,测定各时间点不同药物浓度(剂量)的肿瘤生长抑制率。结果显示,药物浓度(剂量)在33.3~100ug/ml时,肿瘤生长抑制率在24~72小时之间处于抑瘤效应的高峰平台期(最低浓度抑瘤率为69.76%),肿瘤生长抑制率在96小时衰减仍不明显(最低浓度抑瘤率为78.28%)。

[0047] 图4为TRAIL-MuR5S4TR对Calu-1细胞生长抑制效应随时间变化关系图。

[0048] TRAIL-MuR5S4TR以不同浓度(剂量)与肺癌细胞Calu-1共培养,分别观察24、48、72、84或96小时,测定各时间点不同药物浓度(剂量)的肿瘤生长抑制率。结果显示,药物浓度(剂量)在33.3~100ug/ml时,肿瘤生长抑制率在24~72小时之间处于抑瘤效应的高峰平台期(最低浓度抑瘤率为80.75%),肿瘤生长抑制率在96小时衰减仍不明显(最低浓度抑瘤率为90.89%)。

[0049] 图5为TRAIL-Mu3对NCI-H1299细胞生长抑制效应随时间变化关系图。

[0050] TRAIL-Mu3以不同浓度(剂量)与肺癌细胞NCI-H1299共培养,分别观察24、48、72、84或96小时,测定各时间点不同药物浓度(剂量)的肿瘤生长抑制率。结果显示,药物浓度(剂量)在5.55~50ug/ml时,肿瘤生长抑制率在24~72小时之间处于抑瘤效应的高峰平台期(最低浓度抑瘤率为87.56%),肿瘤生长抑制率在96小时衰减仍不明显(最低浓度抑瘤率为71.20%)。

[0051] 图6为TRAIL-MuR5S4TR对NCI-H1299细胞生长抑制效应随时间变化关系图。

[0052] TRAIL-MuR5S4TR以不同浓度(剂量)与肺癌细胞NCI-H1299共培养,分别观察24、48、72、84或96小时,测定各时间点不同药物浓度(剂量)的肿瘤生长抑制率。结果显示,药物浓度(剂量)在5.55~50ug/ml时,肿瘤生长抑制率在24~72小时之间处于抑瘤效应的高峰平台期(最低浓度抑瘤率为88.88%),肿瘤生长抑制率在96小时衰减仍不明显(最低浓度抑瘤率为75.15%)。

[0053] 图7为TRAIL不同给药次数在人肺癌NCI-H460裸鼠移植瘤模型中对动物中瘤体积的影响图。

[0054] 与溶媒组比,紫杉醇(25mg/kg)对人肺癌NCI-H460裸鼠异种移植瘤抑制作用有显著性差异,在Day10时,相对肿瘤增殖率T/C为34.88%;到Day21时,T/C为46.12%。

[0055] 相比溶媒组,本实验中,三个不同给药频率组TRAIL-Mu3对人肺癌NCI-H460裸鼠异

种移植瘤均显著性抑制作用。

[0056] TRAIL(每日一次,连续给5天,方案1:共5次)组,对人肺癌NCI-H460裸鼠异种移植瘤抑制作用在Day3出现显著性差异,相对肿瘤增殖率T/C为39.30%( $P<0.001$ ),在Day10时,相对肿瘤增殖率T/C为54.99%( $P<0.001$ ),到Day21,相对肿瘤增殖率T/C为56.31%( $P<0.01$ )。

[0057] TRAIL(每日一次,连续给药5天,间隔2天,再连续给药5天,方案2:共10次)组,对人肺癌NCI-H460裸鼠异种移植瘤抑制作用在Day3出现显著性差异,相对肿瘤增殖率T/C为32.68%( $P<0.001$ ),在Day10时,相对肿瘤增殖率T/C为34.12%( $P<0.001$ ),到Day21,相对肿瘤增殖率T/C为37.48%( $P<0.001$ )。

[0058] TRAIL(每日一次,连续给药5天后间隔2天再次连续给药5天,再次间隔2天后再次连续给药5天,方案3:共15次)组,对人肺癌NCI-H460裸鼠异种移植瘤抑制作用在Day3出现显著性差异,相对肿瘤增殖率T/C为36.79%( $P<0.001$ ),在Day10时,相对肿瘤增殖率T/C为34.46%( $P<0.001$ ),到Day21,相对肿瘤增殖率T/C为32.87%( $P<0.001$ )。

[0059] 图8为TRAIL不同给药次数在人肺癌NCI-H460裸鼠移植瘤模型中对动物中瘤重量的影响图。

[0060] Day21实验结束,所有动物在称量体重和肿瘤体积后处死,肿瘤从动物身上分离,并称重。生理盐水组,紫杉醇组,TRAIL(每日一次,连续给药5天、每日一次,连续给药5天,间隔2天,再连续给药5天或每日一次,连续给药5天后间隔2天再次连续给药5天,再次间隔2天后再次连续给药5天三个不同给药时间)组各组的肿瘤平均重量分别是1.532g,0.728g,0.845g,0.646g及0.602g。

[0061] 图9为TRAIL-Mu3及TRAIL-MuR5S4TR不同给药间隔在人肺癌NCI-H460裸鼠移植瘤模型中对动物中瘤体积的影响图。

[0062] 与溶媒组比,紫杉醇(20mg/kg)对人肺癌NCI-H460裸鼠异种移植瘤抑制作用有显著性差异,但实验过程中,相对肿瘤增殖率T/C $>40\%$ 。

[0063] 相比溶媒组,本实验中,三个不同给药频率组TRAIL-Mu3对人肺癌NCI-H460裸鼠异种移植瘤均显著性抑制作用。

[0064] TRAIL-Mu3(每天一次,连续给5天,共给两周)组,对人肺癌NCI-H460裸鼠异种移植瘤抑制作用在Day4出现显著性差异,相对肿瘤增殖率T/C为43.97%( $P<0.001$ ),在Day11时,相对肿瘤增殖率T/C最小,为24.75%( $P<0.001$ ),到Day21,相对肿瘤增殖率T/C为33.5%( $P<0.01$ )。

[0065] TRAIL-Mu3(2天一次,共10次)组,对人肺癌NCI-H460裸鼠异种移植瘤抑制作用在Day4出现显著性差异,相对肿瘤增殖率T/C为51.77%( $P<0.001$ ),在Day14时,相对肿瘤增殖率T/C最小,为16.16%( $P<0.001$ ),到Day21,相对肿瘤增殖率T/C为17.63%( $P<0.001$ )。

[0066] TRAIL-Mu3(一周3次,共给3周)组,对人肺癌NCI-H460裸鼠异种移植瘤抑制作用在Day4出现显著性差异,相对肿瘤增殖率T/C为48.94%( $P<0.001$ ),在Day18时,相对肿瘤增殖率T/C最小,为16.61%( $P<0.001$ ),到Day21,相对肿瘤增殖率T/C为16.75%( $P<0.001$ )。

[0067] 与TRAIL-Mu3相似,三个不同给药频率组MuR5S4TR对人肺癌NCI-H460裸鼠异种移植瘤均显著性抑制作用。

[0068] MuR5S4TR(每天一次,连续给5天,共给两周)组,对人肺癌NCI-H460裸鼠异种移植

瘤抑制作用在Day4出现显著性差异,相对肿瘤增值率T/C为59.57% ( $P < 0.001$ ),到Day21,相对肿瘤增值率T/C为38.92% ( $P < 0.01$ )。

[0069] MuR5S4TR (2天一次,共10次)组,对人肺癌NCI-H460裸鼠异种移植瘤抑制作用在Day4出现显著性差异,相对肿瘤增值率T/C为54.61% ( $P < 0.001$ ),到Day21,相对肿瘤增值率T/C最小,为24.43% ( $P < 0.001$ )。

[0070] MuR5S4TR (一周3次,共给3周)组,对人肺癌NCI-H460裸鼠异种移植瘤抑制作用在Day4出现显著性差异,相对肿瘤增值率T/C为56.03% ( $P < 0.001$ ),在Day21时,相对肿瘤增值率T/C最小,为24.43% ( $P < 0.001$ )。

[0071] 图10为TRAIL-Mu3及TRAIL-MuR5S4TR不同给药间隔在人肺癌NCI-H460裸鼠移植瘤模型中对动物中瘤重量的影响图。

[0072] Day21实验结束,所有动物在称量体重和肿瘤体积后处死,肿瘤从动物身上分离,并称重。生理盐水组,紫杉醇组,TRAIL-Mu3 (三个不同给药频率)组,和MuR5S4TR (三个不同给药频率)组,各组的肿瘤平均重量分别是0.911g,0.658g,0.366g,0.170g,0.170g,0.416g,0.249和0.237g。

[0073] 图11为TRAIL-Mu3及TRAIL-MuR5S4TR不同给药间隔在人结肠癌HT-29裸鼠移植瘤模型中对动物中瘤体积的影响图。

[0074] 与溶媒组比,CPT-11,对人结肠癌细胞HT-29裸鼠异种移植瘤有一定的抑制作用,抑瘤率出现显著性差异,在Day3时,T/C出现显著性差异,为88.74% ( $P < 0.05$ );在Day21时,T/C最小,为29.14% ( $P < 0.001$ )

[0075] TRAIL-Mu3 72mg/kg每周三次给药组,对人结肠癌细胞HT-29裸鼠异种移植瘤有一定的抑制作用,在Day7时,T/C出现显著性差异,为54.69% ( $P < 0.05$ );在Day21时,T/C最小,为36.43% ( $P < 0.01$ )。

[0076] TRAIL-Mu3 93mg/kg每三天次给药一次组,对人结肠癌细胞HT-29裸鼠异种移植瘤有一定的抑制作用,在Day3时,T/C出现显著性差异,为81.84% ( $P < 0.05$ );在Day21时,T/C最小,为28.00% ( $P < 0.01$ )。

[0077] TRAIL-Mu3 108mg/kg每四天给药一次组,对人结肠癌细胞HT-29裸鼠异种移植瘤有一定的抑制作用,在Day3时,T/C出现显著性差异,为85.49% ( $P < 0.05$ );在Day21时,T/C最小,为28.69% ( $P < 0.01$ )。

[0078] MuR5S4TR 105mg/kg每周给药三次组,对人结肠癌细胞HT-29裸鼠异种移植瘤有一定的抑制作用,在Day3时,T/C出现显著性差异,为88.26% ( $P < 0.05$ );在Day21时,T/C最小,为42.86% ( $P < 0.01$ )。

[0079] MuR5S4TR 135mg/kg每三天给药一次组,对人结肠癌细胞HT-29裸鼠异种移植瘤有一定的抑制作用,在Day7时,T/C出现显著性差异,为53.26% ( $P < 0.05$ );在Day21时,T/C最小,为29.03% ( $P < 0.01$ )。

[0080] MuR5S4TR 158mg/kg每四天给药一次组,对人结肠癌细胞HT-29裸鼠异种移植瘤有一定的抑制作用,在Day7时,T/C出现显著性差异,为51.53% ( $P < 0.05$ );在Day21时,T/C最小,为28.87% ( $P < 0.01$ )。

[0081] 图12为TRAIL-Mu3及TRAIL-MuR5S4TR不同给药间隔在人结肠癌HT-29裸鼠移植瘤模型中对动物中瘤重量的影响图。

[0082] Day21实验结束,所有动物在称量体重和肿瘤体积后处死,肿瘤从动物身上分离,并称重。溶媒组,CPT-11组,TRAIL-Mu3 72mg/kg每周三次给药组,TRAIL-Mu3 93mg/kg每三天给药一次组,TRAIL-Mu3 108mg/kg每四天给药一次组,MuR5S4TR 105mg/kg每周三次给药组,MuR5S4TR 135mg/kg每三天给药一次组,MuR5S4TR 158mg/kg每四天给药一次组的肿瘤平均重量分别是1.339克,0.811克,0.898克,0.796克,0.805克,0.936克,0.823克,和0.812克。

[0083] 图13为TRAIL-Mu3及TRAIL-MuR5S4TR不同给药间隔在人胰腺癌PANC-1裸鼠移植瘤模型中对动物中瘤体积的影响图。

[0084] 与溶媒组比,吉西他滨对人胰腺癌细胞PANC-1裸鼠异种移植瘤有一定的抑制作用,抑瘤率出现显著性差异,在Day4时,T/C出现显著性差异,为80.28% ( $P < 0.05$ );在Day21时,T/C最小,为36.14% ( $P < 0.001$ )。

[0085] TRAIL-Mu3 72mg/kg每周三次,连续三周组对人胰腺癌细胞PANC-1裸鼠异种移植瘤有一定的抑制作用,抑瘤率出现显著性差异,在Day4时,T/C出现显著性差异,为73.94% ( $P < 0.01$ );在Day21时,T/C最小,为22.34% ( $P < 0.001$ )。

[0086] TRAIL-Mu3 93mg/kg每三天一次,连续三周组对人胰腺癌细胞PANC-1裸鼠异种移植瘤有一定的抑制作用,抑瘤率出现显著性差异,在Day4时,T/C出现显著性差异,为63.38% ( $P < 0.01$ );在Day21时,T/C最小,为23.25% ( $P < 0.001$ )。

[0087] TRAIL-Mu3 108mg/kg每四天一次,连续三周组对人胰腺癌细胞PANC-1裸鼠异种移植瘤有一定的抑制作用,抑瘤率出现显著性差异,在Day4时,T/C出现显著性差异,为61.27% ( $P < 0.01$ );在Day21时,T/C最小,为23.13% ( $P < 0.001$ )。

[0088] MuR5S4TR 105mg/kg每周三次,连续三周组,对人胰腺癌细胞PANC-1裸鼠异种移植瘤有一定的抑制作用,抑瘤率出现显著性差异,在Day4时,T/C出现显著性差异,为65.49% ( $P < 0.001$ );在Day21时,T/C最小,为24.82% ( $P < 0.001$ )。

[0089] MuR5S4TR 135mg/kg每三天一次,连续三周组,对人胰腺癌细胞PANC-1裸鼠异种移植瘤有一定的抑制作用,抑瘤率出现显著性差异,在Day4时,T/C出现显著性差异,为70.42% ( $P < 0.001$ );在Day21时,T/C最小,为27.00% ( $P < 0.001$ )。

[0090] MuR5S4TR 158mg/kg每四天一次,连续三周组,对人胰腺癌细胞PANC-1裸鼠异种移植瘤有一定的抑制作用,抑瘤率出现显著性差异,在Day4时,T/C出现显著性差异,为73.24% ( $P < 0.001$ );在Day21时,T/C最小,为27.02% ( $P < 0.001$ )。

[0091] 图14为TRAIL-Mu3及TRAIL-MuR5S4TR不同给药间隔在人胰腺癌PANC-1裸鼠移植瘤模型中对动物中瘤重量的影响图。

[0092] Day21实验结束,所有动物在称量体重和肿瘤体积后处死,肿瘤从动物身上分离,并称重。溶媒组,吉西他滨组( $n=7$ ),TRAIL-Mu3 72mg/kg每周三次、连续三周组,TRAIL-Mu3 93mg/kg每三天一次、连续三周组,TRAIL-Mu3 108mg/kg每四天一次、连续三周组,MuR5S4TR 105mg/kg每周三次、连续三周组,MuR5S4TR 135mg/kg每三天一次、连续三周组,MuR5S4TR 158mg/kg每四天一次、连续三周组的肿瘤平均重量分别是0.131克,0.075克,0.042克,0.044克,0.043克,0.047克,0.050克和0.052克。

## 具体实施方式

[0093] 下面通过实施例进一步阐述本发明,但本发明的保护范围并不局限于此。

[0094] 实施例1

[0095] TRAIL-Mu3及TRAIL-MuR5S4TR体外抑制肿瘤细胞生长作用时效关系的研究

[0096] 1.研究目的

[0097] 研究不同浓度(剂量)的TRAIL-Mu3及TRAIL-MuR5S4TR体外对于人肺癌细胞NCI-H460、Calu-1、NCI-H1299的抑瘤作用及其随时间变化的关系。

[0098] 2.实验材料、试剂与仪器设备

[0099] 2.1预备实验

[0100] 2.1.1细胞选择:通过之前的实验数据,(见表1)选择三株敏感程度不同的细胞用于正式实验。

[0101] 表1. TRAIL-Mu3及TRAIL-MuR5S4TR对7种肺癌细胞株的体外抑瘤作用

[0102] 实验时间	样本名	TRAIL-MuR5S4TR		TRAIL-Mu3	
	细胞株	IC <sub>50</sub> (ug/ml)	R <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub> (ug/ml)	R <sup>2</sup>
[0103] 20161221	NCI-H358	5.92E-04	0.9949	4.21E-05	0.9875
	calu-1	5.6253	0.9749	1.629	0.9927
	SK-MES-1	0.001	0.9979	0.0035	0.9915
	NCI-H1299	28.5794	0.9926	17.4291	0.9964
	NCI-H226	41.2578	0.9963	10.9216	0.9907
20150508	A549	0.0055	0.9657	0.0137	0.9978
	NCI-H460	0.008	0.9844	0.009	0.9976

[0104] 上表的数据来看,综合TRAIL-Mu3及TRAIL-MuR5S4TR的效果,选择一株敏感株:NCI-H460;一株不敏感株:NCI-H1299;一株中等敏感株:calu-1。

[0105] 2.1.2在20170314-LJ1实验(提前预实验)数据中得出这三株细胞均表现出在药物作用浓度相同的情况下,体外抗肿瘤细胞增殖抑制率在72h之前未出现随时间延长而下降的趋势。因此将药物作用时间间隔调整为24h、48h、72h、84h、96h,以便更进一步的观察时间与药物剂量的关系。

[0106] 2.1.3在20170314-LJ1实验中,显微镜下观察细胞生长情况时发现,在72h时阴性孔细胞密度过大,导致有细胞出现死亡的情况。因此在此次实验中将三株细胞的96孔板接种密度适当降低,分别调整至NCI-H460( $6 \times 10^3$ )、NCI-H1299( $4 \times 10^3$ )、Calu-1( $6 \times 10^4$ )。

[0107] 2.2材料

[0108] TRAIL-Mu3、TRAIL-MuR5S4TR由成都华创生物技术公司提供,批号:20160822。

[0109] 2.3试剂

[0110]

试剂名称	规格	生产批号	生产厂家
CCK8 试剂盒	500kit	KH659	日本同仁化学研究所

[0111] 2.4仪器设备

[0112]

设备名	型号	生产厂家
酶标仪	Infinite F50	TECAN
超净工作台	SW-CJ-2D	苏州净化设备有限公司
倒置显微镜	37XC	上海光学仪器一厂
二氧化碳孵箱	MCO-15AC	三洋电机株式会社

[0113]

电热恒温水温箱	CU600	上海一恒科学仪器有限公司
---------	-------	--------------

[0114] 3.实验方法及步骤

[0115] 3.1方法:见各试剂说明书

[0116] 3.2步骤:

[0117] 一、实验步骤

[0118] 1.细胞培养

[0119] 将细胞NCI-H460、Calu-1、NCI-H1299进行培养,培养基及培养条件见下表,2~3天换液一次,0.25%胰酶与0.02%EDTA混合(1:1)消化传代。实验时取对数生长期细胞接96孔板。

[0120]

细胞名称	培养基及培养条件
NCI-H460	RPMI-1640 +10%FBS(Gibco); CO <sub>2</sub> , 5%; 37.0°C
Calu-1	McCoy's 5A+10% FBS; CO <sub>2</sub> , 5%; 37.0°C
NCI-H1299	RPMI-1640+Sodium Pyruvate 0.11g/L+glucose 2.5g/L+10%FBS(Gibco); CO <sub>2</sub> , 5%; 37.0°C

[0121] 2. IC<sub>50</sub>实验

[0122] (1)收集对数生长期细胞,计数,用完全培养基重新悬浮细胞,调整细胞密度至合适密度NCI-H460 ( $6 \times 10^3$ )、Calu-1 ( $6 \times 10^4$ )、NCI-H1299 ( $4 \times 10^3$ ) 接种96孔板,每孔加100 $\mu$ l细胞悬液。细胞在37°C,100%相对湿度,5%CO<sub>2</sub>培养箱中孵育24小时。

[0123] (2)用细胞相对应的培养基将预试蛋白样品稀释至下表浓度后,梯度稀释10次,3倍梯度稀释,共10个浓度点,按25 $\mu$ l/孔加入细胞。



[0124]

	NCI-H460	Calu-1	NCI-H1299
TRAIL-Mu3 (ug/ml)	25	500	250
TRAIL-MuR5S4TR (ug/ml)	50	500	250

[0125] (3) 细胞置于37℃,100%相对湿度,5%CO<sub>2</sub>培养箱中,每种细胞均分别孵育24h、48h、72h、84h、96h后吸弃培养基,加入含10% CCK-8的完全培养基,再置于37℃培养箱中孵育。

[0126] (4) 待阴性孔在酶标仪450nm波长处检测OD值为1左右时,轻轻震荡后在酶标仪(Infinite F50)上测定450nm波长处的吸光度,计算抑制率。

[0127] 二、数据处理

[0128] 按下式计算药物对肿瘤细胞生长的抑制率:肿瘤细胞生长抑制率% =  $[(Ac-As) / (Ac-Ab)] \times 100\%$

[0129] As:样品的OA/RLU (细胞+CCK-8+待测化合物)

[0130] Ac:阴性对照的OA/RLU (细胞+CCK-8)

[0131] Ab:阳性对照的OA/RLU (培养基+CCK-8)

[0132] 4. 实验结果

[0133] 4.1 TRAIL-Mu3及TRAIL-MuR5S4TR对NCI-H460细胞不同作用时间的抑瘤效应

[0134] 表2. TRAIL-Mu3及TRAIL-MuR5S4TR对NCI-H460细胞不同作用时间的抑瘤率

细胞名称: NCI-H460					
	TRAIL-Mu3 抑制率 (%)				
浓度 (ug/ml)	24h	48h	72h	84h	96h
5	96.69	94.74	92.67	77.70	94.37
1.6667	95.44	95.26	90.14	64.01	79.77
0.5556	95.78	95.70	91.20	53.66	76.51
0.1852	95.73	96.25	92.40	49.02	73.87
0.0617	95.53	94.54	88.62	33.12	68.21
0.0206	90.23	87.63	80.33	10.89	46.30
0.0069	73.27	65.70	48.68	4.12	15.24
0.0023	41.49	23.77	-1.00	-13.42	-1.08
0.0008	25.93	16.12	0.42	-16.18	-3.25
0.0003	17.13	12.77	6.15	-16.19	-7.15
	TRAIL-MuR5S4TR 抑制率 (%)				
浓度 (ug/ml)	24h	48h	72h	84h	96h
10	97.62	96.17	94.86	89.32	96.64
3.3333	97.81	96.20	93.26	66.70	85.82
1.1111	98.48	97.76	96.43	77.38	89.68
0.3704	98.57	97.96	96.82	77.83	90.59
0.1235	98.35	96.80	95.38	67.73	85.74
0.0412	94.39	91.92	88.93	29.81	68.76
0.0137	76.54	66.15	66.46	6.79	19.07
0.0046	47.14	26.79	8.85	-12.55	5.95
0.0015	28.93	19.35	-1.93	-13.89	0.24
0.0005	14.80	10.80	3.82	-16.20	-3.45

[0135] [0136] [0137] 表3. TRAIL-Mu3及TRAIL-MuR5S4TR对Calu-1细胞不同作用时间的抑瘤率

细胞名称: Calu-1					
	TRAIL-Mu3 抑制率 (%)				
浓度 (ug/ml)	24h	48h	72h	84h	96h
100	78.15	79.87	96.19	96.87	99.33
33.3333	55.92	60.74	69.76	55.90	78.28
11.1111	21.25	24.47	32.04	3.64	3.15
3.7037	16.17	16.51	9.47	-33.59	-29.56
1.2346	14.85	18.53	9.84	-25.99	-16.32
0.4115	17.03	20.45	14.45	-16.39	-6.72
0.1372	19.74	19.13	17.87	-11.65	-10.76
0.0457	16.64	16.36	15.20	-9.45	-9.07
0.0152	13.92	16.30	15.69	-5.99	-9.66
0.0051	12.99	14.16	15.14	-7.58	-12.88
	TRAIL-MuR5S4TR 抑制率 (%)				
浓度 (ug/ml)	24h	48h	72h	84h	96h
100	98.64	99.60	99.89	98.91	99.66
33.3333	71.91	74.05	80.75	78.47	90.89
11.1111	35.66	40.86	41.42	-10.12	10.29
3.7037	19.28	21.72	20.14	-38.36	-19.79
1.2346	23.63	29.72	24.05	-28.39	-7.21
0.4115	26.56	32.91	22.33	-23.60	4.72
0.1372	27.02	29.10	19.27	-19.82	2.27
0.0457	23.91	26.39	8.13	-16.62	-1.12
0.0152	17.80	18.52	13.40	-13.19	-4.29
0.0051	8.63	13.43	6.93	-14.98	-10.33

[0138] [0139] [0140] 表4. TRAIL-Mu3及TRAIL-MuR5S4TR对NCI-H1299细胞不同作用时间的抑瘤率

细胞名称: NCI-H1299					
	TRAIL-Mu3 抑制率 (%)				
浓度 (ug/ml)	24h	48h	72h	84h	96h
50	94.73	98.10	99.17	99.22	98.58
16.6667	89.70	94.39	96.00	90.31	93.39
5.5556	83.99	90.18	87.56	69.32	71.20
1.8519	78.40	84.91	79.34	42.07	34.51
0.6173	73.90	78.39	71.47	19.48	15.51
0.2058	74.76	76.72	65.51	6.93	12.99
0.0686	72.43	72.33	56.60	-2.02	10.58
0.0229	65.38	67.07	48.59	-10.65	5.61
0.0076	59.55	59.67	33.44	-18.64	2.41
0.0025	46.70	41.14	25.09	-12.75	0.28
	TRAIL-MuR5S4TR 抑制率 (%)				
浓度 (ug/ml)	24h	48h	72h	84h	96h
50	97.15	99.43	98.90	99.39	99.22
16.6667	93.27	97.04	97.15	94.21	96.05
5.5556	87.50	91.66	88.88	76.08	75.15
1.8519	84.40	88.55	80.30	51.42	42.68
0.6173	82.80	88.46	78.50	41.67	30.45
0.2058	81.22	85.61	70.43	25.50	17.47
0.0686	76.62	74.92	57.47	-4.65	7.72
0.0229	64.28	56.12	25.29	-16.34	-7.19
0.0076	42.14	25.94	17.08	-14.66	-13.57
0.0025	15.79	4.71	20.45	-15.16	-12.29

[0141]

## [0142] 5. 实验结论

[0143] 在体外实验中,TRAIL类蛋白(TRAIL-Mu3及TRAIL-MuR5S4TR)在一定浓度(剂量)范围内与细胞作用,观察24~96小时药物对肿瘤细胞的抑制率。在不同敏感性的肿瘤细胞中,TRAIL类蛋白对肿瘤细胞生长在24~72小时均处于抑制的高峰,对于高度敏感的细胞株(或较高的作用浓度),其抑瘤的高峰时间持续到96小时。TRAIL-Mu3及TRAIL-MuR5S4TR对三株敏感程度不同的肺癌细胞的抑瘤效应随时间而变化的关系详见附图1~6。

## [0144] 实施例2

[0145] TRAIL不同给药次数对人肺癌NCI-H460细胞裸鼠异种移植瘤抗肿瘤作用研究

[0146] 1. 实验目的

[0147] 采用60mg/kg的剂量静脉注射,每日一次,连续注射5天(方案1:共5次)、60mg/kg的剂量静脉注射,每日一次,连续注射5天后间隔2天再次连续注射5天(方案2:共10次)或60mg/kg的剂量静脉注射,每日一次,连续注射5天后间隔2天再次连续注射5天,再次间隔2天后再次连续注射5天(方案3:共15次)三种不同给药方案,比较三种不同给药时间对于人肺癌NCI-H460裸鼠移植瘤模型体内抗肿瘤活性的差异。

[0148] 2. 实验动物

[0149] 2.1 动物种类

[0150] 小鼠。

[0151] 2.2 品种

[0152] Ba1b/c裸鼠。

[0153] 2.3 性别

[0154] 雌性。

[0155] 2.4 数量

[0156] 接种60只,选取40只。

[0157] 2.5. 年龄

[0158] 4~6周。

[0159] 2.6. 体重

[0160] 16~18g±20%体重均值。

[0161] 2.7. 动物来源(供应商)

[0162] 上海西普尔-必凯实验动物有限公司(BK),许可证号SCXK(沪)2013-0016,动物合格证编号:2008001661519。

[0163] 2.8. 实验动物管理

[0164] 2.8.1 动物身份鉴定方法

[0165] 每个鼠笼均佩戴有实验编号、实验组别、实验人员姓名、小鼠品种和性别等信息的身份卡片,小鼠用耳标法标记。

[0166] 2.8.2 随机分组

[0167] 当肿瘤体积达到100~200mm<sup>3</sup>时用随机区组法分组,保证各组间肿瘤体积和小鼠体重均一,各组肿瘤体积的均值与所有实验动物肿瘤体积的均值差异不超过±10%。

[0168] 2.8.3 操作管理规范

[0169] 所有实验动物的操作和管理均严格遵守上海美迪西实验动物使用和管理指导原则。

[0170] 2.8.4 饲养条件

[0171] 居住条件:每笼3只

[0172] 温度:20℃~26℃

[0173] 湿度:40%~70%

[0174] 光照:12小时昼夜交替

[0175] 2.8.5 饲料

[0176] 辐照大小鼠饲料,购自北京科澳协力饲料有限公司。自由进食。

- [0177] 2.8.6 饮水
- [0178] 城市自来水,经过滤高压灭菌后饮用。
- [0179] 2.8.7 垫料
- [0180] 玉米芯,上海茂生衍生物科技有限公司,高压灭菌后使用,每周换两次垫料。
- [0181] 2.8.8 适应期
- [0182] 实验前给予小鼠最短一周环境适应期。
- [0183] 3. 实验材料
- [0184] 3.1 测试药品
- [0185] 测试物TRAIL、紫杉醇信息如下:
- [0186]

受试物	游离分子量 (g/mol)	溶媒	批号	纯度	稳定性/储存	生产厂商 或提供单位
TRAIL	19KDa	注射用水	20160311	≥95%	-70~-86℃储存, 每次新鲜配制, 配制后尽快使用	成都华创生 物技术有限 公司提供
紫杉醇注 射液	/	生理盐水	6c04677	/	室温、避光保存	百时美施贵 宝

- [0187] 3.2 其他化学材料
- [0188] 3.2.1 无菌注射器
- [0189] 1ml 无菌注射器购自购上海康德莱企业发展集团股份有限公司(上海,中国)。
- [0190] 3.2.2 细胞株
- [0191] 人肺癌细胞株NCI-H460购于上海中科院细胞生物研究所。
- [0192] NCI-H460培养于F12-K培养基(GIBCO,美国),含10%胎牛血清FBS(GIBCO,美国)。  
培养于含5%CO<sub>2</sub>的37℃培养箱。
- [0193] 3.2.3 基质胶(BD Matrigel)
- [0194] 基质胶Matrigel购自美国BD公司
- [0195] 4. 实验设计
- [0196] 建立人肺癌NCI-H460裸鼠皮下移植瘤模型,每只动物接种 $3 \times 10^6$ 个细胞,接种体  
积为0.1ml/动物,细胞悬液中含50%Matrigel。
- [0197] 本次独立试验设计给药剂量和给药方案如下。
- [0198] TRAIL不同给药时间对人肺癌NCI-H460裸鼠异种移植瘤给药方案

[0199]

组别	动物数	受试物	给药途径	给药剂量 mg/kg	给药体积 ml/kg	给药浓度 mg/ml	给药频率
1	8	生理盐水	IV	NA	10	NA	Day 0, 1, 2, 3, 4
2	8	紫杉醇	IV	25	10	2.5	Day 0, 2, 4
3	8	TRAIL	IV	60	10	6	Day 0, 1, 2, 3, 4
4	8	TRAIL	IV	60	10	6	Day 0, 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11
5	8	TRAIL	IV	60	10	6	Day 0, 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 14, 15, 16, 17, 18

## [0200] 5. 实验方法

[0201] NCI-H460细胞培养于RPMI-1640,含10%胎牛血清FBS。细胞放置于5%CO<sub>2</sub>培养箱37℃培养。

[0202] 细胞接种法建立肿瘤裸鼠皮下移植模型:收集对数生长期的肿瘤细胞,计数后重悬于1×PBS,1:1加入Matrigel,调整细胞悬液浓度至3×10<sup>7</sup>/ml。用1ml注射器(4号针头)在裸鼠右侧背部皮下接种肿瘤细胞,3×10<sup>6</sup>/0.1ml/鼠,共接种60只。

[0203] 在肿瘤体积达到100~200mm<sup>3</sup>时,将动物按随机区组法进行随机分组,使各组肿瘤差异小于均值的10%,每组8只小鼠,分组当日记为Day 0,并按照平均体重开始给药。

[0204] 实验期间每周测定两次动物体重和肿瘤大小。每日观察记录临床症状。所有动物实验操作严格遵守上海美迪西生物医药有限公司动物使用和管理规范。肿瘤相关参数的计算参考中国SFDA《细胞毒类抗肿瘤药物非临床研究技术指导原则》<sup>[1]</sup>。

[0205] 抗肿瘤活性的评价指标为相对肿瘤增值率T/C(%),计算公式为:T/C(%) = TRTV/CRTV\*100%。(TRTV:治疗组RTV;CRTV:阴性对照组RTV);相对肿瘤体积(relative tumor volume,RTV),计算公式为:RTV=Vt/V0。其中V0为分笼给药时(即Day0)测量所得肿瘤体积,Vt为每一次测量时的肿瘤体积。

[0206] 荷瘤动物的体重变化(%)计算如下:(测量时体重-分组时体重)/分组时体重×100。

[0207] 根据中国SFDA《细胞毒类抗肿瘤药物非临床研究技术指导原则》(2006年11月),T/C(%)≤40%并经统计学分析P<0.05为有效。若小鼠的体重下降超过20%或药物相关的死亡数超过20%,则认为该药物剂量具有严重毒性。

## [0208] 6. 数据分析

[0209] 以时间点为X轴,肿瘤体积为Y轴绘制肿瘤生长曲线;以时间点为X轴,动物体重变化值(%)为Y轴绘制体重增长变化曲线。组间比较采用t-检验, $P < 0.05$ 为显著性差异, $P < 0.01$ 为极显著性差异。

[0210] 7.结果

[0211] 7.1各受试物对人肺癌NCI-H460裸小鼠移植瘤动物体重的影响

[0212] 实验中,溶媒对照组给药21天,动物平均体重不受溶媒影响。在整个试验周期内,动物平均体重不断增长。与Day 0相比,Day21时动物平均体重上涨了8.34%(即2.12克)。

[0213] 动物对紫杉醇(25mg/kg,IV)作用的毒性表现明显,在第二次和第三次给药后分别出现一只动物死亡。在整个试验周期的第7~14天体重下降明显,最大体重降幅达到18.52%,Day14后体重逐渐增加,至试验结束时,体重基本恢复。

[0214] 动物对不同给药时间的TRAIL(方案1:共5次、方案2:共10次、方案3:共15次)能耐受,在整个试验周期内,动物平均体重不断增长。与Day 0相比,Day21时三个不同给药频率组动物平均体重分别上涨了7.68%(即1.97克),5.25%(即1.20克)和5.34%(1.18克)。

[0215] 7.2各受试物对人肺癌NCI-H460裸小鼠移植瘤动物肿瘤体积的影响

[0216] 与溶媒组比,紫杉醇(25mg/kg)对人肺癌NCI-H460裸鼠异种移植瘤抑制作用有显著性差异,在Day10时,相对肿瘤增殖率T/C为34.88%;到Day21时,T/C为46.12%。

[0217] 相比溶媒组,本实验中,三个不同给药频率组TRAIL-Mu3对人肺癌NCI-H460裸鼠异种移植瘤均显著性抑制作用。

[0218] TRAIL(每日一次,连续给5天,方案1:共5次)组,对人肺癌NCI-H460裸鼠异种移植瘤抑制作用在Day3出现显著性差异,相对肿瘤增殖率T/C为39.30%( $P < 0.001$ ),在Day10时,相对肿瘤增殖率T/C为54.99%( $P < 0.001$ ),到Day21,相对肿瘤增殖率T/C为56.31%( $P < 0.01$ )。

[0219] TRAIL(每日一次,连续给药5天,间隔2天,再连续给药5天,方案2:共10次)组,对人肺癌NCI-H460裸鼠异种移植瘤抑制作用在Day3出现显著性差异,相对肿瘤增殖率T/C为32.68%( $P < 0.001$ ),在Day10时,相对肿瘤增殖率T/C为34.12%( $P < 0.001$ ),到Day21,相对肿瘤增殖率T/C为37.48%( $P < 0.001$ )。

[0220] TRAIL(每日一次,连续给药5天后间隔2天再次连续给药5天,再次间隔2天后再次连续给药5天,方案3:共15次)组,对人肺癌NCI-H460裸鼠异种移植瘤抑制作用在Day3出现显著性差异,相对肿瘤增殖率T/C为36.79%( $P < 0.001$ ),在Day10时,相对肿瘤增殖率T/C为34.46%( $P < 0.001$ ),到Day21,相对肿瘤增殖率T/C为32.87%( $P < 0.001$ )。

[0221] 详细结果见表实验结果见表5、附图7。

[0222] 7.3各受试物对人肺癌NCI-H460裸小鼠移植瘤动物肿瘤重量的影响

[0223] Day21实验结束,所有动物在称量体重和肿瘤体积后处死,肿瘤从动物身上分离并称重,收集肿瘤组织,每个肿瘤组织分为两份:一份液氮快速冻存后保存与-80度冰箱保存,用于后续分析;一份用甲醛固定后进行石蜡包埋,用于后续分析。生理盐水组,紫杉醇组,TRAIL(每日一次,连续给药5天、每日一次,连续给药5天,间隔2天,再连续给药5天或每日一次,连续给药5天后间隔2天再次连续给药5天,再次间隔2天后再次连续给药5天三个不同给药时间)组各组的肿瘤平均重量分别是1.532g,0.728g,0.845g,0.646g及0.602g。

[0224] 详细结果见表5、附图8。



[0225] 表5. TRAIL不同给药时间在人肺癌NCI-H460裸鼠异种移植瘤模型中对动物肿瘤大小影响

[0226]

组别	Treatment	动物数	剂量 mg/kg	肿瘤体积 (mm <sup>3</sup> , Mean±SEM)		T/C (%) Day21	肿瘤重量 (g)
				Day0	Day21		
1	生理盐水	8	N/A	123.33 ± 7.83	3345.73 ± 187.94	/	1.532 ± 0.113
2	紫杉醇	8	25	124.66 ± 8.29	1559.68 ± 252.26	46.12%**	0.728 ± 0.125
3	TRAIL (方案1)	8	60	124.90 ± 7.75	1908.00 ± 196.54	56.31%**	0.845 ± 0.104
4	TRAIL (方案2)	8	60	123.56 ± 8.00	1256.38 ± 142.53	37.48***	0.646 ± 0.084
5	TRAIL (方案3)	8	60	123.63±7.76	1102.29 ± 252.23	32.87***	0.602± 0.070

[0227] \*:P<0.05;\*\*P<0.01;\*\*\*:P<0.001与溶媒组相比

[0228] 8. 小结

[0229] 本次实验中,与生理盐水组相似,紫杉醇,TRAIL(每日一次,连续给药5天、每日一次,连续给药5天,间隔2天,再连续给药5天或每日一次,连续给药5天后间隔2天再次连续给药5天,再次间隔2天后再次连续给药5天三个不同给药时间)组对动物体重几乎没有影响,毒性小,较为安全;紫杉醇组动物体重略有下降,实验过程中逐渐稳定,较为安全。相比生理盐水组,紫杉醇组,TRAIL(每日一次,连续给药5天、每日一次,连续给药5天,间隔2天,再连续给药5天及每日一次,连续给药5天后间隔2天再次连续给药5天,再次间隔2天后再次连续给药5天三个不同给药时间)组对人肺癌NCI-H460裸鼠异种移植瘤有一定的抑制作用,其中静脉注射,每日一次,连续给药5天,间隔2天,再连续给药5天组及每日一次,连续给药5天后间隔2天再次连续给药5天,再次间隔2天后再次连续给药5天组的疗效明显优越于单独每日一次,连续给药5天组,给药后,抑瘤率均出现显著性差异。但方案3与方案2相比抑瘤作用的提高无统计学意义(P>0.05)。实验表明,增加给药次数(延长给药时间)可明显提高药物对裸鼠移植瘤模型的抑瘤率,但给药次数在15次与10次相比,抑瘤率的提高不明显。

[0230] 9. 参考文献

[0231] [1]《细胞毒类抗肿瘤药物非临床研究技术指导原则》2006年11月

[0232] 实施例3

[0233] TRAIL-Mu3和TRAIL-MuR5S4TR不同给药间隔对人肺癌NCI-H460裸鼠异种移植瘤的治疗作用研究

[0234] 1. 实验目的

[0235] 本研究采用人肺癌NCI-H460裸鼠异种移植瘤模型,评价不同给药间隔TRAIL-Mu3和TRAIL-MuR5S4TR的体内抗肿瘤活性差别。

[0236] 2. 实验动物

[0237] 2.1 动物种类

- [0238] 小鼠。
- [0239] 2.2品种
- [0240] Balb/c裸鼠。
- [0241] 2.3性别
- [0242] 雌性。
- [0243] 2.4数量
- [0244] 接种90只,选取64只。
- [0245] 2.5.年龄
- [0246] 4-6周。
- [0247] 2.6.体重
- [0248] 16~18g±20%体重均值。
- [0249] 2.7.动物来源(供应商)
- [0250] 上海西普尔-必凯实验动物有限公司(BK),许可证号SCXK(沪)2013-0016,动物合格证编号:2008001661519。
- [0251] 2.8.实验动物管理
- [0252] 2.8.1动物身份鉴定方法
- [0253] 每个鼠笼均佩挂有实验编号、实验组别、实验人员姓名、小鼠品种和性别等信息的身份卡片,小鼠用耳标法标记。
- [0254] 2.8.2随机分组
- [0255] 当肿瘤体积达到100~200mm<sup>3</sup>时用随机区组法分组,保证各组间肿瘤体积和小鼠体重均一,各组肿瘤体积的均值与所有实验动物肿瘤体积的均值差异不超过±10%。
- [0256] 2.8.3操作管理规范
- [0257] 所有实验动物的操作和管理均严格遵守上海美迪西实验动物使用和管理指导原则。
- [0258] 2.8.4饲养条件
- [0259] 居住条件:每笼3只
- [0260] 温度:20℃~26℃
- [0261] 湿度:40%~70%
- [0262] 光照:12小时昼夜交替
- [0263] 2.8.5饲料
- [0264] 辐照大小鼠饲料,购自北京科澳协力饲料有限公司。自由进食。
- [0265] 2.8.6饮水
- [0266] 城市自来水,经过滤高压灭菌后饮用。
- [0267] 2.8.7垫料
- [0268] 玉米芯,上海茂生衍生物科技有限公司,高压灭菌后使用。每周换两次垫料。
- [0269] 2.8.8适应期
- [0270] 实验前给予小鼠最短一周环境适应期。
- [0271] 3.实验材料
- [0272] 3.1测试药品

[0273] 测试物TRAIL-Mu3和TRAIL-MuR5S4TR,紫杉醇信息如下:

[0274]

受试物	游离分子量(g/mol)	溶媒	批号	纯度	稳定性/储存	生产厂商或提供单位
TRAIL-Mu3	19KDa	注射用水 生理盐水	20160629	≥95%	-70~-86℃储存,配制后尽快使用,每次新鲜配制	成都华创生物技术有限公司提供
TRAIL-MuR5S4TR	19KDa	注射用水 生理盐水	20160625	≥95%	-70~-86℃储存,配制后尽快使用,每次新鲜配制	成都华创生物技术有限公司提供
紫杉醇注射液	/	生理盐水	6c04677	/	室温 避光	百时美施贵宝

[0275] 3.2其他化学材料

[0276] 3.2.1无菌注射器

[0277] 1ml无菌注射器购自购上海康德莱企业发展集团股份有限公司(上海,中国)。

[0278] 3.2.2细胞株

[0279] 人肺癌细胞株NCI-H460购于上海中科院细胞生物研究所。

[0280] NCI-H460培养于F12-K培养基(GIBCO,美国),含10%胎牛血清FBS(GIBCO,美国)。培养于含5%CO<sub>2</sub>的37℃培养箱。

[0281] 3.2.3基质胶(BD Matrigel)

[0282] 基质胶Matrigel购自美国BD公司

[0283] 4.实验设计

[0284] 建立人肺癌NCI-H460裸鼠皮下移植瘤模型,每只动物接种 $3 \times 10^6$ 个细胞,接种体积为0.1ml/动物,细胞悬液中含50%Matrigel。

[0285] 本次独立试验设计给药剂量和给药方案如下:

[0286] TRAIL-Mu3和MuR5S4TR在人肺癌NCI-H460裸鼠移植瘤模型中的抗肿瘤作用

[0287]

组别	动物数	受试物	给药途径	给药剂量 mg/kg	给药体积 ml/kg	给药浓度 mg/ml	给药频率
1	8	生理盐水	IV	NA	10	NA	Day0, 1, 2, 3, 4
2	8	紫杉醇	IV	20	10	2	Day0, 2, 4
3	8	TRAIL-Mu3	IV	60	10	6	Day0, 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11
4	8	TRAIL-Mu3	IV	60	10	6	Day0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18
5	8	TRAIL-Mu3	IV	60	10	6	Day0, 2, 4, 7, 9, 11, 14, 16, 18
6	8	TRAIL-MuR5S4TR	IV	60	10	6	Day0, 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11
7	8	TRAIL-MuR5S4TR	IV	60	10	6	Day0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18
8	8	TRAIL-MuR5S4TR	IV	60	10	6	Day0, 2, 4, 7, 9, 11, 14, 16, 18

[0288] 5. 实验方法

[0289] NCI-H460细胞培养于RPMI-1640,含10%胎牛血清FBS。细胞放置于5%CO<sub>2</sub>培养箱37℃培养。

[0290] 细胞接种法建立肿瘤裸鼠皮下移植模型:收集对数生长期的肿瘤细胞,计数后重悬于1×PBS,1:1加入Matrigel,调整细胞悬液浓度至3×10<sup>7</sup>/ml。用1ml注射器(4号针头)在裸鼠右侧背部皮下接种肿瘤细胞,3×10<sup>6</sup>/0.1ml/鼠,共接种90只。

[0291] 在肿瘤体积达到100~200mm<sup>3</sup>时,将动物按随机区组法进行随机分组,使各组肿瘤差异小于均值的10%,每组8只小鼠,分组当日记为Day0,并按照平均体重开始给药。

[0292] 实验期间每周测定两次动物体重和肿瘤大小。每日观察记录临床症状。所有动物实验操作严格遵守上海美迪西生物医药有限公司动物使用和管理规范。肿瘤相关参数的计算参考中国SFDA《细胞毒类抗肿瘤药物非临床研究技术指导原则》<sup>[1]</sup>。

[0293] 抗肿瘤活性的评价指标为相对肿瘤增值率T/C(%),计算公式为:T/C(%)=TRTV/CRTV\*100%。(TRTV:治疗组RTV;CRTV:阴性对照组RTV);相对肿瘤体积(relative tumor volume,RTV),计算公式为:RTV=V<sub>t</sub>/V<sub>0</sub>。其中V<sub>0</sub>为分笼给药时(即Day0)测量所得肿瘤体积,V<sub>t</sub>为每一次测量时的肿瘤体积。

[0294] 荷瘤动物的体重变化(%)计算如下:(测量时体重-分组时体重)/分组时体重×100。

[0295] 根据中国SFDA《细胞毒类抗肿瘤药物非临床研究技术指导原则》(2006年11月),T/C(%)≤40%并经统计学分析P<0.05为有效。若小鼠的体重下降超过20%或药物相关的死亡数超过20%,则认为该药物剂量具有严重毒性。

[0296] 6. 数据分析

[0297] 以时间点为X轴,肿瘤体积为Y轴绘制肿瘤生长曲线;以时间点为X轴,动物体重变化值(%)为Y轴绘制体重增长变化曲线。组间比较采用t-检验, $P < 0.05$ 为显著性差异, $P < 0.01$ 为极显著性差异。

[0298] 7.结果

[0299] 7.1各受试物对人肺癌NCI-H460裸小鼠移植瘤动物体重的影响

[0300] 实验中,溶媒对照组给药21天,动物平均体重不受溶媒影响。在整个试验周期内,动物平均体重不断增长。与Day 0相比,Day21时动物平均体重上涨了9.27% (即2.22克)。

[0301] 动物对紫杉醇(20mg/kg, IV)能耐受,在整个试验周期内体重略有下降,Day21时,此组动物平均体重下降了2.32% (即0.52g)。

[0302] 动物对不同给药频率的TRAIL-Mu3(每天一次,连续给5天,共给两周;2天一次给共10次;一周3次,共给3周;60mg/kg, IV)能耐受,在整个试验周期内,动物平均体重不断增长。与Day 0相比,Day21时三个不同给药频率组动物平均体重分别上涨了8.93% (即2.06克), 5.38% (即1.23克)和7.72% (即1.78克)。

[0303] 动物对不同给药频率的MuR5S4TR(每天一次,连续给5天,共给两周;2天一次给共10次;一周3次给3周;60mg/kg, IV)能耐受,在整个试验周期内,动物平均体重不断增长。与Day 0相比,Day21时三个不同给药频率组动物平均体重分别上涨了8.02% (即1.79克), 6.80% (即1.56克)和6.68% (即1.52克)。

[0304] 7.2各受试物对人肺癌NCI-H460裸小鼠移植瘤动物肿瘤体积的影响

[0305] 与溶媒组比,紫杉醇(20mg/kg)对人肺癌NCI-H460裸鼠异种移植瘤抑制作用有显著性差异,但实验过程中,相对肿瘤增值率 $T/C > 40\%$ 。

[0306] 相比溶媒组,本实验中,三个不同给药频率组TRAIL-Mu3对人肺癌NCI-H460裸鼠异种移植瘤均显著性抑制作用。

[0307] TRAIL-Mu3(每天一次,连续给5天,共给两周)组,对人肺癌NCI-H460裸鼠异种移植瘤抑制作用在Day4出现显著性差异,相对肿瘤增值率 $T/C$ 为43.97% ( $P < 0.001$ ),在Day11时,相对肿瘤增值率 $T/C$ 最小,为24.75% ( $P < 0.001$ ),到Day21,相对肿瘤增值率 $T/C$ 为33.5% ( $P < 0.01$ )。

[0308] TRAIL-Mu3(2天一次,共10次)组,对人肺癌NCI-H460裸鼠异种移植瘤抑制作用在Day4出现显著性差异,相对肿瘤增值率 $T/C$ 为51.77% ( $P < 0.001$ ),在Day14时,相对肿瘤增值率 $T/C$ 最小,为16.16% ( $P < 0.001$ ),到Day21,相对肿瘤增值率 $T/C$ 为17.63% ( $P < 0.001$ )。

[0309] TRAIL-Mu3(一周3次,共给3周)组,对人肺癌NCI-H460裸鼠异种移植瘤抑制作用在Day4出现显著性差异,相对肿瘤增值率 $T/C$ 为48.94% ( $P < 0.001$ ),在Day18时,相对肿瘤增值率 $T/C$ 最小,为16.61% ( $P < 0.001$ ),到Day21,相对肿瘤增值率 $T/C$ 为16.75% ( $P < 0.001$ )。

[0310] 与TRAIL-Mu3相似,三个不同给药频率组MuR5S4TR对人肺癌NCI-H460裸鼠异种移植瘤均显著性抑制作用。

[0311] MuR5S4TR(每天一次,连续给5天,共给两周)组,对人肺癌NCI-H460裸鼠异种移植瘤抑制作用在Day4出现显著性差异,相对肿瘤增值率 $T/C$ 为59.57% ( $P < 0.001$ ),到Day21,相对肿瘤增值率 $T/C$ 为38.92% ( $P < 0.01$ )。

[0312] MuR5S4TR(2天一次,共10次)组,对人肺癌NCI-H460裸鼠异种移植瘤抑制作用在Day4出现显著性差异,相对肿瘤增值率 $T/C$ 为54.61% ( $P < 0.001$ ),到Day21,相对肿瘤增值

率T/C最小,为24.43% ( $P < 0.001$ )。

[0313] MuR5S4TR(一周3次,共给3周)组,对人肺癌NCI-H460裸鼠异种移植瘤抑制作用在Day4出现显著性差异,相对肿瘤增值率T/C为56.03% ( $P < 0.001$ ),在Day21时,相对肿瘤增值率T/C最小,为24.43% ( $P < 0.001$ )。

[0314] 详细结果见表实验结果见表6和附图9。

[0315] 7.3各受试物对人肺癌NCI-H460裸小鼠移植瘤动物肿瘤重量的影响

[0316] Day21实验结束,所有动物在称量体重和肿瘤体积后处死,肿瘤从动物身上分离并称重,收集肿瘤组织,每个肿瘤组织分为两份:一份液氮快速冻存后保存与-80度冰箱保存,用于后续分析;一份用甲醛固定后进行石蜡包埋,用于后续分析。生理盐水组,紫杉醇组,TRAIL-Mu3(三个不同给药频率)组,和MuR5S4TR(三个不同给药频率)组,各组的肿瘤平均重量分别是0.911g,0.658g,0.366g,0.170g,0.170g,0.416g,0.249和0.237g。

[0317] 详细结果见表6和附图10。

[0318] 表6. TRAIL-Mu3和MuR5S4TR在人肺癌NCI-H460裸鼠异种移植瘤模型中对动物肿瘤大小影响

[0319]

组别	Treatment	动物数	剂量 mg/kg	肿瘤体积 ( $\text{mm}^3$ , Mean $\pm$ SEM)		T/C (%) Day21	肿瘤重量 (g)
				Day0	Day21		
1	生理盐水	8	N/A	179.98 $\pm$ 26.21	1330.67 $\pm$ 114.04	/	0.911 $\pm$ 0.113
2	紫杉醇	8	20	184.21 $\pm$ 28.55	756.30 $\pm$ 92.67	56.84%**	0.658 $\pm$ 0.125
3	TRAIL-Mu3	8	60	183.35 $\pm$ 27.91	448.34 $\pm$ 33.73	33.69%***	0.366 $\pm$ 0.084
4	TRAIL-Mu3	8	60	177.35 $\pm$ 23.49	220.28 $\pm$ 28.27	16.55%***	0.170 $\pm$ 0.043
5	TRAIL-Mu3	8	60	180.89 $\pm$ 20.59	230.55 $\pm$ 18.95	17.33%***	0.170 $\pm$ 0.032
6	MuR5S4TR	8	60	179.72 $\pm$ 18.26	566.02 $\pm$ 61.06	42.54%**	0.416 $\pm$ 0.075
7	MuR5S4TR	8	60	177.44 $\pm$ 18.71	339.07 $\pm$ 27.82	25.48%***	0.249 $\pm$ 0.042
8	MuR5S4TR	8	60	173.83 $\pm$ 17.40	336.22 $\pm$ 31.68	25.27%***	0.237 $\pm$ 0.025

[0320] \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ 与溶媒组相比

[0321] 8. 小结

[0322] 本次实验中,与生理盐水组相似,紫杉醇,TRAIL-Mu3组和MuR5S4TR组对动物体重几乎没有影响,毒性小,较为安全;紫杉醇组动物体重略有下降,实验过程中逐渐稳定,较为安全。

[0323] 相比生理盐水组,紫杉醇组,TRAIL-Mu3组和MuR5S4TR各组,对人肺癌NCI-H460裸鼠异种移植瘤有一定的抑制作用,给药后,抑瘤率均出现显著性差异,其中TRAIL-Mu3和MuR5S4TR两药隔日给药组和每周三次,三周给药组的抑瘤作用优越于每日给药,连续5天,共两周组。TRAIL-Mu3和MuR5S4TR两药隔日给药组和每周三次,三周给药组的抑瘤作用疗效相当。

[0324] 9. 参考文献

[0325] [1]《细胞毒类抗肿瘤药物非临床研究技术指导原则》2006年11月

- [0326] 实施例4
- [0327] TRAIL-Mu3和TRAIL-MuR5S4TR不同给药间隔对人结肠癌细胞HT-29裸鼠异种移植瘤的治疗作用研究
- [0328] 1.实验目的
- [0329] 本研究采用人结肠癌细胞HT-29裸鼠异种移植瘤模型,评价TRAIL-Mu3和TRAIL-MuR5S4TR不同给药间隔的体内抗肿瘤活性。
- [0330] 2.实验动物
- [0331] 2.1动物种类
- [0332] 小鼠。
- [0333] 2.2品种
- [0334] Ba1b/c裸鼠。
- [0335] 2.3性别
- [0336] 雌性。
- [0337] 2.4数量
- [0338] 实验使用64只。
- [0339] 2.5年龄
- [0340] 4~6周。
- [0341] 2.6体重
- [0342] 16~18g±20%体重均值。
- [0343] 2.7动物来源(供应商)
- [0344] 上海西普尔-必凯实验动物有限公司(BK),许可证号SCXK(沪)2013-0016,动物合格证编号:2008001665079。
- [0345] 2.8实验动物管理
- [0346] 2.8.1动物身份鉴定方法
- [0347] 每个鼠笼均佩戴有实验编号、实验组别、实验人员姓名、小鼠品种和性别等信息的身份卡片,小鼠用耳标法标记。
- [0348] 2.8.2随机分组
- [0349] 当肿瘤体积平均达到200mm<sup>3</sup>左右用随机区组法分组,保证各组间肿瘤体积和小鼠体重均一,各组肿瘤体积的均值与所有实验动物肿瘤体积的均值差异不超过±10%。
- [0350] 2.8.3操作管理规范
- [0351] 所有实验动物的操作和管理均严格遵守上海美迪西实验动物使用和管理指导原则。
- [0352] 2.8.4饲养条件
- [0353] 居住条件:每笼3只。
- [0354] 温度:20℃~26℃
- [0355] 湿度:40%~70%
- [0356] 光照:12小时昼夜交替
- [0357] 2.8.5饲料
- [0358] 辐照大小鼠饲料,购自北京科澳协力饲料有限公司。自由进食。

- [0359] 2.8.6 饮水
- [0360] 城市自来水,经过滤高压灭菌后饮用。
- [0361] 2.8.7 垫料
- [0362] 玉米芯,上海茂生衍生物科技有限公司,高压灭菌后使用。每周换两次垫料。
- [0363] 2.8.8 适应期
- [0364] 实验前给予小鼠最短一周环境适应期。
- [0365] 3. 实验材料
- [0366] 3.1 测试药品
- [0367] 测试物TRAIL-Mu3和MuR5S4TR信息
- [0368]

受试物	分子量	溶媒	批号	纯度	稳定性/储存	生产厂商或提供单位
吉西他滨	299.66	生理盐水	C558141A	市售产品	室温, 现配现用	LILLY FRANCE
TRAIL-Mu3	19KDa	注射用水 生理盐水	20160727	≥95%	-70~-86℃储存, 配制后尽快使用, 每次新鲜配制	成都华创生物技术 有限公司提供
MuR5S4TR	19KDa	注射用水 生理盐水	20160923	≥95%	-70~-86℃储存, 配制后尽快使用, 每次新鲜配制	成都华创生物技术 有限公司提供

- [0369] 3.2 细胞株
- [0370] 人结肠癌细胞细胞株HT-29购于上海中科院细胞生物研究所。
- [0371] 3.3 试剂
- [0372] McCoy's 5a培养基(GIBCO, 美国)
- [0373] 胎牛血清FBS(GIBCO, 美国)
- [0374] 胰酶Trypsin-EDTA(购自GIBCO, 美国)
- [0375] 台盼蓝Trypan Blue(购自GIBCO, 美国)
- [0376] 生理盐水购自华裕(无锡)制药有限公司(江苏, 中国)。
- [0377] 3.4 仪器
- [0378] 生物安全柜(型号:AC2-6E1), 购自ESCO;
- [0379] CO<sub>2</sub>隔水细胞培养箱(型号:3111), 购自Thermo Scientific Forma;
- [0380] 倒置显微镜(型号:CKX41SF), 购自Olympus;
- [0381] 电动吸引器(型号YX930D), 购自上海医疗器械工业(集团)有限公司;
- [0382] 低速离心机(型号LD5-2A), 购自北京雷勃尔离心机有限公司。
- [0383] 3.5 其他
- [0384] 1ml无菌注射器购自上海康德莱企业发展集团股份有限公司(上海, 中国)。
- [0385] 4. 实验设计
- [0386] 建立人结肠癌细胞HT-29裸鼠皮下移植瘤模型, 每只动物接种 $3 \times 10^6$ 个细胞, 接种



体积为0.1ml/动物。

[0387] 本次独立实验设计给药剂量和给药方案如下：

[0388] TRAIL-Mu3和MuR5S4TR不同给药间隔在人结肠癌细胞HT-29裸鼠移植瘤模型中的抗肿瘤作用

[0389]

组别	动物数	受试物	给药途径	给药剂量 mg/kg	给药体积 ml/kg	给药浓度 mg/ml	给药频率
1	8	生理盐水	IV	NA	10	NA	Day 0, 1, 2, 3, 4
2	8	CPT-11	IV	25	10	2.5	Day 0, 2, 4, 6, 8, 10
3	8	TRAIL-Mu3	IV	72	10	7.2	Day 0, 2, 4, 7, 9, 11, 14, 16, 18
4	8	TRAIL-Mu3	IV	93	10	9.3	Day 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18
5	8	TRAIL-Mu3	IV	108	10	10.8	Day 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18
6	8	MuR5S4 TR	IV	105	10	10.5	Day 0, 2, 4, 7, 9, 11, 14, 16, 18
7	8	MuR5S4 TR	IV	135	10	13.5	Day 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18
8	8	MuR5S4 TR	IV	158	10	15.8	Day 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18

[0390] 5. 实验方法

[0391] 5.1 测试药制剂配制

[0392] 5.1.1 CPT-11 2.5mg/ml 2ml

[0393] CPT-11以原液(20mg/ml)进行分装,每管0.25ml。置室温保存。

[0394] 取上述分装的CPT-11原液(20mg/ml)一支。

[0395] 加入1.75ml生理盐水,混匀。

[0396] 现配现用,使用前,于18~25℃保存。

[0397] 5.1.2 TRAIL-Mu3 10.8mg/ml 2.4ml

[0398] 溶媒:0.9%生理盐水:注射用水=1:1

[0399] 取TRAIL-Mu3原液(24mg/ml)1.08ml,

[0400] 加入1.32ml上述溶媒,混匀。

[0401] 现配现用,使用前保持在4℃,4小时内使用。

[0402] 5.1.3 TRAIL-Mu3 9.3mg/ml 2.4ml

[0403] 溶媒:0.9%生理盐水:注射用水=1:1

- [0404] 取TRAIL-Mu3原液 (24mg/ml) 0.93ml,
- [0405] 加入1.47ml上述溶媒,混匀。
- [0406] 现配现用,使用前保持在4℃,4小时内使用。
- [0407] 5.1.4TRAIL-Mu3 7.2mg/ml 2.4ml
- [0408] 取TRAIL-Mu3原液 (24mg/ml) 0.72ml。
- [0409] 加入1.68ml上述溶媒,混匀。
- [0410] 现配现用,使用前保持在4℃,4小时内使用。
- [0411] 5.1.5MuR5S4TR 15.8mg/ml 2.4ml
- [0412] 溶媒:0.9%生理盐水:注射用水=1:1
- [0413] 取MuR5S4TR原液 (24mg/ml) 1.58ml。
- [0414] 加入0.82ml上述溶媒,混匀。
- [0415] 现配现用,使用前保持在4℃,4小时内使用。
- [0416] 5.1.6MuR5S4TR 13.5mg/ml 2.4ml
- [0417] 溶媒:0.9%生理盐水:注射用水=1:1
- [0418] 取MuR5S4TR原液 (24mg/ml) 1.35ml。
- [0419] 加入1.05ml上述溶媒,混匀。
- [0420] 现配现用,使用前保持在4℃,4小时内使用。
- [0421] 5.1.7MuR5S4TR 10.5mg/ml 2.4ml
- [0422] 取MuR5S4TR原液 (24mg/ml) 1.05ml。
- [0423] 加入1.35ml上述溶媒,混匀。
- [0424] 现配现用,使用前保持在4℃,4小时内使用
- [0425] 5.2实验方法
- [0426] 5.2.1细胞培养
- [0427] HT-29细胞培养于McCoy's 5a培养基,含10%胎牛血清FBS。培养于含5%CO<sub>2</sub>的37℃培养箱。细胞复苏后,经过细胞扩增和传代,收集足够的细胞用于动物接种。
- [0428] 5.2.2细胞接种法建立肿瘤裸鼠皮下移植瘤模型
- [0429] 收集对数生长期的肿瘤细胞,计数后重悬于无血清McCoy's 5a培养基,调整细胞悬液浓度至 $3 \times 10^7$ /mL。用1mL注射器(4号针头)在裸鼠右侧背部皮下接种肿瘤细胞, $3 \times 10^6$ /0.1mL/鼠,共接种92只动物。
- [0430] 5.2.3分组给药
- [0431] 在肿瘤体积达到200mm<sup>3</sup>左右,将动物按随机区组法进行随机分组,使各组肿瘤差异小于均值的10%,每组8只,共8组。分组当日记为Day 0。按“4.实验设计”给药。
- [0432] 5.2.4指标检测
- [0433] 实验期间每周测定两次动物体重和肿瘤大小,每日观察记录临床症状,Day21测量完毕后处死所有动物,剥取肿瘤,称量瘤重并拍照。
- [0434] 所有动物实验操作严格遵守上海美迪西生物医药股份有限公司动物使用和管理规范。肿瘤相关参数的计算参考中国CFDA《细胞毒类抗肿瘤药物非临床研究技术指导原则》<sup>[1]</sup>。
- [0435] 5.3计算

[0436] 肿瘤相关参数的计算:

[0437] 肿瘤体积 (Tumor volume, TV) 的计算公式为:  $TV = a \times b^2 / 2$ 。其中 a、b 分别代表肿瘤测量长和宽。

[0438] 抗肿瘤活性的评价指标为相对肿瘤增值率 T/C (%) 和抑瘤率 (%), 计算公式分别为:  $T/C (\%) = TRTV / CRTV \times 100\%$ 。(TRTV: 治疗组 RTV; CRTV: 阴性对照组 RTV); 相对肿瘤体积 (relative tumor volume, RTV), 计算公式为:  $RTV = V_t / V_0$ 。其中  $V_0$  为分笼给药时 (即 Day 0) 测量所得肿瘤体积,  $V_t$  为每一次测量时的肿瘤体积。

[0439] 荷瘤动物的体重变化 (%) 计算如下:  $(\text{测量时体重} - \text{分组时体重}) / \text{分组时体重} \times 100$ 。

[0440] 根据中国 CFDA《细胞毒类抗肿瘤药物非临床研究技术指导原则》(2006年11月), T/C (%)  $\leq 40\%$  并经统计学分析  $P < 0.05$  为有效。若小鼠的体重下降超过 20% 或药物相关的死亡数超过 20%, 则认为该药物剂量具有严重毒性。

[0441] 6. 数据分析

[0442] 以时间点为 X 轴, 肿瘤体积为 Y 轴绘制肿瘤生长曲线; 以时间点为 X 轴, 动物平均体重 (g) 为 Y 轴绘制体重变化曲线。组间比较采用 t-检验,  $P < 0.05$  为显著性差异,  $P < 0.01$  为极显著性差异。

[0443] 7. 结果

[0444] 7.1 各受试物对人结肠癌细胞 HT-29 裸鼠移植瘤动物体重的影响

[0445] 在本次整个实验周期内, 溶媒组动物平均体重不受溶媒溶媒影响。动物平均体重不断增长。与给药首日即 Day 0 相比, Day 21 时动物平均体重上涨了 7.01% (即 1.64 克)。

[0446] 动物对 CPT-11 25mg/kg 能耐受, 在整个实验周期内, 与给药首日即 Day 0 相比, Day 21 时, 此组动物平均体重上涨了 9.23% (即 2.17 克)。

[0447] 动物对 TRAIL-Mu3 72mg/kg 每周给药三次, 连续三周给药方案能耐受, 在整个实验周期内, 与 Day 0 相比, Day 21 时, 此组动物平均体重上涨了 10.62% (即 2.46g)。

[0448] 动物对 TRAIL-Mu3 93mg/kg 每三天给药一次, 连续三周给药方案能耐受, 在整个实验周期内, 与 Day 0 相比, Day 21 时, 此组动物平均体重上涨了 5.83% (即 1.44 克)。

[0449] 动物对 TRAIL-Mu3 108mg/kg 每四天给药一次, 连续三周给药方案能耐受, 在整个实验周期内, 与 Day 0 相比, Day 21 时, 此组动物平均体重上涨了 7.85% (即 1.82 克)。

[0450] 动物对 MuR5S4TR 105mg/kg 每周给药三次, 连续三周给药方案能耐受, 在整个实验周期内, 与 Day 0 相比, Day 21 时, 此组动物平均体重上涨了 6.76% (即 1.60 克)。

[0451] 动物对 MuR5S4TR 135mg/kg 每三天给药一次, 连续三周给药方案能耐受, 在整个实验周期内, 与 Day 0 相比, Day 21 时, 此组动物平均体重上涨了 5.62% (即 1.30 克)。

[0452] 动物对 MuR5S4TR 158mg/kg 每四天给药一次, 连续三周给药方案能耐受, 在整个实验周期内, 与 Day 0 相比, Day 21 时, 此组动物平均体重上涨了 7.60% (即 1.78 克)。

[0453] 7.2 各受试物对人结肠癌细胞 HT-29 裸鼠移植瘤动物肿瘤体积的影响

[0454] 与溶媒组比, CPT-11, 对人结肠癌细胞 HT-29 裸鼠异种移植瘤有一定的抑制作用, 抑瘤率出现显著性差异, 在 Day 3 时, T/C 出现显著性差异, 为 88.74% ( $P < 0.05$ ); 在 Day 21 时, T/C 最小, 为 29.14% ( $P < 0.001$ )

[0455] TRAIL-Mu3 72mg/kg 每周三次给药组, 对人结肠癌细胞 HT-29 裸鼠异种移植瘤有一

定的抑制作用,在Day7时,T/C出现显著性差异,为54.69% ( $P<0.05$ );在Day21时,T/C最小,为36.43% ( $P<0.01$ )。

[0456] TRAIL-Mu3 93mg/kg每三天次给药一次组,对人结肠癌细胞HT-29裸鼠异种移植瘤有一定的抑制作用,在Day3时,T/C出现显著性差异,为81.84% ( $P<0.05$ );在Day21时,T/C最小,为28.00% ( $P<0.01$ )。

[0457] TRAIL-Mu3 108mg/kg每四天给药一次组,对人结肠癌细胞HT-29裸鼠异种移植瘤有一定的抑制作用,在Day3时,T/C出现显著性差异,为85.49% ( $P<0.05$ );在Day21时,T/C最小,为28.69% ( $P<0.01$ )。

[0458] MuR5S4TR 105mg/kg每周给药三次组,对人结肠癌细胞HT-29裸鼠异种移植瘤有一定的抑制作用,在Day3时,T/C出现显著性差异,为88.26% ( $P<0.05$ );在Day21时,T/C最小,为42.86% ( $P<0.01$ )。

[0459] MuR5S4TR 135mg/kg每三天给药一次组,对人结肠癌细胞HT-29裸鼠异种移植瘤有一定的抑制作用,在Day7时,T/C出现显著性差异,为53.26% ( $P<0.05$ );在Day21时,T/C最小,为29.03% ( $P<0.01$ )。

[0460] MuR5S4TR 158mg/kg每四天给药一次组,对人结肠癌细胞HT-29裸鼠异种移植瘤有一定的抑制作用,在Day7时,T/C出现显著性差异,为51.53% ( $P<0.05$ );在Day21时,T/C最小,为28.87% ( $P<0.01$ )。

[0461] 实验结果见表7和附图11。

[0462] 7.3各受试物对人结肠癌细胞HT-29裸鼠移植瘤动物肿瘤重量的影响

[0463] Day21实验结束,所有动物在称量体重和肿瘤体积后处死,肿瘤从动物身上分离,并称重。溶媒组,CPT-11组,TRAIL-Mu3 72mg/kg每周三次给药组,TRAIL-Mu3 93mg/kg每三天给药一次组,TRAIL-Mu3 108mg/kg每四天给药一次组,MuR5S4TR 105mg/kg每周三次给药组,MuR5S4TR 135mg/kg每三天给药一次组,MuR5S4TR 158mg/kg每四天给药一次组的肿瘤平均重量分别是1.339克,0.811克,0.898克,0.796克,0.805克,0.936克,0.823克,和0.812克。实验结果见表7和附图12。

[0464] 表7. TRAIL-Mu3和MuR5S4TR在人结肠癌细胞HT-29裸鼠异种移植瘤模型中对动物肿瘤大小影响

[0465]

组别	受试物	剂量 mg/kg	动物数	肿瘤体积 ( $\text{mm}^3$ , Mean $\pm$ SEM)		T/C (%) Day21	肿瘤重量 (g)
				开始给药时	实验结束时		

[0466]

				Day0	Day 21		
1	溶媒组	N/A	8	206.95 ± 16.56	2494.18 ± 161.21	N/A	1.339 ± 0.100
2	CPT-11	25	8	209.51 ± 18.18	735.86 ± 111.21	29.14%	0.811 ± 0.092
3	TRAIL-Mu3	72	8	210.21 ± 18.25	922.94 ± 99.87	36.43%	0.898 ± 0.142
4	TRAIL-Mu3	93	8	210.48 ± 18.10	710.38 ± 63.76	28.00%	0.796 ± 0.049
5	TRAIL-Mu3	108	8	211.33 ± 17.97	730.71 ± 90.76	28.69%	0.805 ± 0.090
6	MuR5S4TR	105	8	212.61 ± 15.12	1098.14 ± 135.81	42.86%	0.936 ± 0.082
7	MuR5S4TR	135	8	209.82 ± 14.73	734.20 ± 103.25	29.03%	0.823 ± 0.122
8	MuR5S4TR	158	8	207.73 ± 15.58	722.83 ± 145.08	28.87%	0.812 ± 0.146

[0467] 8. 小结

[0468] 本次实验中,与溶媒组相似,CPT-11组,TRAIL-Mu3 72mg/kg每周三次给药组,TRAIL-Mu3 93mg/kg每三天给药一次组,TRAIL-Mu3 108mg/kg每四天给药一次组,MuR5S4TR 105mg/kg每周三次给药组,MuR5S4TR 135mg/kg每三天给药一次组,MuR5S4TR 158mg/kg每四天给药一次组,对动物体重几乎没有影响。

[0469] 相比溶媒组,CPT-11组,TRAIL-Mu3 72mg/kg每周三次给药组,TRAIL-Mu3 93mg/kg每三天给药一次组,TRAIL-Mu3 108mg/kg每四天给药一次组,MuR5S4TR 105mg/kg每周三次给药组,MuR5S4TR 135mg/kg每三天给药一次组,MuR5S4TR 158mg/kg每四天给药一次组对人结肠癌细胞HT-29裸鼠异种移植瘤有均有一定的抑制作用,给药后,抑瘤率均出现显著性差异。TRAIL-Mu3及TRAIL-MuR5S4TR每三天给药一次组和每四天给药一次组的肿瘤抑制效应明显优越于每周三次给药组,而每三天给药一次组和每四天给药一次组的肿瘤抑制效应无显著性差异。

[0470] 9. 参考文献

[0471] [1]《细胞毒类抗肿瘤药物非临床研究技术指导原则》2006年11月

[0472] 实施例5

[0473] TRAIL-Mu3和TRAIL-MuR5S4TR不同给药间隔对人胰腺癌细胞PANC-1裸鼠异种移植瘤的治疗作用研究

[0474] 1. 实验目的

[0475] 本研究采用人胰腺癌细胞PANC-1裸鼠异种移植瘤模型,评价TRAIL-Mu3和TRAIL-MuR5S4TR不同给药间隔的体内抗肿瘤活性。

[0476] 2. 实验动物

- [0477] 2.1动物种类
- [0478] 小鼠。
- [0479] 2.2品种
- [0480] Balb/c裸鼠。
- [0481] 2.3性别
- [0482] 雌性。
- [0483] 2.4数量
- [0484] 实验使用64只。
- [0485] 2.5年龄
- [0486] 4~6周。
- [0487] 2.6体重
- [0488] 16~18g±20%体重均值。
- [0489] 2.7动物来源(供应商)
- [0490] 上海西普尔-必凯实验动物有限公司(BK),许可证号SCXK(沪)2013-0016,动物合格证编号:2008001665079。
- [0491] 2.8实验动物管理
- [0492] 2.8.1动物身份鉴定方法
- [0493] 每个鼠笼均佩戴有实验编号、实验组别、实验人员姓名、小鼠品种和性别等信息的身份卡片,小鼠用耳标法标记。
- [0494] 2.8.2随机分组
- [0495] 当肿瘤体积平均达到160mm<sup>3</sup>左右用随机区组法分组,保证各组间肿瘤体积和小鼠体重均一,各组肿瘤体积的均值与所有实验动物肿瘤体积的均值差异不超过±10%。
- [0496] 2.8.3操作管理规范
- [0497] 所有实验动物的操作和管理均严格遵守上海美迪西实验动物使用和管理指导原则。
- [0498] 2.8.4饲养条件
- [0499] 居住条件:每笼3只。
- [0500] 温度:20℃~26℃
- [0501] 湿度:40%~70%
- [0502] 光照:12小时昼夜交替
- [0503] 2.8.5饲料
- [0504] 辐照大小鼠饲料,购自北京科澳协力饲料有限公司。自由进食。
- [0505] 2.8.6饮水
- [0506] 城市自来水,经过滤高压灭菌后饮用。
- [0507] 2.8.7垫料
- [0508] 玉米芯,上海茂生衍生物科技有限公司,高压灭菌后使用。每周换两次垫料。
- [0509] 2.8.8适应期
- [0510] 实验前给予小鼠最短一周环境适应期。
- [0511] 3.实验材料

[0512] 3.1测试药品

[0513] 测试物TRAIL-Mu3和MuR5S4TR信息

[0514]

受试物	分子量	溶媒	批号	纯度	稳定性/储存	生产厂商或提供单位
吉西他滨	299.66	生理盐水	C558141A	市售产品	室温, 现配现用	LILLY FRANCE
TRAIL-Mu3	19KDa	注射用水 生理盐水	20160727	≥95%	-70~-86°C储存, 每次新鲜配制, 配制后尽快使用	成都华创生物技术有 限公司提供
TRAIL-MuR5S4TR	19KDa	注射用水 生理盐水	20160923	≥95%	-70~-86°C储存, 每次新鲜配制, 配制后尽快使用	成都华创生物技术有 限公司提供

[0515] 3.2细胞株

[0516] 人胰腺癌细胞细胞株PANC-1购于上海中科院细胞生物研究所。

[0517] 3.3试剂

[0518] DMEM培养基(GIBCO,美国)

[0519] 胎牛血清FBS(GIBCO,美国)

[0520] 胰酶Trypsin-EDTA(购自GIBCO美国)

[0521] 台盼蓝Trypan Blue(购自GIBCO美国)

[0522] 3.4仪器

[0523] 生物安全柜(型号:AC2-6E1),购自ESCO;

[0524] CO<sub>2</sub>隔水细胞培养箱(型号:3111),购自Thermo Scientific Forma;

[0525] 倒置显微镜(型号:CKX41SF),购自Olympus;

[0526] 电动吸引器(型号YX930D),购自上海医疗器械工业(集团)有限公司;

[0527] 低速离心机(型号LD5-2A),购自北京雷勃尔离心机有限公司。

[0528] 3.5其他

[0529] 1ml无菌注射器购自购上海康德莱企业发展集团股份有限公司(上海,中国)。

[0530] 4.实验设计

[0531] 建立人胰腺癌细胞PANC-1裸鼠皮下移植瘤模型,每只动物接种 $5 \times 10^6$ 个细胞,接种体积为0.1ml/动物。

[0532] 本次独立实验设计给药剂量和给药方案如下:

[0533] TRAIL-Mu3和MuR5S4TR在人胰腺癌细胞PANC-1裸鼠移植瘤模型中的抗肿瘤作用

[0534]

组别	动物数	受试物	给药途径	给药剂量 mg/kg	给药体积 ml/kg	给药浓度 mg/ml	给药频率
1	8	生理盐水	IV	NA	10	NA	Day 0, 1, 2, 3, 4
2	8	吉西他滨	IV	40	10	4	Day 0, 2, 4
3	8	TRAIL -Mu3	IV	72	10	7.2	Day 0, 2, 4, 7, 9, 11, 14, 16, 18
4	8	TRAIL -Mu3	IV	93	10	9.3	Day 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18
5	8	TRAIL -Mu3	IV	108	10	10.8	Day 0, 4, 8, 12, 16, 20
6	8	MuR5S4TR	IV	105	10	10.5	Day 0, 2, 4, 7, 9, 11, 14, 16, 18
7	8	MuR5S4TR	IV	135	10	13.5	Day 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18
8	8	MuR5S4TR	IV	158	10	15.8	Day 0, 4, 8, 12, 16, 20

[0535] 5. 实验方法

[0536] 5.1 测试药制剂配制

[0537] 5.1.1 吉西他滨 4mg/ml 2ml

[0538] -吉西他滨原液 (20mg/ml)

[0539] -吉西他滨 (200mg) 进行分装, 均分为四管 (每管含吉西他滨 50mg)。置 4 度冰箱保存。

[0540] -取上述分装的吉西他滨 (50mg) 一管。

[0541] -加入 2.5ml 生理盐水, 混匀, 溶解至澄清, 配制成 20mg/ml 吉西他滨原液。

[0542] -取吉西他滨原液 (20mg/ml) 0.4ml。

[0543] -加入 1.6ml 生理盐水, 混匀。

[0544] -现配现用。

[0545] 5.1.2 TRAIL-Mu3 10.8mg/ml 2.4ml

[0546] -溶媒: 0.9% 生理盐水: 注射用水 = 1:1

[0547] -取 TRAIL-Mu3 原液 (24mg/ml) 1.08ml,

[0548] -加入 1.32ml 上述溶媒, 混匀。

[0549] -现配现用, 使用前保持在 4℃, 4 小时内使用。

[0550] 5.1.3 TRAIL-Mu3 9.3mg/ml 2.4ml

[0551] -溶媒: 0.9% 生理盐水: 注射用水 = 1:1



- [0552] -取TRAIL-Mu3原液(24mg/ml) 0.93ml,
- [0553] -加入1.47ml上述溶媒,混匀。
- [0554] -现配现用,使用前保持在4℃,4小时内使用。5.1.4TRAIL-Mu3 7.2mg/ml 2.4ml
- [0555] -取TRAIL-Mu3原液(24mg/ml) 0.72ml。
- [0556] -加入1.68ml上述溶媒,混匀。
- [0557] -现配现用,使用前保持在4℃,4小时内使用。
- [0558] 5.1.5MuR5S4TR 15.8mg/ml 2.4ml
- [0559] -溶媒:0.9%生理盐水:注射用水=1:1
- [0560] -取MuR5S4TR原液(24mg/ml) 1.58ml。
- [0561] -加入0.82ml上述溶媒,混匀。
- [0562] -现配现用,使用前保持在4℃,4小时内使用。
- [0563] 5.1.6MuR5S4TR 13.5mg/ml 2.4ml
- [0564] -溶媒:0.9%生理盐水:注射用水=1:1
- [0565] -取MuR5S4TR原液(24mg/ml) 1.35ml。
- [0566] -加入1.05ml上述溶媒,混匀。
- [0567] -现配现用,使用前保持在4℃,4小时内使用。
- [0568] 5.1.7MuR5S4TR 10.5mg/ml 2.4ml
- [0569] -取MuR5S4TR原液(24mg/ml) 1.05ml。
- [0570] -加入1.35ml上述溶媒,混匀。
- [0571] -现配现用,使用前保持在4℃,4小时内使用
- [0572] 5.2实验方法
- [0573] 5.2.1细胞培养
- [0574] PANC-1细胞培养于DMEM培养基,含10%胎牛血清FBS。培养于含5%CO<sub>2</sub>的37℃培养箱。细胞复苏后,经过细胞扩增和传代,收集足够的细胞用于动物接种。
- [0575] 5.2.2细胞接种法建立肿瘤裸鼠皮下移植瘤模型
- [0576] 收集对数生长期的肿瘤细胞,计数后重悬于无血清DMEM培养基,调整细胞悬液浓度至 $5 \times 10^7$ /mL。用1mL注射器(4号针头)在裸鼠右侧背部皮下接种肿瘤细胞, $5 \times 10^6$ /0.1mL/鼠,共接种90只动物。
- [0577] 5.2.3分组给药
- [0578] 在肿瘤体积达到160mm<sup>3</sup>左右,将动物按随机区组法进行随机分组,使各组肿瘤差异小于均值的10%,每组8只,共8组。分组当日记为Day0。按“4.实验设计”给药。
- [0579] 5.2.4指标检测
- [0580] 实验期间每周测定两次动物体重和肿瘤大小,每日观察记录临床症状,Day21测量完毕后处死所有动物,剥取肿瘤,称量瘤重并拍照。
- [0581] 所有动物实验操作严格遵守上海美迪西生物医药股份有限公司动物使用和管理规范。肿瘤相关参数的计算参考中国CFDA《细胞毒类抗肿瘤药物非临床研究技术指导原则》[1]。
- [0582] 5.3计算
- [0583] 肿瘤相关参数的计算:

[0584] 肿瘤体积 (Tumor volume, TV) 的计算公式为:  $TV = a \times b^2 / 2$ 。其中 a、b 分别代表肿瘤测量长和宽。

[0585] 抗肿瘤活性的评价指标为相对肿瘤增值率 T/C (%) 和抑瘤率 (%), 计算公式分别为:  $T/C (\%) = TRTV / CRTV \times 100\%$ 。(TRTV: 治疗组 RTV; CRTV: 阴性对照组 RTV); 相对肿瘤体积 (relative tumor volume, RTV), 计算公式为:  $RTV = V_t / V_0$ 。其中  $V_0$  为分笼给药时 (即 Day 0) 测量所得肿瘤体积,  $V_t$  为每一次测量时的肿瘤体积。

[0586] 荷瘤动物的体重变化 (%) 计算如下:  $(\text{测量时体重} - \text{分组时体重}) / \text{分组时体重} \times 100$ 。

[0587] 根据中国 CFDA《细胞毒类抗肿瘤药物非临床研究技术指导原则》(2006年11月),  $T/C (\%) \leq 40\%$  并经统计学分析  $P < 0.05$  为有效。若小鼠的体重下降超过 20% 或药物相关的死亡数超过 20%, 则认为该药物剂量具有严重毒性。

[0588] 6. 数据分析

[0589] 以时间点为 X 轴, 肿瘤体积为 Y 轴绘制肿瘤生长曲线; 以时间点为 X 轴, 动物平均体重 (g) 为 Y 轴绘制体重变化曲线。组间比较采用 t-检验,  $P < 0.05$  为显著性差异,  $P < 0.01$  为极显著性差异。

[0590] 7. 结果

[0591] 7.1 各受试物对人胰腺癌细胞 PANC-1 裸鼠移植瘤动物体重的影响

[0592] 在本次整个实验周期内, 溶媒组动物平均体重不受溶媒溶媒影响。动物平均体重不断增长。与给药首日即 Day 0 相比, Day 21 时动物平均体重上涨了 8.42% (即 1.93 克)。

[0593] 吉西他滨 (40mg/kg, IV, Day 0, 2, 4) 组, 在给药初期, 动物体重出现大幅下降, 与给药首日即 Day 0 相比, Day 7 时, 此组动物平均体重下降了 16.92% (即 3.18 克), 同时 Day 7 时, 出现一只动物死亡; 随着给药周期结束, 此组动物体重开始恢复并上涨, 在 Day 21 时, 此组动物平均体重上涨了 8.57% (即 1.93 克)。

[0594] 动物对 TRAIL-Mu3 72mg/kg 每周给药三次, 连续三周给药方案能耐受, 在整个实验周期内, 与 Day 0 相比, Day 21 时, 此组动物平均体重上涨了 6.09% (即 1.36g)。

[0595] 动物对 TRAIL-Mu3 93mg/kg 每三天给药一次, 连续三周给药方案能耐受, 在整个实验周期内, 与 Day 0 相比, Day 21 时, 此组动物平均体重上涨了 5.76% (即 1.35g)。

[0596] 动物对 TRAIL-Mu3 108mg/kg 每四天给药一次, 连续三周给药方案能耐受, 在整个实验周期内, 与 Day 0 相比, Day 21 时, 此组动物平均体重上涨了 5.63% (即 1.26g)。

[0597] 动物对 MuR5S4TR 105mg/kg 每周给药三次, 连续三周给药方案能耐受, 在整个实验周期内, 与 Day 0 相比, Day 21 时, 此组动物平均体重上涨了 5.53% (即 1.24g)。

[0598] 动物对 MuR5S4TR 135mg/kg 每三天给药一次, 连续三周给药方案能耐受, 在整个实验周期内, 与 Day 0 相比, Day 21 时, 此组动物平均体重上涨了 5.09% (即 1.12g)。

[0599] 动物对 MuR5S4TR 158mg/kg 每四天给药一次, 连续三周给药方案能耐受, 在整个实验周期内, 与 Day 0 相比, Day 21 时, 此组动物平均体重上涨了 5.89% (即 1.33g)。

[0600] 7.2 各受试物对人胰腺癌细胞 PANC-1 裸鼠移植瘤动物肿瘤体积的影响

[0601] 与溶媒组比, 吉西他滨对人胰腺癌细胞 PANC-1 裸鼠异种移植瘤有一定的抑制作用, 抑瘤率出现显著性差异, 在 Day 4 时, T/C 出现显著性差异, 为 80.28% ( $P < 0.05$ ); 在 Day 21 时, T/C 最小, 为 36.14% ( $P < 0.001$ )。

[0602] TRAIL-Mu3 72mg/kg每周三次,连续三周组对人胰腺癌细胞PANC-1裸鼠异种移植瘤有一定的抑制作用,抑瘤率出现显著性差异,在Day4时,T/C出现显著性差异,为73.94% ( $P<0.01$ );在Day21时,T/C最小,为22.34% ( $P<0.001$ )。

[0603] TRAIL-Mu3 93mg/kg每三天一次,连续三周组对人胰腺癌细胞PANC-1裸鼠异种移植瘤有一定的抑制作用,抑瘤率出现显著性差异,在Day4时,T/C出现显著性差异,为63.38% ( $P<0.01$ );在Day21时,T/C最小,为23.25% ( $P<0.001$ )。

[0604] TRAIL-Mu3 108mg/kg每四天一次,连续三周组对人胰腺癌细胞PANC-1裸鼠异种移植瘤有一定的抑制作用,抑瘤率出现显著性差异,在Day4时,T/C出现显著性差异,为61.27% ( $P<0.01$ );在Day21时,T/C最小,为23.13% ( $P<0.001$ )。

[0605] MuR5S4TR 105mg/kg每周三次,连续三周组,对人胰腺癌细胞PANC-1裸鼠异种移植瘤有一定的抑制作用,抑瘤率出现显著性差异,在Day4时,T/C出现显著性差异,为65.49% ( $P<0.001$ );在Day21时,T/C最小,为24.82% ( $P<0.001$ )。

[0606] MuR5S4TR 135mg/kg每三天一次,连续三周组,对人胰腺癌细胞PANC-1裸鼠异种移植瘤有一定的抑制作用,抑瘤率出现显著性差异,在Day4时,T/C出现显著性差异,为70.42% ( $P<0.001$ );在Day21时,T/C最小,为27.00% ( $P<0.001$ )。

[0607] MuR5S4TR 158mg/kg每四天一次,连续三周组,对人胰腺癌细胞PANC-1裸鼠异种移植瘤有一定的抑制作用,抑瘤率出现显著性差异,在Day4时,T/C出现显著性差异,为73.24% ( $P<0.001$ );在Day21时,T/C最小,为27.02% ( $P<0.001$ )。

[0608] 实验结果见表8和附图13。

[0609] 7.3各受试物对人胰腺癌细胞PANC-1裸鼠移植瘤动物肿瘤重量的影响

[0610] Day21实验结束,所有动物在称量体重和肿瘤体积后处死,肿瘤从动物身上分离,并称量。溶媒组,吉西他滨组 ( $n=7$ ),TRAIL-Mu3 72mg/kg每周三次、连续三周组,TRAIL-Mu3 93mg/kg每三天一次、连续三周组,TRAIL-Mu3108mg/kg每四天一次、连续三周组,MuR5S4TR 105mg/kg每周三次、连续三周组,MuR5S4TR 135mg/kg每三天一次、连续三周组,MuR5S4TR 158mg/kg每四天一次、连续三周组的肿瘤平均重量分别是0.131克,0.075克,0.042克,0.044克,0.043克,0.047克,0.050克和0.052克。实验结果见表8和附图14。

[0611] 表8. TRAIL-Mu3和MuR5S4TR在人胰腺癌细胞PANC-1裸鼠异种移植瘤模型中对动物肿瘤大小影响

[0612]

组别	受试物	剂量 mg/kg	动物数	肿瘤体积 (mm <sup>3</sup> , Mean±SEM)		T/C (%) Day21	肿瘤重量 (g)
				开始给药时 Day0	实验结束时 Day 21		
1	溶媒组	N/A	8	162.27 ± 8.18	402.25 ± 22.06	N/A	0.131 ± 0.016
2	吉西他滨	40	8	161.91 ± 8.55	184.51 ± 33.47	36.14%	0.075 ± 0.019
3	TRAIL -Mu3	72	8	163.29 ± 9.10	90.45 ± 20.83	22.34%	0.042 ± 0.009
4	TRAIL -Mu3	93	8	163.85 ± 8.92	94.45 ± 15.49	23.25%	0.044 ± 0.016
5	TRAIL -Mu3	108	8	163.18 ± 8.82	93.56 ± 17.75	23.13%	0.043 ± 0.009
6	MuR5S4 TR	105	8	164.37 ± 6.90	101.14 ± 40.14	24.82%	0.047 ± 0.021
7	MuR5S4 TR	135	8	163.06 ± 6.58	109.15 ± 20.63	27.00%	0.050 ± 0.015
8	MuR5S4 TR	158	8	161.69 ± 6.77	108.28 ± 26.57	27.02%	0.052 ± 0.012

[0613] 8. 小结

[0614] 本次实验中,与溶媒组相似,TRAIL-Mu3 72mg/kg每周三次、连续三周组,TRAIL-Mu3 93mg/kg每三天一次、连续三天组,TRAIL-Mu3 108mg/kg每四天一次、连续三周组,MuR5S4TR 105mg/kg每周三次、连续三周组,MuR5S4TR135mg/kg每三天一次、连续三周组,MuR5S4TR 158mg/kg每四天一次、连续三周组,对动物体重几乎没有影响。

[0615] 吉西他滨组,在Day7时出现一只动物死亡。

[0616] 相比溶媒组,吉西他滨组,TRAIL-Mu3 72mg/kg每周三次、连续三周组,TRAIL-Mu3 93mg/kg每三天一次、连续三周组,TRAIL-Mu3 108mg/kg每四天一次、连续三周组,MuR5S4TR 105mg/kg每周三次、连续三周组,MuR5S4TR135mg/kg每三天一次、连续三周组,MuR5S4TR 158mg/kg每四天一次、连续三周组对人胰腺癌细胞PANC-1裸鼠异种移植瘤有均有明显的抑制作用,给药后,抑瘤率均出现显著性差异。TRAIL-Mu3 72mg/kg每周三次、连续三周组,TRAIL-Mu3 93mg/kg每三天一次、连续三周组,TRAIL-Mu3 108mg/kg每四天一次、连续三周组各组之间疗效没有差异。MuR5S4TR 105mg/kg每周三次、连续三周组,MuR5S4TR 135mg/kg每三天一次、连续三周组,MuR5S4TR158mg/kg每四天一次、连续三周组各组之间疗效没有差异。

[0617] 9. 参考文献

[0618] [1]《细胞毒类抗肿瘤药物非临床研究技术指导原则》2006年11月

[0619] 上文所列出的一系列的详细说明仅仅是针对本发明的可行性实施例的具体说明,它们并非用以限制本发明的保护范围,凡未脱离本发明技艺精神所作的等效实施例或变更

---

均应包含在本发明的保护范围之内。

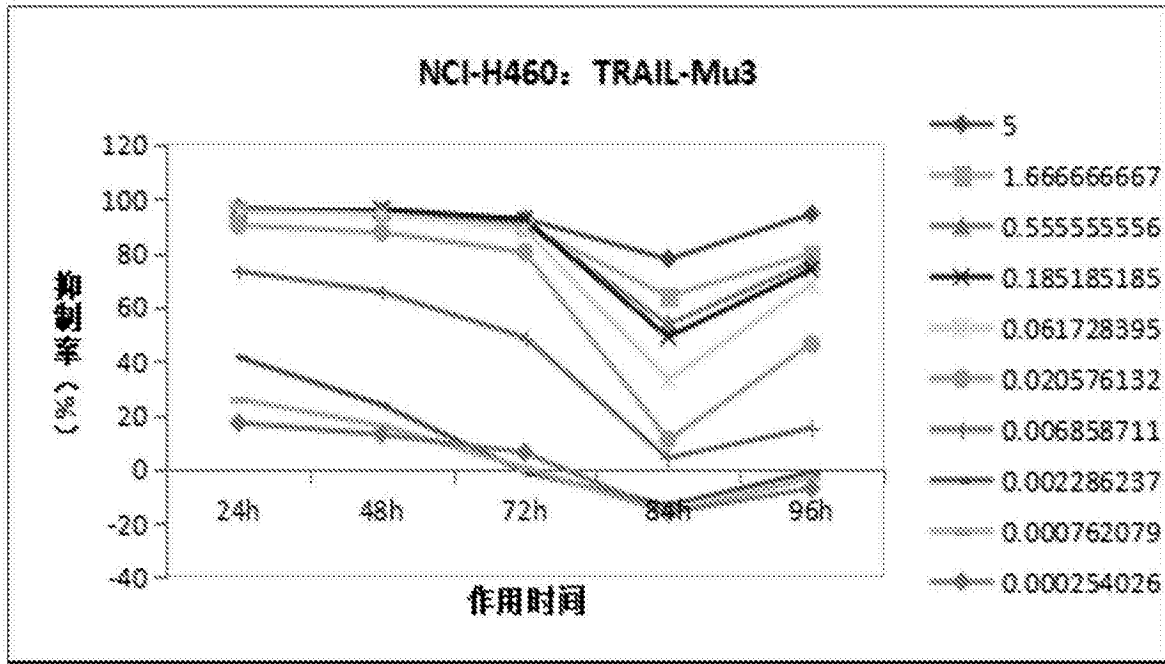


图1

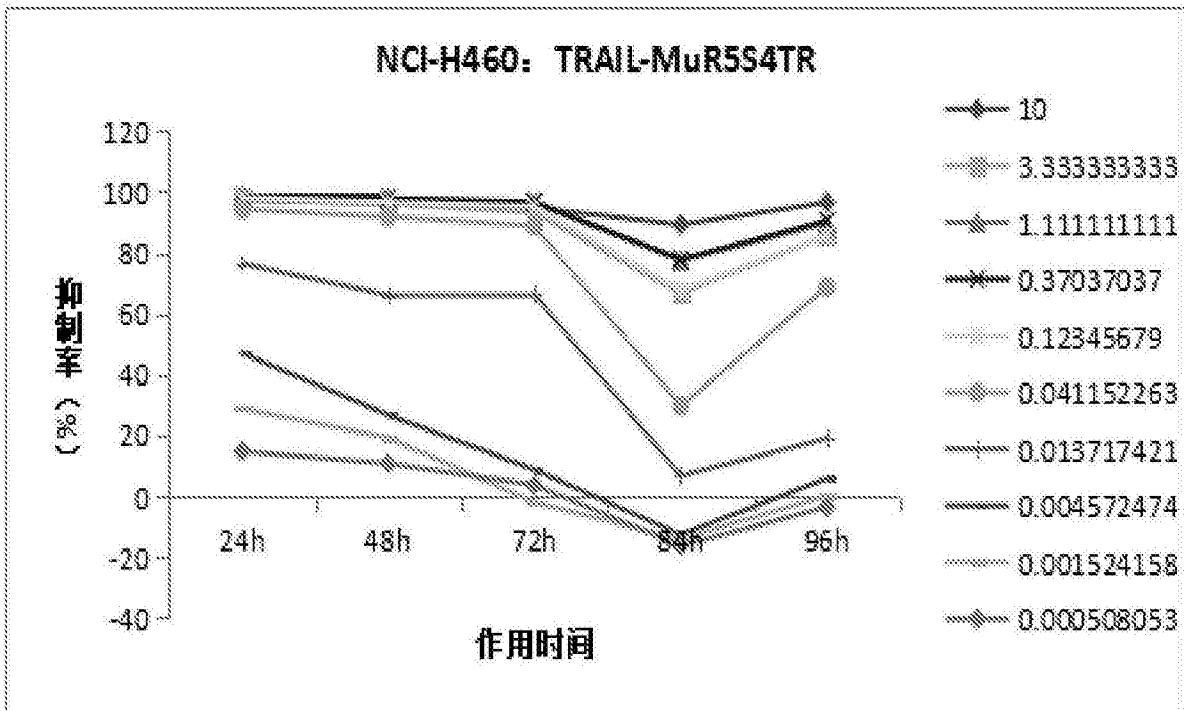


图2

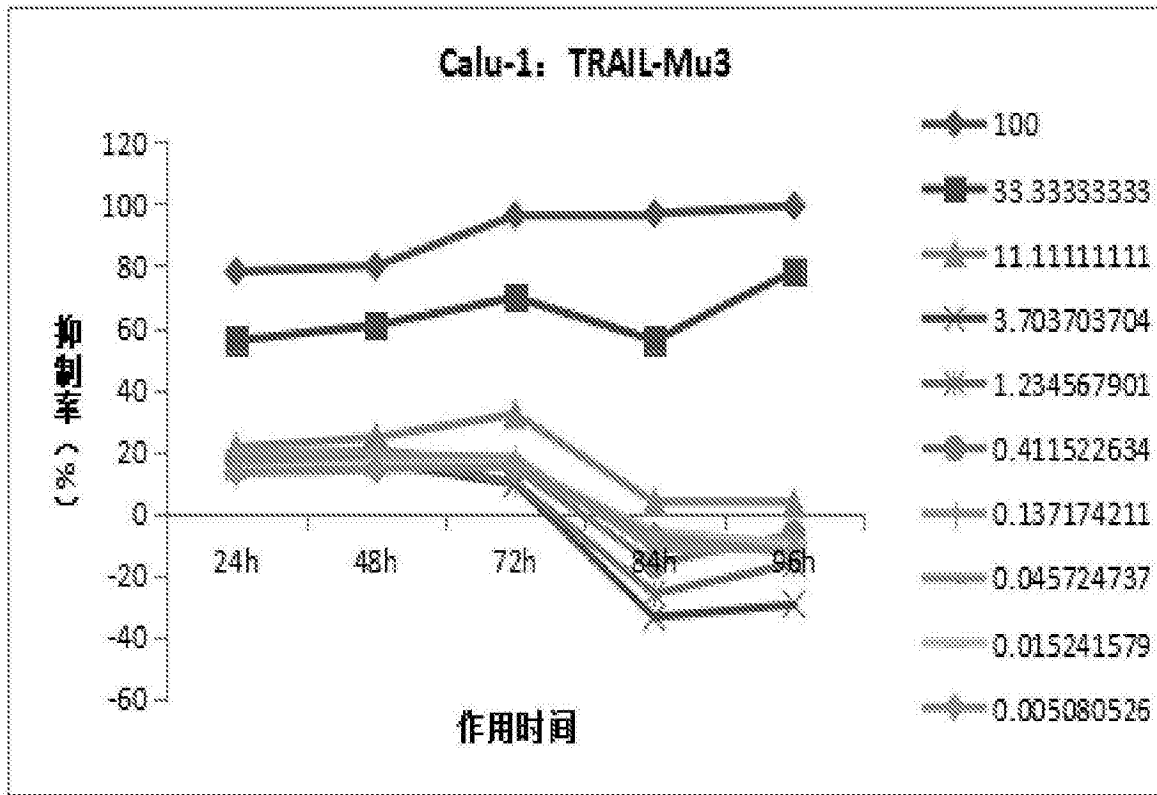


图3

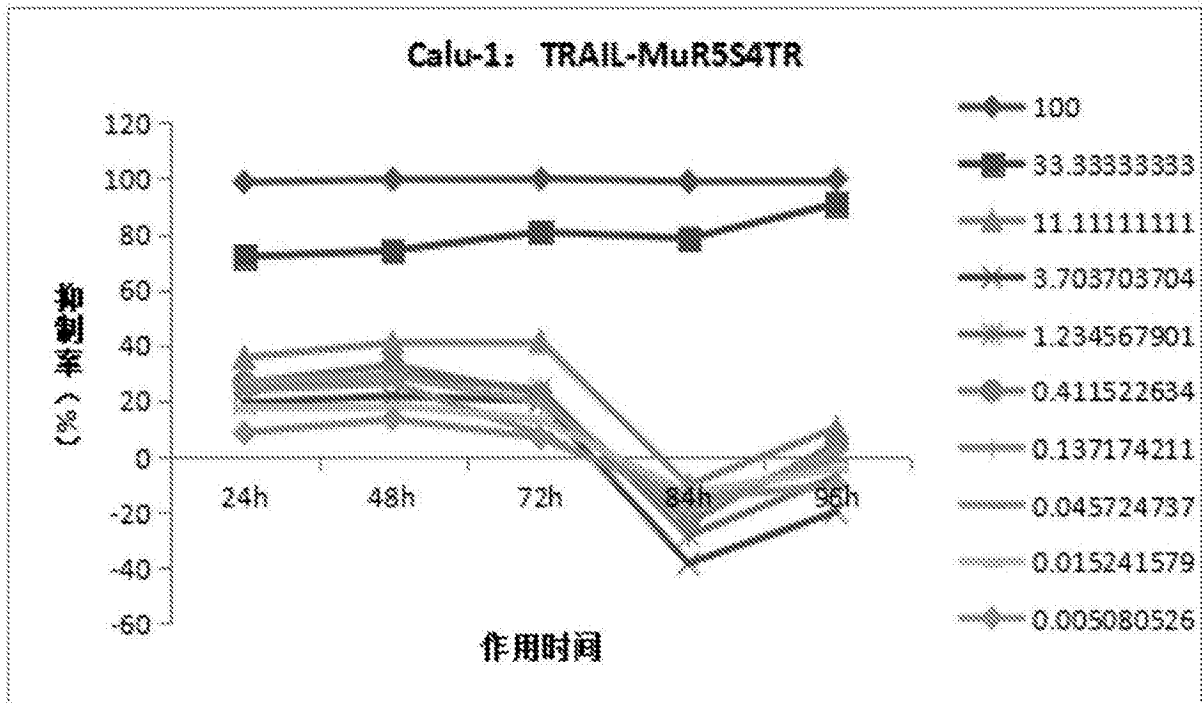


图4

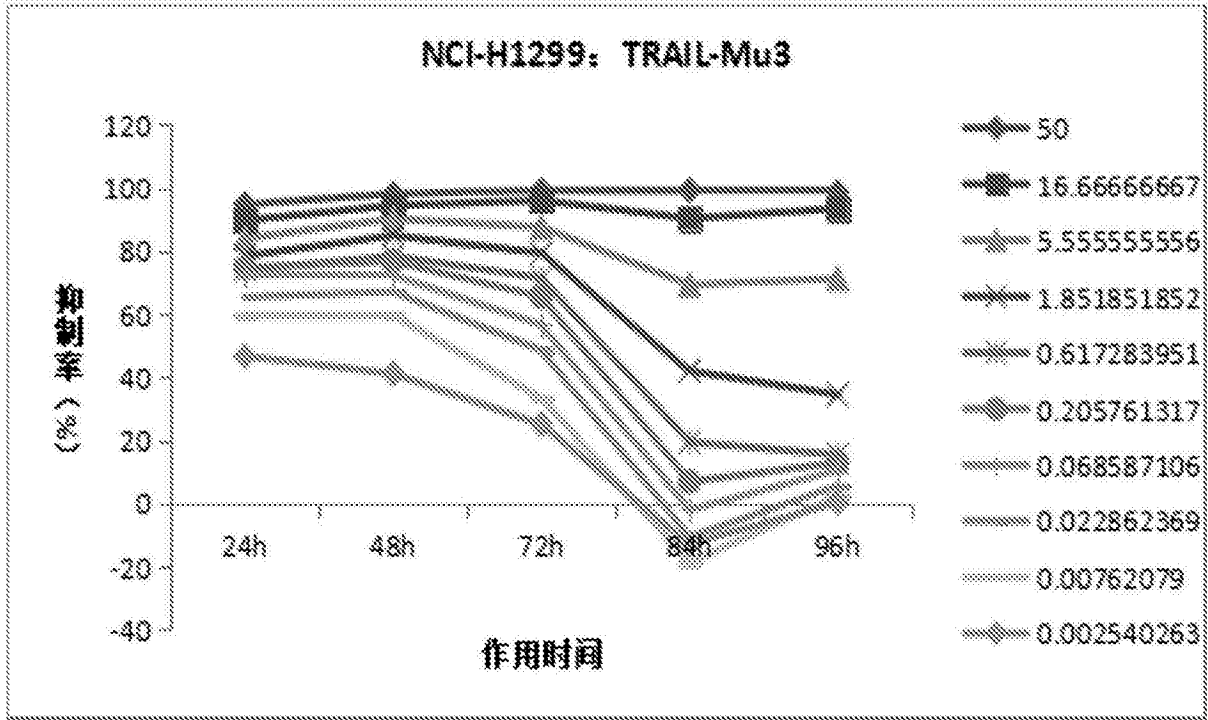


图5

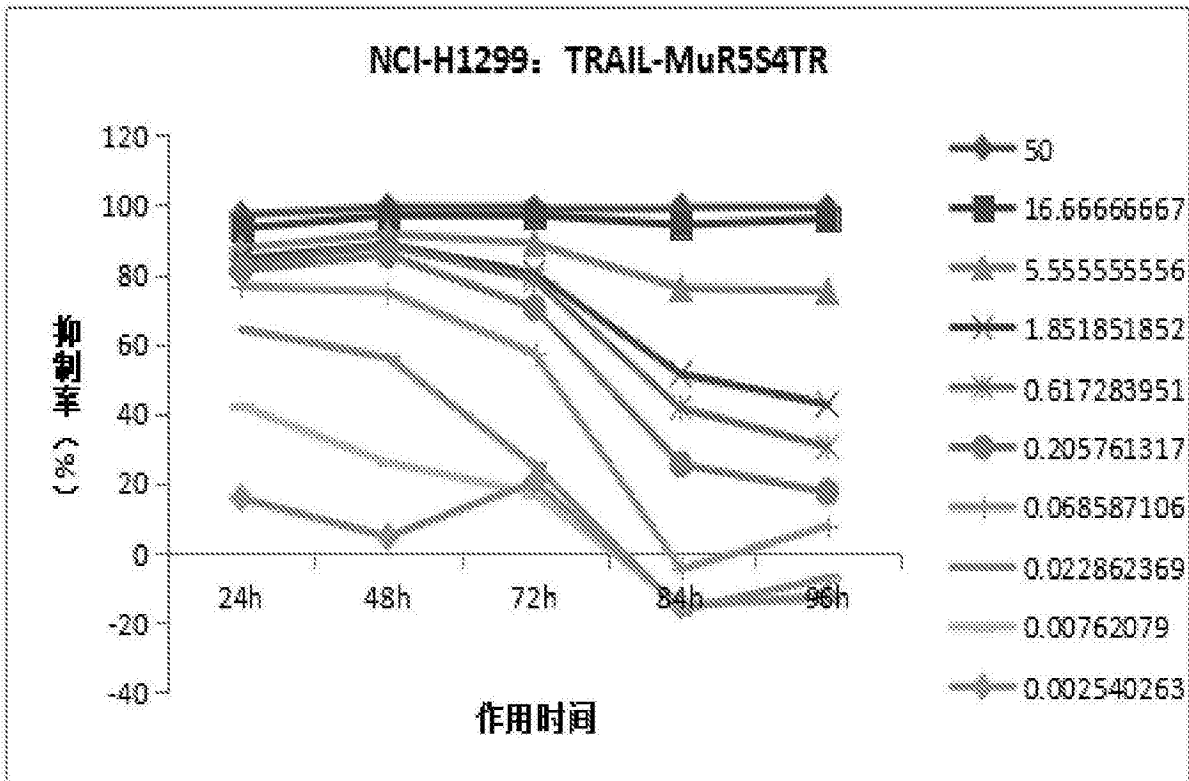


图6



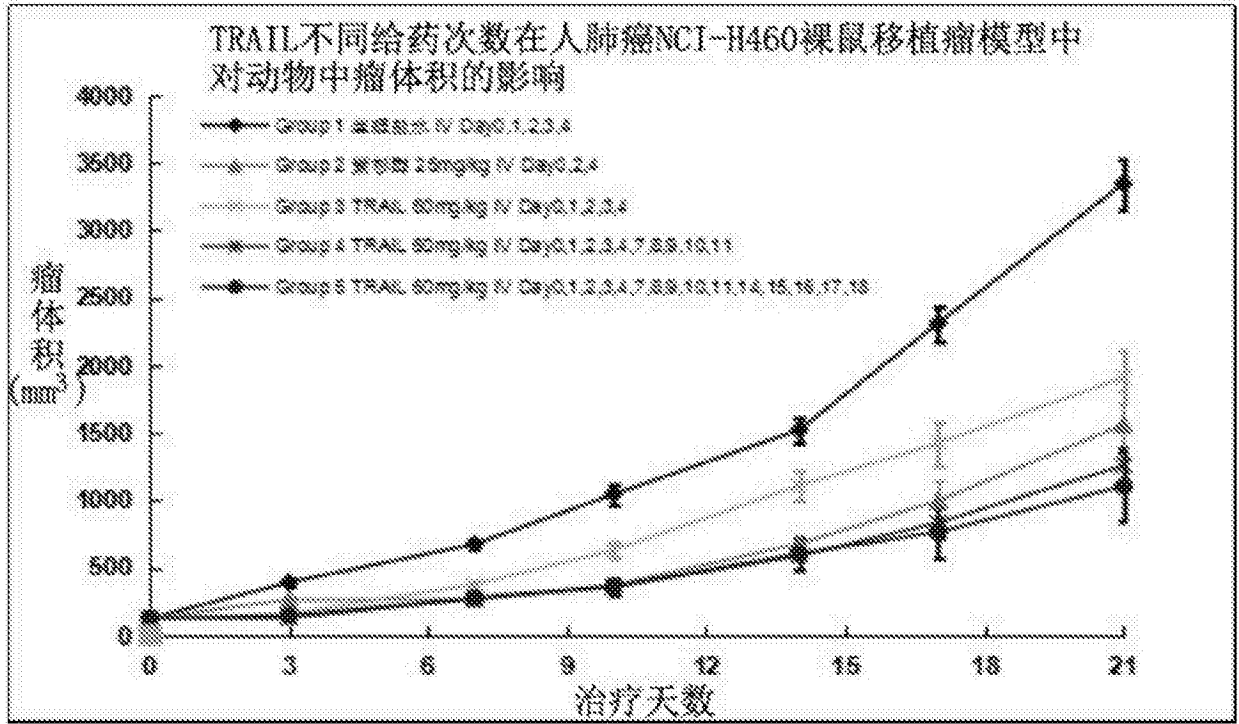


图7

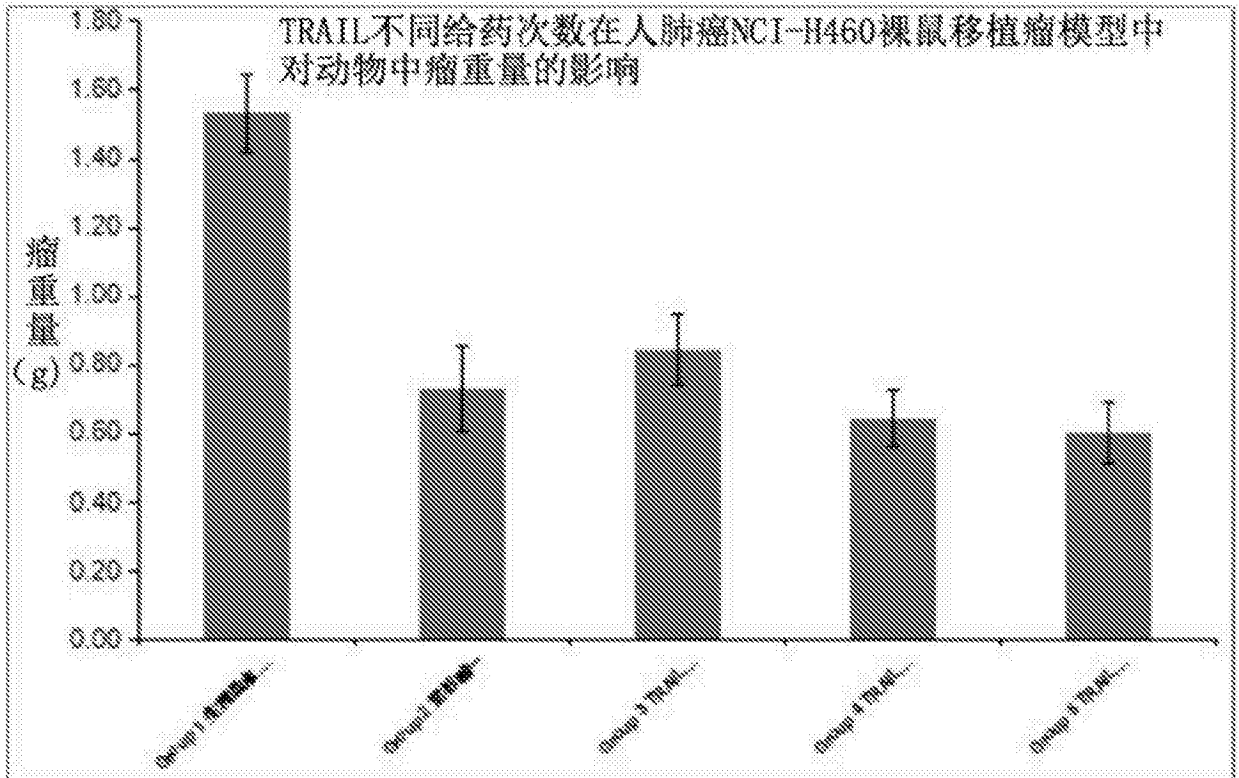


图8

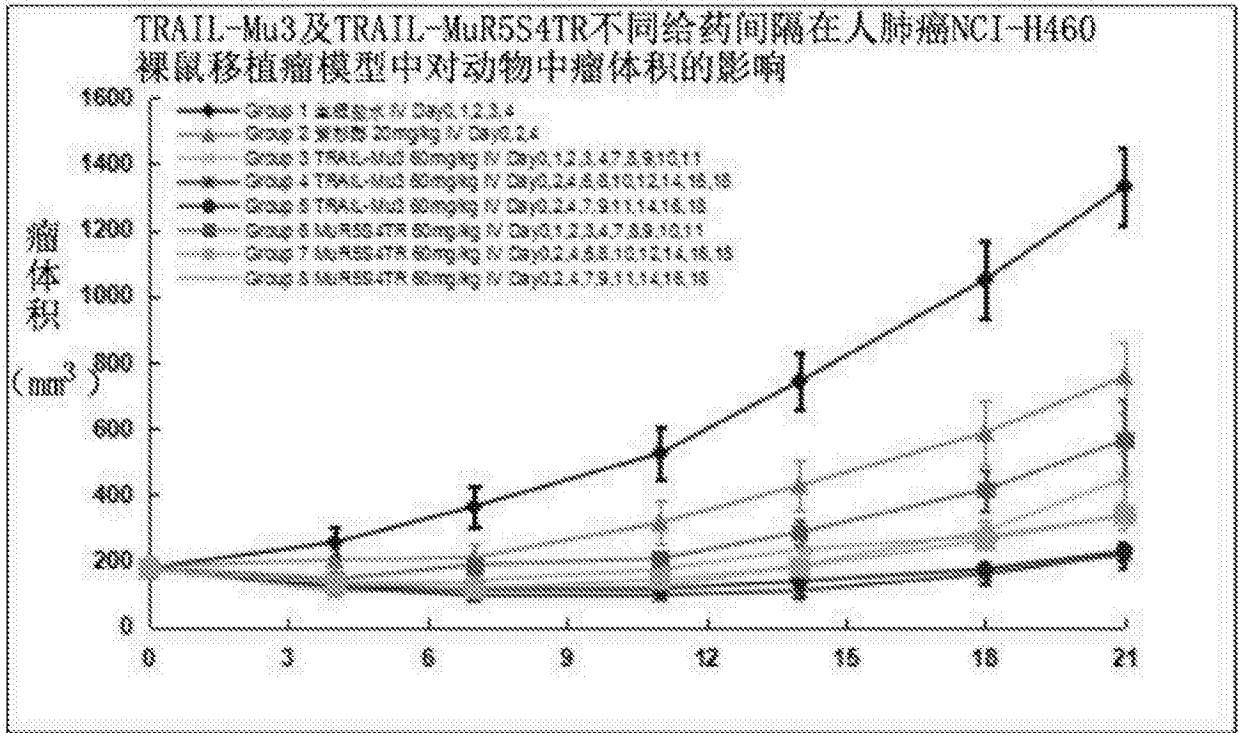


图9

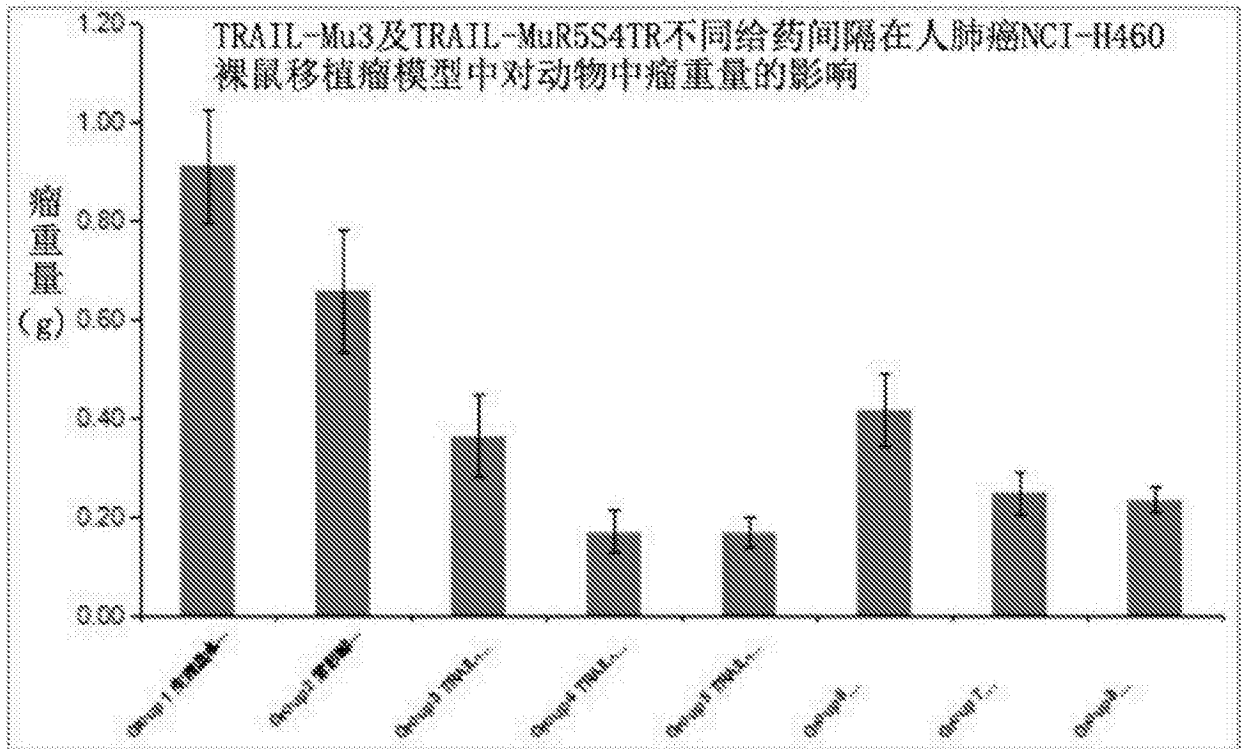


图10

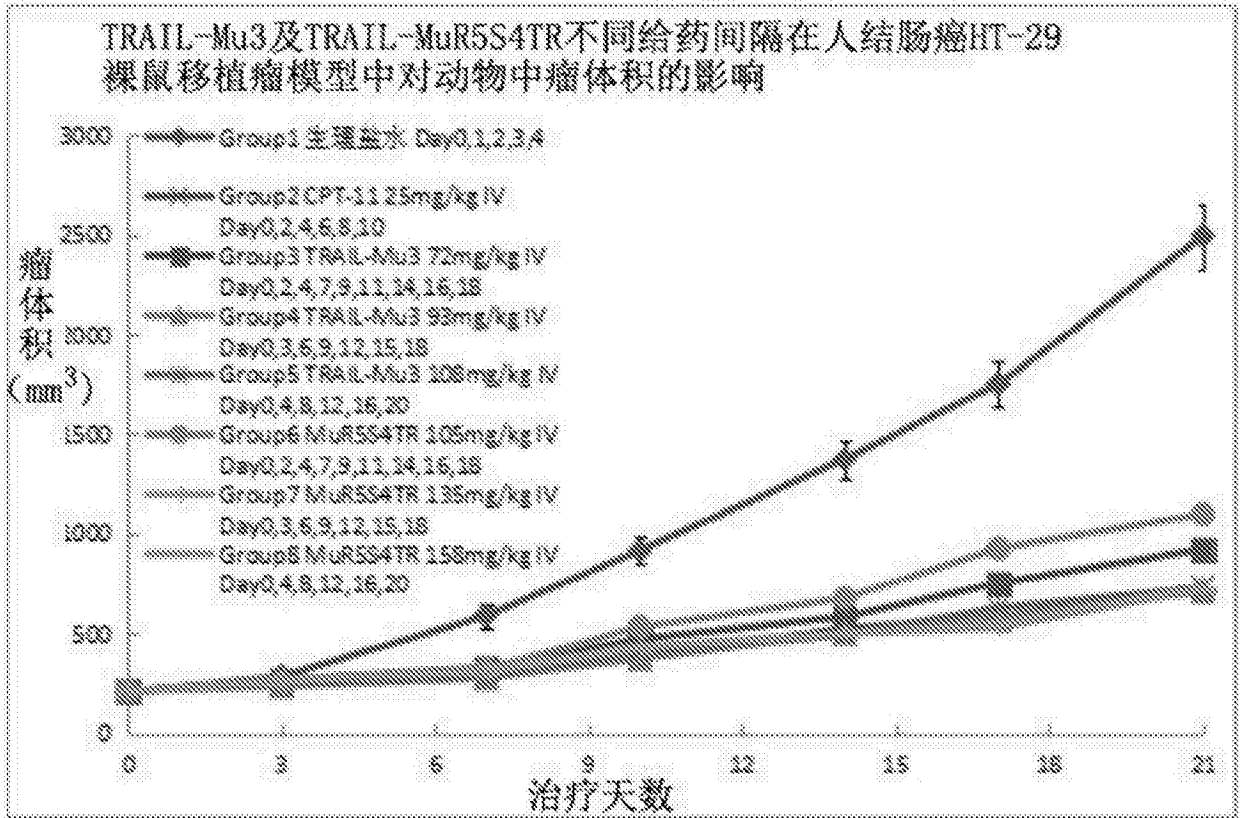


图11

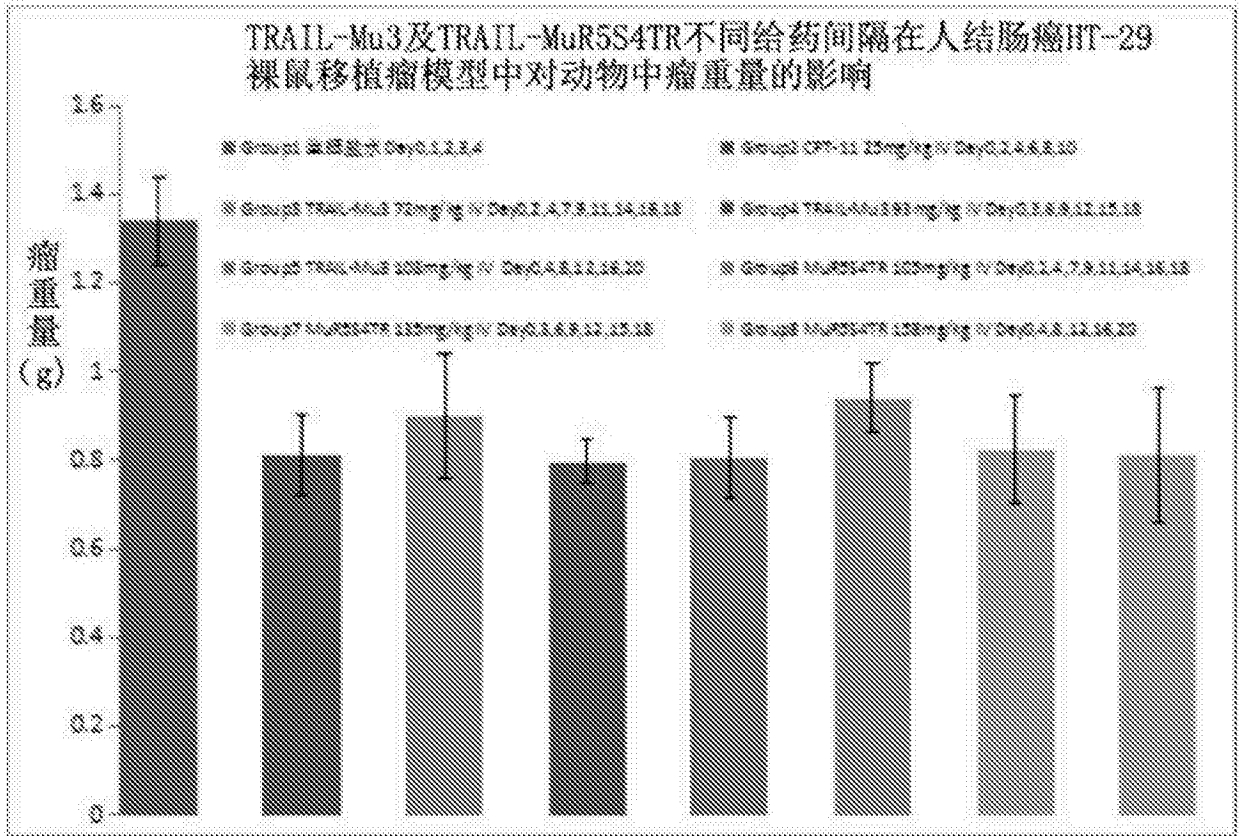


图12

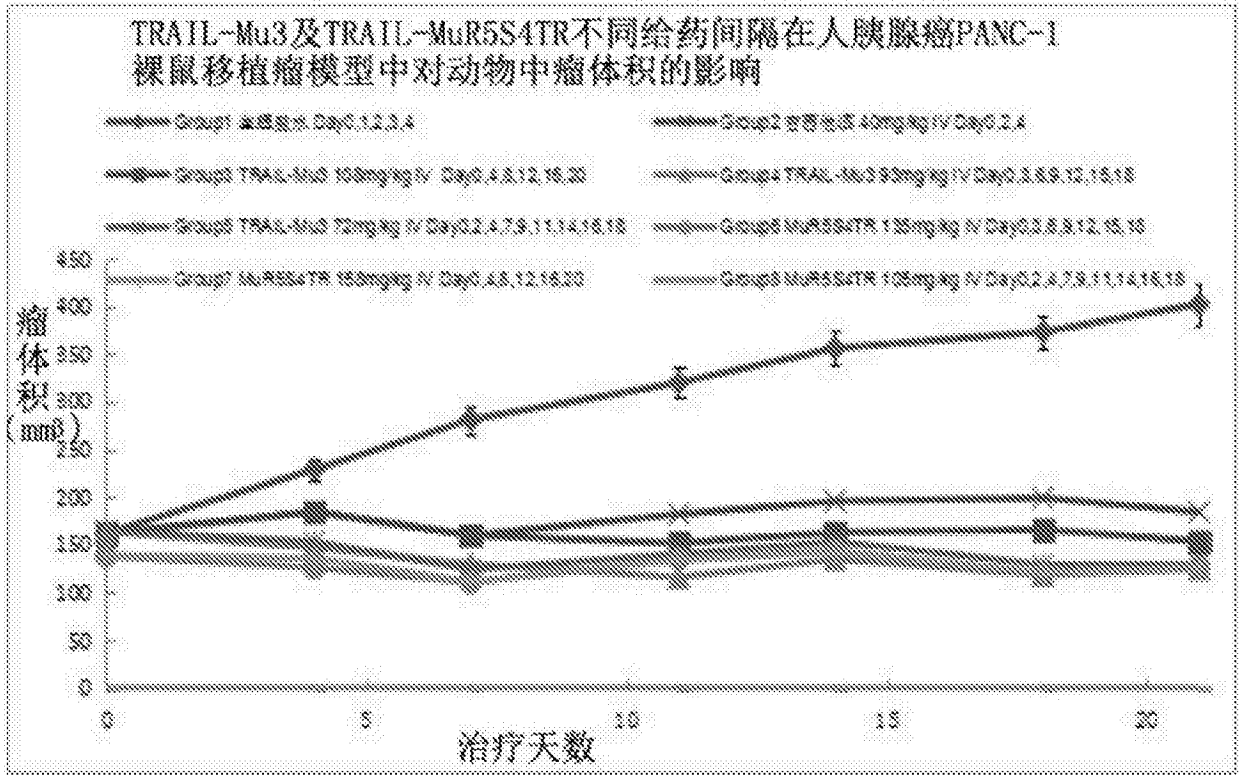


图13

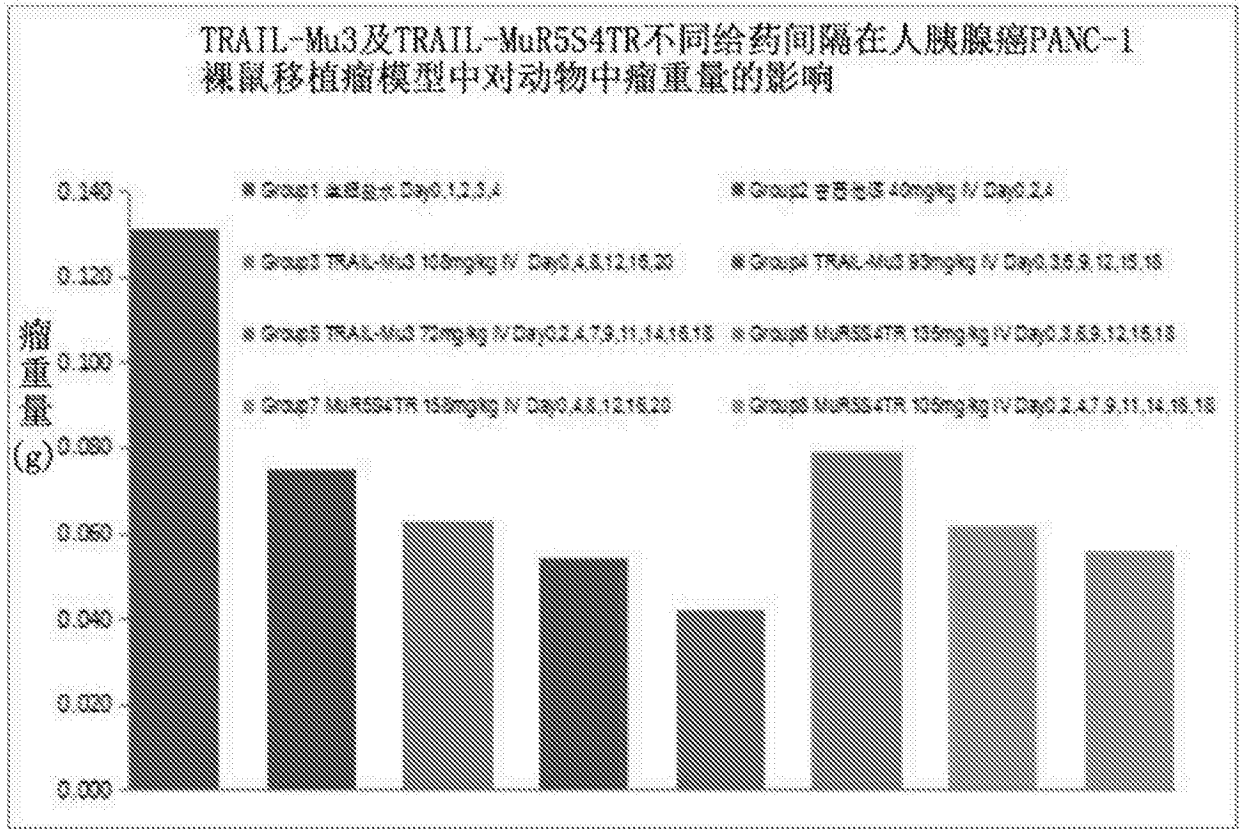


图14