

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810062998.2

[51] Int. Cl.

A61K 38/05 (2006.01)

A61K 31/203 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

[43] 公开日 2009 年 1 月 7 日

[11] 公开号 CN 101337065A

[22] 申请日 2008.7.11

[21] 申请号 200810062998.2

[71] 申请人 浙江大学

地址 310027 浙江省杭州市西湖区浙大路 38 号

[72] 发明人 何俏军 杨波 方艳芬 应美丹
罗沛华 朱迪峰

[74] 专利代理机构 杭州求是专利事务所有限公司
代理人 张法高 赵杭丽

权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 2 页

[54] 发明名称

MG132 在制备协同诱导分化治疗白血病药物中的应用

[57] 摘要

本发明提供化合物 MG132 在制备协同促进维甲酸类药物诱导分化治疗白血病的药物中的应用, 所述化合物 MG132 的分子式为 $C_{26}H_{41}N_3O_5$, 化合物 MG132 的浓度为 $1 \times 10^{-8} - 1 \times 10^{-6} M$, 维甲酸的浓度为 $1 \times 10^{-9} - 1 \times 10^{-5} M$ 。化合物 MG132 单独作用不能诱导白血病细胞分化, 但它可以促进维甲酸类药物对白血病细胞的诱导分化作用, 表现为促进维甲酸类药物对白血病细胞的增殖抑制作用, 细胞周期阻滞作用及促进白血病细胞表面分化特异性抗原 CD11b 的表达及增加分叶核的细胞数目。本发明为化合物 MG132 开辟了新的药物应用领域。

1. 化合物 MG132 在制备促进维甲酸诱导分化治疗白血病的药物中的应用, 所述化合物 MG132 的分子式为 $C_{26}H_{41}N_3O_5$, 所述应用中化合物 MG132 的浓度为 1×10^{-8} - 1×10^{-6} M, 维甲酸的浓度为 1×10^{-9} - 1×10^{-5} M。

2. 根据权利要求 1 所述的应用, 其特征是: 所述应用中化合物 MG132 的浓度为 0.2×10^{-6} M, 维甲酸的浓度为 1×10^{-6} M。

3. 根据权利要求 1 所述的应用, 其特征是: 所述化合物 MG132 制备的药物与维甲酸类药物一起应用。

MG132 在制备协同诱导分化治疗白血病药物中的应用

技术领域

本发明属化合物的药物应用，涉及化合物 MG132 与维甲酸类药物在制备联合治疗白血病药物中的应用，尤其是涉及化合物 MG132 在制备协同促进维甲酸类药物诱导分化治疗白血病的药物中的应用。

背景技术

自二十世纪七十年代 Sachs 首先提出分化治疗（differentiation therapy）概念以来，细胞分化异常在恶性肿瘤的发病学和治疗学上的意义日益引起人们的广泛兴趣，并成为当今肿瘤学研究的热点之一。肿瘤细胞不论在形态、功能、代谢、行为诸方面都类似未分化的胚胎细胞，因此利用化学药物诱导肿瘤细胞分化并逆转其增殖、浸润、转移等恶性表型，使其成为正常或接近正常的细胞，从而达到治疗肿瘤的目的成为新的治疗手段。

维甲酸类化合物是被研究和临床应用最为广泛的分化诱导剂，其中全反式维甲酸（all-trans retinoid acid, ATRA）是第一个成功应用于白血病治疗的诱导分化药物，能够特异性诱导急性早幼粒细胞性白血病（APL）细胞分化成熟。1988 年，上海瑞金医院率先应用 ATRA 治疗 24 例 APL，23 例取得完全缓解（CR）。随后进行的一系列大样本随机对照临床研究进一步验证了 ATRA 治疗 APL 的有效性，明显降低了化疗引发的出血相关死亡率，提高了 APL 的 CR 率。维甲酸对 APL 细胞的诱导分化作用，使大多数患者临床上得到缓解，但随着病人生存期的延长，维甲酸使用过程中仍有一些问题尚待研究解决，如治疗中维甲酸毒副作用，特别是高白细胞综合征及维甲酸综合征；缓解后单用维甲酸往往数月内复发；治疗过程中细胞内维甲酸结合蛋白（CRABP）高表达及细胞色素 P450 酶促分解代谢使维甲酸治疗失效等。因此，寻找高效、低毒的新型化合物，有效促进维甲酸的诱导分化作用，降低维甲酸起效浓度，改善白血病患者的预后及解决相关耐药问题是一个亟待解决的问题。

化合物 MG132，是一种有效、可逆的醛基肽类特异性蛋白酶体抑制剂，分子式为 $C_{26}H_{41}N_3O_5$ ，能进入细胞中可逆性地抑制蛋白酶体的活性，从而抑制泛素-蛋白酶体通路所介导的蛋白质的降解，进而影响细胞周期进程和诱导细

胞凋亡。目前,许多文献报道 MG132 能够诱导多种肿瘤细胞发生凋亡,是一种潜在的抗肿瘤药物,但关于 MG132 能否促进维甲酸类药物对白血病细胞的诱导分化作用,从而改善白血病患者的预后及解决相关耐药问题等尚未见报道。

发明内容

本发明的目的是提供化合物 MG132 在制备协同促进维甲酸类药物诱导分化治疗白血病的药物中的应用,所述化合物 MG132 的分子式为 $C_{26}H_{41}N_3O_5$, 化合物 MG132 的浓度为 1×10^{-8} - 1×10^{-6} M, 维甲酸的浓度为 1×10^{-9} - 1×10^{-5} M。

化合物 MG132 最优选的浓度为 0.2×10^{-6} M, 维甲酸最优选的浓度为 1×10^{-6} M。

所述化合物 MG132 制备的药物与维甲酸类药物一起应用。

化合物 MG132 单独作用不能诱导白血病细胞分化,但它可以促进维甲酸类药物对白血病细胞的诱导分化作用,表现为促进维甲酸类药物对白血病细胞的增殖抑制作用,细胞周期阻滞作用及促进白血病细胞表面分化特异性抗原 CD11b 的表达及增加分叶核的细胞数目。

化合物 MG132 在制备协同促进维甲酸在诱导分化治疗白血病的药物中的应用机制在于:化合物 MG132 通过抑制蛋白酶体活性,使维甲酸作用过程中被泛素-蛋白酶体系统降解的维甲酸受体 RAR α 降解减少,从而提高白血病细胞对维甲酸的敏感性。

本发明通过化合物 MG132 与维甲酸联合应用达到制备协同促进维甲酸诱导分化治疗白血病的药物的目的。化合物 MG132 单独使用对白血病细胞无诱导分化作用,但可明显促进维甲酸诱导的细胞分化,而且可明显减少维甲酸的用量和作用时间,进而缩短获得 CR 时间。化合物 MG132 能够明显促进维甲酸对白血病细胞增殖抑制作用,周期阻滞作用,促进白血病细胞分化表面特异性抗原 CD11b 表达,细胞核质比减小,分叶型核较维甲酸单用组明显增多。化合物 MG132 促进维甲酸诱导白血病细胞分化的作用具有明显的浓度和时间依赖性。上述作用均有助于减轻维甲酸的毒副作用及降低维甲酸使用过程中耐药问题的发生。总之,化合物 MG132 对维甲酸诱导白血病细胞分化能力的增强作用为该药物开辟了新的应用领域,同时为进一步提高白血病患者的疗效,改善耐药及相关预后情况提供了可能性。

附图说明

图 1 是 HL60 细胞在不同浓度的 MG132 与维甲酸处理下的生长曲线。

图 2 是 MG132 分别与不同浓度的维甲酸合用对 HL60 细胞的生长抑制情

况。

图 3 是 MG132 与维甲酸合用对 HL60 细胞周期的影响。

图 4 是 MG132 与维甲酸合用对 HL60 细胞表面分化抗原 CD11b 表达的影响。

图 5 是 MG132 与维甲酸合用对 HL60 细胞内维甲酸受体 RAR α 蛋白表达的影响。

具体实施方式

本发明结合附图和具体实施例作进一步的说明。

实施例 1:

用不同浓度的 MG132 (1×10^{-8} - 1×10^{-6} M)分别与维甲酸 (1×10^{-6} M)合用处理 HL60 细胞株, 分别在处理后 24、48、72、96、120 小时通过胎盼蓝拒染法计数活细胞数并绘制 HL60 细胞的生长曲线, 发现低浓度的 MG132 (1×10^{-8} - 1×10^{-7} M)单用对 HL60 细胞生长无明显抑制作用, 但能明显促进维甲酸对 HL60 细胞的生长抑制作用, 并呈时间-剂量依赖性, 结果参见图 1。

实施例 2:

将 MG132 (1×10^{-7} M)分别与维甲酸 (1×10^{-9} - 1×10^{-5} M)合用处理 HL60 细胞株, 120 小时后通过胎盼蓝拒染法计数活细胞数, 发现 MG132 能促进不同浓度维甲酸(1×10^{-9} - 1×10^{-5} M)对 HL60 细胞的生长抑制作用, 结果参见图 2。

实施例 3:

采用不同浓度的 MG132 (1×10^{-8} - 1×10^{-6} M)分别与维甲酸 (1×10^{-6} M)合用处理 HL60 细胞株, 在处理后 72 小时收集细胞, 检测细胞周期变化。细胞用冰预冷的 70 %乙醇固定过夜, 上机前离心弃去固定液, 用 PBS 重悬细胞, 加入碘化丙啶(PI)染液 500 μ l (含 50 μ g/ml PI, 100 μ g/ml RNase A), 室温避光染色 30 min。用流式细胞仪测定 DNA 含量, 用 ModFIT 软件计算细胞周期百分比。结果发现, MG132 可明显促进维甲酸诱导的细胞 G0/G1 期阻滞, 且具有明显的剂量依赖性, 而 MG132 对细胞周期没有明显影响。结果参见图 3。

实施例 4:

用不同浓度的 MG132 (1×10^{-8} - 1×10^{-6} M)分别与维甲酸 (1×10^{-6} M)合用

处理 HL60 细胞株，在处理后 72 小时收集细胞，检测细胞表面分化特异性抗原 CD11b 的表达。细胞用冰 PBS 漂洗 2 次后用 3%BSA 在室温下封闭 45 min，然后用 CD11b-PE 标记的单克隆抗体避光孵育 30 min，经 PBS 洗涤后用流式细胞仪进行检测，并用 CellQuest Pro 软件分析。结果发现，化合物 MG132 可明显促进维甲酸诱导的分化表面特异性抗原 CD11b 表达增加，分化的细胞随 MG132 浓度的增大、处理时间的延长而增多，而 MG132 单用无明显的诱导分化作用。结果参见图 4。

实施例 5:

用不同浓度的化合物 MG132 (1×10^{-8} - 1×10^{-6} M) 分别与维甲酸 (1×10^{-6} M) 合用处理 HL60 细胞株，分别在处理后 120 小时收集细胞，用瑞氏-吉木萨染色法观察细胞核形态变化。维甲酸作用后，细胞核质比明显减小，并出现明显的分叶型核，而化合物 MG132 与维甲酸合用组具有分叶型核的细胞数目明显增多。

实施例 6:

将 MG132 (1×10^{-7} M) 与维甲酸 (1×10^{-6} M) 合用处理 HL60 细胞株，在处理后 72 小时收集细胞，并用细胞裂解液裂解细胞抽取蛋白质，然后用 RAR α 抗体(购自美国 Santa Cruz 公司)进行 Western blot 免疫印迹。结果发现，MG132 能部分抑制维甲酸诱导的维甲酸受体 RAR α 降解，从而增加 HL60 细胞对维甲酸的敏感性。结果参见图 5。

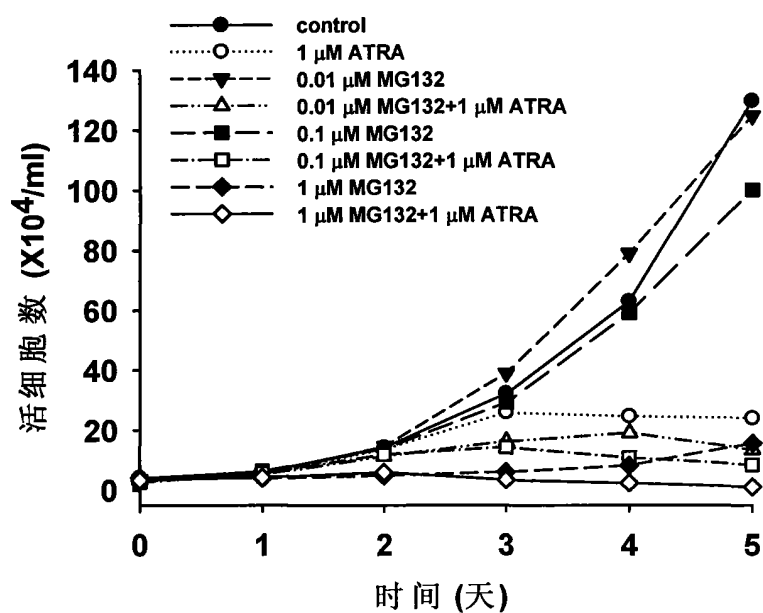


图 1

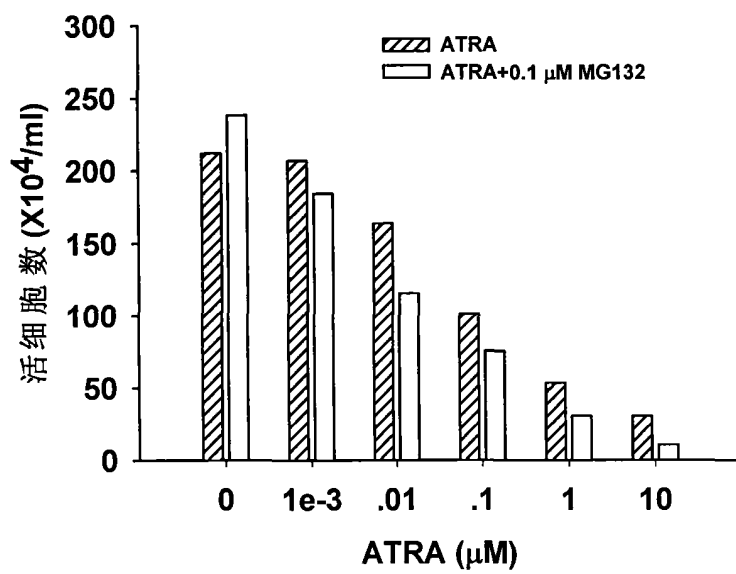


图 2

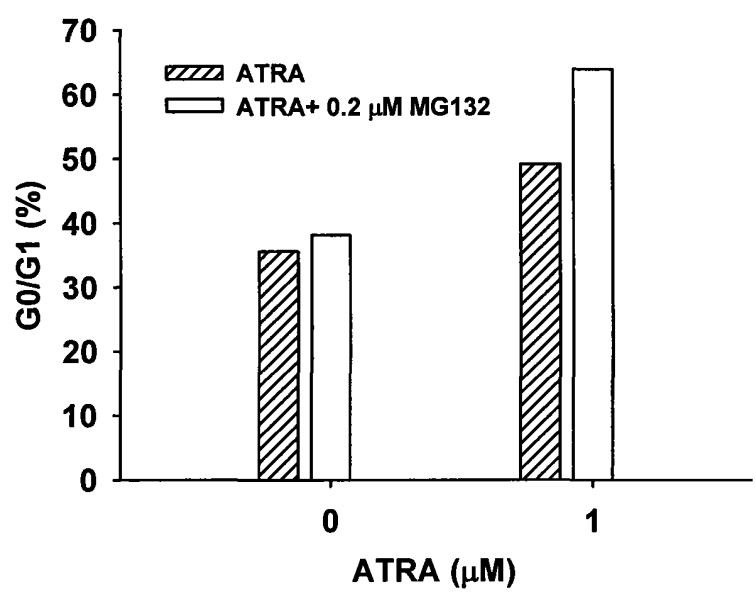


图 3

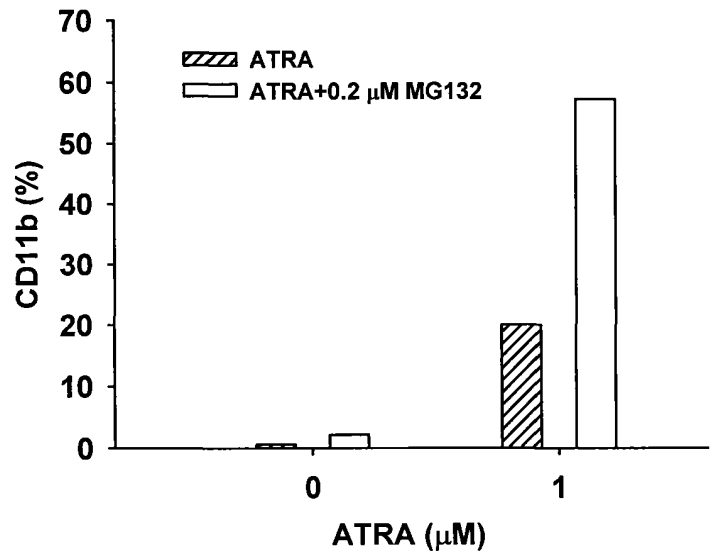


图 4



图 5