



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113662942 B

(45) 授权公告日 2023.02.07

(21) 申请号 202110954090.8
 (22) 申请日 2021.08.19
 (65) 同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 113662942 A
 (43) 申请公布日 2021.11.19
 (73) 专利权人 中国人民解放军陆军军医大学第一附属医院
 地址 400038 重庆市沙坪坝区高滩岩正街30号
 (72) 发明人 姚月良 毛敏 王岩 卞修武
 (74) 专利代理机构 北京元本知识产权代理事务所(普通合伙) 11308
 专利代理师 黎昌莉
 (51) Int.Cl.
 A61K 31/4745 (2006.01)
 A61K 31/4375 (2006.01)
 A61P 35/00 (2006.01)
 (56) 对比文件
 CN 113194752 A, 2021.07.30
 CN 108024540 A, 2018.05.11
 TW 201815395 A, 2018.05.01

US 2017/0312278 A1, 2017.11.02
 Lustri A M, et al..TGF-β signaling is an effective target to impair survival and induce apoptosis of human cholangiocarcinoma cells: A study on human primary cell cultures.《PloS one》.2017,第12卷(第9期),第e0183932页.
 Lustri A M, et al..TGF-β signaling is an effective target to impair survival and induce apoptosis of human cholangiocarcinoma cells: A study on human primary cell cultures.《PloS one》.2017,第12卷(第9期),第e0183932页.
 Kotulak Chrzyszcz A, et al..Sonic Hedgehog signaling pathway in gynecological and genitourinary cancer.《International Journal of Molecular Medicine》.2021,第47卷(第6期),第1-20页.

(续)

审查员 黄玉梅

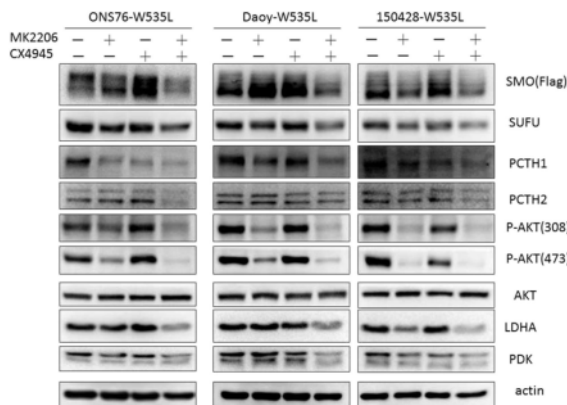
权利要求书1页 说明书6页 附图6页

(54) 发明名称
 药物组合物及其在SMO突变性髓母细胞瘤中的应用

(57) 摘要

本发明属于髓母细胞瘤用药技术领域,具体涉及一种基于MK2206和CX4945的药物组合物及其在SMO突变性髓母细胞/细胞瘤中的应用。所述药物组合物包括MK2206和CX4945。联合使用MK2206和CX4945可以抑制Hedgehog通路中SMO和/或SUFU和/或PCTH1和/或PTCH2表达;或阻断SMO/AKT/CK2信号通路的信号传导;或抑制糖酵解通路中的PDK1和/或LDHA蛋白的表达从而有效抑制耐药型髓母细胞/细胞瘤生长。该药物组合物解决了SMO抑制剂产生耐药型髓母细胞/细胞瘤的问题,能有效作用于SMO突变型耐药型髓母

细胞/细胞瘤。



CN 113662942 B

[接上页]

(56) 对比文件

Kotulak Chrzęszcz A, et al..Sonic Hedgehog signaling pathway in gynecological and genitourinary cancer.《International Journal of Molecular Medicine》.2021,第47卷(第6期),第1-20页.

Purzner T, et al..Developmental phosphoproteomics identifies the kinase

CK2 as a driver of Hedgehog signaling and a therapeutic target in medulloblastoma.《Science signaling》.2018,第11卷(第547期),第eaau5147页.

D' Amore C, et al..Role of CK2 inhibitor CX-4945 in anti-cancer combination therapy-potential clinical relevance.《Cellular Oncology》.2020,第43卷(第6期),第1003-1016页.

1. 包含MK2206和CX4945的药物组合物在制备抑制耐药型髓母细胞瘤生长的抑制剂中的应用。

2. 根据权利要求1所述的药物组合物的应用,其特征在于,所述药物组合物还包括药学上可接受的活性成分和/或载体。

3. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,所述耐药型髓母细胞瘤包括ONS76-W535L耐药型髓母细胞瘤、Daoy-W535L耐药型髓母细胞瘤和150428-W535L耐药型髓母细胞瘤。

4. 一种体外抑制耐药型髓母细胞瘤生长的方法,其特征在于,包括:使用权利要求1或2所述的药物组合物进行用药。

5. 根据权利要求4所述的方法,其特征在于,所述耐药型髓母细胞瘤包括ONS76-W535L耐药型髓母细胞瘤、Daoy-W535L耐药型髓母细胞瘤和150428-W535L耐药型髓母细胞瘤。

6. 根据权利要求4所述的方法,其特征在于,所述方法包括:使用所述药物组合物抑制Hedgehog通路中SMO和/或有效SUFU和/或PCTH1和/或PTCH2表达从而抑制耐药型髓母细胞瘤生长;或使用所述药物组合物阻断SMO/AKT/CK2信号通路的信号传导从而抑制耐药型髓母细胞瘤生长;或抑制糖酵解通路中的PDK1和/或LDHA蛋白的表达从而抑制耐药型髓母细胞瘤生长。

药物组合物及其在SMO突变性髓母细胞瘤中的应用

技术领域

[0001] 本发明属于髓母细胞/细胞瘤用药技术领域,具体涉及一种基于MK2206和CX4945的药物组合物及其在SMO突变性髓母细胞/细胞瘤中的应用。

背景技术

[0002] Hedgehog (Hh) 信号通路在维持胚胎发育和成体组织稳态平衡中起重要的作用,Hh通路一旦发生异常调控,就会产生机体缺陷或者肿瘤等。在许多肿瘤中Hh信号通路都异常活跃,其中SMO是Hh信号通路中关键的信号转导分子,靶向SMO已经成为药物研究热点。目前已有SMO抑制剂进入临床使用治疗各种肿瘤,如Vismodegib (GDC-0449) 已经被批准用于治疗晚期和转移性基底细胞癌。虽然不少肿瘤患者接受GDC-0449治疗后,临床治疗获得显著益处,但是也有些患者容易产生耐药性。对这些耐药患者进行基因组分析,发现GDC-0449耐药性与Hh通路再活化有关,主要是SMO发生突变,导致SMO持续表达,Hh信号通路激活,导致药物作用失效。这些突变体主要有SMO-W535L和SMO-D473H等,其中SMO-W535L突变体不需要Hh激活就可以自我持续激活,SMO-D473H破坏了GDC-0449药物与SMO相互作用结合靶点。国内外大量的研究工作,主要还是集中于利用模式生物果蝇,研究果蝇SMO的各种翻译后修饰作用;而对于SMO如何直接传导生物信号,与哪些蛋白质直接发生相互作用研究的比较少。SMO-W535L和SMO-D473H等突变体与野生型SMO之间直接传导信号通路的蛋白质存在怎么样的差异性都不清楚。

[0003] 髓母细胞瘤/细胞是人颅内的一种恶性肿瘤,SMO性突变导致髓母细胞/细胞瘤增强了耐药性,现有的治疗药剂治疗或抑制效果不明显,如何控制和对SMO突变性耐药型髓母细胞/细胞瘤用药是亟待解决的技术问题。

发明内容

[0004] 有鉴于此,本发明在于提供一种药物组合物及其应用。所述药物组合物在体外能有效抑制SMO突变性髓母细胞/细胞瘤的生长。

[0005] 所述药物组合物包括MK2206和CX4945。

[0006] 本发明清楚SMO分子在Hedgehog信号通路中直接相互作用的分子机制,特别是清楚突变体与野生型直接相互作用的差异性蛋白质;同时这针对这些蛋白质抑制或拮抗,更加抑制肿瘤细胞/细胞瘤生长,解决耐药性问题。

[0007] 本发明中,三种不同的耐药型髓母细胞瘤ONS76-W535L, Daoy-W535L和原代150428-W535L细胞体外应用MK2206与CX4945联合筛选,应用CompSyn软件分析发现MK2206与CX4945联合用药具有协同作用,联合指数(CI)值小于1。体外克隆形成和细胞增殖实验中验证了SMO-W535L组各种不同细胞系中MK2206和CX4945之间都具有很好的协同联合抑制作用。MK2206+CX4945联合治疗不但可以有效抑制Hedgehog通路中的SMO表达外;同时还可以有效SUFU,PCTH1和PTCH2的表达;另外还可以有效抑制糖酵解通路中的PDK1和LDHA蛋白的表达。RNA-SEQ分析发现糖酵解通路在SMO(W535L)突变组中富集,高度激活。CO-IP的结果表

明AKT与CK2, AKT与SMO之间有蛋白相互作用,表明信号轴为SMO/AKT/CK2,这也解释了SMO突变后AKT会异常激活的原因,SMO/AKT/CK2轴是耐药型髓母细胞瘤的信号传导方式,同时有效联合AKT抑制剂与CK2抑制剂可以用效抑制耐药型髓母细胞瘤的生长。

[0008] 进一步,本发明还提供一种包含前述的药物组合物的制剂,所述制剂还包括其他药学上可接受的活性成分和/或载体。

[0009] 具体地,所述MK2206为AKT抑制剂,所述CX4945为CK2抑制剂。所述药物组合物还可以包含除MK2206和CX4945以外的一些辅助剂和/或活性成分,所述药物组合物或制剂可以在培养基中直接使用,也可以直接用药。

[0010] 进一步,本发明还提供一种前述的MK2206和CX4945药物组合物在制备抑制耐药型髓母细胞/细胞瘤生长的抑制剂中的应用。

[0011] MK2206和CX4945可以制备成各种抑制剂,或者使用含有MK2206和CX4945的培养基培养耐药型髓母细胞从而抑制耐药型髓母细胞/细胞瘤生长。

[0012] 具体地,所述耐药型髓母细胞瘤的耐药性是由SMO突变导致的,SMO突变耐药型髓母细胞/细胞瘤包括ONS76-W535L耐药型髓母细胞/细胞瘤、Daoy-W535L耐药型髓母细胞/细胞瘤和150428-W535L耐药型髓母细胞/细胞瘤。

[0013] 本发明目的在于提供一种体外抑制耐药型髓母细胞/细胞瘤生长的方法,所述方法包括使用前述的MK2206和CX4945药物组合物进行用药,该方法可以有效抑制耐药型髓母细胞/细胞瘤的生长。

[0014] 进一步,所述药型髓母细胞瘤包括ONS76-W535L耐药型髓母细胞/细胞瘤、Daoy-W535L耐药型髓母细胞/细胞瘤和150428-W535L耐药型髓母细胞/细胞瘤。

[0015] 进一步,所述方法包括:使用所述药物组合物抑制Hedgehog通路中SMO和/或SUFU和/或PCTH1和/或PTCH2表达从而抑制抑制耐药型髓母细胞/细胞瘤生长;或使用所述药物组合物阻断SMO/AKT/CK2信号通路的信号传导从而抑制耐药型髓母细胞/细胞瘤生长;或抑制糖酵解通路中的PDK1和/或LDHA蛋白的表达从而抑制耐药型髓细胞/细胞瘤生长。

[0016] 本发明目的在于还提供一种体外抑制耐药型髓母细胞/细胞瘤生长的方法,所述方法为通过阻断SMO/AKT/CK2信号通路的信号传导。

[0017] 具体地,在某些实施例中,联合使用MK2206和CX4945可以有效阻断SMO/AKT/CK2信号通路的信号传导。

[0018] 优选地,所述耐药型髓母细胞包括ONS76-W535L耐药型髓母细胞/细胞瘤、Daoy-W535L耐药型髓母细胞/细胞瘤和150428-W535L耐药型髓母细胞/细胞瘤。

[0019] 本发明目的在于还提供一种MK2206和CX4945组成的药物组合物在制备抑制剂/阻断剂中的应用,所述抑制剂为Hedgehog通路中SMO和/或SUFU和/或PCTH1和/或PTCH2表达抑制剂;或所述抑制剂为糖酵解通路中的PDK1和/或LDHA蛋白的表达抑制剂;或所述阻断剂为SMO/AKT/CK2信号通路的信号传导阻断剂。

[0020] 具体地,在某些具体实施例中,通过在培养基中添加MK2206和CX4945然后培养耐药型髓母细胞/细胞瘤的方式进行用药。

[0021] 本发明有益效果在于

[0022] 本发明提供的MK2206和CX4945药物组合物较单一MK2206或CX4945药物更能有效抑制耐药型髓细胞/细胞瘤的生长。

[0023] 本发明提供的MK2206和CX4945药物组合物解决了SMO抑制剂产生耐药型髓母细胞的问题,能有效作用与耐药型髓母细胞/细胞瘤。

附图说明

- [0024] 图1为MK2206与CX4945联合用药对耐药型髓母细胞Daoy-W535L作用情况。
[0025] 图2为MK2206与CX4945联合用药对耐药型髓母细胞ONS76-W535L作用情况。
[0026] 图3为MK2206与CX4945联合用药对耐药型髓母细胞150428-W535L作用情况。
[0027] 图4为MK2206和CX4945联合抑制ONS76-W535L肿瘤细胞克隆形成情况。
[0028] 图5为MK2206和CX4945联合抑制Daoy-W535L肿瘤细胞克隆形成情况。
[0029] 图6为MK2206和CX4945联合抑制150428-W535L肿瘤细胞克隆形成情况。
[0030] 图7为MK2206和CX4945联合抑制SMO-W535L组细胞肿瘤细胞生长情况。
[0031] 图8为MK2206和CX4945联合抑制蛋白变化情况。
[0032] 图9为CO-IP检测AKT与CK2之间的蛋白相互作用情况。
[0033] 图10为CO-IP检测AKT与SMO之间的蛋白相互作用情况。
[0034] 图11为MK2206+CX4945联合用药及单独用药小鼠体内肿瘤情况。
[0035] 图12为MK2206+CX4945联合用药及单独用药小鼠体内荧光情况。
[0036] 图13为MK2206+CX4945联合用药及单独用药小鼠存活率情况。

具体实施方式

[0037] 所举实施例是为了更好地对本发明进行说明,但并不是本发明的内容仅局限于所举实施例。所以熟悉本领域的技术人员根据上述发明内容对实施方案进行非本质的改进和调整,仍属于本发明的保护范围。

[0038] 本发明实施例中,生物安全柜来自美国赛默飞(Thermo Scientific);细胞培养箱来自美国赛默飞(Thermo Scientific);Orbital Shaker TS-100摇床来自海门市其林贝尔仪器制造有限公司;高速离心机ST 8R来自美国赛默飞(Thermo Scientific);凝胶成像仪来自美国BIO-RAD公司;Mini-PROTEAN Tetran System来自美国BD公司;ChemiDoc MP imaging System来自美国BIO-RAD公司;DK-8D三孔电热恒温水槽来自上海齐欣科学仪器有限公司;IVIS活体动物成像仪来自美国Perkin-Elmer公司。

[0039] 本发明实施例中,使用到的材料包括:髓母细胞瘤细胞系ONS76-W535L,ONS76-WT, Daoy-W535L, Daoy-WT和原代髓母细胞瘤细胞150428-W535L和150428-WT. LDE225, SAG, Perifosine (AKT抑制剂), MK2206 AKT抑制剂), 化合物3K (PKM2抑制剂), CTZ (PFKP抑制剂), CX4945 (CK2抑制剂), flag M2抗体 (sigma monoclonal), AKT抗体 (CST, 2938), p-AKT抗体 (CST, 4060L), p-AKT抗体 (CST, 13038S), Actin抗体 (CST, 3700S), SUFU抗体 (CST, 2522S), PCTH 1抗体 (CST, 2468S), PCTH 2抗体 (CST, 2470P), LDHA抗体 (CST, 3582T), PDH抗体 (CST, 3205T) 等。

[0040] 实施例1 MK2206与CX4945联合筛选

[0041] 取第3-10代对数生长期的耐药型髓母细胞瘤ONS76-W535L, Daoy-W535L, 150428-W535L铺96孔板,每孔5000个细胞,第二天换成有含MK2206、CX4945或者MK2206加CX4945的培养基,每个浓度5个重复,6个浓度梯度,48小时后换成含10% CCK8的培养基,4小时后检

测OD值。

[0042] 结果:三种不同的耐药型髓母细胞瘤ONS76-W535L, Daoy-W535L和原代150428-W535L细胞MK2206与CX4945联合筛选获得的OD值,应用CompSyn软件分析结果如图1,2,3所示,发现不同耐药型髓母细胞瘤种MK2206与CX4945联合用药都具有协同作用,联合指数(CI)值小于1。

[0043] 实施例2克隆形成能力检测

[0044] 取第3-10代对数生长期的耐药型髓母细胞瘤细胞铺6孔板,每孔200个细胞,第二天换成含不同组分化合物的培养基,如含DMSO组, MK2206组, CX4945组, MK2206加CX4945组, 每组3个重复, 每隔一天更换新的培养基, 2周左右, 弃除培养基, 用冰浴PBS缓冲溶液洗三遍, 再用4%甲醛固定, 再用结晶紫染色。

[0045] 结果:体外克隆形成如图4、5、6及其统计显示,各种不同SMO-W535L组细胞系中MK2206和CX4945之间都具有良好的协同联合抑制肿瘤细胞克隆形成能力。

[0046] 实施例3化合物对耐药型髓母细胞瘤的生长曲线

[0047] (1)取生长状态良好第3-10代的髓母细胞瘤细胞,调整至 1×10^3 /mL浓度的细胞,培养于96孔细胞培养板中,200 μ L/孔,放置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂的培养箱中培养;

[0048] (2)第二天更换新的DMEM培养基,第二天换成含不同组分化合物的培养基,如含DMSO组, MK2206组, CX4945组, MK2206加CX4945组, 每组3个重复, 每隔一天更换新的培养基;

[0049] (3)放置于37 $^{\circ}$ C、5%的CO₂的培养箱中培养,每24小时检测一次CCK8,更换新的含10% CCK8培养基,在450nm波长检测OD值。连续检测九天。

[0050] 结果:如图7所示,各种不同SMO-W535L组细胞系中MK2206和CX4945之间都具有良好的协同联合抑制肿瘤细胞的生长。

[0051] 实施例4 Western Blot检测不同化合物处理组的蛋白变化

[0052] 取第3-10代对数生长期的耐药型的髓母细胞瘤细胞密度80%无血清培养基饥饿一晚后,更换无血清培养基根据不同的实验要求添加不同的化合物如,DMSO, MK2206 (AKT抑制剂), CX4945 (CK2抑制剂), 或者MK2206+CX4945等处理24小时后, PBS缓冲溶液洗3遍后, 收集细胞。裂解细胞和Western Blot等过程同前面实验步骤。

[0053] 结果:MK2206+CX4945联合效果如图8所示。除了有效抑制Hedgehog通路中的SMO表达外,也可以有效SUFU和PCTH1, PTCH2的表达。另外还可以有效抑制糖酵解通路中的PDK1和LDHA蛋白的表达。

[0054] 实施例5 CO-IP检测AKT与CK2, AKT与SMO之间的蛋白相互作用

[0055] 第3-10代对数生长期的耐药型的髓母细胞瘤细胞密度80%的细胞,各转染AKT-HA, CK2a-MYC和AKT-HA+CK2a-MYC(各4皿), 24小时后用冰浴的PBS缓冲溶液洗3遍后, 收集细胞。立刻用IP裂解液(同前面)裂解细胞,进行CO-IP实验,大概实验步骤与前面的IP实验过程相同,就是开始时分组时转染了三组质粒,需要分成六组IP实验。转染AKT-WT-HA的细胞要分成Flag (SMO)组与HA (AKT)组;转染CK2a-MYC的细胞需要分成Flag (SMO)组与MYC (CK2a)组;转染AKT-HA+CK2a-MYC的细胞要分成HA (AKT)组与MYC (CK2a)组。再利用对应的标签蛋白进行IP实验。

[0056] 结果:CO-IP的结果如图9、10所示, AKT与CK2, AKT与SMO两两蛋白之间可以互相把对方拉下来。结果表明AKT与CK2, AKT与SMO之间蛋白相互作用,信号通路为SMO/AKT/CK2。

[0057] 实施例6小鼠动物体内联合治疗实验

[0058] 取第3-10代对数生长期的耐药型的髓母细胞瘤细胞的细胞,接种于5周的NOD/SCID小鼠小脑部位,每只小鼠接种 10^4 个细胞,第5天随机分四组,即DMSO对照组,MK2206组,CX4945组和MK2206+CX4945组,每组10只小鼠,每隔一天给一次药,每周给药3次。第16天、23天、30天和37天用IVIS活体动物成像仪进行成像。

[0059] 结果:动物体内联合治疗实验结果如图11、12、13所示,MK2206+CX4945联合治疗组的小鼠疗效最好,生存的时间最长,DMSO对照组的生存时间最短,单独用药的MK2206组或CX4945组次之,单独用药的MK2206组或CX4945组之间没有显著差异。图12中,不同分组小鼠第16天、第23天、第30天、第37天时的荧光强度 (photon flux) 如下表1-表4所示。

[0060] 表1 Ctrl组小鼠第16天、第23天、第30天、第37天时的荧光强度

时间	Ctrl				
	16天	23天	30天	37天	40天
16天	0.713×10^6	0.784×10^6	0.911×10^6	1.060×10^6	1.55×10^6
23天	1.830×10^6	10.80×10^6	11.10×10^6	29.50×10^6	40.20×10^6
30天	34.10×10^6	48.00×10^6	53.80×10^6	54.80×10^6	149.00×10^6
37天	161.00×10^6	209.00×10^6	226.00×10^6	439.00×10^6	463.00×10^6

[0062] 表2 MK2206组小鼠第16天、第23天、第30天、第37天时的荧光强度

时间	MK2206				
	16天	23天	30天	37天	40天
16天	0.732×10^6	0.827×10^6	0.978×10^6	1.11×10^6	1.35×10^6
23天	1.11×10^6	1.99×10^6	2.09×10^6	3.41×10^6	5.54×10^6
30天	2.11×10^6	4.54×10^6	7.97×10^6	28.80×10^6	31.30×10^6
37天	5.52×10^6	20.00×10^6	57.40×10^6	57.90×10^6	177.00×10^6

[0064] 表3 CX4945组小鼠第16天、第23天、第30天、第37天时的荧光强度

时间	CX4945				
	16天	23天	30天	37天	40天
16天	1.050×10^6	1.22×10^6	1.58×10^6	1.624×10^6	1.67×10^6
23天	1.44×10^6	1.71×10^6	1.58×10^6	5.89×10^6	8.35×10^6
30天	3.53×10^6	8.30×10^6	11.70×10^6	30.40×10^6	34.60×10^6
37天	22.80×10^6	60.50×10^6	77.20×10^6	151.00×10^6	176.00×10^6

[0066] 表4 MK2206+CX4945组小鼠第16天、第23天、第30天、第37天时的荧光强度

时间	荧光强度	MK2206+ CX4945				
		分组	分组	分组	分组	分组
16天		0.736×10^6	0.755×10^6	0.860×10^6	1.53×10^6	1.72×10^6
23天		0.742×10^6	0.766×10^6	0.956×10^6	1.50×10^6	2.17×10^6
30天		1.24×10^6	1.24×10^6	1.34×10^6	7.83×10^6	10.10×10^6
37天		1.62×10^6	2.64×10^6	14.10×10^6	26.70×10^6	36.80×10^6

[0067] [0068] 最后说明的是,以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非限制,尽管参照较佳实施例对本发明进行了详细说明,本领域的普通技术人员应当理解,可以对本发明的技术方案进行修改或者等同替换,而不脱离本发明技术方案的宗旨和范围,其均应涵盖在本发明的权利要求范围当中。

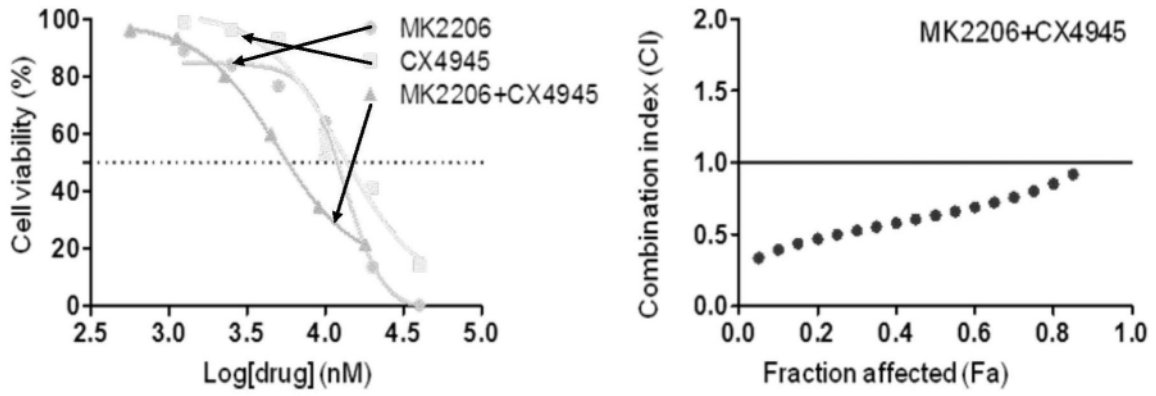


图1

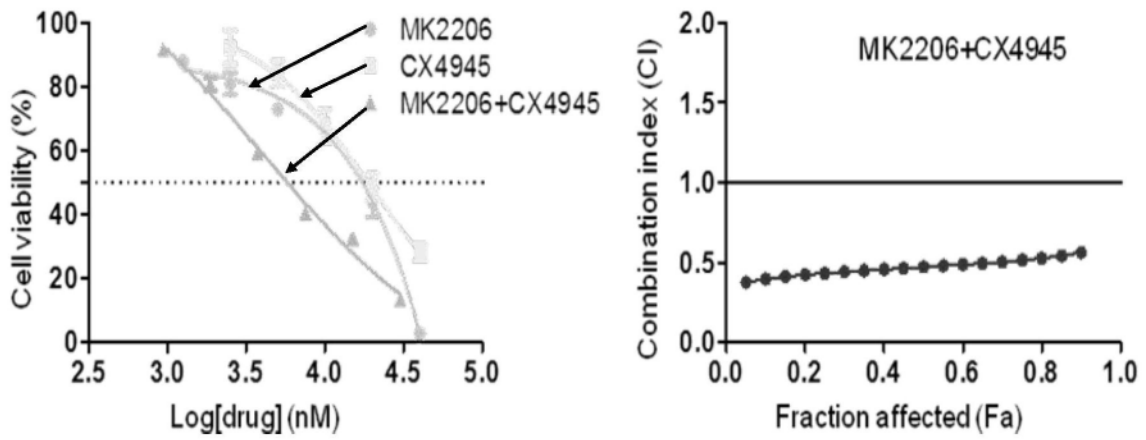


图2

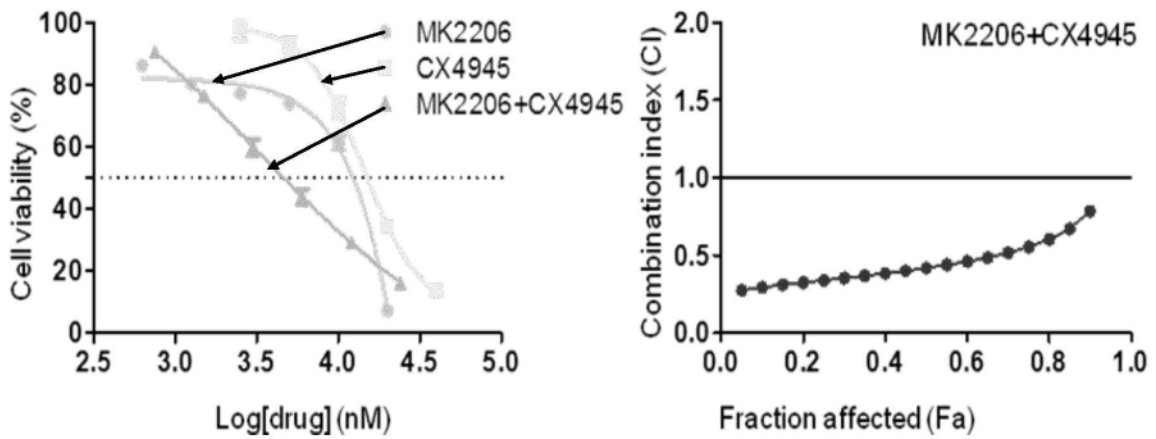


图3

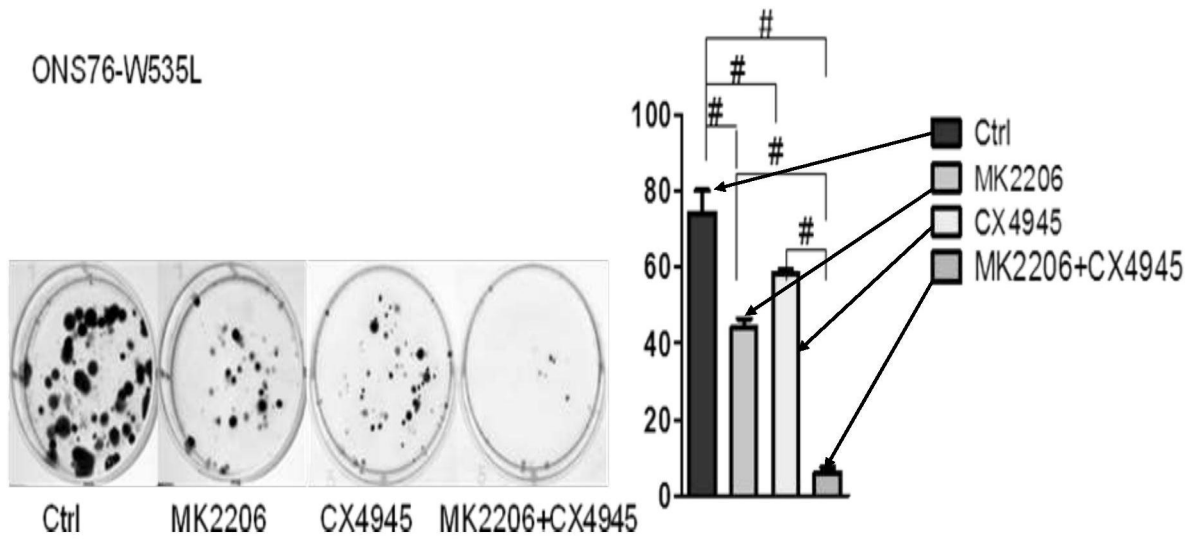


图4

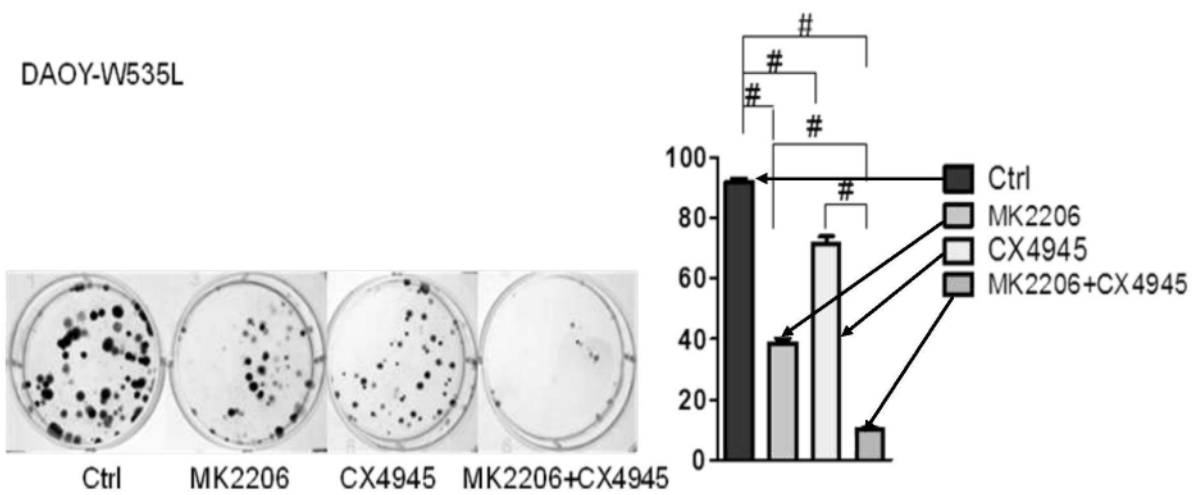


图5

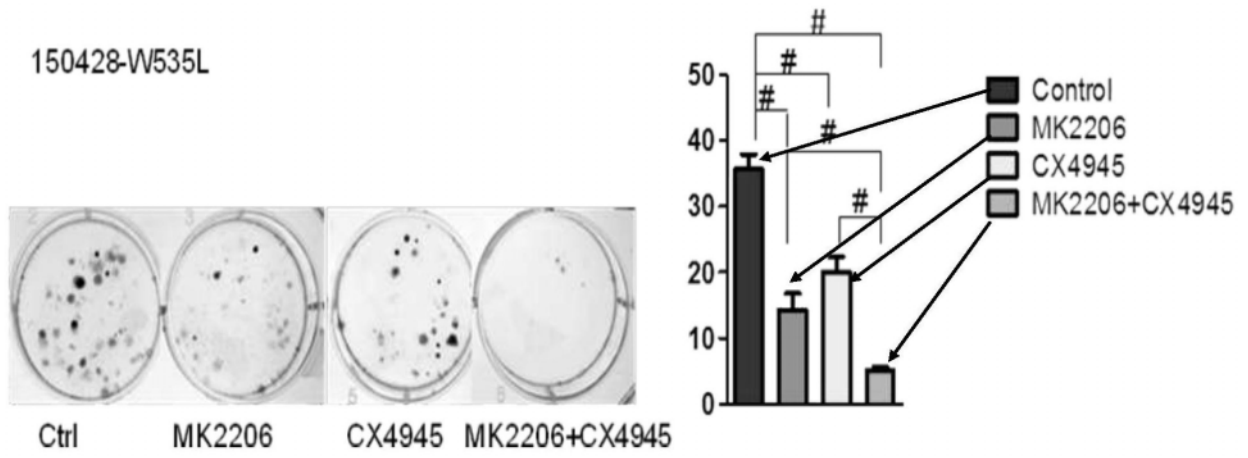


图6

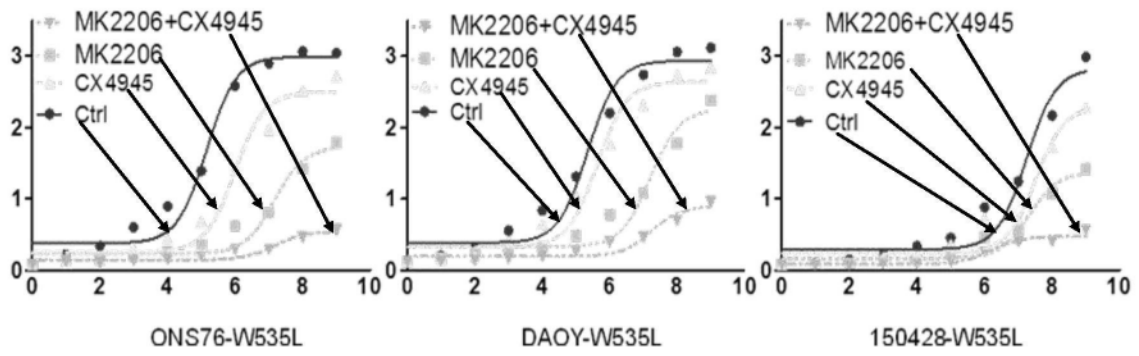


图7

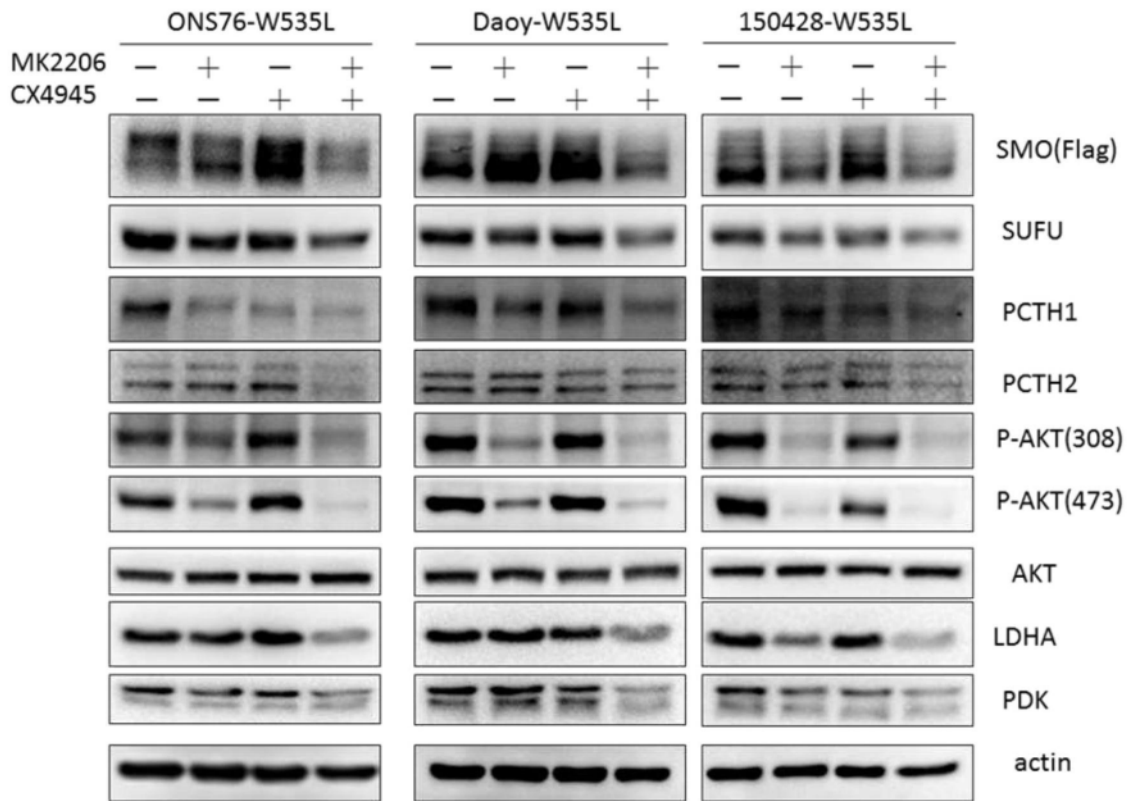


图8

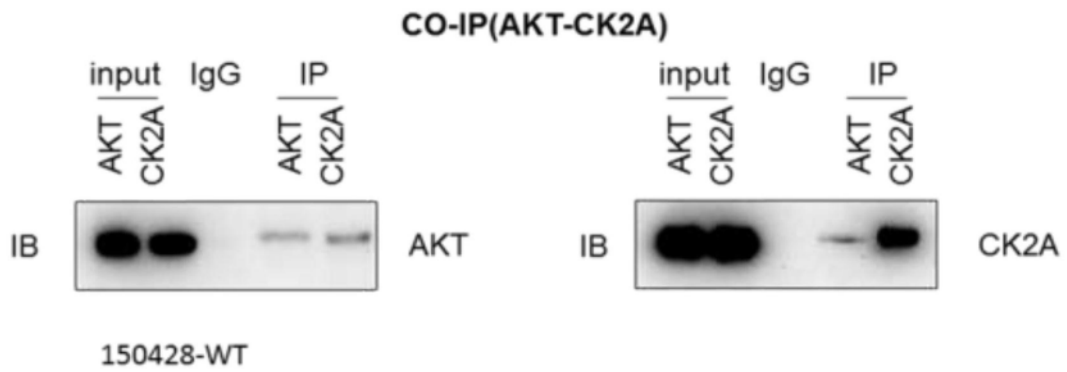


图9

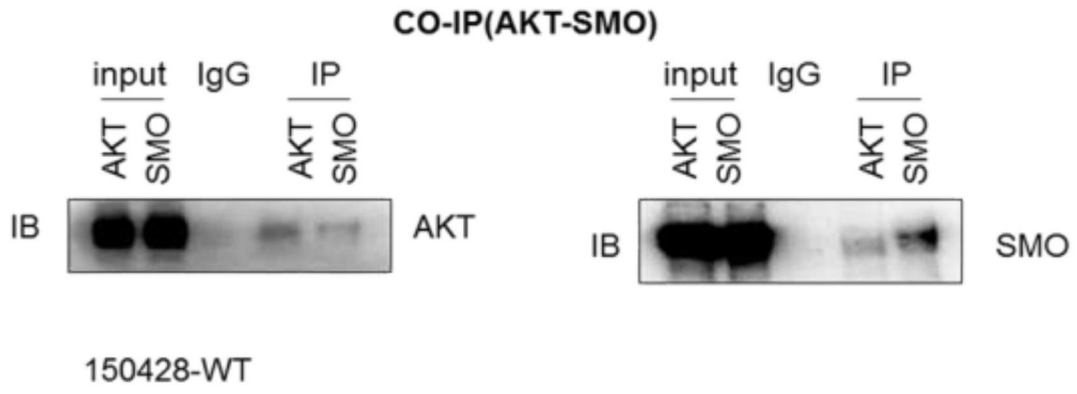


图10

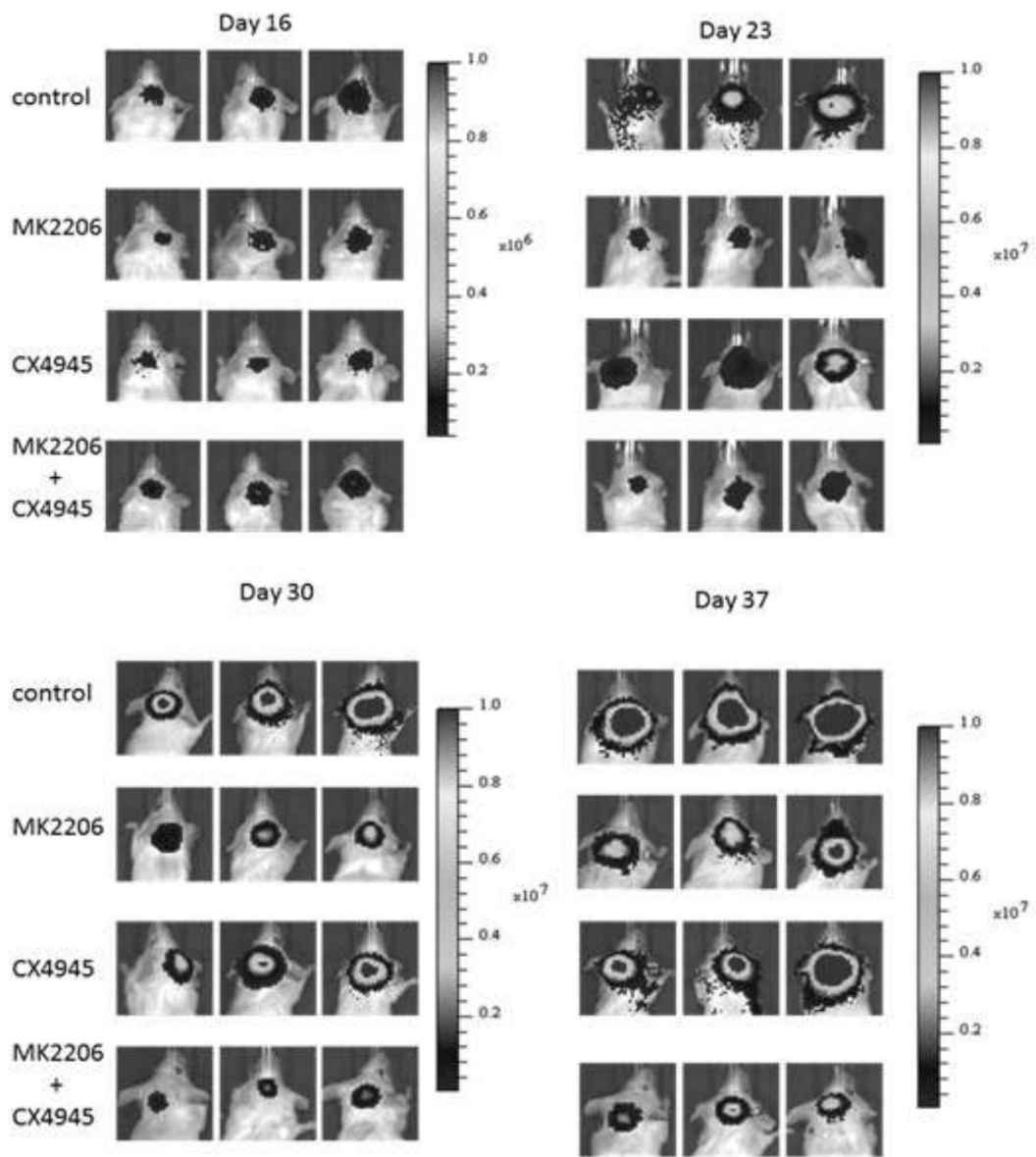


图11

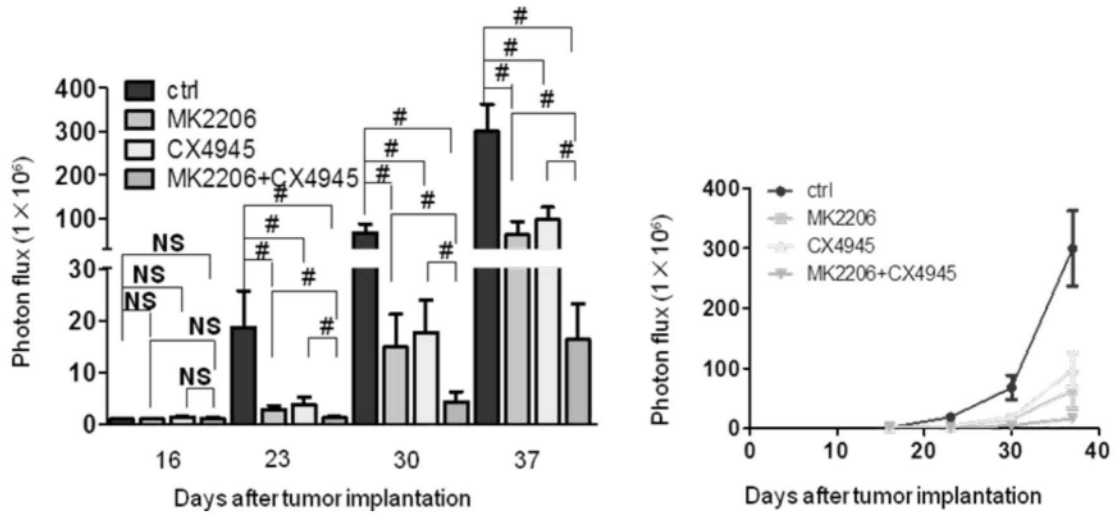


图12

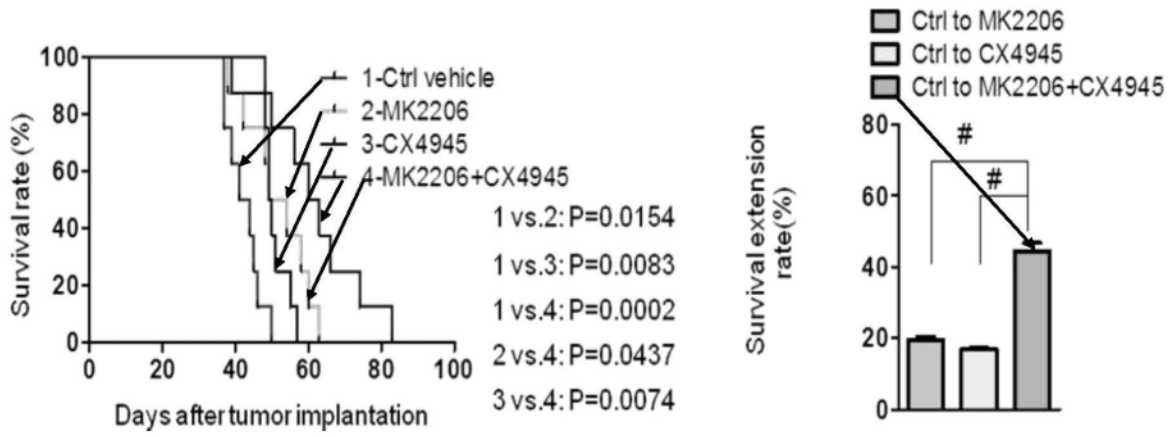


图13