



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114949230 A

(43) 申请公布日 2022. 08. 30

(21) 申请号 202210664602.1

A61K 31/496 (2006.01)

(22) 申请日 2022.06.13

A61P 35/02 (2006.01)

(71) 申请人 厦门大学附属第一医院

地址 361003 福建省厦门市思明区镇海路
上古街10号

申请人 深圳微芯生物科技股份有限公司
成都微芯药业有限公司

(72) 发明人 徐兵 解晨笛 鲁先平 周辉
查洁 李志峰 潘德思 付鑫

(74) 专利代理机构 北京品源专利代理有限公司
11332

专利代理师 刘二艳

(51) Int. Cl.

A61K 45/06 (2006.01)

A61K 31/403 (2006.01)

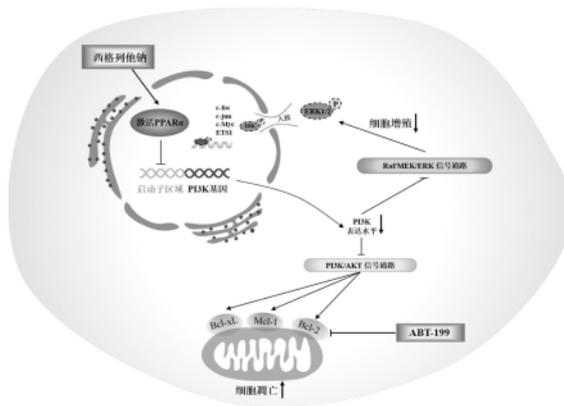
权利要求书1页 说明书8页 附图10页

(54) 发明名称

一种预防和/或治疗急性髓系白血病的联合用药物组合物及其应用

(57) 摘要

本发明涉及一种预防和/或治疗急性髓系白血病的联合用药物组合物及其应用,所述联合用药物组合物包括PPAR激动剂和Bcl-2抑制剂。本发明研究发现PPAR激动剂联合Bcl-2抑制剂具有比单一PPAR激动剂或Bcl-2抑制剂更显著抑制AML细胞增殖的作用、更显著诱导AML细胞凋亡的作用、更显著抑制AML细胞克隆形成能力的作用。本发明为急性髓系白血病的治疗提供了有效的药物联用策略,具有十分显著的意义。



1. 一种预防和/或治疗急性髓系白血病的联合用药物组合物,其特征在于,所述联合用药物组合物包括PPAR激动剂和Bcl-2抑制剂。

2. 根据权利要求1所述的预防和/或治疗急性髓系白血病的联合用药物组合物,其特征在于,所述PPAR激动剂包括:西格列羧、非诺贝特、吉非罗齐、非诺贝酸、氟芬那酸、布洛芬、苯扎贝特、吡哌美辛、罗格列酮、环丙贝特、丙戊酸、右旋布洛芬、胺碘酮、普拉睾酮、 α -月见草油酸、PPM-204、克利贝特、没药、棕榈酸、非诺洛芬、月桂酸、硬脂酸、氯贝丁酯、二十二碳六烯酸、油酸、曲格列酮、 ω -3脂肪酸、二十碳五烯酸、肉豆蔻酸、花生四烯酸、异黄酮、阿格列扎、瑞格列扎、GFT505、莫格列扎、厄罗他非、邻苯二甲酸、拉格列扎、替格列扎、GW-590735、白细胞三烯B₄、辛酸、GW501516、白藜芦醇、N,N-双(3-(D-葡糖酰胺)丙基)脱氧胆酰胺或上述化合物在药学上可接受的盐、异构体、溶剂化物、代谢产物中的任意一种或至少两种的组合;

优选地,所述PPAR激动剂为西格列羧或其在药学上可接受的盐、异构体、溶剂化物、代谢产物中的任意一种或至少两种的组合;

优选地,所述药学上可接受的盐包括碱金属盐、碱土金属盐、铵盐或季铵盐中的任意一种,优选为碱金属盐,进一步优选为钠盐或钾盐;

优选地,所述PPAR激动剂为西格列他钠、西格列他钾或其左旋体。

3. 根据权利要求1所述的预防和/或治疗急性髓系白血病的联合用药物组合物,其特征在于,所述Bcl-2抑制剂包括ABT-199、ABT-737或ABT-263中的任意一种或至少两种的组合。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述的预防和/或治疗急性髓系白血病的联合用药物组合物,其特征在于,所述药物组合物还包括药学上可接受的辅料;

优选地,所述药学上可接受的辅料包括载体、稀释剂、赋形剂、填充剂、粘合剂、润湿剂、崩解剂、乳化剂、助溶剂、增溶剂、渗透压调节剂、表面活性剂、包衣材料、着色剂、pH调节剂、抗氧化剂、抑菌剂或缓冲剂中的任意一种或至少两种的组合。

5. 根据权利要求1-4中任一项所述的预防和/或治疗急性髓系白血病的联合用药物组合物,其特征在于,所述联合用药物组合物为单一的复方制剂或两种单独的制剂的组合;

优选地,所述联合用药物组合物为两种单独的制剂的组合,两种单独的制剂同时施用或依次施用;

优选地,所述制剂为药剂学上可接受的任意一种剂型。

6. 根据权利要求1-5中任一项所述的预防和/或治疗急性髓系白血病的联合用药物组合物在制备预防、缓解或治疗急性髓系白血病的药物中的应用。

7. 根据权利要求1-5中任一项所述的预防和/或治疗急性髓系白血病的联合用药物组合物在制备急性髓系白血病细胞的增殖抑制剂中的应用。

8. 根据权利要求1-5中任一项所述的预防和/或治疗急性髓系白血病的联合用药物组合物在制备急性髓系白血病细胞的凋亡促进剂中的应用。

9. 根据权利要求1-5中任一项所述的预防和/或治疗急性髓系白血病的联合用药物组合物在制备急性髓系白血病细胞的克隆形成抑制剂中的应用。

10. 根据权利要求7-9中任一项所述的应用,其特征在于,所述急性髓系白血病细胞包括KG-1 α 细胞和/或Kasumi细胞。

一种预防和/或治疗急性髓系白血病的联合用药物组合物及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物医药技术领域,涉及一种急性髓系白血病的新的预防或治疗方式,具有涉及一种预防和/或治疗急性髓系白血病的联合用药物组合物及其应用。

背景技术

[0002] 急性髓系白血病(AML)是一种异质性强的血液恶性肿瘤,表现为骨髓和血液中的异常髓系细胞快速增殖并干扰正常血细胞生长。尽管目前的一线治疗方案阿糖胞苷与蒽环霉素联合化疗能使大部分患者得到缓解,但是大多数AML患者会复发,治疗现状不容乐观。化疗失败的主要原因是AML患者对化疗产生耐药性。因此,迫切需要寻找新的AML治疗方案,延长患者的生存时间,提高患者的治愈率。

[0003] Bcl-2抑制剂可特异靶向Bcl-2并抑制其抗凋亡功能,从而介导肿瘤细胞的凋亡行使肿瘤细胞杀伤功能。已有的研究结果显示,抗凋亡Bcl-2家族蛋白的过表达与AML产生化疗抗性及其预后不良有着紧密的相关性。因此,通过靶向抑制抗凋亡Bcl-2家族蛋白,降低细胞凋亡发生的阈值成为治疗AML的潜力方案。ABT-199(Venetoclax,维奈托克)是全球第一个针对蛋白-蛋白相互作用(PPI)的小分子抑制剂,是一种高效、有选择性和口服活性的小分子Bcl-2抑制剂,其能够和Bcl-2的疏水凹槽结合,破坏Bcl-2分子与促凋亡蛋白(如Bax)的相互作用。ABT-199已于2016年被FDA批准用于治疗慢性淋巴细胞白血病等血液肿瘤的治疗,但其单一疗法的结果不佳,易出现耐药。因此,可能需要合理的组合方法来提高ABT-199在AML中的疗效。

[0004] CN109641002A公开了端粒酶抑制剂和Bcl-2抑制剂的组合用于治疗血液癌症,包括AML。所述端粒酶抑制剂是伊美司他或伊美司他钠,所述Bcl-2抑制剂是ABT-199,研究表明端粒酶抑制剂和Bcl-2抑制剂的协同作用用以在AML细胞中诱导比任何药物单独诱导更高水平的细胞凋亡。

[0005] 但现有技术中已公开的治疗急性髓系白血病的有效的药物联用策略还比较少,开发出更多的新的急性髓系白血病治疗策略是非常有意义的。

发明内容

[0006] 针对现有技术的不足,本发明的目的在于提供一种急性髓系白血病的新的预防或治疗方式,具有提供一种预防和/或治疗急性髓系白血病的联合用药物组合物及其应用。

[0007] 为达到此发明目的,本发明采用以下技术方案:

[0008] 第一方面,本发明提供一种预防和/或治疗急性髓系白血病的联合用药物组合物,所述联合用药物组合物包括PPAR激动剂和Bcl-2抑制剂。

[0009] 本发明所涉及的联合用药物组合物创造性地将PPAR激动剂和Bcl-2抑制剂进行联用作为预防或治疗急性髓系白血病的药物,其中PPAR激动剂除了能够与PPAR α 结合激活PPAR α 外,其还能在分子水平抑制AML细胞株的PI3K表达水平,并联合Bcl-2抑制剂下调

PI3K/AKT通路和Raf/MEK/ERK通路,在细胞水平能够抑制AML细胞株的增殖、诱导其细胞凋亡水平以及抑制AML细胞株的克隆形成能力,最终抑制AML发生发展进程。本发明研究发现PPAR激动剂联合Bcl-2抑制剂具有比单一PPAR激动剂或Bcl-2抑制剂更显著抑制AML细胞增殖的作用、更显著诱导AML细胞凋亡的作用、更显著抑制AML细胞克隆形成能力的作用。本发明为急性髓系白血病的治疗提供了有效的药物联用策略,具有十分显著的意义。

[0010] 优选地,所述PPAR激动剂包括:西格列羧(Chiglitazar)、非诺贝特(Fenofibrate)、吉非罗齐(Gemfibrozil)、非诺贝酸(Fenofibric acid)、氟芬那酸(Flufenamic acid)、布洛芬(Ibuprofen)、苯扎贝特(Bezafibrate)、吲哚美辛(Indomethacin)、罗格列酮(Rosiglitazone)、环丙贝特(Ciprofibrate)、丙戊酸(Valproic acid)、右旋布洛芬(Dexibuprofen)、胺碘酮(Amiodarone)、普拉睾酮(Prasterone)、 α -月见草油酸(α -Linolenic acid)、PPM-204(Indeglitazar)、克利贝特(Clinofibrate)、没药(Myrrh)、棕榈酸(Palmitic Acid)、非诺洛芬(Fenoprofen)、月桂酸(Lauric acid)、硬脂酸(Stearic acid)、氯贝丁酯(Clofibrate)、二十二碳六烯酸(Doconexent)、油酸(Oleic Acid)、曲格列酮(Troglitazone)、 ω -3脂肪酸(Omega-3fatty acids)、二十碳五烯酸(Icosapent)、肉豆蔻酸(Myristic acid)、花生四烯酸(Arachidonic Acid)、异黄酮(Isoflavone)、阿格列扎(Aleglitazar)、瑞格列扎(Reglitazar)、GFT505(Elafibranor)、莫格列扎(Muraglitazar)、厄罗他非(Ertiprotafib)、邻苯二甲酸(Phthalic Acid)、拉格列扎(Ragaglitazar)、替格列扎(Tesaglitazar)、GW-590735、白细胞三烯B₄(Leukotriene B₄)、辛酸(Caprylic acid)、GW501516(Cardarine)、白藜芦醇(Resveratrol)、N,N-双(3-(D-葡萄糖酰胺)丙基)脱氧胆酰胺(N,N-Bis(3-(D-gluconamido)propyl)deoxycholamide)或上述化合物在药学上可接受的盐、异构体、溶剂化物、代谢产物中的任意一种或至少两种的组合。

[0011] 优选地,所述PPAR激动剂为西格列羧或其在药学上可接受的盐、异构体、溶剂化物、代谢产物中的任意一种或至少两种的组合。

[0012] 优选地,所述药学上可接受的盐包括碱金属盐、碱土金属盐、铵盐或季铵盐中的任意一种,优选为碱金属盐,进一步优选为钠盐或钾盐。

[0013] 优选地,所述PPAR激动剂为西格列他钠、西格列他钾或其左旋体。

[0014] 优选地,所述Bcl-2抑制剂包括ABT-199(Venetoclax)、ABT-737或ABT-263(Navitoclax)中的任意一种或至少两种的组合。

[0015] 本发明在AML细胞株中证明PPAR激动剂西格列他钠(Chiglitazar)和Bcl-2抑制剂ABT-199(Venetoclax)联合可以抑制AML细胞增殖以及诱导其发生凋亡,还能抑制AML细胞株克隆形成能力。在机制方面,西格列他钠能够与PPAR α 结合,激活AML细胞中PPAR α 的蛋白表达,PPAR α 与PI3K启动子互作抑制该基因表达水平,进而一方面下调AKT,并联合Bcl-2抑制剂ABT-199诱导AML细胞发生凋亡;另一方面通过下调Raf/MEK/ERK通路抑制AML细胞增殖,最终抑制了AML发生发展进程。其抑制AML发生发展进程的作用机制示意图如图1所示。

[0016] 优选地,所述药物组合物还包括药学上可接受的辅料。

[0017] 优选地,本发明所述联合用药物组合物可单独给药也可以与辅料搭配做成适当的剂型进行给药,所述药学上可接受的辅料包括载体、稀释剂、赋形剂、填充剂、粘合剂、润湿剂、崩解剂、乳化剂、助溶剂、增溶剂、渗透压调节剂、表面活性剂、包衣材料、着色剂、pH调节

剂、抗氧剂、抑菌剂或缓冲剂中的任意一种或至少两种的组合。

[0018] 所述至少两种的组合例如稀释剂和赋形剂的组合、乳化剂和助溶剂的组合、填充剂和粘合剂和润湿剂的组合等,其他任意的组合方式均可选择,在此便不再一一赘述。

[0019] 优选地,所述联合用药物组合物为单一的复方制剂或两种单独的制剂的组合。

[0020] 优选地,所述联合用药物组合物为两种单独的制剂的组合,两种单独的制剂同时施用或依次施用。

[0021] 所述联合用药物组合物可以为单一的复方制剂形式,也可以为两种单独的制剂的组合;当为两种单独的制剂的组合时,其用药方式可以为同时施用,也可以为交叉施用或依次施用。

[0022] 优选地,所述制剂为药剂学上可接受的任意一种剂型,例如片剂、散剂、混悬剂、颗粒剂、胶囊剂、溶液剂、灌肠剂、乳剂等。

[0023] 第二方面,本发明提供一种根据第一方面所述的预防和/或治疗急性髓系白血病的联合用药物组合物在制备预防、缓解或治疗急性髓系白血病的药物中的应用。

[0024] 第三方面,本发明提供一种根据第一方面所述的预防和/或治疗急性髓系白血病的联合用药物组合物在制备急性髓系白血病细胞的增殖抑制剂中的应用。

[0025] 第四方面,本发明提供一种根据第一方面所述的预防和/或治疗急性髓系白血病的联合用药物组合物在制备以非诊断和/或治疗为目的的急性髓系白血病细胞的增殖抑制剂中的应用。

[0026] 根据本发明的研究结果,所述联合用药物组合物具有显著地抑制急性髓系白血病细胞增殖的作用,因此,该结果表明所述联合用药物组合物可以作为一种以非诊断和/或治疗为目的的急性髓系白血病细胞增殖抑制剂,用于科研领域,例如研究更多的急性髓系白血病细胞生长和代谢机制或行为、筛选治疗急性髓系白血病的药物等等。

[0027] 第五方面,本发明提供一种根据第一方面所述的预防和/或治疗急性髓系白血病的联合用药物组合物在制备急性髓系白血病细胞的凋亡促进剂中的应用。

[0028] 第六方面,本发明提供一种根据第一方面所述的预防和/或治疗急性髓系白血病的联合用药物组合物在制备以非诊断和/或治疗为目的的急性髓系白血病细胞的凋亡促进剂中的应用。

[0029] 根据本发明的研究结果,所述联合用药物组合物具有显著地诱导急性髓系白血病细胞凋亡的作用,因此,该结果表明所述联合用药物组合物可以作为一种以非诊断和/或治疗为目的的急性髓系白血病细胞凋亡促进剂,用于科研领域,例如研究更多的急性髓系白血病细胞凋亡和代谢机制或行为、筛选治疗急性髓系白血病的药物等等。

[0030] 第七方面,本发明提供一种根据第一方面所述的预防和/或治疗急性髓系白血病的联合用药物组合物在制备急性髓系白血病细胞的克隆形成抑制剂中的应用。

[0031] 第八方面,本发明提供一种根据第一方面所述的预防和/或治疗急性髓系白血病的联合用药物组合物在制备以非诊断和/或治疗为目的的急性髓系白血病细胞的克隆形成抑制剂中的应用。

[0032] 在根据本发明的研究结果,所述联合用药物组合物具有显著地抑制急性髓系白血病细胞的克隆形成,因此,该结果表明所述联合用药物组合物可以作为一种以非诊断和/或治疗为目的的急性髓系白血病细胞的克隆形成抑制剂,用于科研领域,例如研究更多的急

性髓系白血病细胞克隆和代谢机制或行为、筛选治疗急性髓系白血病的药物等等。

[0033] 在上述应用中,所述急性髓系白血病细胞包括KG-1 α 细胞和/或Kasumi细胞。

[0034] 相对于现有技术,本发明具有以下有益效果:

[0035] 本发明所涉及的联合用药物组合物创造性地将PPAR激动剂和Bcl-2抑制剂进行联用作为预防或治疗急性髓系白血病的药物,其中PPAR激动剂除了能够与PPAR α 结合激活PPAR α 外,其还能在分子水平抑制AML细胞株的PI3K表达水平,并联合Bcl-2抑制剂下调PI3K/AKT通路和Raf/MEK/ERK通路,在细胞水平能够抑制AML细胞株的增殖、诱导其细胞凋亡水平以及抑制AML细胞株的克隆形成能力,最终抑制AML发生发展进程。本发明研究发现PPAR激动剂联合Bcl-2抑制剂具有比单一PPAR激动剂或Bcl-2抑制剂更显著抑制AML细胞增殖的作用、更显著诱导AML细胞凋亡的作用、更显著抑制AML细胞克隆形成能力的作用。本发明为急性髓系白血病的治疗提供了有效的药物联用策略,具有十分显著的意义。

附图说明

[0036] 图1是本发明的联合用药物组合物抑制AML发生发展进程的作用机制示意图;

[0037] 图2A是各组的KG1 α 细胞增殖水平结果图;

[0038] 图2B是各组的Kasumi细胞增殖水平结果图;

[0039] 图3A是各组的KG1 α 细胞计数结果统计图;

[0040] 图3B是各组的Kasumi细胞计数结果统计图;

[0041] 图4A是使用不同浓度的西格列他钠和ABT-199处理KG-1 α 细胞,在24h后的凋亡细胞比率统计结果图;

[0042] 图4B是使用不同浓度的西格列他钠和ABT-199处理KG-1 α 细胞,在24h后的活细胞比率统计结果图;

[0043] 图4C是使用不同浓度的西格列他钠和ABT-199处理Kasumi细胞,在24h后的凋亡细胞比率统计结果图;

[0044] 图4D是使用不同浓度的西格列他钠和ABT-199处理Kasumi细胞,在24h后的活细胞比率统计结果图;

[0045] 图5A是西格列他钠和ABT-199处理KG-1 α 细胞和Kasumi细胞后的细胞克隆形成能力鉴定结果图;

[0046] 图5B是KG-1 α 细胞克隆形成统计结果图;

[0047] 图5C是Kasumi细胞克隆形成统计结果图;

[0048] 图6A是西格列他钠和ABT-199处理后蛋白表达水平的Western blot结果图;

[0049] 图6B是HEK293T细胞共转染pGL3-PI3K、pML-SV40-hRluc和不等量pCMV-PPAR α 的Luc/Rluc结果统计图;

[0050] 图7A是西格列他钠和ABT-199处理KG-1 α 细胞和Kasumi细胞24h后增殖相关基因的Western blot分析结果图;

[0051] 图7B是西格列他钠和ABT-199处理KG-1 α 细胞和Kasumi细胞24h后凋亡相关基因的Western blot分析结果图;

[0052] 图8A是PDX小鼠模型给药14天后各组小鼠的脾脏外观图;

[0053] 图8B是PDX小鼠模型给药14天后各组小鼠的脾重统计图;

[0054] 图8C是PDX小鼠模型给药14天后小鼠腿骨骨髓中人CD45阳性细胞比率统计结果图；

[0055] 图8D是PDX小鼠模型给药14天后小鼠的生存率统计图。

具体实施方式

[0056] 下面通过具体实施方式来进一步说明本发明的技术方案。本领域技术人员应该明了,所述实施例仅仅是帮助理解本发明,不应视为对本发明的具体限制。

[0057] 实施本发明的过程、条件、试剂、实验方法等,除以下专门提及的内容之外,均为本领域的普遍知识和公知常识,本发明没有特别限制内容。各实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件或按照制造厂商所建议的条件。

[0058] 除非另有说明,本说明书中使用的所有专业术语和科学用语的含义均与本发明所属技术领域的技术人员一般理解的含义相同。但如有冲突,以包含定义的本说明书为准。

[0059] 下述实施例所涉及的药物ABT-199 (Venetoclax) 和西格列他钠 (Chiglitazar) 均由深圳微芯生物公司提供。

[0060] AML细胞株(包括KG1 α 、Kasumi)由厦门大学医学院血液学研究所提供。

[0061] 实施例1

[0062] 联合用药物组合物对AML细胞株增殖的抑制作用

[0063] 操作方法为:取数量为 1×10^4 对数生长期的AML细胞株(包括KG1 α 、Kasumi细胞株)接种于96孔板,对照组用DMSO处理细胞,实验组的西格列他钠浓度梯度设置为0 μ M、0.25 μ M、0.5 μ M、1 μ M、2 μ M、4 μ M、8 μ M和16 μ M;ABT-199浓度梯度设置为0nM、2.5nM、5nM、10nM、20nM、40nM、80nM和160nM;各组分别作用24h后,应用CCK8试剂盒检测不同组AML细胞的增殖水平,并用台盼蓝染色进行活细胞计数。

[0064] 各组的细胞增殖水平结果如图2A (KG1 α) 和图2B (Kasumi) 所示;

[0065] 各组的细胞计数结果如图3A (KG1 α) 和图3B (Kasumi) 所示。

[0066] 结合上述结果可知,西格列他钠联合ABT-199能够抑制AML细胞的增殖水平,并且表现出浓度的依赖性;随着处理浓度的增加,其抑制率逐渐上升;相较于单药实验组,两药联合能显著提升KG-1 α 与Kasumi细胞对药物的敏感性。

[0067] 实施例2

[0068] 联合用药物组合物对AML细胞株的诱导凋亡作用

[0069] 操作方法为:取数量为 1×10^5 对数生长期的AML细胞株(包括KG1 α 、Kasumi细胞株)接种于24孔板,对照组用DMSO处理细胞,实验组的西格列他钠浓度梯度设置为0 μ M、0.25 μ M、0.5 μ M、1 μ M、2 μ M、4 μ M、8 μ M和16 μ M;ABT-199浓度梯度设置为0nM、2.5nM、5nM、10nM、20nM、40nM、80nM和160nM;各组分别作用24h后,应用Annexin V/PI试剂盒检测不同组AML细胞的凋亡情况(具体操作步骤按照试剂盒说明书进行)。

[0070] 图4A和图4B分别为使用不同浓度的西格列他钠和ABT-199处理KG-1 α 细胞,在24h后的凋亡细胞比率和活细胞比率统计结果;图4C和图4D为使用不同浓度的西格列他钠和ABT-199处理Kasumi细胞,在24h后的凋亡细胞比率和活细胞比率统计结果。

[0071] 由上述结果可知,西格列他钠联合ABT-199诱导AML细胞发生凋亡,提高AML细胞的凋亡水平,且呈现浓度依赖性。

[0072] 实施例3

[0073] 联合用药物组合物对AML细胞株的克隆形成抑制作用

[0074] 操作方法为:用蒸馏水分别制备出1.2%和0.7%两个浓度的低熔点琼脂糖液,高压灭菌;将1.2%的琼脂糖和2×DMEM培养基按1:1比例混合,温度保持在40℃;取3mL混合液注入直径6cm平皿中,冷却凝固,作底层琼脂置CO₂培养箱中备用;将0.7%的琼脂糖和2×DMEM培养基按1:1比例于无菌试管中混合,再向管中加入细胞悬液(接种1000个细胞)充分混匀,注入铺有1.2%琼脂糖底层平皿中,逐形成双琼脂层;

[0075] 对照组用DMSO处理,实验组西格列他钠浓度为10μM,ABT-199浓度为100nM;待上层琼脂凝固后,置入37℃5%CO₂培养箱中培养14天;单个克隆所含细胞数大于50后方可用低浓度结晶紫溶液(0.1%)染色并统计克隆形成率。

[0076] 图5A为西格列他钠和ABT-199处理KG-1α细胞和Kasumi细胞后的细胞克隆形成能力鉴定结果图;图5B为KG-1α细胞克隆形成统计结果图;图5C为Kasumi细胞克隆形成统计结果图。

[0077] 所得结果表明,西格列他钠联合ABT-199显著抑制AML细胞株克隆形成能力。

[0078] 实施例4

[0079] 西格列他钠对AML细胞株PI3K基因表达的影响

[0080] 操作方法为:取1×10⁶对数生长期AML细胞株KG-1α与Kasumi分别接种于6cm细胞培养皿中;对照组用DMSO处理细胞,实验组KG1α和Kasumi细胞西格列他钠处理浓度为10μM,ABT-199处理浓度为50nM;处理36h后300g离心5min收集细胞,取一半细胞用200μL RIPA裂解液冰置裂解1h,提取总蛋白进行Western blot,检测PPARα、PI3K相关蛋白水平表达。

[0081] 图6A为西格列他钠和ABT-199处理后蛋白表达水平的Western blot结果图,由图可知,西格列他钠单药组与两药联合组PPARα表达显著上调,PI3K表达显著下调。

[0082] 为探究转录因子PPARα是否调控PI3K基因表达:

[0083] 首先,使用UCSC数据库(<https://genome.ucsc.edu/>)查找PI3K启动子序列,并在NCBI中比对验证;

[0084] 利用JASPAR数据库(<https://jaspar.genereg.net/>)和FIMO数据库(<https://meme-suite.org/meme/tools/fimo>)预测PPARα在PI3K启动子区域的结合位点。

[0085] 使用双荧光素酶报告基因系统验证转录因子PPARα与PI3K启动子结合从而下调该基因表达水平。

[0086] 将PI3K的启动子片段克隆入Luciferase报告载体(pGL3-basic),构建得到重组质粒pGL3-PI3K promoter;

[0087] 将PPARα克隆入pCMV载体,构建得到重组质粒pCMV-PPARα;

[0088] 待接种于24孔板的HEK293T细胞生长至融合率达70%时,使用Lipofectamine2000共转染200ng pGL3-PI3K、40ng pML-SV40-hRluc和pCMV-PPARα(0、200、400、800ng);

[0089] 转染24-36h后,吸去培养液,用预冷的1×PBS洗涤细胞,每孔加入200μL Harvest Buffer于冰上放置10min裂解细胞,10000rpm离心15min;

[0090] 取定量上清加入适量荧光素酶底物,30s内检测荧光强度,荧光虫荧光素酶的检测值/海肾荧光素酶的检测值(Luc/Rluc)与转录因子的作用强度成正比。

[0091] 图6B为HEK293T细胞共转染pGL3-PI3K、pML-SV40-hRluc和不等量pCMV-PPARα的

Luc/Rluc结果统计图。结果表明,转入pCMV-PPAR α 越多,Luc/Rluc值越低,故转录因子PPAR α 能与PI3K启动子结合,下调该基因表达水平。

[0092] 实施例5

[0093] 联合用药物组合物对AML细胞株PI3K基因表达的影响

[0094] 操作方法为:取 1×10^6 对数生长期AML细胞株KG-1 α 与Kasumi分别接种于6cm细胞培养皿中;对照组用DMSO处理细胞,实验组KG1 α 和Kasumi细胞西格列他钠处理浓度为10 μ M,ABT-199处理浓度为50nM;处理36h后300g离心5min收集细胞,取一半细胞用200 μ L RIPA裂解液冰置裂解1h,提取总蛋白进行Western blot,检测PPAR α 、PI3K的下游信号通路相关蛋白水平表达。

[0095] 图7A为西格列他钠和ABT-199处理KG-1 α 细胞和Kasumi细胞24h后增殖相关基因的Western blot分析结果图。结果表明,西格列他钠处理的细胞,PI3K下游信号通路Raf/MEK/ERK下调,ERK蛋白磷酸化水平降低,其进入细胞核调控多种基因表达水平,例如该通路下游增殖相关基因c-Myc表达下调。

[0096] 图7B为西格列他钠和ABT-199处理KG-1 α 细胞和Kasumi细胞24h后凋亡相关基因的Western blot分析结果图。结果表明,西格列他钠处理的细胞PI3K/AKT通路下调,促凋亡蛋白Bax表达上调,抗凋亡蛋白Bcl-2、Bcl-xL、Mcl-1表达下调;Bcl-2抑制剂ABT-199处理的细胞抗凋亡蛋白Bcl-2表达显著下调;西格列他钠联合ABT-199诱导AML细胞株更快发生凋亡。

[0097] 实施例6

[0098] 从动物水平评价联合用药物组合物对AML细胞的杀伤作用

[0099] 具体操作方法如下:

[0100] (1) 构建PDX小鼠模型

[0101] 收集 5×10^5 原代AML细胞,通过尾静脉注射到NOD-Prkdc^{-/-}IL2rg^{-/-}(NSG)小鼠体内进行成瘤,其中NSG小鼠购自厦门大学实验动物中心,并且由实验动物中心饲养。

[0102] (2) 分别设置对照组、ABT-199给药组、西格列他钠给药组、两药联合组

[0103] 注射约14天后,ABT-199按50mg/kg/day、西格列他钠按10mg/kg/day剂量给药,以给药起始日记为第0天,灌胃给药14天。每组共9只鼠,其中4只取腿骨骨髓进行流式分析,5只统计生存率。

[0104] 图8A是PDX小鼠模型给药14天后各组小鼠的脾脏外观图;图8B是PDX小鼠模型给药14天后各组小鼠的脾重统计图;结果表明两药联合组小鼠脾显著小于对照组和单药组。图8C是PDX小鼠模型给药14天后小鼠腿骨骨髓中人CD45阳性细胞比率统计结果图;结果表明两药联合组小鼠骨髓人CD45阳性细胞比率低于对照组和单药组;图8D是PDX小鼠模型给药14天后小鼠的生存率统计图。综上可知,西格列他钠联合ABT-199能够明显抑制PDX模型的成瘤进程。

[0105] 申请人声明,本发明通过上述实施例来说明本发明的一种预防和/或治疗急性髓系白血病的联合用药物组合物及其应用,但本发明并不局限于上述实施例,即不意味着本发明必须依赖上述实施例才能实施。所属技术领域的技术人员应该明了,对本发明的任何改进,对本发明产品各原料的等效替换及辅助成分的添加、具体方式的选择等,均落在本发明的保护范围和公开范围之内。

[0106] 以上详细描述了本发明的优选实施方式,但是,本发明并不限于上述实施方式中

的具体细节,在本发明的技术构思范围内,可以对本发明的技术方案进行多种简单变型,这些简单变型均属于本发明的保护范围。

[0107] 另外需要说明的是,在上述具体实施方式中所描述的各个具体技术特征,在不矛盾的情况下,可以通过任何合适的方式进行组合,为了避免不必要的重复,本发明对各种可能的组合方式不再另行说明。

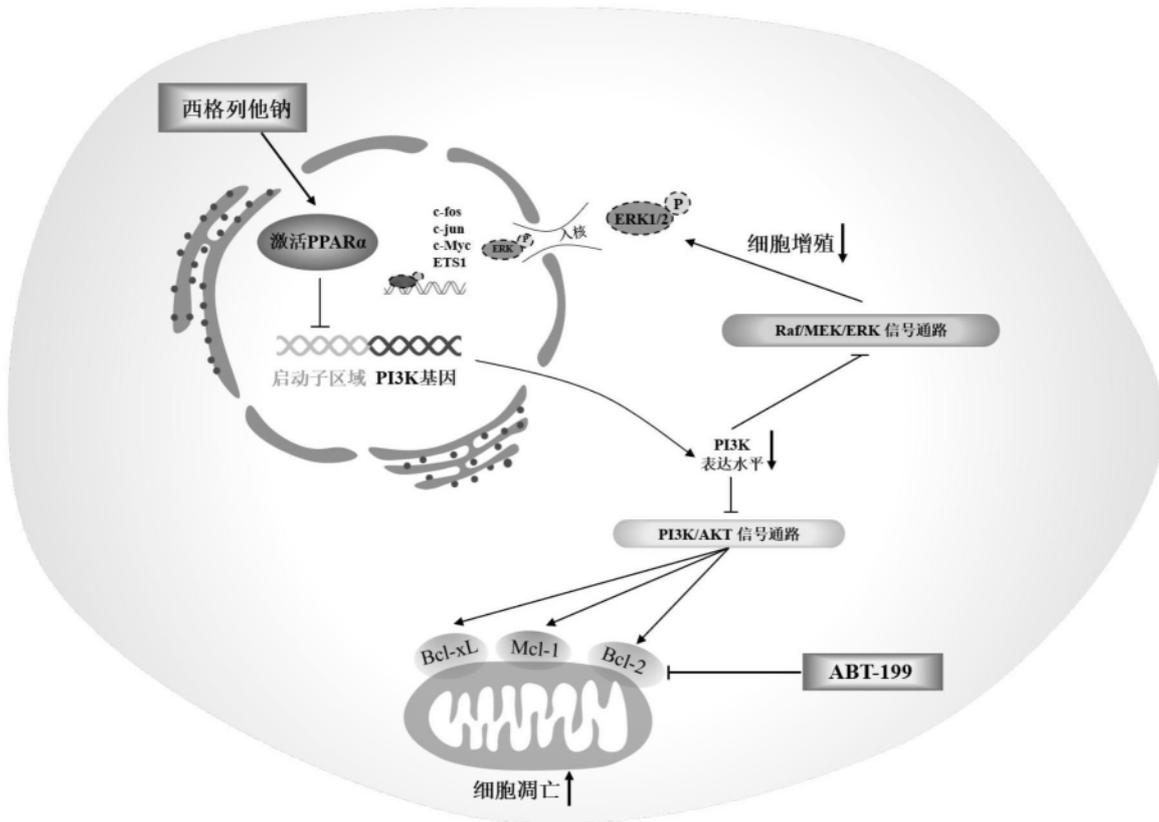


图1

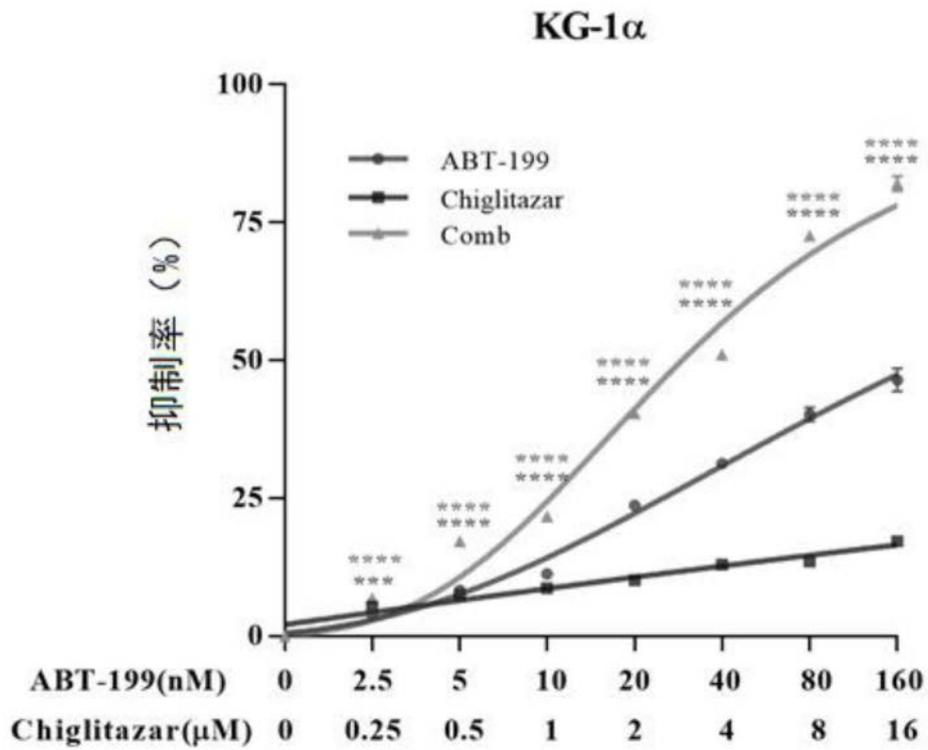


图2A

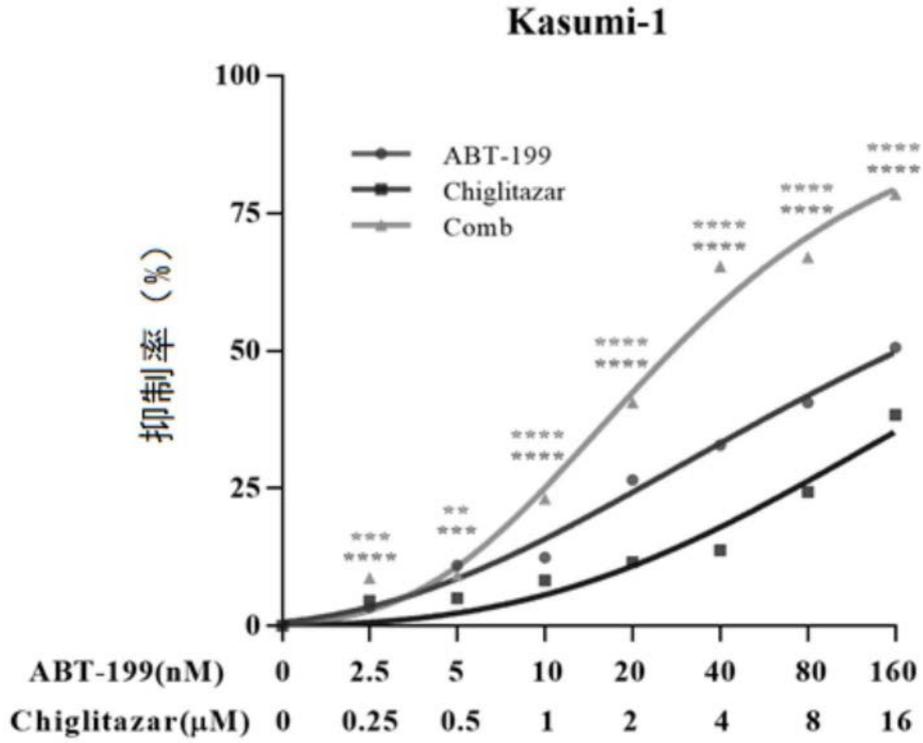


图2B

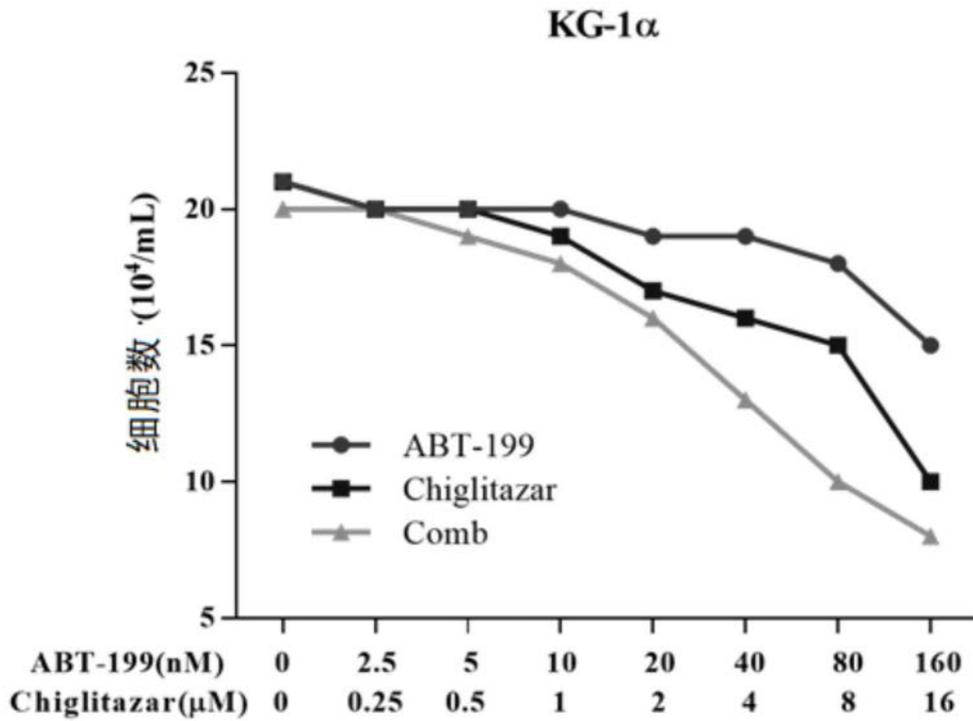


图3A

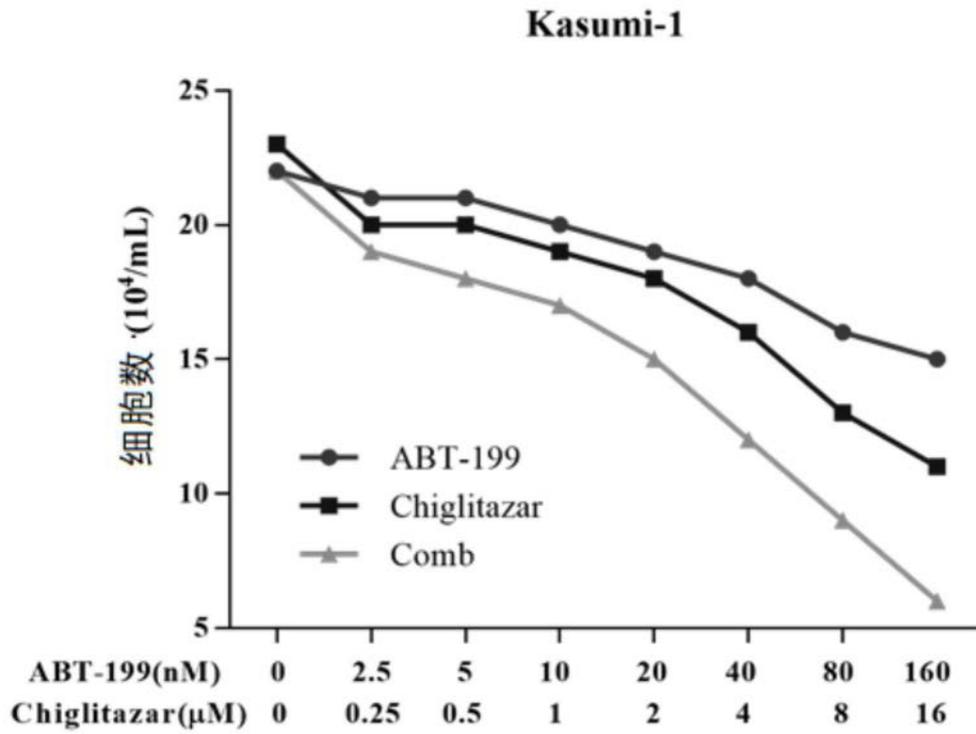


图3B

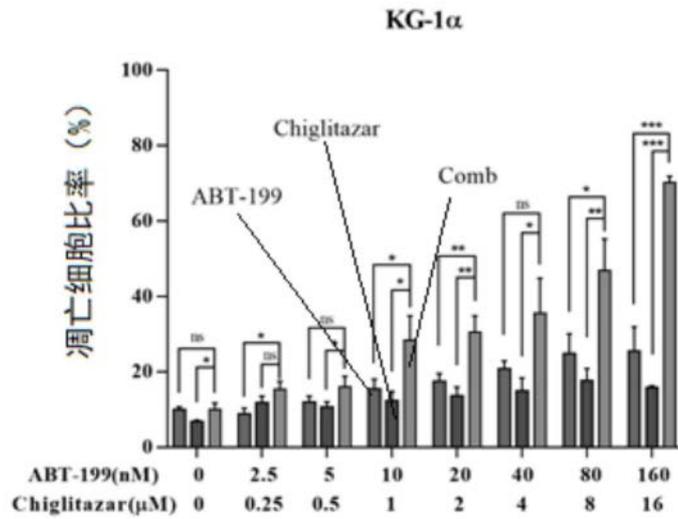


图4A

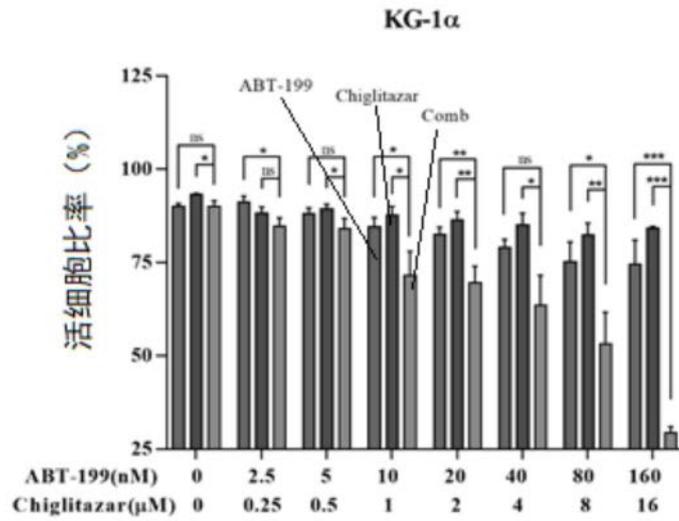


图4B

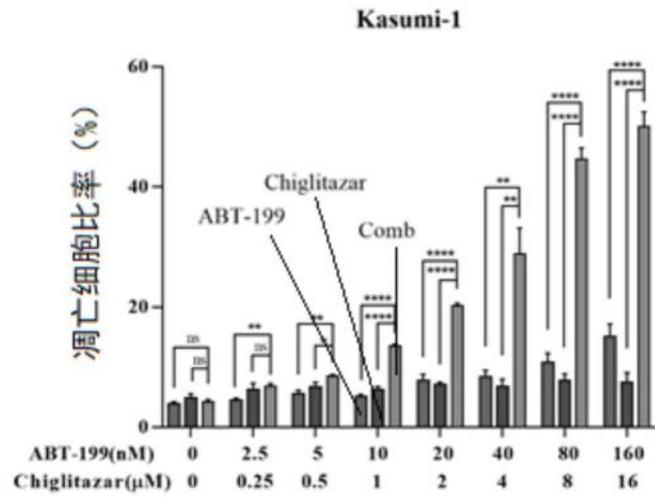


图4C

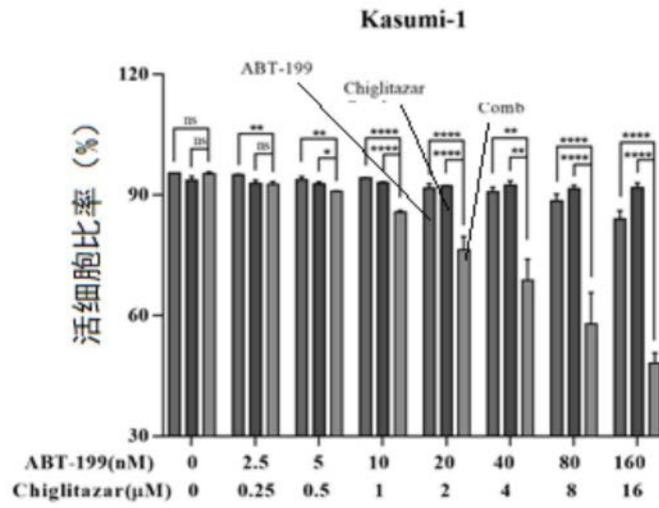


图4D

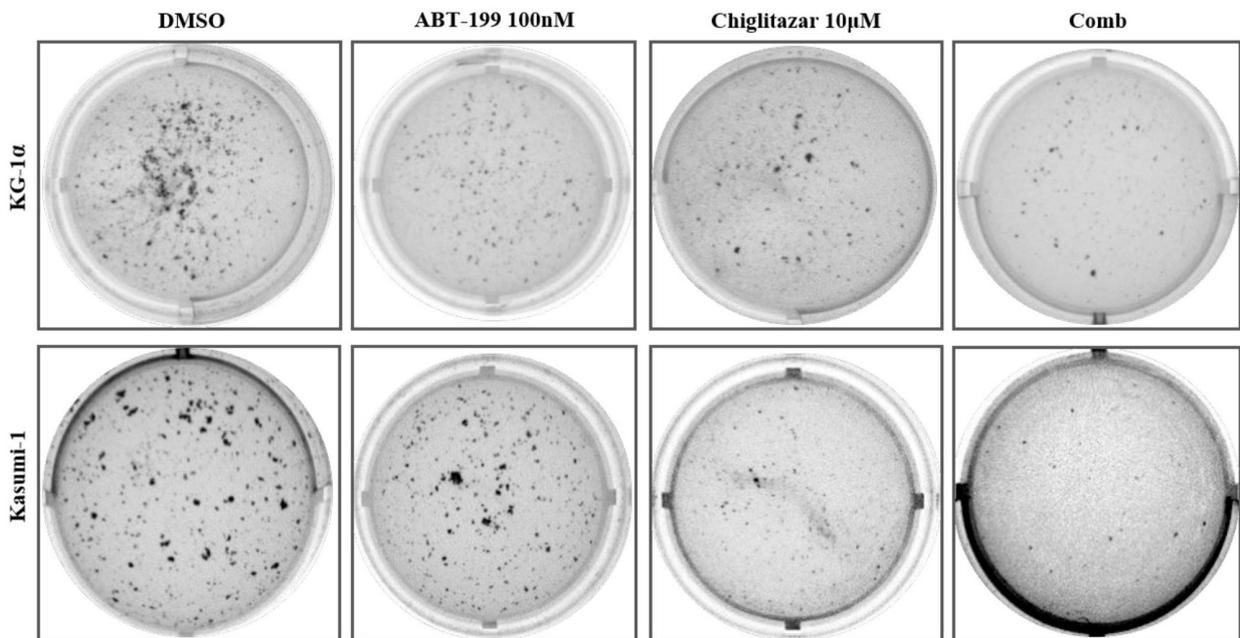


图5A

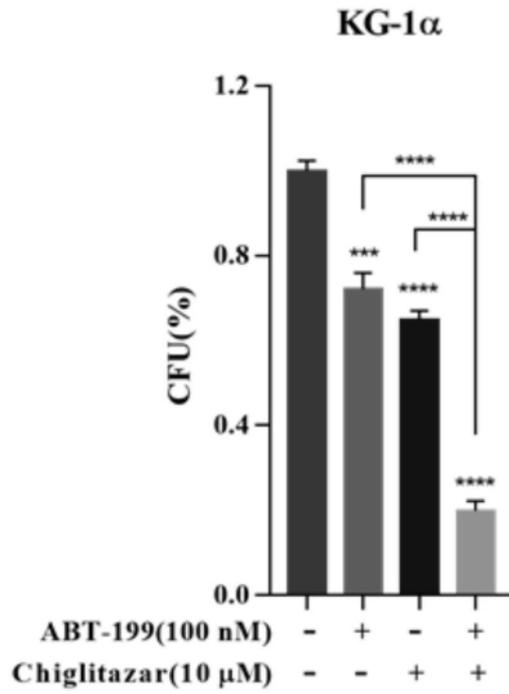


图5B

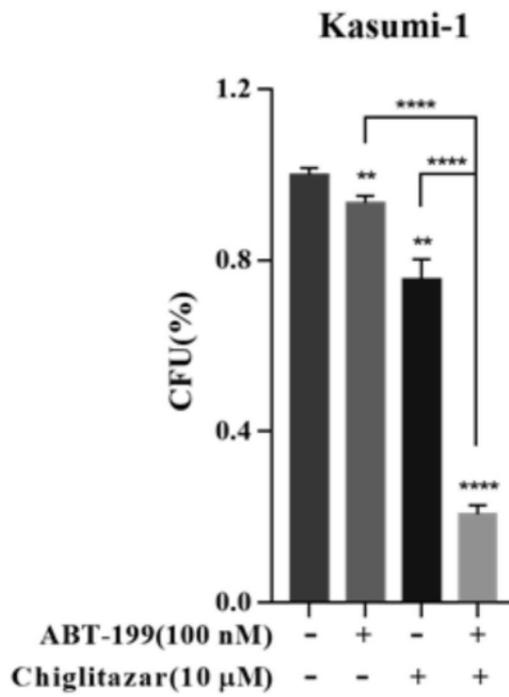


图5C

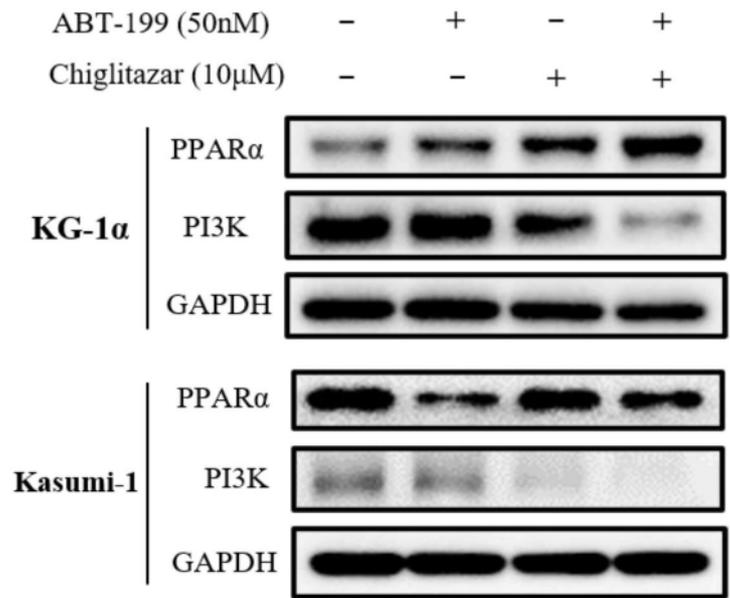


图6A

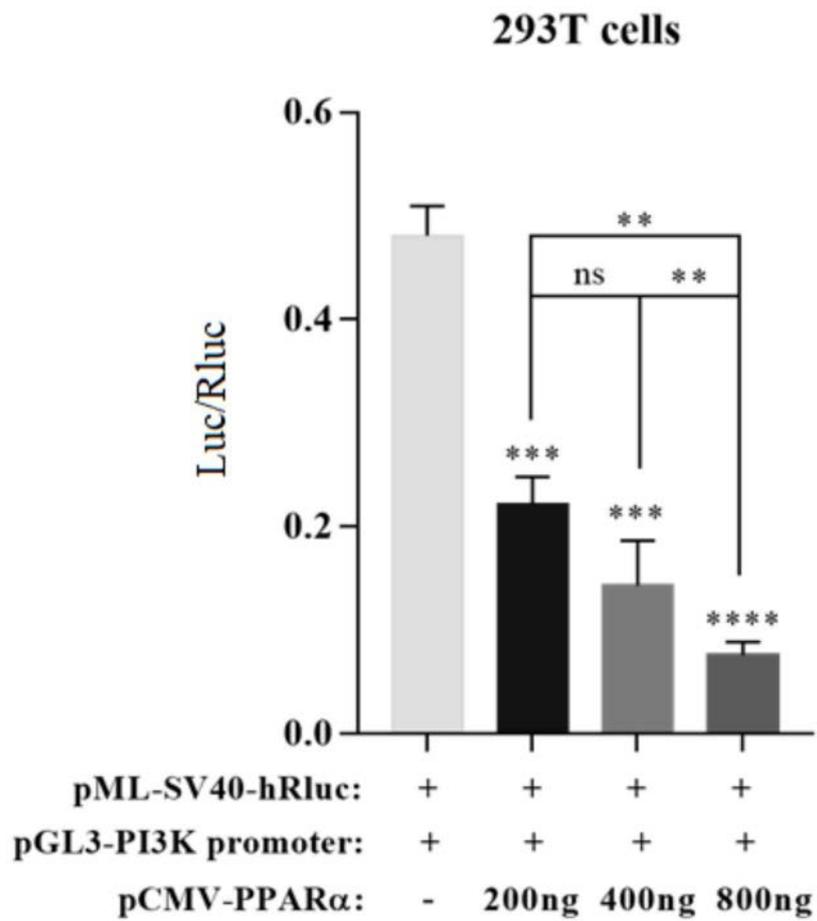


图6B

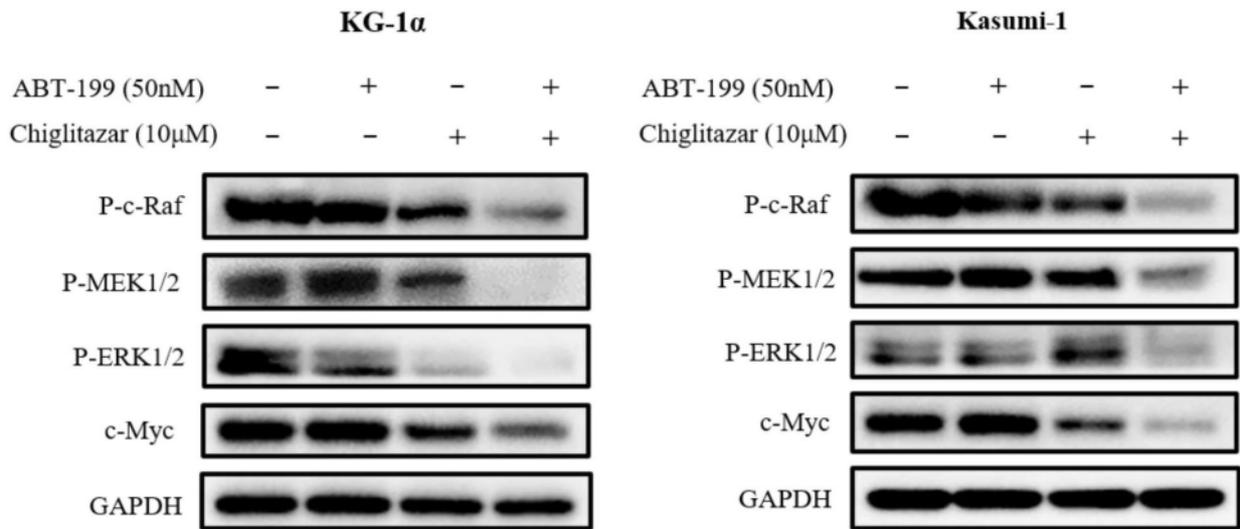


图7A

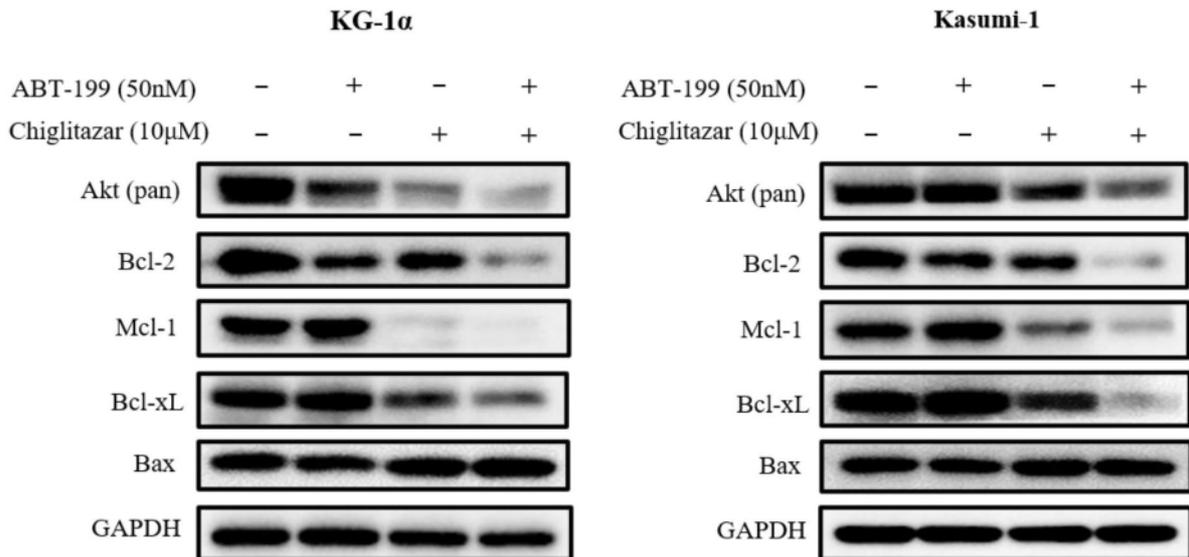


图7B

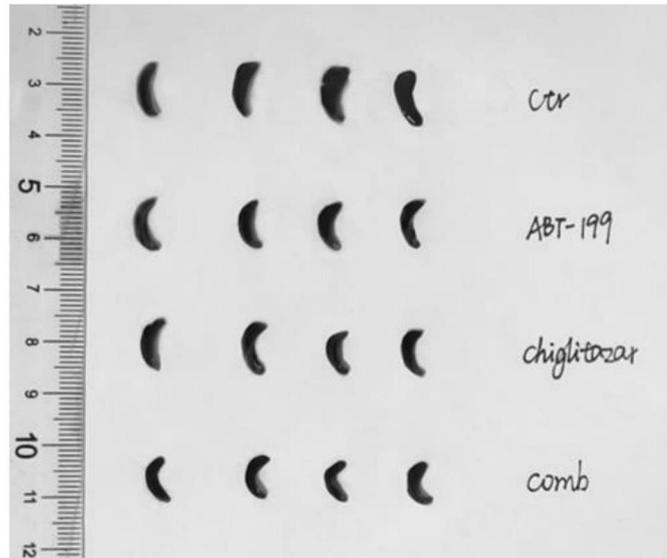


图8A

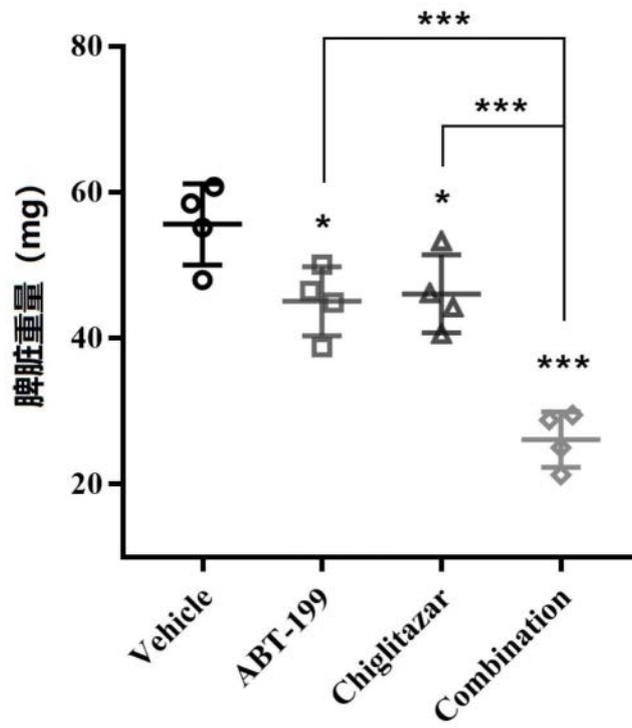


图8B

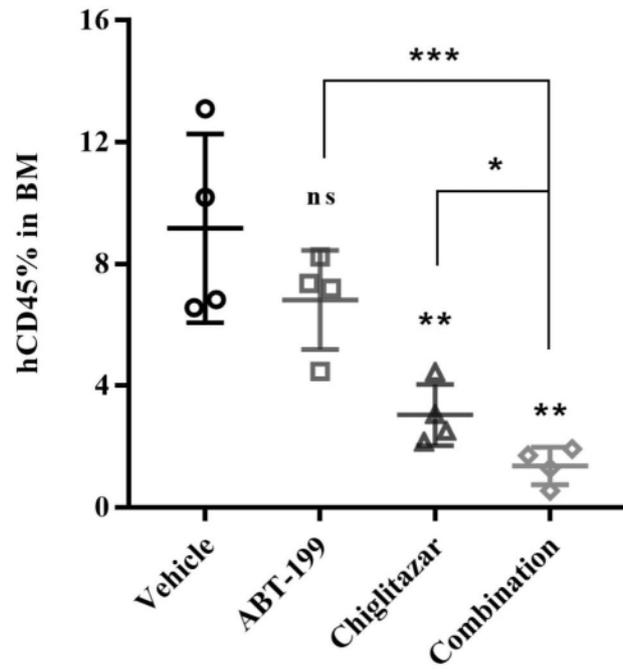


图8C

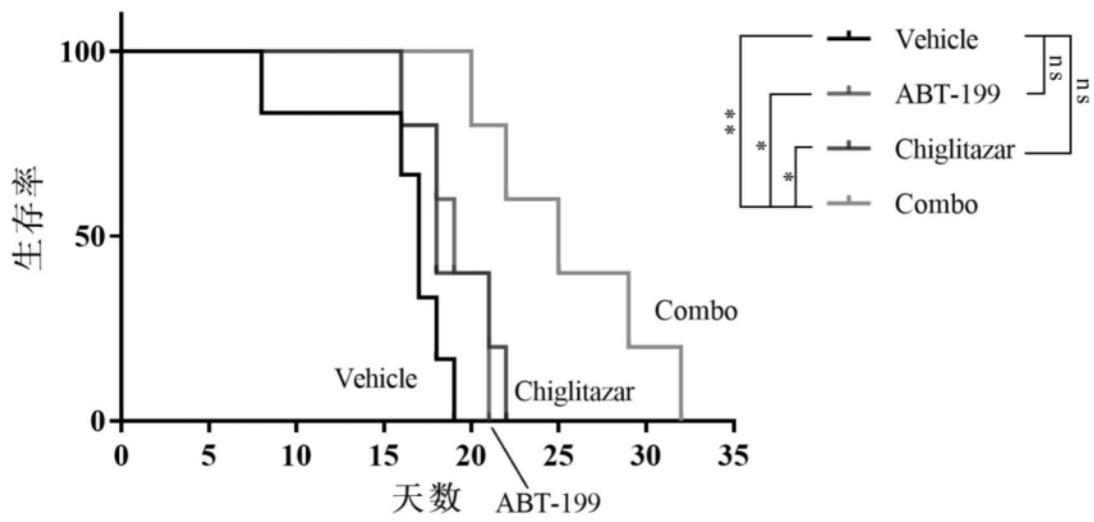


图8D