(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118178608 A
(43)申请公布日 2024.06.14

(21)申请号 202410321448.7

(22)申请日 2024.03.20

(71)申请人 深圳市龙岗区人民医院
地址 518172 广东省深圳市龙岗区中心城爱心路53号

(72)发明人 田发青 王金星

(74)专利代理机构 广州骏思知识产权代理有限公司 44425
专利代理师 吴静芝

(51)Int.Cl.
A61K 38/14(2006.01)
A61K 38/05(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)

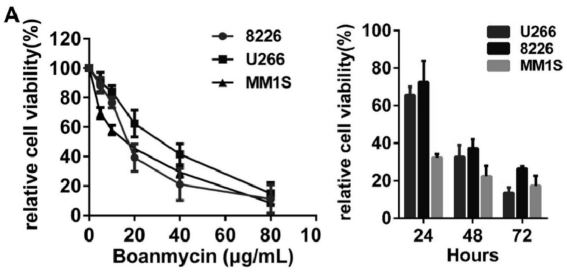
权利要求书1页 说明书8页 附图10页

(54)发明名称

博安霉素在制备治疗多发性骨髓瘤药物中的应用

(57)摘要

本发明公开了博安霉素在制备治疗多发性骨髓瘤的药物中的应用,属于医学和制药领域。本发明首次将博安霉素用于治疗多发性骨髓瘤,并在细胞实验和动物实验中取得了良好的效果,药物毒性小,具有良好的临床应用前景;本发明首次发现博安霉素单药对硼替佐米耐药的多发性骨髓瘤具有较好的抑制效果,并且博安霉素可与硼替佐米联用,从而降低硼替佐米的用量,进而显著降低患者的治疗费用,未来有望用于多发性骨髓瘤患者尤其是替佐米耐药的多发性骨髓瘤患者的临床治疗。



CN 118178608 A

1.博安霉素在制备治疗多发性骨髓瘤的药物中的应用。

2.根据权利要求1所述应用,其特征在于,所述多发性骨髓瘤是指普通的多发性骨髓瘤或对硼替佐米产生耐药性的多发性骨髓瘤。

3.根据权利要求1所述应用,其特征在于,所述治疗多发性骨髓瘤的药物包括抑制多发性骨髓瘤细胞增殖的药物、诱导多发性骨髓瘤细胞凋亡的药物、抑制多发性骨髓瘤瘤体积生长或瘤体重量生长的药物。

4.博安霉素与硼替佐米在制备治疗多发性骨髓瘤的联合用药物中的应用。

5.一种治疗多发性骨髓瘤的药物组合物,其特征在于,活性成分包括博安霉素。

6.根据权利要求5所述药物组合物,其特征在于,所述多发性骨髓瘤是指普通的多发性骨髓瘤或对硼替佐米产生耐药性的多发性骨髓瘤。

7.根据权利要求5所述药物组合物,其特征在于,所述活性成分还包括硼替佐米,所述博安霉素与硼替佐米的摩尔比为1000:0.1~1。

8.根据权利要求5~7任一所述药物组合物,其特征在于,所述药物组合物包括药学上可接受的辅料。

9.根据权利要求8所述药物组合物,其特征在于,所述药物为口服或非肠胃给药剂型。

10.如权利要求9所述药物组合物,其特征在于,非肠胃给药剂型为经鼻、静脉、皮内注射、皮下注射或者局部给药剂型。

博安霉素在制备治疗多发性骨髓瘤药物中的应用

技术领域

[0001] 本发明属于医学和制药领域,具体涉及博安霉素在制备治疗多发性骨髓瘤药物中的应用。

背景技术

[0002] 多发性骨髓瘤(Multiple Myeloma,MM)是一种常见的血液恶性肿瘤,其特点是浆细胞异常增殖,在发达国家为第二常见的血液肿瘤。多发性骨髓瘤在老年人中高发,中位年龄约为70岁,随着我国人口老龄化,其发病率呈逐年上升趋势。多发性骨髓瘤患者常常经历贫血、肾损伤、感染、高钙血症和骨病等症状。尽管治疗取得了显著的进步,患者生存期也明显延长,但多发性骨髓瘤仍然是不可治愈的疾病。目前多发性骨髓瘤的化疗药物中,蛋白酶体抑制剂硼替佐米(Bortezomib)是1线治疗药物,与免疫调节药物如依那利胺和泊马度胺、糖皮质激素如地塞米松,以及与达雷妥尤单抗等联合治疗时,对多发性骨髓瘤显示明显的治疗效果,硼替佐米对多发性骨髓瘤的作用机制包括抑制酶体蛋白质酶活性,阻止酶体对非必要的蛋白质的降解,从而使蛋白质累积于细胞内,并导致癌变细胞死亡、增加其他类型的细胞死亡和减缓癌细胞生长。然而,硼替佐米的有效性有限,且几乎所有患者最终都会产生硼替佐米耐药并复发。因此,寻找更为有效的治疗药物,尤其是克服硼替佐米耐药的治疗药物具有巨大的临床治疗价值。

[0003] 博安霉素(Boanmycin)是一种新型抗肿瘤抗生素,临床上主要用于治疗头颈鳞状细胞癌,且前临床实验显示,博安霉素对多种癌症类型,包括食管癌、肝细胞癌、结直肠癌和结肠癌等具有疗效。一期临床研究表明,与博来霉素和平阳霉素相比,博安霉素对骨髓抑制的影响较小,肺毒性显著降低。二期临床研究对325名中度和恶性癌症患者进行了盐酸博安霉素治疗,结果显示在恶性淋巴瘤、头颈癌、乳腺癌和食管癌的治疗中均具有疗效,对骨髓、肝脏或肾脏功能的损害较小,临床应用前景很好。并且博安霉素与单克隆抗体的联合应用在体内和体外均能提高治疗效果。博安霉素抑制上述癌症的作用机理包括与DNA发生特异性结合,引起DNA链断裂干扰肿瘤细胞的分裂与增殖,此外,博安霉素作为细胞周期非特异药物,其对G2和M期作用最强,在Q期细胞内堆积,引起许多细胞染色体畸变;另对S-G2期边界及G2期有延缓作用。但目前关于博安霉素在血液肿瘤中的研究极少,并且博安霉素在硼替佐米耐药的多发性骨髓瘤中的疗效尚未见报道。

发明内容

[0004] 基于现有技术的不足,本发明提供一种治疗多发性骨髓瘤尤其是硼替佐米耐药的多发性骨髓瘤的药物,为多发性骨髓瘤的防治提供一种新的药物选择。

[0005] 本发明上述目的通过以下技术方案实现:

[0006] 博安霉素在制备治疗多发性骨髓瘤的药物中的应用。

[0007] 本发明首次将博安霉素用于治疗多发性骨髓瘤,并在细胞实验和动物实验中取得了良好的效果,药物毒性小,具有良好的临床应用前景;本发明首次发现博安霉素单药对硼

替佐米耐药的多发性骨髓瘤具有较好的抑制效果,并且博安霉素可与硼替佐米联用,从而降低硼替佐米的用量,进而显著降低患者的治疗费用,未来有望用于多发性骨髓瘤患者尤其是替佐米耐药的多发性骨髓瘤患者的临床治疗。

[0008] 进一步,所述多发性骨髓瘤是指普通的多发性骨髓瘤或对硼替佐米产生耐药性的多发性骨髓瘤。

[0009] 进一步,所述治疗多发性骨髓瘤的药物包括抑制多发性骨髓瘤细胞增殖的药物、诱导多发性骨髓瘤细胞凋亡的药物、抑制多发性骨髓瘤瘤体积生长或瘤体重量生长的药物。

[0010] 进一步,本发明还提供博安霉素与硼替佐米在制备治疗多发性骨髓瘤的联合用药物中的应用。

[0011] 进一步,本发明提供一种治疗多发性骨髓瘤的药物组合物,其活性成分包括博安霉素。

[0012] 进一步,所述多发性骨髓瘤是指普通的多发性骨髓瘤或对硼替佐米产生耐药性的多发性骨髓瘤。

[0013] 进一步,所述活性成分还包括硼替佐米,所述博安霉素与硼替佐米的摩尔比为1000:0.1~1。

[0014] 进一步,所述药物组合物包括药学上可接受的辅料。

[0015] 进一步,所述药物为口服或非肠胃给药剂型。

[0016] 进一步,非肠胃给药剂型为经鼻、静脉、皮内注射、皮下注射或者局部给药剂型。

附图说明

[0017] 图1A为实施例1中不同浓度和处理时间的博安霉素对RPMI 8226、U266和MM1S细胞的相对细胞活力的影响。

[0018] 图1B为博安霉素对RPMI 8226细胞和U266细胞的Wright-Giemsa染色结果。

[0019] 图1C为博安霉素对RPMI 8226细胞和U266细胞集落形成的影响。

[0020] 图1D为博安霉素对U266细胞和MM1S细胞的细胞凋亡水平的影响。

[0021] 图1E为博安霉素处理对U266细胞和MM1S细胞内PARP、剪切形式的PARP、caspase 3、caspase 7和caspase 9的蛋白水平的影响,其中α-tubulin蛋白为对照。

[0022] 图2A为实施例2中不同浓度的硼替佐米和博安霉素共处理对U266细胞和MM1S细胞的相对细胞活力的影响。

[0023] 图2B为硼替佐米和博安霉素共处理对U266细胞和MM1S细胞内PARP、剪切形式的PARP、caspase 3、caspase 7和caspase 9的蛋白水平的影响。

[0024] 图2C为硼替佐米和博安霉素对U266细胞和MM1S细胞的细胞凋亡水平的影响。

[0025] 图3A为实施例3中8226和U266耐药株对硼替佐米的耐药性的CCK-8检测结果。

[0026] 图3B为博安霉素对硼替佐米耐药细胞的CFSE染色效果。

[0027] 图3C和图3D为博安霉素对硼替佐米耐药细胞集落形成的影响。

[0028] 图3E为博安霉素对硼替佐米耐药细胞内PARP、剪切形式的PARP、caspase 3、caspase 7和caspase 9等蛋白水平的影响。

[0029] 图3F为硼替佐米对硼替佐米耐药细胞的细胞凋亡水平的影响。

[0030] 图4A为实施例4中博安霉素对多发性骨髓瘤细胞的内质网通路的GSEA分析结果。

[0031] 图4B为博安霉素和硼替佐米处理对CHOP基因的相对表达水平的影响。

[0032] 图4C为博安霉素处理的RPMI 8226和MM1S细胞的透射电子显微镜(TEM)观察结果。

[0033] 图4D为博安霉素对多发性骨髓瘤细胞的钙离子信号通路的GSEA分析结果。

[0034] 图4E为博安霉素对使多发性骨髓瘤细胞钙离子水平的影响。

[0035] 图5A为不同处理的MM1S异种移植模型的NOD-SCID小鼠身上分离出的肿瘤。

[0036] 图5B为博安霉素对MM1S异种移植模型小鼠的肿瘤重量的影响。

[0037] 图5C为博安霉素对MM1S异种移植模型小鼠的肿瘤体积的影响。

[0038] 图5D为博安霉素对MM1S异种移植模型小鼠的体重的影响。

[0039] 图5E为不同处理的MM1S异种移植模型的小鼠的肿瘤的苏木精和伊红(H&E)染色结果以及Ki-67免疫组织化学染色结果,其中n＝5,*p<0.05,**p<0.01vs.Vehicle。

[0040] 图6A为不同处理的MM1S异种移植模型的小鼠的肝脏组织的H&E染色结果。

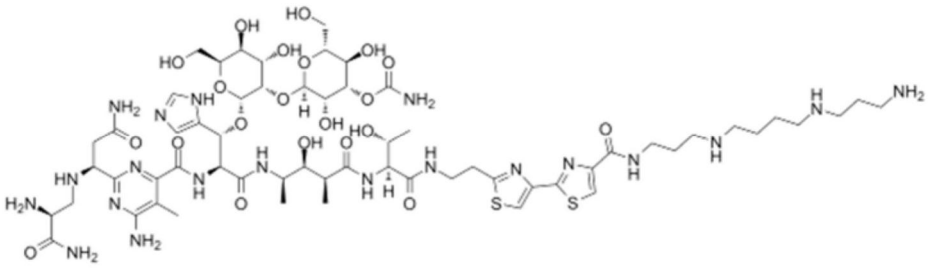
[0041] 图6B为不同处理的MM1S异种移植模型的小鼠的脾脏组织的H&E染色结果。

[0042] 图6C为不同处理的MM1S异种移植模型的小鼠的肺组织的H&E染色结果。

具体实施方式

[0043] 鉴于博安霉素具有抑制蛋白质合成的作用,它可能对多发性骨髓瘤的治疗带来益处。本发明进行了以下研究,旨在探索博安霉素对硼替佐米敏感和耐药的多发性骨髓瘤细胞的作用,以提供一个克服硼替佐米的新疗法。

[0044] 本发明的博安霉素的结构式如下:

[0045] 

[0046] 本发明的博安霉素可单独使用或以药物组合物的形式使用。药物组合物包括作为活性成分的本发明的博安霉素及可药用载体。较佳地,本发明的药物组合物含有0.1-99.9%重量百分比的作为活性成分的博安霉素。“可药用载体”不会破坏博安霉素的药学活性,同时其有效用量,即能发挥药物载体作用时的用量对人体无毒。另外,药物组合物的活性成分还包括硼替佐米。

[0047] 所述可药用载体包括但不限于:软磷脂、硬脂酸铝、氧化铝、离子交换材料、自乳化药物传递系统、吐温或其他表面活化剂、血清蛋白、缓冲物质如磷酸盐、氨基乙酸、山梨酸、水、盐、电解质如硫酸盐精蛋白、磷酸氢二钠、磷酸氢钾、氯化钠、锌盐、硅酸镁、饱和脂肪酸部分甘油酯混合物等。

[0048] 其他常用的药物辅料如粘合剂(如微晶纤维素)、填充剂(如淀粉、葡萄糖、无水乳糖和乳糖珠粒)、崩解剂(如交联PVP、交联羧甲基淀粉钠、交联羧甲基纤维素钠、低取代羟丙基纤维素)、润滑剂(如硬脂酸镁)以及吸收促进剂、吸附载体、香味剂、甜味剂、赋形剂、稀释剂、润湿剂等。

[0049] 本发明的博安霉素及其药物组合物具有良好的抑制骨髓瘤生长的效果,可以解决多发性骨髓瘤对现有药物具有耐药性的问题。

[0050] 本发明的博安霉素及其药物组合物可以以任何途径给药,例如以液体或固体的形式采用口服、经鼻、非肠胃、静脉、皮内注射、皮下注射或者局部给药。

[0051] 为了非肠胃给药的目的,可以将活性成分置于溶液或混悬液中。溶液和混悬液还可以包含下面的成分:用于注射的无菌稀释剂,例如,注射用水;脂质体颗粒混悬物,其中在颗粒的中心包含稳定的活性药,该颗粒具有预定的pH值和受保护的内环境;脂质体颗粒混悬物,其中活性药外挂在颗粒的外表或是双膜的任何一膜;盐水溶液、不挥发油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或者其他合成溶剂;抗菌剂,例如苄醇;抗氧化剂,例如抗坏血酸或者亚硫酸氢钠;螯合剂,例如乙二胺四乙缓冲剂,例如乙酸(盐)、柠檬酸(盐)以及用于调节张力的物质,例如氯化钠或者葡萄糖。非肠胃给药的制剂可以装在由玻璃或塑料制成的安瓿、一次性注射器或者多次剂量的小瓶中。

[0052] 本发明实施例中的多发性骨髓瘤细胞株RPMI 8226、U266和MM1S购自美国细胞系资源保存中心(ATCC),并使用10%胎牛血清(FBS)RPMI 1640培养基进行培养。

[0053] 初发或复发的多发性骨髓瘤患者的标本是在中国香港中文大学(深圳)附属第二医院伦理委员会的批准下获得的。

[0054] Fluo-4 AM和CellTrace™CFSE试剂盒购自Thermo Fisher Scientific;CCK-8细胞活力测定试剂盒、Annexin V/PI凋亡分析试剂盒和高灵敏度ECL发光液购自Vazyme(中国南京);细胞周期分析试剂盒购自碧云天公司。

[0055] 博安霉素由吉林敖东制药集团公司赠送;甲基纤维购自R&D Systems公司;凋亡相关蛋白抗体购自Cell Signaling Technology公司。

[0056] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。

[0057] 实施例1:博安霉素抑制多发性骨髓瘤细胞增殖和集落形成

[0058] (1)细胞活力检测

[0059] 为了探究博安霉素对多发性骨髓瘤细胞的抑制效果,采用CCK-8细胞活力实验评估不同浓度和时间处理的博安霉素对RPMI 8226、U266和MM1S细胞活力的影响:使用96孔板,每孔种1万或2万个细胞,然后使用不同浓度的博安霉素处理不同细胞48h,以及用一定浓度的博安霉素对不同细胞处理24h、48h和72h。处理结束后,每孔加入10μL的CCK-8试剂,37℃孵育4h后,450nm波长测量吸光度。

[0060] 参阅图1A,博安霉素以剂量和时间依赖的方式抑制多发性骨髓瘤细胞的增殖。

[0061] (2)Wright-Giemsa染色

[0062] 对经博安霉素处理和未处理的RPMI 8226和U266细胞进行了Wright-Giemsa染色:收集细胞并用PBS洗涤两次,取100μL含有10万个细胞的悬液,小心地滴到玻璃载玻片上。使用70%乙醇固定细胞10min后使用改良的Giemsa染色试剂盒进行染色,最后使用显微镜拍摄观察。

[0063] 参阅图1B,博安霉素处理导致细胞形态和细胞核大小的增加,细胞质中出现空泡,细胞膜异常褶皱,这是典型的凋亡前特征。

[0064] (3)集落形成实验

[0065] 检测博安霉素对U266和MM1S细胞细胞集落形成的影响:将每孔200个细胞培养在

含有不同浓度博安霉素的0.9%甲基纤维素中。大约经过两周后,使用倒置显微镜对集落进行计数和拍照。

[0066] 参阅图1C,集落形成实验显示博安霉素处理组的集落数量和大小明显减少。

[0067] (4)凋亡分析

[0068] 为了评估博安霉素对多发性骨髓瘤细胞凋亡的影响,使用不同浓度的博安霉素处理U266和MM1S细胞48h后收集细胞并用PBS洗涤两次。根据Annexin V/PI凋亡分析试剂盒的说明进行凋亡测定。

[0069] 参阅图1D,与对照组相比,博安霉素组的细胞凋亡比例呈浓度依赖性显著增加。

[0070] (5)免疫印迹分析

[0071] 用不同浓度的博安霉素处理U266和MM1S细胞48h后,将收集的细胞在4℃下的RIPA缓冲液中孵育20min,离心取上清,加入loading buffer,100℃下孵育5min。将蛋白质样品加载到SDS-PAGE凝胶上进行分离,然后转移到硝酸纤维膜上。膜被5%的BSA缓冲液阻滞1h,并在4℃下用主要抗体孵育过夜。随后,将膜与过氧化物酶偶联的次要抗体孵育1h。最后,使用高灵敏ECL reagent和化学发光成像系统检测抗体与膜的结合。

[0072] 参阅图1E,在博安霉素处理48h后,剪切形式的PARP、caspase 3、caspase 7和caspase9的等蛋白水平呈浓度依赖性增加。

[0073] 综上所述,博安霉素有效抑制了多发性骨髓瘤细胞的增殖并诱导细胞凋亡。

[0074] 实施例2:博安霉素和硼替佐米的协同抑制作用

[0075] (1)细胞活力检测

[0076] 为了研究博安霉素和硼替佐米是否具有协同效应,采用不同浓度的硼替佐米和博安霉素共处理多发性骨髓瘤细胞48h,并使用CCK-8实验评估细胞活力。

[0077] 参阅图2A,硼替佐米(1、2、4nM)与博安霉素(10μg/mL)在U266和MM1S细胞中显示出协同效应(图3A)。

[0078] (2)免疫印迹分析

[0079] 采用不同浓度的硼替佐米和博安霉素共处理U266和MM1S细胞48h后,收集细胞并采用免疫印迹分析检测剪切形式的PARP、caspase 3、caspase 7和caspase 9等的蛋白水平。

[0080] 参阅图2B,免疫印迹分析显示,相比于单独药物处理,博安霉素和硼替佐米的联合使用导致细胞凋亡蛋白水平显著增加。

[0081] (3)细胞凋亡

[0082] 使用不同浓度的硼替佐米和博安霉素共处理U266和MM1S细胞48h后收集细胞并用PBS洗涤两次,使用Annexin V和PI染色测定细胞凋亡。

[0083] 参阅图2C,流式细胞术实验证明,两种药物的联合使用能更大程度上诱导细胞凋亡。

[0084] 综上所述,博安霉素和硼替佐米的联合使用显示出协同效应,并导致更高水平的凋亡。另外,硼替佐米单独使用时,其浓度大于2nM对多发性骨髓瘤细胞的增殖有明显的抑制效果,而博安霉素和硼替佐米联合使用后,更小剂量的硼替佐米就能达到较好的抑制效果,因此,博安霉素和硼替佐米联合使用可显著降低硼替佐米的使用剂量,进而显著降低患者的治疗费用。

[0085] 实施例3:博安霉素抑制硼替佐米耐药细胞株

[0086] (1)细胞活力检测

[0087] 为了研究博安霉素是否能够克服多发性骨髓瘤细胞对硼替佐米的耐药,建立硼替佐米耐药的细胞系RPMI 8226-Res和U266-Res,采用不同浓度硼替佐米处理硼替佐米耐药的细胞48h,并使用CCK-8实验评估细胞活力。

[0088] 参阅图3A,耐药细胞株相比原始株其耐药性显著增强。

[0089] (2)羧基荧光素丁二酰亚胺酯(CFSE)染色分析

[0090] 硼替佐米耐药的细胞使用终浓度为5μM的CFSE进行染色,并与不同浓度的博安霉素一起培养48h。收集细胞,洗涤、并重新悬浮于不含胎牛血清的RPMI 1640培养基中。使用流式细胞仪检测CFSE荧光,并使用FlowJo软件进行分析。

[0091] 参阅图3B,CFSE结果显示博安霉素显著抑制硼替佐米耐药细胞的增殖。

[0092] (3)集落形成实验

[0093] 检测不同浓度博安霉素对硼替佐米耐药的U266和MM1S细胞细胞集落形成的影响。

[0094] 参阅图3C和图3D,低浓度的博安霉素可以抑制耐药细胞株的集落形成。

[0095] (4)免疫印迹分析

[0096] 采用不同浓度的安霉素处理硼替佐米耐药的U266和MM1S细胞48h后,收集细胞并采用免疫印迹分析检测剪切形式的PARP、caspase 3、caspase 7和caspase 9等的蛋白水平。

[0097] 参阅图3E,随着博安霉素浓度的升高,细胞凋亡相关蛋白的水平显著上升。

[0098] (4)细胞凋亡

[0099] 采用不同浓度的安霉素处理硼替佐米耐药的U266和MM1S细胞48h后用PBS洗涤两次,使用Annexin V和PI染色测定细胞凋亡。

[0100] 参阅图3F,随着博安霉素浓度的升高,细胞凋亡凋亡水平显著上升。

[0101] 综上所述,博安霉素能够抑制硼替佐米耐药的多发性骨髓瘤细胞,克服多发性骨髓瘤细胞对硼替佐米的耐药。

[0102] 实施例4:博安霉素诱导多发性骨髓瘤细胞内质网应激

[0103] (1)生物信息学分析

[0104] 使用不同浓度的博安霉素处理U266和MM1S细胞48h后收集细胞并使用Trizol试剂(Life Technologies)提取总RNA。将RNA样本进行逆转录,然后使用Illumina HiSeq2500平台进行测序。使用DESeq2软件筛选差异表达基因(DEGs)。所得DEGs使用Gene Ontology(GO)数据库(http://www.geneontology.org/)和KEGG通路数据库(https://www.genome.jp/kegg/)进行分析。使用GSEA软件进行基因集富集分析。

[0105] 参阅图4A,通过GSEA分析,发现与内质网功能相关的通路富集。另外,参阅图4D,GSEA结果显示,在博安霉素处理后,钙信号通路上调。

[0106] (2)定量PCR分析

[0107] 使用不同浓度的硼替佐米和博安霉素共处理U266和MM1S细胞48h后收集细胞并用PBS洗涤两次,并在TRizol试剂中裂解。按照说明书提取RNA,并使用HiScript II 1st Strand cDNA合成试剂盒(Vazyme)将RNA逆转录为cDNA。随后,通过与参考基因GAPDH的比较确定基因表达水平。

[0108] CHOP基因是内质网应激的关键调节因子,参阅图4B,博安霉素与硼替佐米共同作用增强CHOP基因的表达。

[0109] (3)透射电子显微镜(TEM)

[0110] 细胞收集后并在4℃下使用TEM固定液固定过夜。固定的细胞离心并用磷酸盐缓冲液洗涤三次,然后嵌入到1%琼脂糖溶液中。琼脂糖块在室温下用1%OsO4固定2h。使用不同浓度的酒精和丙酮进行脱水。然后,用树脂浸渍嵌入并转移到烘箱中,在65℃下聚合至少48h。用超微切片机将树脂块切成60-80nm厚的薄片,然后将组织放置在有Formvar薄膜的150目铍网格上。在用2%乙酸铀饱和酒精溶液和2.6%柠檬酸铅染色后,样品用透射电子显微镜(TEM)进行观察拍照。

[0111] 参阅图4C,通过透射电镜实验观察博安霉素处理后的多发性骨髓瘤细胞,发现博安霉素引起细胞器形态变化,特别是细胞质内中内质网排列不规则,形态细长。

[0112] (4)细胞钙离子水平测定

[0113] 细胞在指定浓度的博安霉素处理48h。收集细胞后,用不含Ca^{2+}和Mg^{2+}的PBS缓冲液洗涤两次,并在用2μM Fluo-4 AM,37℃下孵育30min。细胞钙离子水平使用流式细胞术进行分析。

[0114] 参阅图4E,流式细胞术结果显示,在博安霉素处理48h后,细胞质钙水平显著增加。由于钙主要储存于内质网中,这表明博安霉素会诱导多发性骨髓瘤细胞的内质网应激。

[0115] 实施例5:博安霉素在动物体内抑制肿瘤生长

[0116] (1)动物实验

[0117] 为了进一步探索博安霉素在体内的抑制效果,构建小鼠异种移植模型:动物实验经过中国香港中文大学(深圳)伦理委员会批准。NOD-SCID小鼠(6周龄的雌性)购自北京维通利华实验动物技术有限公司,在每只小鼠的胁腹部皮下注射1×10^{6}个MM1S细胞。当肿瘤能够触及时,小鼠每3天接受PBS(对照)或博安霉素(10mg/kg)的处理。治疗后,二氧化碳处死小鼠,取出肿瘤、称重和固定。肿瘤体积根据以下公式用卡尺计算:A×B2/2(A代表最大直径,B代表与A垂直的直径)。还监测了每只动物的体重、进食行为和运动活动作为总体健康的指标。

[0118] 参阅图5A,与对照组相比,博安霉素处理组的肿瘤大小明显较小,表明博安霉素显著抑制了肿瘤生长。参阅图5B和5C,在10mg/kg的剂量下,肿瘤的重量和体积与对照组相比显著减少。此外,参阅图5D,博安霉素治疗组和对照组之间的体重没有明显波动,表明博安霉素的药物毒性较低。

[0119] (2)免疫组织化学染色

[0120] 采用4%的多聚甲醛固定小鼠肿瘤、肝脏、脾脏和肺组织,然后采用石蜡包埋,并制备厚度为5μm的切片,再使用二甲苯和乙醇梯度对切片进行脱水再水化。然后对切片进行PBS洗涤和抗原修复后,在室温下用10%的正常兔血清阻断1h。随后,在4℃,对切片使用兔抗ki67抗体4℃孵育过夜。然后,使用二抗室温孵育1h,接着进行二氨基联苯胺反应和显微镜观察。另外,H&E染色则是分别使用苏木精和伊红染色对切片进行染色,并在用中性树胶密封后进行观察。

[0121] 参阅图5E,H&E染色显示博安霉素处理后细胞和细胞核体积增加,多核细胞的比例随着博安霉素剂量的增加而增加。Ki-67染色结果显示博安霉素处理后细胞增殖减少。此

外,参阅图6,肝脏、脾脏和肺组织的H&E染色结果显示,博安霉素对其他组织细胞形态和组织结构几乎没有影响。因此,博安霉素能够有效抑制小鼠体内的多发性骨髓瘤细胞生长。

[0122] 综上所述,本发明首次将博安霉素用于治疗多发性骨髓瘤,并在细胞实验和动物实验中取得了良好的效果,药物毒性小,具有良好的临床应用前景;本发明首次发现博安霉素单药对硼替佐米耐药的多发性骨髓瘤具有较好的抑制效果,并且博安霉素可与硼替佐米联用,从而降低硼替佐米的用量,进而显著降低患者的治疗费用,未来有望用于多发性骨髓瘤患者尤其是替佐米耐药的多发性骨髓瘤患者的临床治疗。此外,本发明发现博安霉素通过诱导多发性骨髓瘤细胞的内质网应激从而抑制多发性骨髓瘤细胞的增殖并诱导细胞凋亡,与其抑制其他癌症的作用机理存在差异。

[0123] 以上所述实施例仅是为充分说明本发明而所举的较佳的实施例,本发明的保护范围不限于此。本技术领域的技术人员在本发明基础上所作的等同替代或变换,均在本发明的保护范围之内。本发明的保护范围以权利要求书为准。

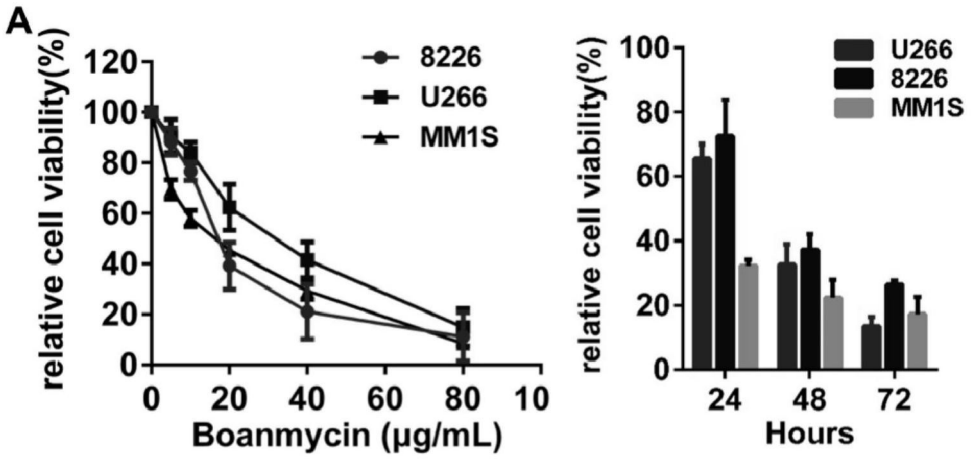

A
relative cell viability(%)
120
100
80
60
40
20
0
0
20
40
60
80
10
Boanmycin (μg/mL)
8226
U266
MM1S
relative cell viability(%)
100
80
60
40
20
0
24
48
72
Hours
U266
8226
MM1S

图1A

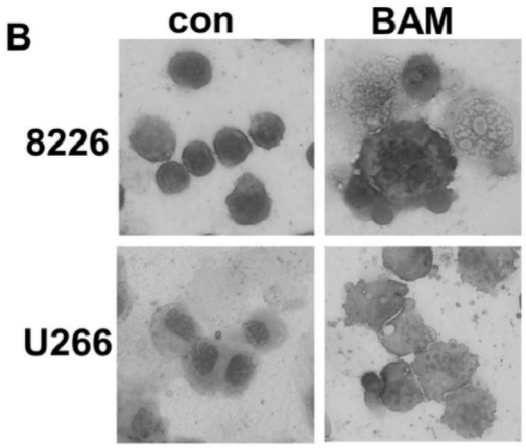

B
con
BAM
8226
U266

图1B

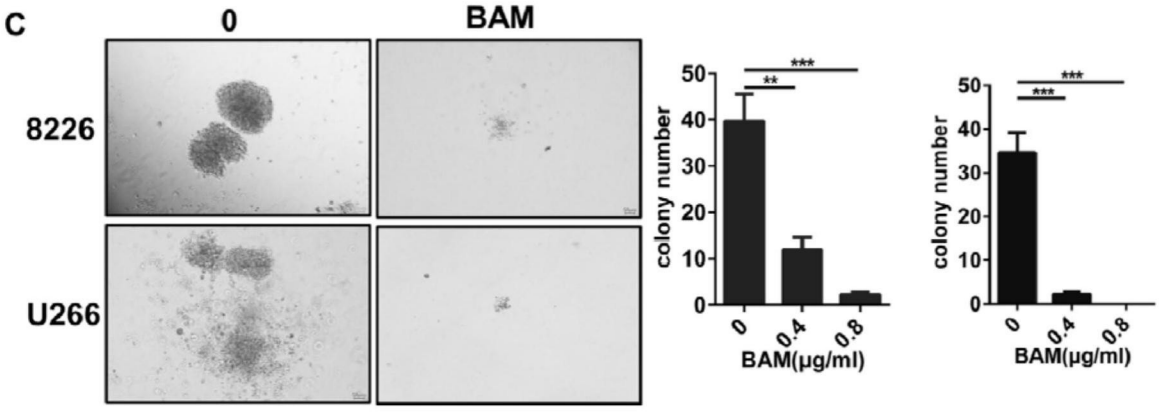

C
0
BAM
8226
U266
colony number
50
40
30
20
10
0
***
**
0
0.4
0.8
BAM(μg/ml)
colony number
50
40
30
20
10
0
***
***
0
0.4
0.8
BAM(μg/ml)

图1C

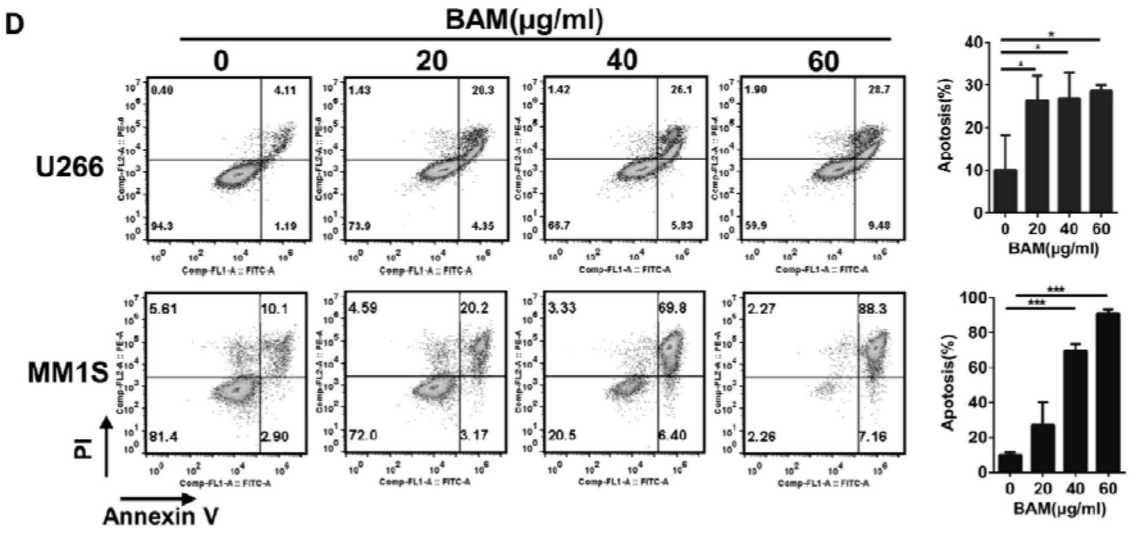

D
BAM(μg/ml)
0
20
40
60
U266
MM1S
PI
Annexin V
Apotosis(%)
BAM(μg/ml)

图1D

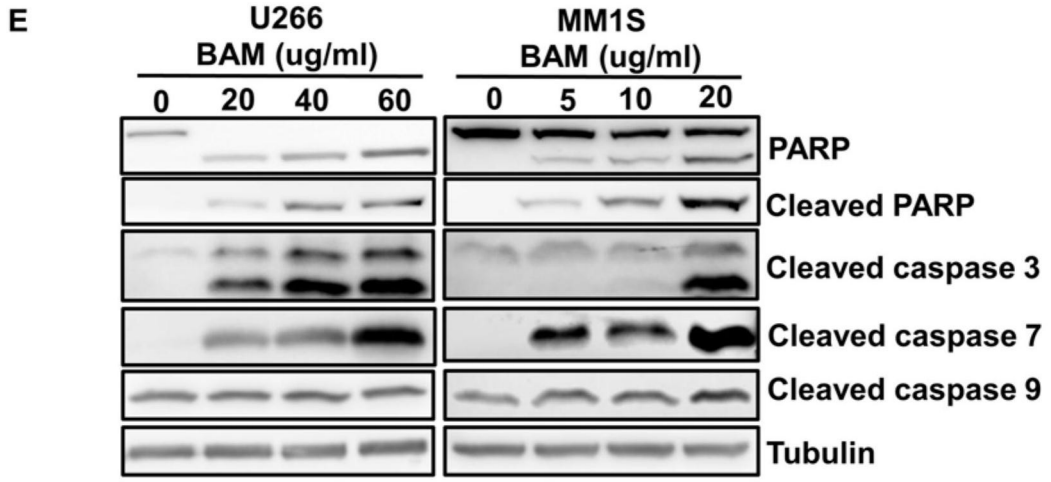

E
U266
BAM (ug/ml)
0 20 40 60
MM1S
BAM (ug/ml)
0 5 10 20
PARP
Cleaved PARP
Cleaved caspase 3
Cleaved caspase 7
Cleaved caspase 9
Tubulin

图1E

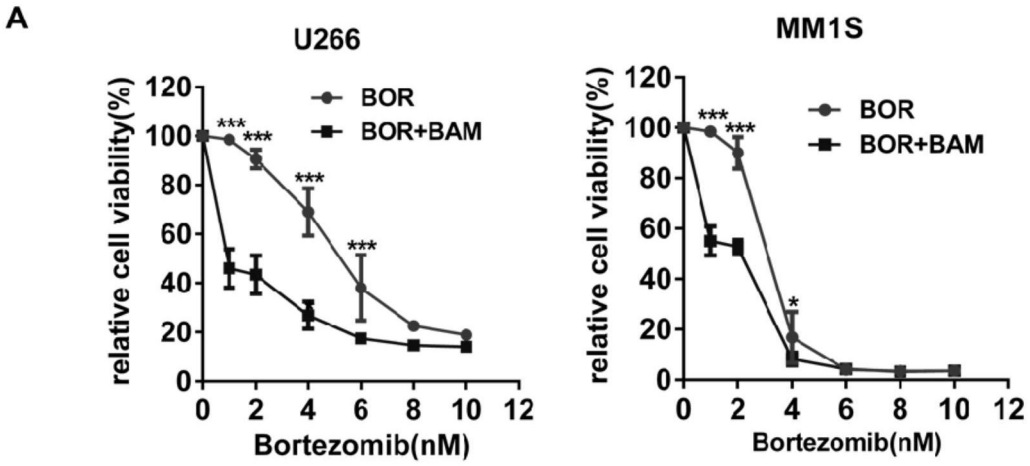

A
U266
MM1S
BOR
BOR+BAM
relative cell viability(%)
Bortezomib(nM)
***
*

图2A

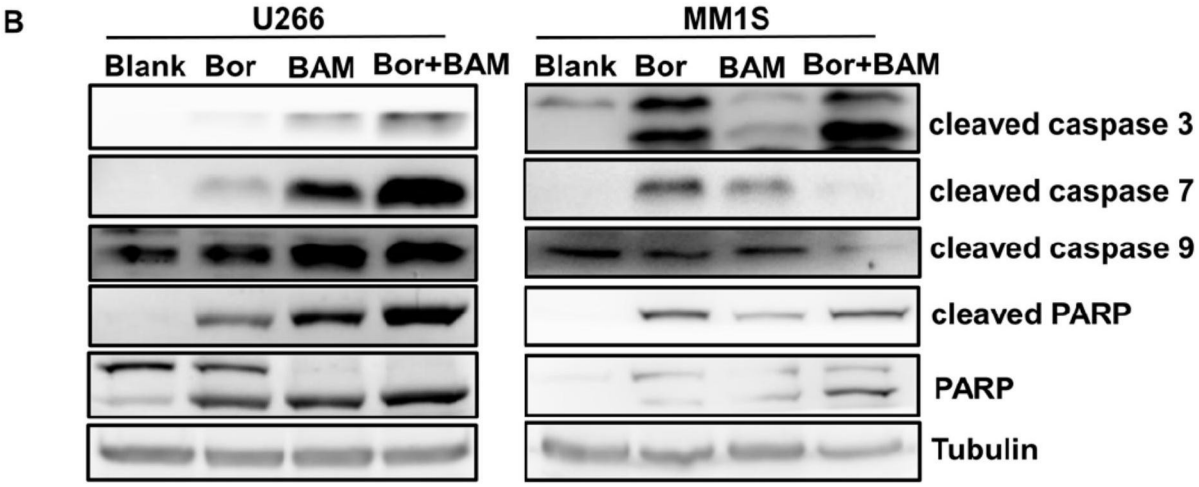

B
U266
MM1S
Blank
Bor
BAM
Bor+BAM
cleaved caspase 3
cleaved caspase 7
cleaved caspase 9
cleaved PARP
PARP
Tubulin

图2B

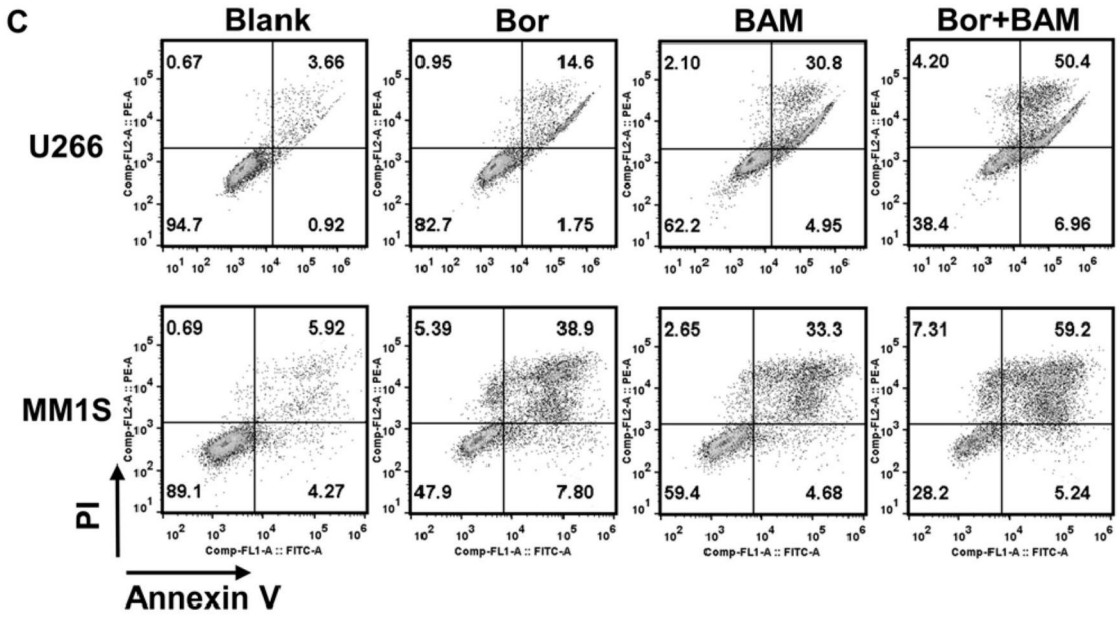

C
Blank
Bor
BAM
Bor+BAM
U266
MM1S
0.67
3.66
94.7
0.92
0.95
14.6
82.7
1.75
2.10
30.8
62.2
4.95
4.20
50.4
38.4
6.96
0.69
5.92
89.1
4.27
5.39
38.9
47.9
7.80
2.65
33.3
59.4
4.68
7.31
59.2
28.2
5.24
PI
Annexin V
Comp-FL2-A :: PE-A
Comp-FL1-A :: FITC-A

图2C

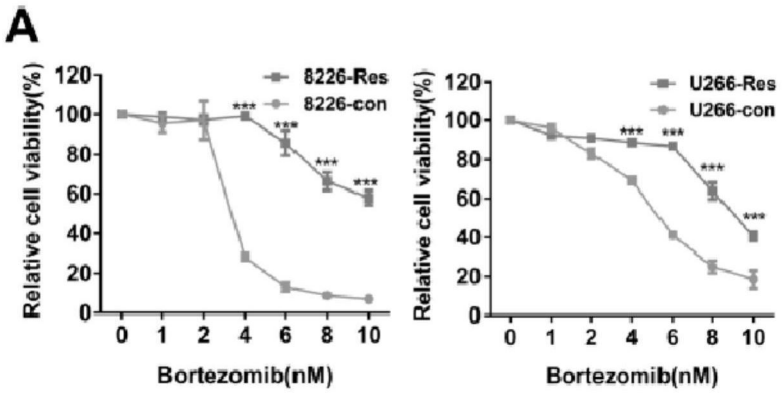

A
Relative cell viability(%)
8226-Res
8226-con
U266-Res
U266-con
Bortezomib(nM)
***

图3A

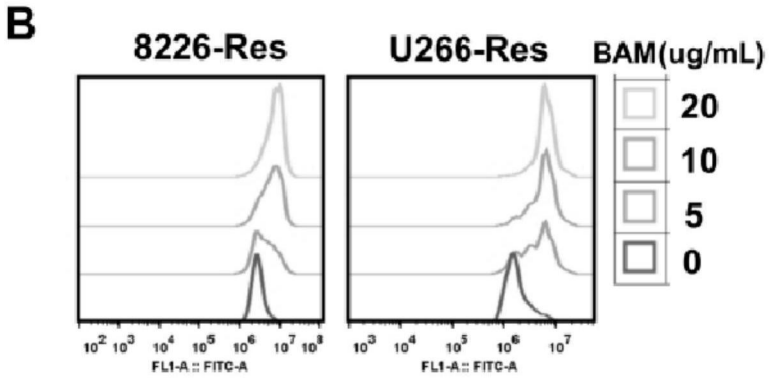

B
8226-Res
U266-Res
BAM(ug/mL)
20
10
5
0
FL1-A :: FITC-A

图3B

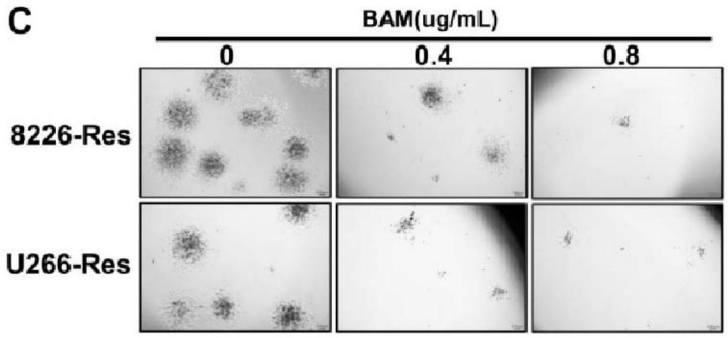

C
BAM(ug/mL)
0
0.4
0.8
8226-Res
U266-Res

图3C

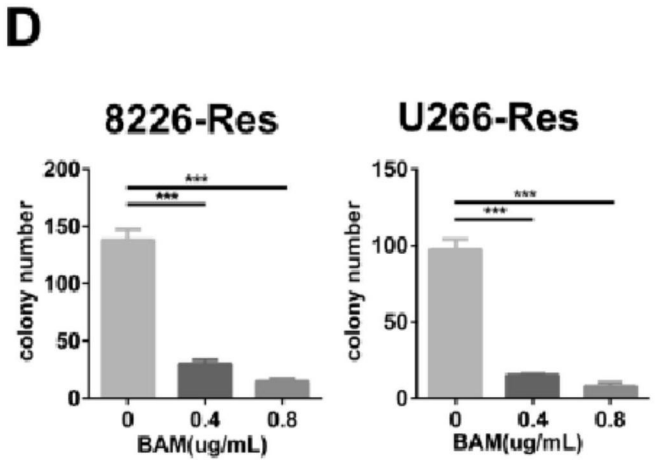

D
8226-Res
U266-Res
colony number
200
150
100
50
0
***
***
0
0.4
0.8
BAM(ug/mL)

图3D

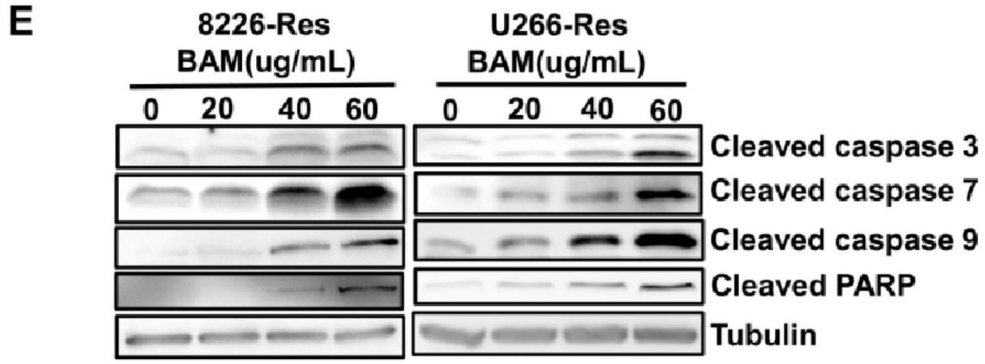

E
8226-Res
BAM(ug/mL)
U266-Res
BAM(ug/mL)
0 20 40 60
0 20 40 60
Cleaved caspase 3
Cleaved caspase 7
Cleaved caspase 9
Cleaved PARP
Tubulin

图3E

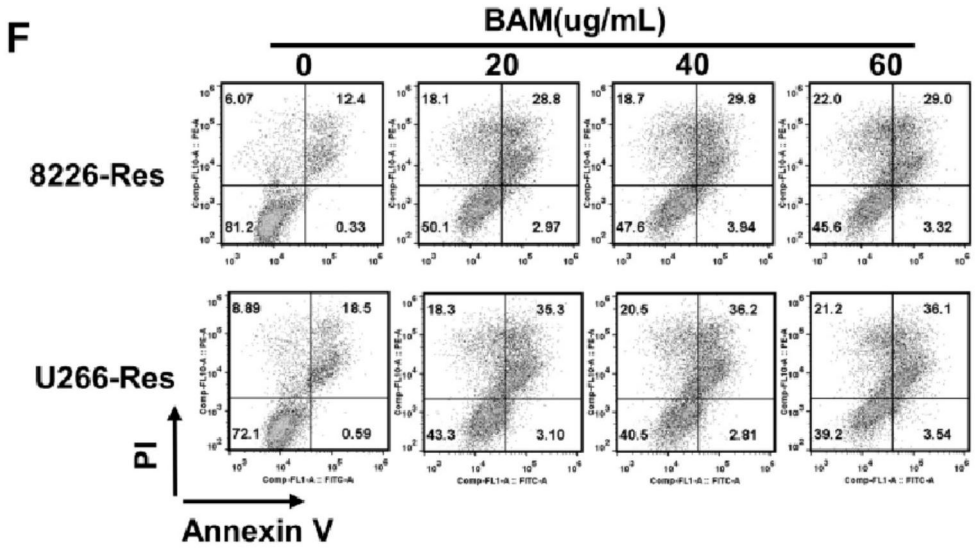

F
BAM(ug/mL)
0
20
40
60
8226-Res
U266-Res
6.07
12.4
81.2
0.33
18.1
28.8
50.1
2.97
18.7
29.8
47.6
3.94
22.0
29.0
45.6
3.32
8.89
18.5
72.1
0.59
18.3
35.3
43.3
3.10
20.5
36.2
40.5
2.91
21.2
36.1
39.2
3.54
PI
Annexin V

图3F

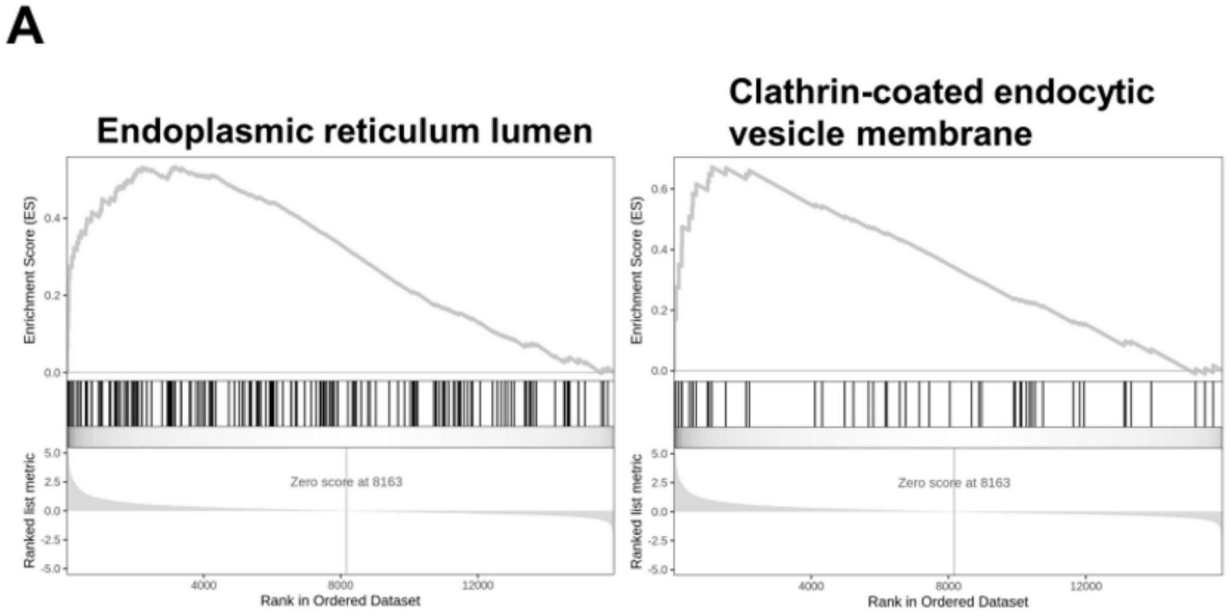

A
Endoplasmic reticulum lumen
Clathrin-coated endocytic vesicle membrane
Enrichment Score (ES)
Ranked list metric
Zero score at 8163
Rank in Ordered Dataset

图4A

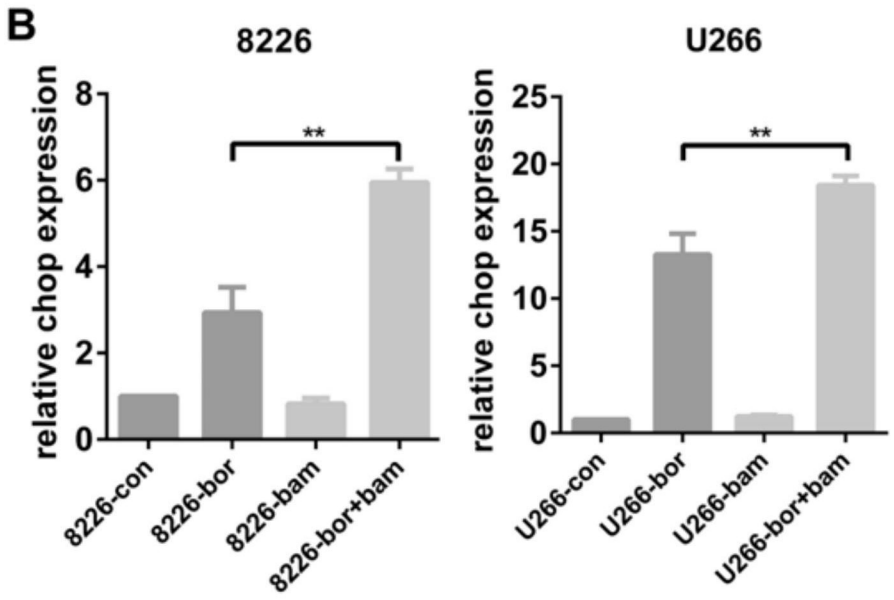

B
8226
U266
relative chop expression
**
8226-con
8226-bor
8226-bam
8226-bor+bam
U266-con
U266-bor
U266-bam
U266-bor+bam

图4B

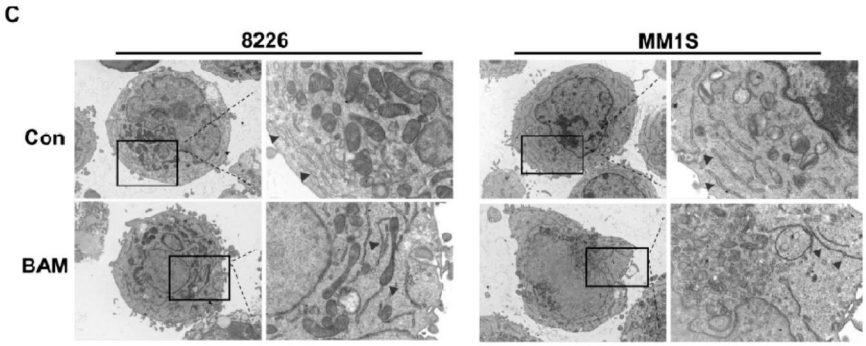

C
8226
MM1S
Con
BAM

图4C

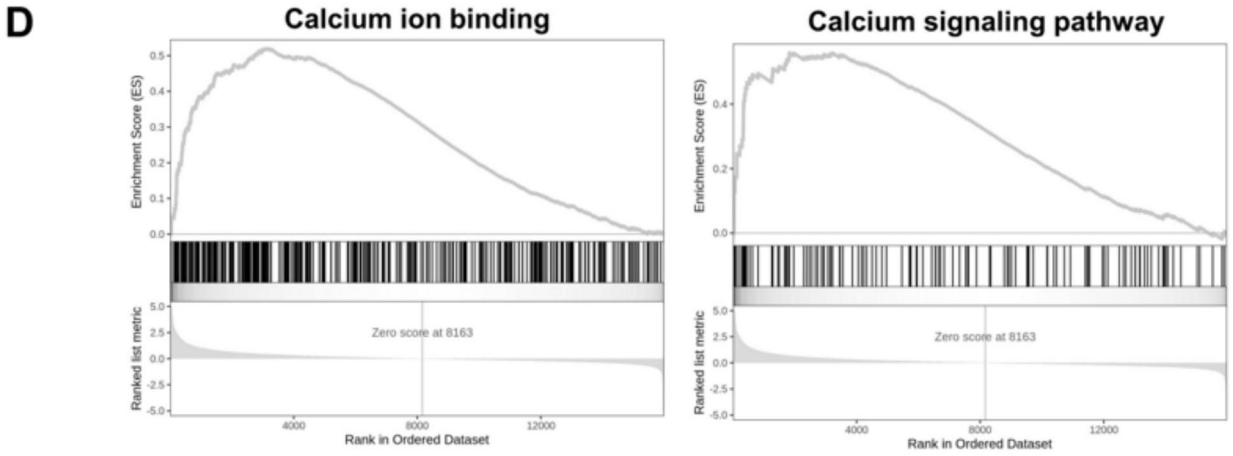

D
Calcium ion binding
Calcium signaling pathway
Enrichment Score (ES)
Ranked list metric
Zero score at 8163
Rank in Ordered Dataset

图4D

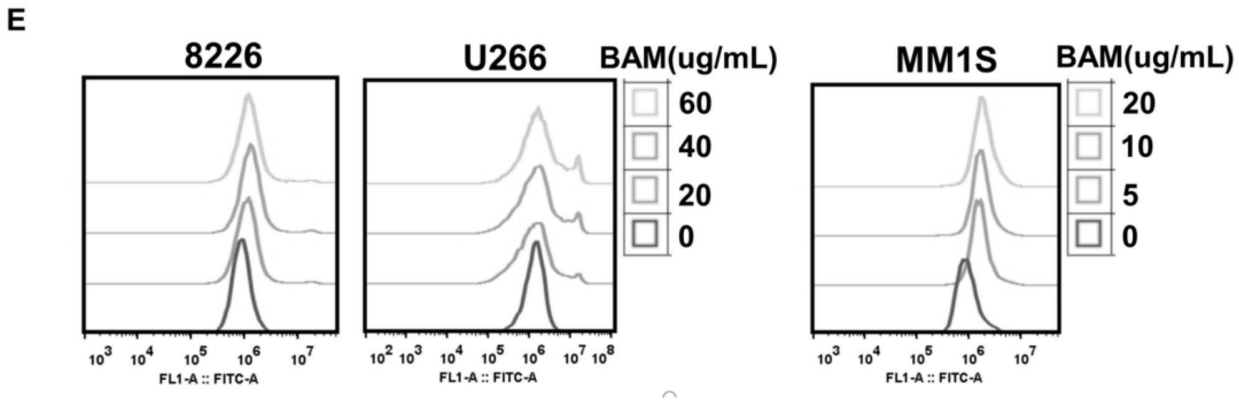

E
8226
U266
BAM(ug/mL)
60
40
20
0
MM1S
BAM(ug/mL)
20
10
5
0
FL1-A :: FITC-A
FL1-A :: FITC-A
FL1-A :: FITC-A

图4E

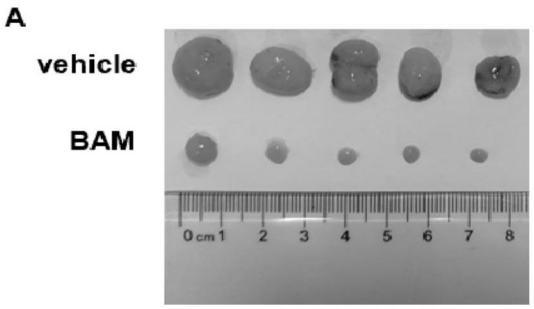

A
vehicle
BAM

图5A

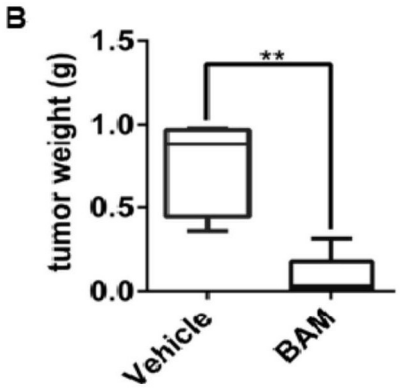

B
tumor weight (g)
1.5
1.0
0.5
0.0
**
Vehicle
BAM

图5B

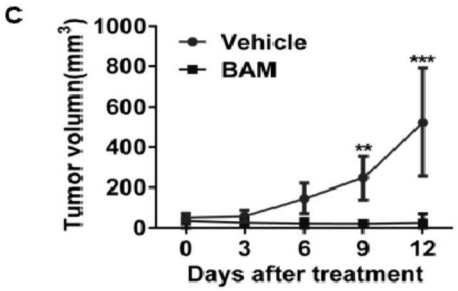

C
Tumor volumn(mm3)
1000
800
600
400
200
0
Vehicle
BAM
**
***
0
3
6
9
12
Days after treatment

图5C

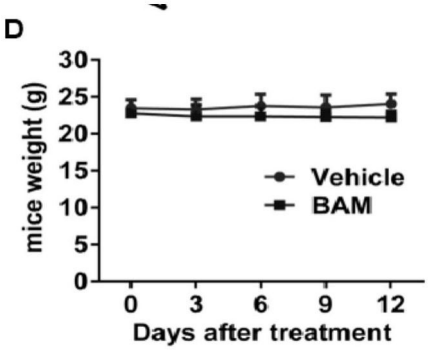

D
mice weight (g)
30
25
20
15
10
5
0
Vehicle
BAM
0
3
6
9
12
Days after treatment

图5D

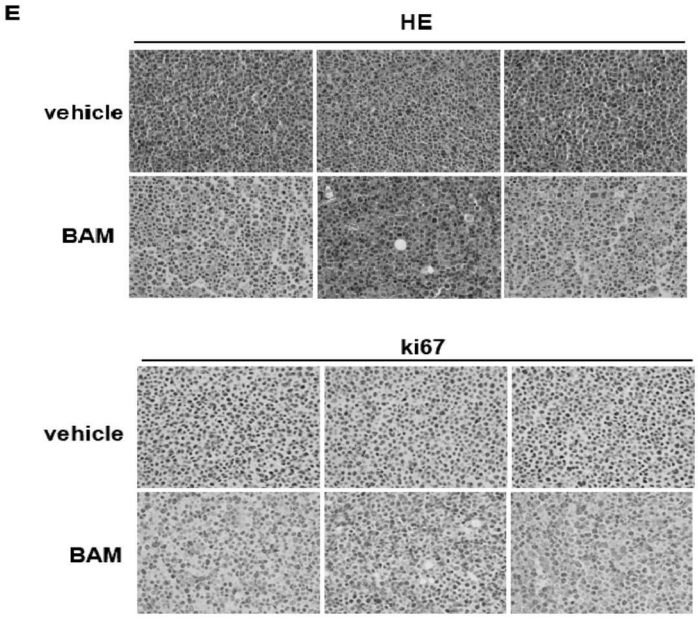

E
HE
vehicle
BAM
ki67
vehicle
BAM

图5E

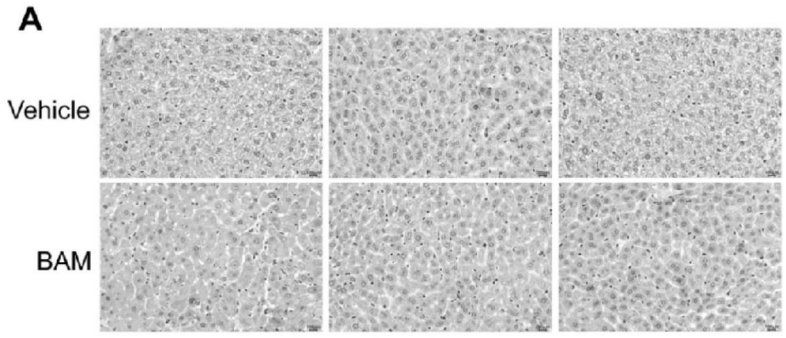


图6A

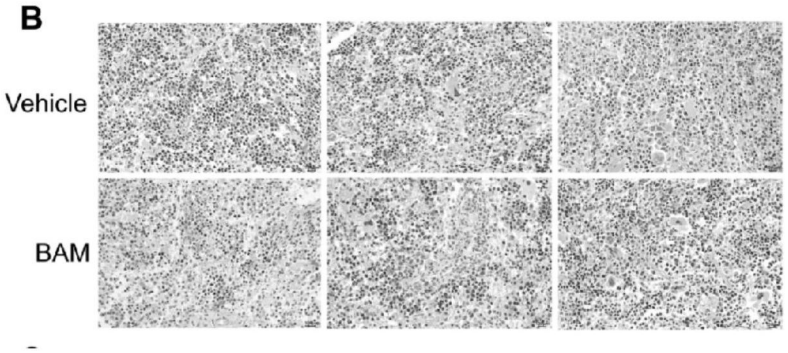


图6B

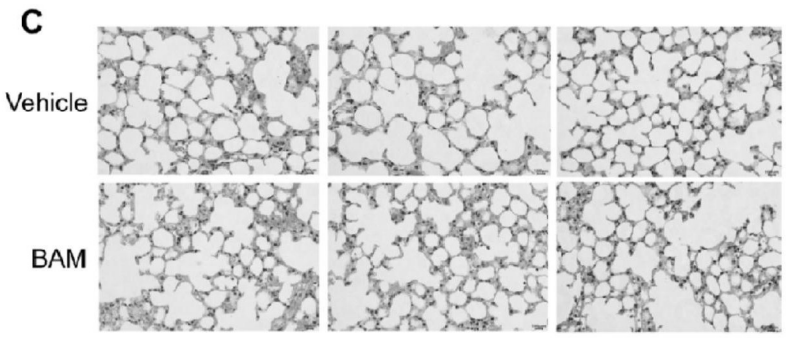


图6C