



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108815512 B

(45) 授权公告日 2021.06.11

(21) 申请号 201810968867.4

US 2015344573 A1, 2015.12.03

(22) 申请日 2018.08.23

WO 2005044981 A2, 2005.05.19

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 108815512 A

李晓诗.“维生素C在肿瘤细胞代谢与凋亡中的作用”.《临床肿瘤学杂志》.2001,第6卷(第2期),

(43) 申请公布日 2018.11.16

许晓亚 等.“重组豹蛙抗瘤酶促进大鼠肝癌RH-35细胞凋亡”.《基础医学与临床》.2016,第36卷(第1期),

(73) 专利权人 河南师范大学  
地址 453000 河南省新乡市牧野区建设路46号

G.G. Yang 等.“Linker length affects expression and bioactivity of the onconase fusion protein in Pichia pastoris”.《Genetics and Molecular Research》.2015,第14卷(第4期),

(72) 发明人 杨刚刚 王泽 常翠芳 王改平  
齐剑英 张全义 张全海 吕中原  
郝敏仰 徐存拴

王泽 等.“豹蛙抗瘤酶与维生素C协同促进大鼠肝癌RH-35细胞凋亡”.《河南科技大学学报(自然科学版)》.2020,第41卷(第2期),

(74) 专利代理机构 北京超凡志成知识产权代理  
事务所(普通合伙) 11371  
代理人 李永宏

Henrike Westekemper 等.  
“Chemosensitivity of conjunctival melanoma cell lines to target-specific chemotherapeutic agents”.《Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol》.2012,第251卷

(51) Int.Cl.

A61K 38/46 (2006.01)  
A61K 31/375 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01)

审查员 彭丹丹

(56) 对比文件

CN 102188698 A, 2011.09.21  
CN 1748653 A, 2006.03.22

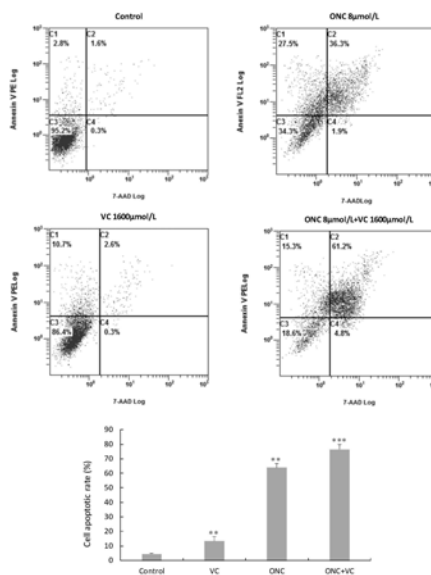
权利要求书1页 说明书6页 附图5页

(54) 发明名称

一种抗癌药物及其应用

(57) 摘要

本发明涉及抗癌药物领域,具体而言,涉及一种抗癌药物及其应用。一种抗癌药物,其主要组分为豹蛙抗瘤酶和维生素C。本发明以大鼠肝癌细胞株RH-35为研究对象,研究两种药物的单独与联合作用,评估两者联合作用的效果,证实两者在体外细胞水平上协同促进大鼠肝癌RH-35细胞凋亡,为后期的肿瘤药物联合开发奠定基础。



1. 一种抗癌药物,其特征在于,主要组分为豹蛙抗瘤酶和维生素C;  
所述豹蛙抗瘤酶和维生素C的物质的量比例为1:50-800。
2. 根据权利要求1所述的抗癌药物,其特征在于,所述豹蛙抗瘤酶和维生素C的物质的量比例为1:50。
3. 根据权利要求1所述的抗癌药物,其特征在于,所述癌为肝癌。
4. 根据权利要求1-3任一项所述的抗癌药物,其特征在于,所述药物还包括药学上可接受的辅料,所述药学上可接受的辅料选自稀释剂、赋形剂、崩解剂、填充剂、粘合剂、润滑剂、矫味剂、表面活性剂、稳定剂中的任一种或多种组合。
5. 根据权利要求4所述的抗癌药物,其特征在于,所述赋形剂选自甘露醇、乳糖、淀粉、右旋糖酐、微晶纤维素中的任一种或多种组合。
6. 根据权利要求4所述的抗癌药物,其特征在于,所述崩解剂选自聚乙烯吡咯烷酮、羧甲基纤维素、羧甲基纤维素钠、羟丙甲基纤维素中的任一种或多种组合。
7. 根据权利要求4所述的抗癌药物,其特征在于,所述润滑剂选自滑石粉、硬脂酸镁中的任一种或两种组合。
8. 根据权利要求4所述的抗癌药物,其特征在于,所述药物的剂型选自注射剂、针剂、片剂、冲剂、颗粒剂、丸剂、胶囊剂中的任一种。

## 一种抗癌药物及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及抗癌药物领域,具体而言,涉及一种抗癌药物及其应用。

### 背景技术

[0002] 豹蛙抗癌酶(onconase, ONC)是一种新型抗癌药物,最早在豹蛙的卵母细胞和早期胚胎细胞中提取到,由104个氨基酸组成的核酸酶。ONC目前是第一个进入临床试验阶段的核糖核酸酶,它能够特异性降解RNA抑制蛋白质的合成,进而对肿瘤细胞进行诱导凋亡。在多种肿瘤细胞试验中,ONC可选择性杀伤肿瘤细胞,但对正常细胞影响基本无影响。此外,ONC还具有不良反应少、免疫原性低、不易产生耐药性等优点,是一种极具潜力的抗肿瘤药物。

[0003] 原发性肝癌(主要指肝细胞癌,HCC)是全球发病率和死亡率最高的恶性肿瘤之一,是全球癌症相关死亡的主要原因。中国是肝癌大国,全世界一半以上的肝癌发生在中国。临床上采用的治疗方法有手术切除、肝移植、局部消融、化疗、导管肝动脉插管化疗栓塞(TACE)、靶向药物治疗及免疫治疗等,然而现有方法治疗效果远不能令人满意,其中生存时间提高不足3个月。现有抗肿瘤药物多有不良反应且价格高昂,临床的大剂量使用不仅增大了药物的副作用,还提高了患者的治疗成本。因此,寻找新药和新药联合施用提高抗肿瘤效果、降低药物副作用和成本,对于肿瘤治疗具有重要而迫切的意义。

[0004] 有鉴于此,特提出本发明。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供豹蛙抗癌酶和维生素C具有协同增强的促进癌细胞凋亡的作用,特别是肝癌,为肝癌的治疗提供良好的基础。

[0006] 为了实现本发明的上述目的,特采用以下技术方案:

[0007] 一种抗癌药物,其主要组分为豹蛙抗癌酶和维生素C。

[0008] 豹蛙抗癌酶(onconase, ONC)是一种具有广谱抗实体瘤的蛋白,是第一个进入抗肿瘤临床试验的核糖核酸酶,其良好的抗肿瘤效果、低免疫原性和低耐药性等优点备受青睐。现有研究认为肿瘤药物的高剂量使用有较多副作用,因此临床为了保证药效的情况下更倾向于联合药物的治疗。

[0009] 维生素C(vitamin C, VC),一种水溶性维生素,在癌症治疗和减轻化疗不良反应之间具有明显的效果,同时,VC具有价格低廉等优势。但新型的抗癌药ONC与VC联合疗效如何尚未见报道。

[0010] 鉴于此,本发明以大鼠肝癌细胞株RH-35为研究对象,研究两种药物的单独与联合作用,评估两者联合作用的效果,为后期的肿瘤药物联合开发奠定基础。

[0011] 具体地,本发明用ONC和VC单药处理RH-35细胞,发现ONC和VC呈浓度依赖性显著抑制细胞增殖,并能降低细胞密度,使细胞核发生破碎等明显变化,且有凋亡小体等典型凋亡特征出现,进一步验证了ONC和VC能够抑制细胞增殖,促进细胞凋亡。

[0012] 另外,通过CI值与等效线分析图得到,ONC与VC联合具有协同抑制作用。这两种药物的作用机制与现有的其它肿瘤化疗药物非常不同,对ONC的多种作用机制的主要研究集中在它能够特异性的作用于RNA (tRNA),不同于传统的阻断DNA双链合成,或者作用特定蛋白,降解RNA抑制蛋白质的合成,进而诱导肿瘤细胞凋亡。而VC的抗癌作用机制可能为捕获氧自由基,保护正常细胞免受损失,并通过诱导氧化应激,抑制糖酵解和能量危机,诱导细胞凋亡,选择性杀死癌细胞。本发明凋亡检测结果提示,通过两药联合可以大大提高诱导的细胞凋亡率,进一步证明两药联合使用具有协同增强作用。

[0013] 综上所述,本发明通过检测ONC和VC的联合作用,初步得到两者在体外细胞水平上协同促进大鼠肝癌RH-35细胞凋亡,这为进一步用于体内实验研究奠定了基础。

[0014] 进一步地,所述豹蛙抗瘤酶和维生素C的质量比例为1:50-800,优选为1:50。

[0015] 如在不同的实施例中,豹蛙抗瘤酶和维生素C的质量比例为1:50、1:100、1:200、1:300、1:400、1:500、1:600、1:700、1:800等等。

[0016] 进一步地,所述癌为肝癌。

[0017] 进一步地,所述药物还包括药学上可接受的辅料,所述药学可接受的辅料包括稀释剂、赋形剂、崩解剂、填充剂、粘合剂、润滑剂、矫味剂、表面活性剂、稳定剂中的任一种或多种组合。

[0018] 进一步地,所述赋形剂包括甘露醇、乳糖、淀粉、右旋糖酐、微晶纤维素中的任一种或多种组合。

[0019] 进一步地,所述崩解剂包括聚乙烯吡咯烷酮、羧甲基纤维素、羧甲基纤维素钠、羟丙甲基纤维素中的任一种或多种组合。

[0020] 进一步地,所述润滑剂包括滑石粉、硬脂酸镁中的任一种或两种组合。

[0021] 进一步地,所述药物的剂型包括注射剂、针剂、片剂、冲剂、颗粒剂、丸剂、胶囊剂中的任一种。

[0022] 本发明还提供了上述的抗癌药物在促进癌细胞凋亡中的应用。

[0023] 进一步地,所述癌细胞为肝癌。

[0024] 本发明提供的抗癌药物应用于治疗肝癌的症状。

[0025] 肝癌的治疗方法,包括给予受试者有效量的上述抗癌药物。

[0026] 给药方式可以为口服、静脉注射或者是透皮渗透方式,施加于需要治疗的患者。

[0027] 药学有效量是指以应用药物治疗可获得的合理的效益/风险比、足以治疗疾病的数量。有效剂量的水平可以取决于一些因素来确定,包括患者的疾病类型、严重度、药物的活性、对药物的敏感性、施用时间、施用途径、排出率、治疗周期、同时使用的药物、以及医药领域公知的其他因素。本发明的药物可以作为独立的治疗试剂施用,或与其他治疗试剂组合施用。并且,本发明的组合物可以连续地或同时地添加典型的治疗试剂,组合物可以单次或多次施用。重要的是考虑上述所有因素、以可以产生最大效果而没有副作用的最小剂量施用,所述剂量可由医师根据病人的病情、年龄等决定。

[0028] 与现有技术相比,本发明的有益效果为:

[0029] (1) 本发明首次发现豹蛙抗瘤酶和维生素C具有协同增强促进RH-35细胞凋亡的作用。

[0030] (2) 本发明提供的抗癌药物为肝癌的治疗提供良好的理论基础。

## 附图说明

[0031] 为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案,以下将对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍。

[0032] 图1为本发明实施例1中ONC的分离纯化的图;

[0033] 图2为本发明实施例1中用药24小时后细胞形态的变化显微镜观察图;

[0034] 图3为本发明实施例1中用药24小时后细胞核形态的变化Hoechst染色在倒置荧光显微镜下的观察图;

[0035] 图4为本发明实施例1中ONC和VC对RH-35细胞增殖的抑制率柱形图;

[0036] 图5为本发明实施例1中ONC和VC联合作用的等效线分析图;

[0037] 图6为本发明实施例2中不同组别的细胞凋亡分选图以及对应的柱形图。

## 具体实施方式

[0038] 下面将结合实施例对本发明的实施方案进行详细描述,但是本领域技术人员将会理解,下列实施例仅用于说明本发明,而不应视为限制本发明的范围。实施例中未注明具体条件者,按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市售购买获得的常规产品。

[0039] 实施例1

[0040] 1材料与方法

[0041] 1.1材料

[0042] ONC固体粉末(本实验室利用毕赤酵母系统表达、分离纯化得到,纯度大于95%,收率高于90%,如图1所示,图1中,1:上清;2:双水相上相;3:双水相中相;4:双水相下相;5:超滤浓缩液;6-7:平衡液洗脱;M:protein ladder)、VC粉末(由河南新乡华星药厂提供)、大鼠肝癌RH-35细胞(中科院上海生命科学研究院细胞库)、DMEM培养基和胎牛血清FBS(Gibico公司)、磺酰罗丹明B(Sulforhodamine B,SRB,Sigm公司)、凋亡检测试剂盒PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I(BD Pharmingent),其余试剂均为国产分析纯。

[0043] 1.2实验方法

[0044] 1.2.1细胞培养大鼠肝癌细胞RH-35于含10%FBS、100U/mL青霉素和链霉素(Invitrogen,USA)的DMEM高糖培养基中,置于饱和湿度、37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养,0.25%胰蛋白酶(含0.02%EDTA)消化,常规传代,2~3d更换培养液1次。

[0045] 1.1.2ONC和VC单药处理0.25%胰酶消化对数生长期的细胞,接种于96孔板(5×10<sup>3</sup>个细胞/每孔/90μL培养基),于37℃、5%CO<sub>2</sub>、饱和湿度下培养24h后,分别加入10μL不同浓度的VC(终浓度为800、1200、1600、2000、2400μmol/L)以及不同浓度的ONC(终浓度为2、4、8、12、16μmol/L),对照组加入10μL PBS,每个浓度做5个复孔,3次重复处理。药物处理24h后(倒置显微镜下及时观察细胞的生长情况并拍照),SRB法检测细胞增殖抑制率。细胞抑制率(inhibition rate,RI)=(对照组A值-实验组A值)/对照组A值×100%。直线回归算出药物半数抑制浓度IC<sub>50</sub>(inhibitory concentration 50,IC<sub>50</sub>)值。

[0046] 1.1.3ONC和VC联合处理两种药物(终浓度为IC<sub>50</sub>)以不同体积比混合即4:1、3:2、2:3、1:4,配置4种溶液,每种溶液用PBS连续稀释,每次稀释相同倍数,设定6个梯度。按1.1.2接种于96孔板于37℃、5%CO<sub>2</sub>、饱和湿度下培养24h后,分别加入10μL不同配比、不同浓度的

联合药物,对照组加入10 $\mu$ L PBS,每个浓度做5个复孔,3次重复处理,药物处理24h后(倒置显微镜下及时观察细胞的生长情况并拍照),SRB法检测药物的细胞增殖抑制率,每种溶液得到2个IC<sub>50</sub>值(分别对应ONC和VC)。

[0047] 1.1.4Hoechst染色按照1.1.2和1.1.3的方法加药处理细胞24h后,加入4%多聚甲醛固定液固定15min,PBS清洗3次,5min/次,加入hoechst33258染色10min,PBS清洗3次,5min/次,倒置荧光显微镜下观察细胞数量及形态变化并拍照。

[0048] 1.1.5联合指数分析联合指数(combination index,CI)即两种药物抑制浓度的分式之和,公式为 $CI = C_{50A}/IC_{50A} + C_{50B}/IC_{50B}$ , $C_{50A}$ 和 $C_{50B}$ 指A、B两种药物联用达到50%抑制时的药物浓度,IC<sub>50A</sub>和IC<sub>50B</sub>指单用某一药物达到50%抑制时的药物浓度。当CI<1时,两药联用具有协同效应;当CI>1时,两药联用具有拮抗效应;当CI=1时,则认为是协同效应。

[0049] 1.1.6等效线图解两药联用时,可以通过计算药物的分数抑制浓度(fractional inhibitory concentration,FIC)观察两种药物的相互作用,此时, $FIC_{ONC} = \text{联合用药抑制50\%细胞时ONC的浓度}(C_{50ONC}) / \text{单药ONC抑制50\%细胞的浓度}(IC_{50ONC})$ ,而 $FIC_{VC} = \text{联合用药抑制50\%细胞时VC的浓度}(C_{50VC}) / \text{单药VC抑制50\%细胞的浓度}(IC_{50VC})$ 。以 $FIC_{ONC}$ 的值为横坐标, $FIC_{VC}$ 的值为纵坐标,将两种药物单独作用的FIC值设定为1,连接两种药物单独作用的坐标,绘制出等效线分析图(即加成线)。两种药物联合作用时,ONC的FIC值对应等效分析图上联合作用的横坐标值,VC的FIC值对应联合作用的纵坐标值,即可绘出联合作用的点。代表联合作用的点位于加成线的下方、线上或上方,分别代表两种药物联用时具有协同、加成或拮抗效应。

[0050] 2结果

[0051] 2.1单药和联合用药24h后细胞形态变化如图2所示。图2中,NC正常细胞;PBS对照组;ONC单药组(8 $\mu$ mol/L);VC单药组(1600 $\mu$ mol/L);ONC与VC联合用药组(简写为0:V-1:4、0:V-2:3、0:V-3:2、0:V-4:1),其中,ONC与VC联合用药的数值分别代表不同的用量比例。

[0052] 从图2可以看出,在药物处理24h后,倒置显微镜下可观察到正常细胞及对照细胞的形态、轮廓清晰,结构紧密,贴壁牢靠,生长状态良好。给药组细胞(单药组及联合组)均出现皱缩、变形,呈晶亮的小圆点,贴壁不稳甚至脱落死亡。

[0053] 2.2使用Hoechst染色在倒置荧光显微镜下观察细胞核的变化情况如图3所示。图3中,NC空白组;PBS对照组;ONC:8 $\mu$ mol/L;VC:1600 $\mu$ mol/L;ONC/VC:不同比例联合用药组(0:V-1:4、0:V-2:3、0:V-3:2、0:V-4:1)。更直观的观测加药处理后对细胞的影响,从图3可以看到,实验组细胞核体积增大,多处可见核呈月牙形的典型凋亡现象和发芽起泡形成的凋亡小体(Fig 3箭头所示)。可见,药物干预后出现细胞体积变小、染色质浓缩、边缘化、呈月形的典型凋亡现象。联合组比单药组效果显著,后两组联合效果更明显。

[0054] 2.3ONC和VC对RH-35的单独作用

[0055] 采用SRB法检测不同浓度的ONC(2~16 $\mu$ mol/L)和VC(800~2400 $\mu$ mol/L)干预RH-35细胞24h后的细胞存活率,结果发现随着药物浓度的增加,细胞存活的数目逐渐降低( $P < 0.01$ ),且ONC和VC作用细胞的IC<sub>50</sub>值分别为8 $\mu$ mol/L和1600 $\mu$ mol/L(Fig 4)。

[0056] 2.4联合指数分析

[0057] ONC与VC联合时,实验共分为对照组、ONC单药组、VC单药组、ONC与VC联合组四组(0:V-1:4、0:V-2:3、0:V-3:2、0:V-4:1)。对照组中,贴壁细胞生长状态良好,细胞核完整;在

给药组中,细胞的增殖受到抑制,并呈现出不同程度的凋亡。SRB法测定ONC与VC对肝癌细胞株的 $IC_{50}$ 值如表1所示。

[0058] 表1ONC与VC对肝癌细胞株的 $IC_{50}$ 值

Cell line	$V_{ONC}: V_{VC}$	$IC_{50 ONC}$ ( $\mu\text{mol/L}$ )	$IC_{50 VC}$ ( $\mu\text{mol/L}$ )
[0059] RH-35	1:4	0.94	1059
	2:3	1.79	976
	3:2	2.42	883
	4:1	3.92	763

[0060] 依据公式利用表1中的4种比例的 $IC_{50}$ 值计算出四种配比的CI值,其CI值分别为0.78、0.83、0.85、0.97,均小于1,具体见表2。

[0061] 表2ONC与VC联合作用RH-35细胞的联合指数

Cell line	$V_{ONC}: V_{VC}$			
	1:4	2:3	3:2	4:1
[0062] RH-35	0.78	0.83	0.85	0.97

[0063] 得到的等效线分析图上代表联合作用的点均位于加成线的下方(图5)。由此判定ONC与VC联合能协同抑制RH-35的增殖,且ONC与VC联合的最佳体积比为4:1, $IC_{50ONC}$ 和 $IC_{50VC}$ 分别为 $3.92\mu\text{mol/L}$ 和 $763\mu\text{mol/L}$ 。

[0064] 实施例2

[0065] 流式细胞术

[0066] 取指数生长期的细胞,制成单细胞悬液,按照每孔 $2 \times 10^5/\text{mL}$ 铺6孔板培养24h后,将细胞分成4组:(1)PBS对照组;(2)ONC单药组: $8\mu\text{mol/L}$ ;(3)VC单药组: $1600\mu\text{mol/L}$ ;(4)联合组:ONC  $8\mu\text{mol/L}$ +VC $1600\mu\text{mol/L}$ ,加药处理24h后,收集各孔细胞,PBS洗涤两遍后,按凋亡试剂盒操作,流式细胞仪(BD,USA)检测细胞凋亡情况。

[0067] 统计学分析所有数据用平均数±标准差表示,用SPSS 13.0统计学软件的单因素方差分析法分析组间差异, $P < 0.01$ 表示差异显著, $P < 0.001$ 表示差异极显著。

[0068] 流式细胞术检测细胞凋亡发现,如图6所示,PBS对照组和实验组(ONC、VC和O+V)细胞的凋亡率分别为 $4.24 \pm 0.36\%$ 、 $15.73 \pm 3.08\%$ 、 $61.53 \pm 2.98\%$ 和 $73.65 \pm 3.38\%$ ,且ONC和VC单药组的细胞凋亡率显著降低( $P < 0.01$ ),两药联合的促凋亡作用优于单药组,达到极显著差异( $P < 0.001$ )。

[0069] 综上所述,本发明用不同浓度(单药组)、不同配比(联合组)的ONC和VC处理RH-35细胞24h后,SRB法测定细胞活性,显微镜检和Hoechst染色观察药物处理后的细胞数量和形态的变化,联合指数(combination index,CI)和等效图解法评估两者的联合效果,流式细胞法(flow cytometry,FCM)检测细胞的凋亡情况。结果如下:单药作用RH-35时,ONC和VC对细胞增殖的抑制作用随药物浓度的增加而加强,显著抑制增殖( $P < 0.01$ ), $IC_{50ONC}$ 和 $IC_{50VC}$ 分别为 $8\mu\text{mol/L}$ 和 $1600\mu\text{mol/L}$ ;联合作用时,联合指数CI值均小于1,等效线分析图显示,代表两者联合作用的点均位于加成线下方;镜检结果可见,药物处理组的细胞核均出现了显著

的凋亡特征。FCM结果显示单药组的细胞凋亡比例显著上升 ( $P < 0.01$ ), 而两药联合的促凋亡作用优于单药组, 达到极显著差异 ( $P < 0.001$ )。结论为VC协同ONC促进RH-35细胞凋亡。

[0070] 即本发明以为大鼠肝癌细胞株RH-35为研究对象, SRB法、FCM测定ONC与VC对RH-35的单独或联合作用, 联合指数和等效线分析评估联合效果, 得到两者在体外细胞水平上协同促进大鼠肝癌RH-35细胞凋亡, 这为进一步用于体内实验研究奠定了基础。

[0071] 尽管已用具体实施例来说明和描述了本发明, 然而应意识到, 在不背离本发明的精神和范围的情况下可以作出许多其它的更改和修改。因此, 这意味着在所附权利要求中包括属于本发明范围内的所有这些变化和修改。



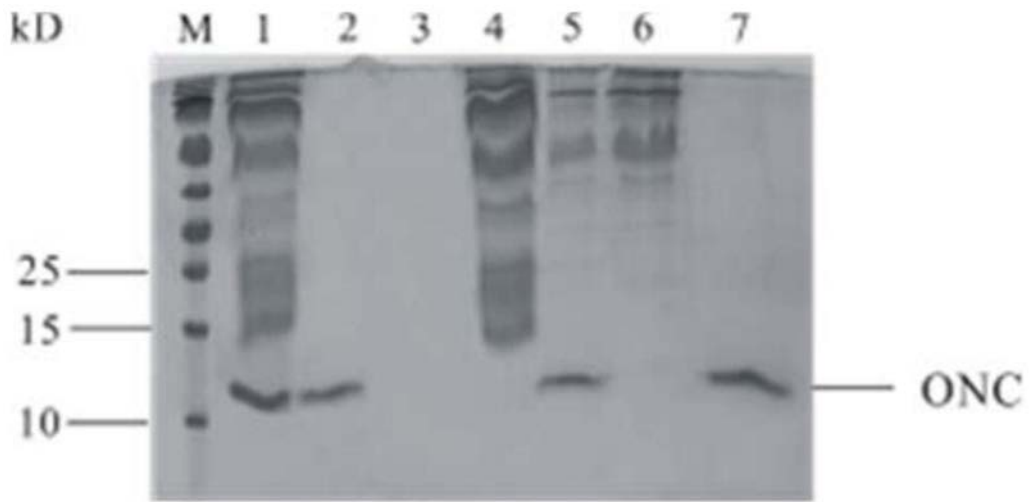


图1

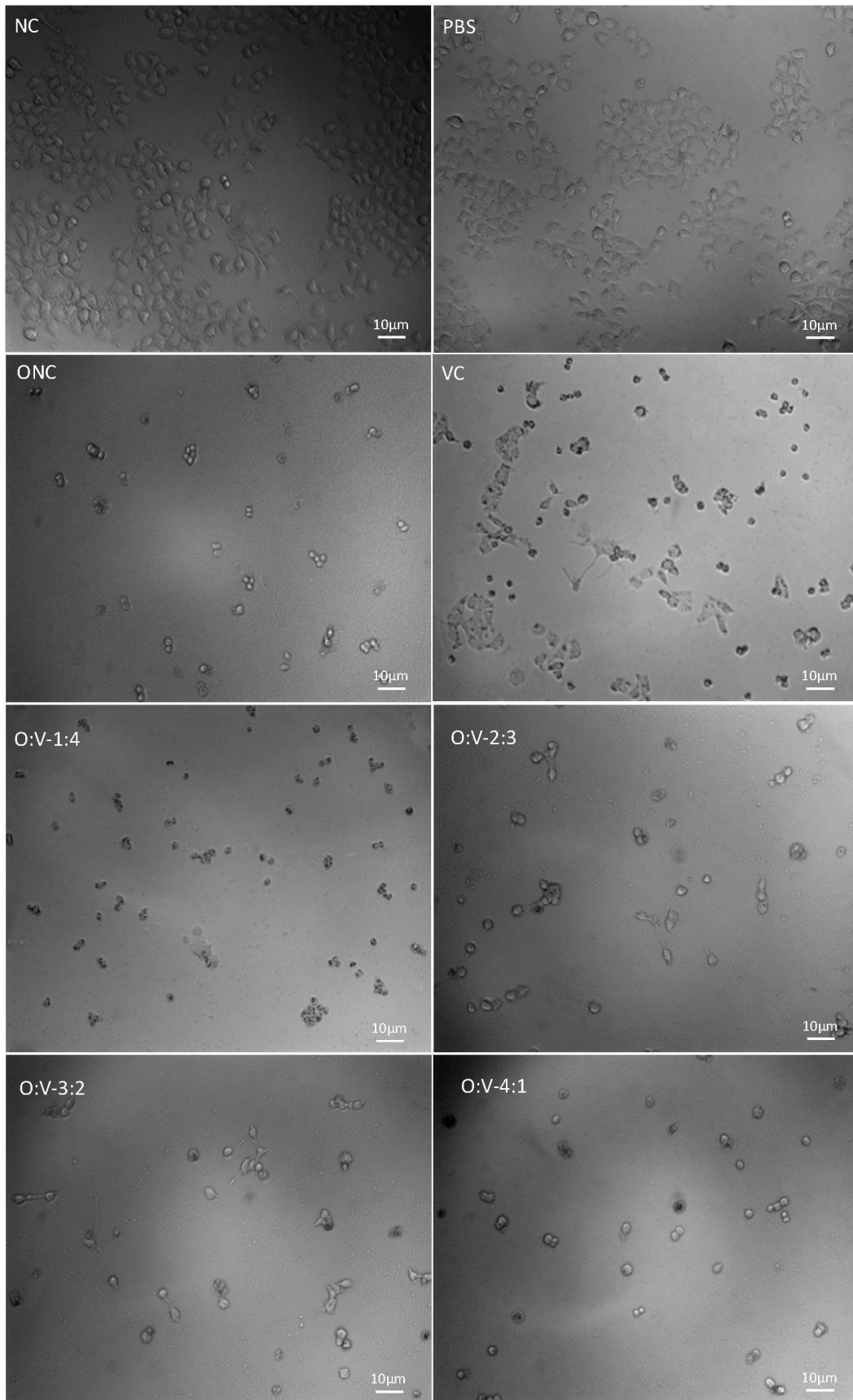


图2

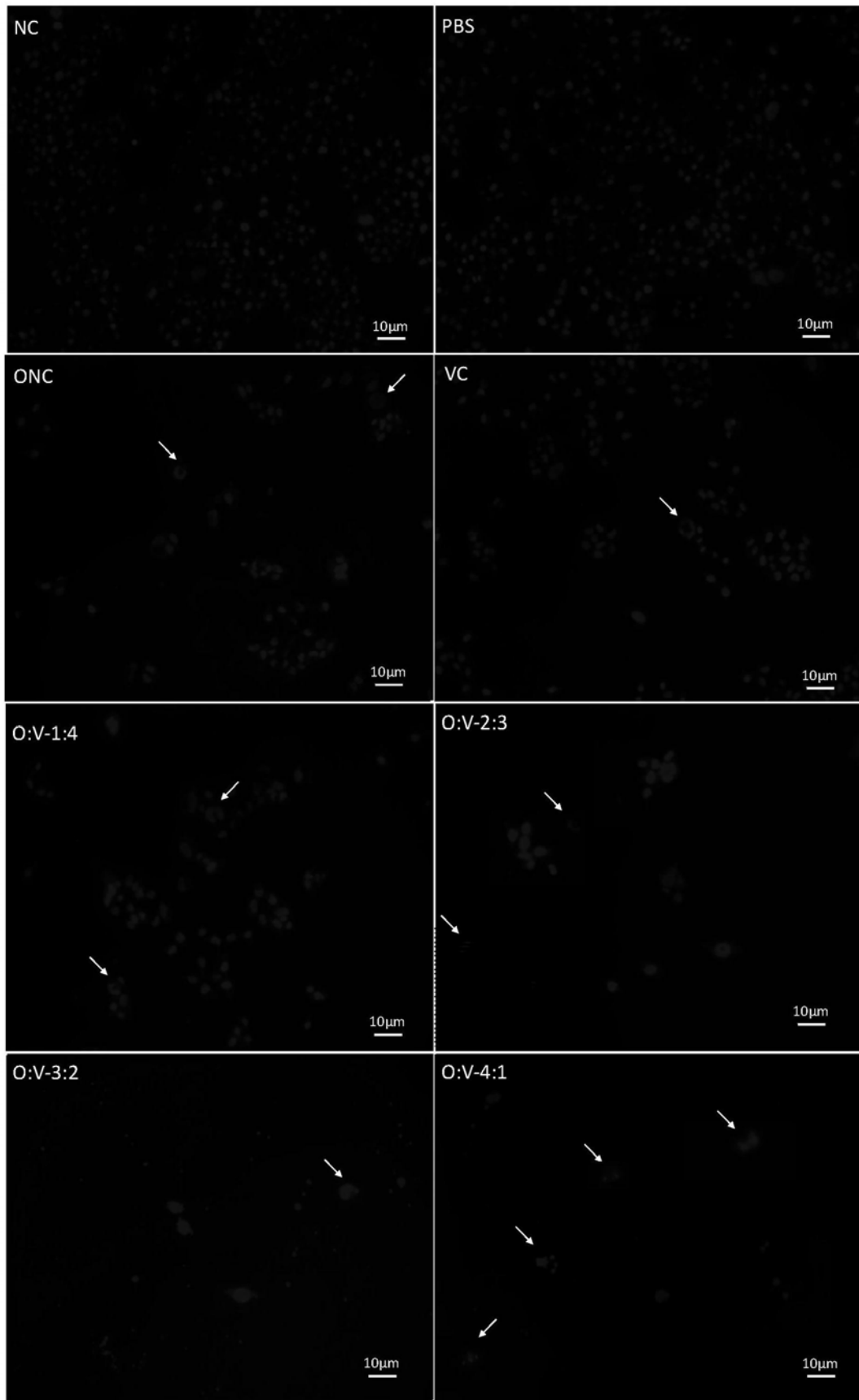


图3

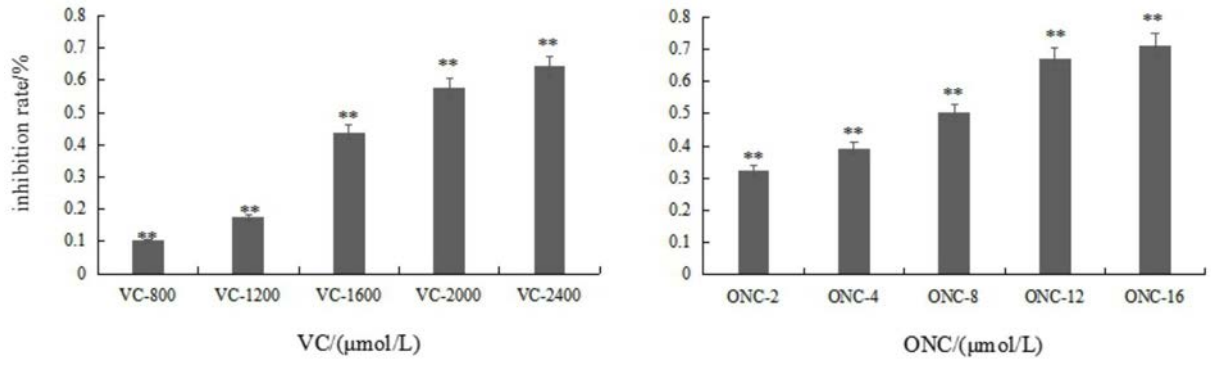


图4

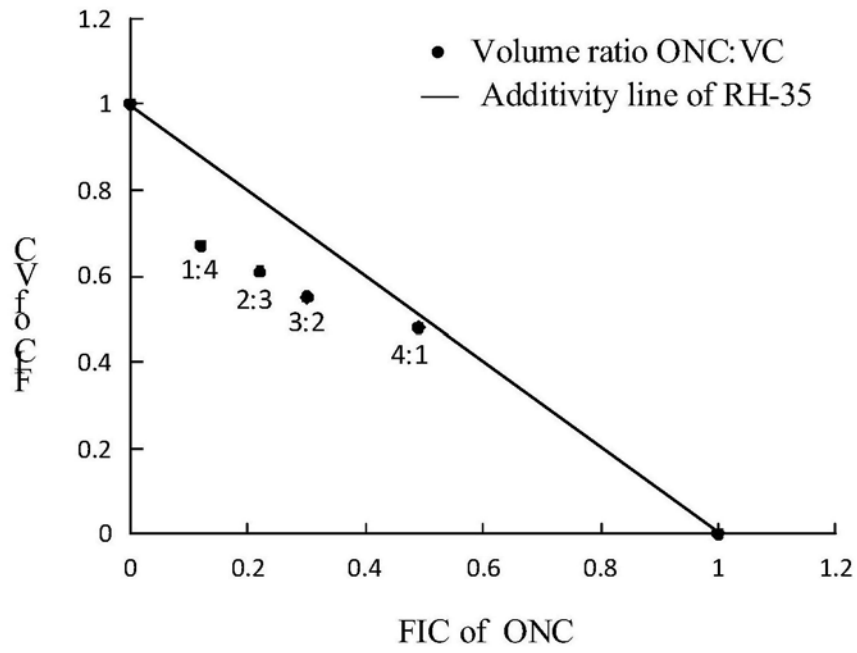


图5

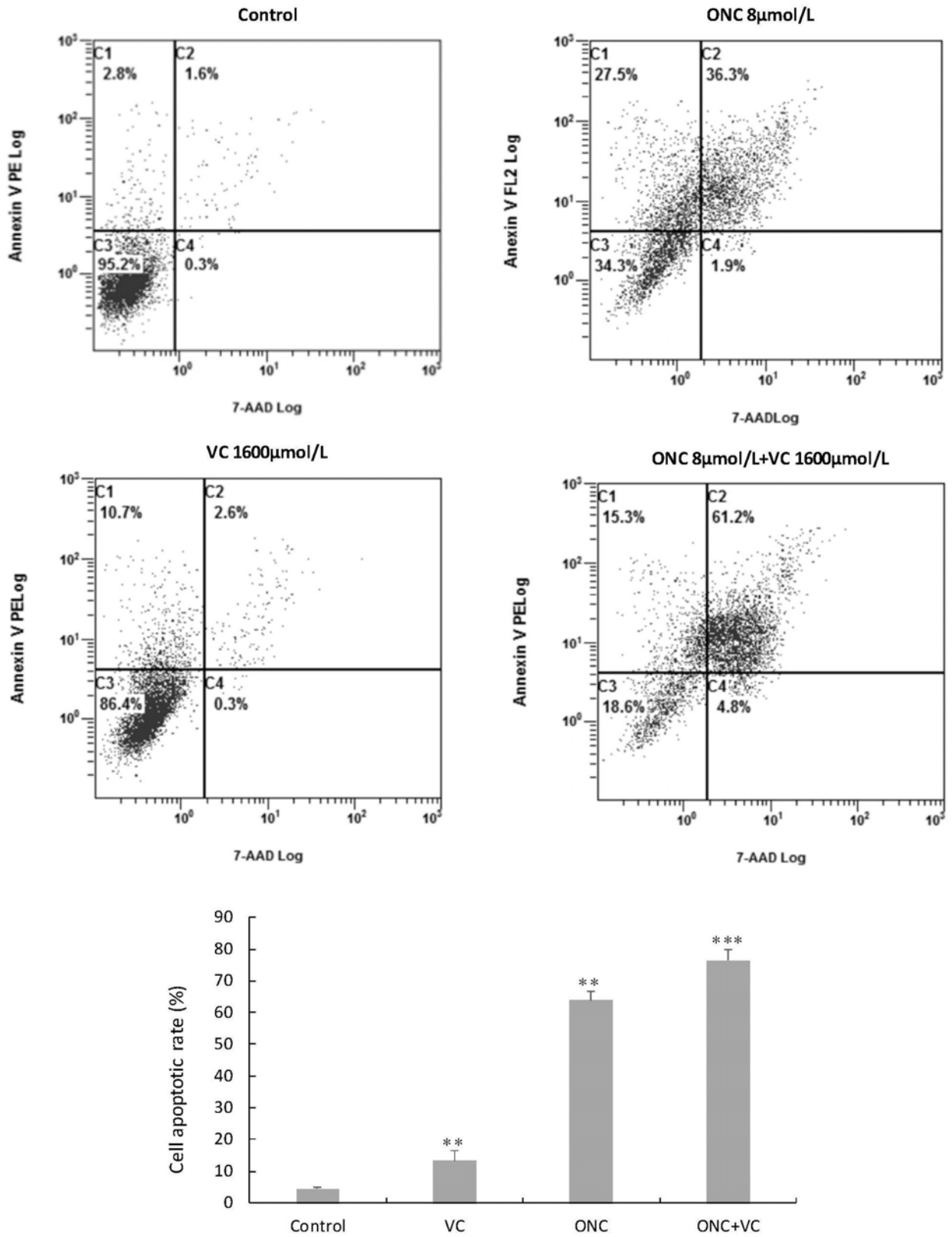


图6