



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111744001 B

(45) 授权公告日 2021.05.11

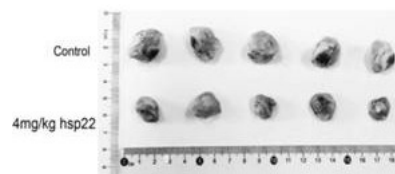
(21) 申请号 202010495941.2	A61K 35/64 (2015.01)
(22) 申请日 2020.06.03	A61P 35/00 (2006.01)
(65) 同一申请的已公布的文献号 申请公布号 CN 111744001 A	(56) 对比文件 CN 1851461 A, 2006.10.25
(43) 申请公布日 2020.10.09	审查员 颜泉梅
(73) 专利权人 桂林医学院附属医院 地址 541000 广西壮族自治区桂林市乐群路15号	
(72) 发明人 李清华 韦载娟 王文晶 廖儒佳 莫靖欣 田宁 石芳 李美营	
(74) 专利代理机构 广州三环专利商标代理有限公司 44202 代理人 颜希文	
(51) Int. Cl. A61K 38/17 (2006.01)	权利要求书1页 说明书4页 序列表2页 附图3页

(54) 发明名称

一种果蝇Hsp22蛋白在制备用于抗肿瘤的
药物中的应用

(57) 摘要

本发明属于医药领域,尤其涉及一种果蝇Hsp22蛋白在制备用于抗肿瘤的
药物中的应用。本发明药理活性实验部分针对果蝇Hsp22蛋白对Ras肿瘤果蝇模型
的治疗效果以及对小鼠肿瘤模型的治疗效果进行评价,发现果蝇Hsp22蛋白具
有很好的抗肿瘤活性。所述果蝇Hsp22蛋白可用于开发抗肿瘤的新型药物,具
有重要的医用前景和经济价值。



1. 一种果蝇Hsp22蛋白在制备用于抗肿瘤的藥物中的应用,其特征在於,所述果蝇Hsp22蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示,所述肿瘤为肝癌。
2. 根据权利要求1所述的应用,其特征在於,所述果蝇Hsp22蛋白以溶剂化物的剂型施用。
3. 根据权利要求2所述的应用,其特征在於,所述溶剂化物为果蝇Hsp22蛋白的冻干物溶于溶剂中得到。
4. 根据权利要求3所述的应用,其特征在於,所述溶剂包括水、异丙醇、乙醇、甲醇、二甲亚砷、乙酸乙酯、乙酸、氨基乙醇中的至少一种。
5. 根据权利要求1所述的应用,其特征在於,所述药物用于皮下注射、静脉注射、肌肉注射或经鼻给药。

一种果蝇Hsp22蛋白在制备用于抗肿瘤的藥物中的应用

技术领域

[0001] 本发明属于医药领域,尤其涉及一种果蝇Hsp22蛋白在制备用于抗肿瘤的藥物中的应用。

背景技术

[0002] 癌症是一种死亡率极高的恶性疾病,治疗难度高,给患者和家庭带来沉重的负担。近年来,我国癌症发生率明显增加,使癌症防治面临着严峻的形势。据相关研究报道显示,在20世纪70年代,我国癌症由10.13%增加至22.32%,死亡增加率为82.11%。癌症排在城市死亡的第一位,在农村排列为第二位。尤其是现今老龄化日益加重,吸烟、饮食结构变化、微生物感染、肥胖、活动减少、作息不良等因素是导致癌症发生的主要原因。目前排在我国癌症前十位的是:肺癌、胃癌、结直肠癌、肝癌、食管癌、女性乳腺癌、胰腺癌、淋巴癌、膀胱癌与甲状腺癌。肺癌是城市男性常见病症,乳腺癌是城市女性常见癌症;消化系统癌症是农村男女发病首位,肺癌死亡率占据最高位。

[0003] 恶性肿瘤是危害健康及生命的多发病,恶性肿瘤带来的疲乏、疼痛、治疗的毒副作用,使患者的身心健康和生活质量受到了严重的影响。RAS癌基因在30%的癌症类型中都处于激活状态,其会导致肿瘤细胞的增殖及转化,目前针对该蛋白(RAS基因所编码)并没有有效的抑制剂,因此针对抗恶性肿瘤藥物需求迫切。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于克服现有技术的不足,提供一种果蝇Hsp22蛋白在制备用于抗肿瘤的藥物中的应用。

[0005] 为实现上述目的,本发明采取的技术方案为:一种果蝇Hsp22蛋白在制备用于抗肿瘤的藥物中的应用,所述果蝇Hsp22蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示。

[0006] 热休克蛋白22 / H11激酶(Hsp22)是一种应力诱导型蛋白,可对包括缺血在内的各种肿瘤微环境变化应激条件作出反应。

[0007] 先前研究表明Hsp22位于线粒体以及核和胞质组分中。另外,在果蝇中已经表明,Hsp22在线粒体中的定位是由于依赖于其N末端结构域的易位机制引起的。Hsp22在哺乳动物线粒体内的生物学功能仍然未知。我们发现果蝇Hsp22蛋白对小鼠肝癌模型的治疗可能是通过下调转录因子HIF2 α ,导致癌基因RAS表达下调来实现的。

[0008] 作为本发明所述的应用的优选实施方式,所述肿瘤为Ras肿瘤或肝癌。

[0009] 作为本发明所述的应用的优选实施方式,所述果蝇Hsp22蛋白以溶剂化物的剂型施用。

[0010] 作为本发明所述的应用的优选实施方式,所述溶剂化物为果蝇Hsp22蛋白的冻干物溶于溶剂中得到。

[0011] 作为本发明所述的应用的优选实施方式,所述溶剂包括水、异丙醇、乙醇、甲醇、二甲亚砜、乙酸乙酯、乙酸、氨基乙醇中的至少一种。

[0012] 作为本发明所述的应用的优选实施方式,所述药物用于皮下注射、静脉注射、肌肉注射或经鼻给药。

[0013] 本发明还提供了一种药物组合物,所述药物组合物包括果蝇Hsp22蛋白和药学上可接受的载体,所述果蝇Hsp22蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示。

[0014] 本发明的有益效果:

[0015] 本发明药理活性实验部分针对果蝇Hsp22蛋白对Ras肿瘤果蝇模型的治疗效果以及对小鼠肿瘤模型的治疗效果进行评价,发现本发明果蝇Hsp22蛋白具有很好的抗肿瘤活性。

附图说明

[0016] 图1为本发明荧光体式显微镜分别检测果蝇幼虫的荧光强度;其中,A:正常对照组;B:Ras^{V12}; scrib^{-/-}肿瘤果蝇幼虫;C:hsp22过表达的Ras^{V12}; scrib^{-/-}肿瘤果蝇幼虫。

[0017] 图2为本发明RT-PCR检测hsp22过表达的Ras^{V12};scrib^{-/-}肿瘤果蝇幼虫中RAS基因的表达量。

[0018] 图3为本发明RT-PCR检测hsp22过表达的Ras^{V12};scrib^{-/-}肿瘤果蝇幼虫中Myc基因的表达量。

[0019] 图4为本发明RT-PCR检测hsp22过表达的Ras^{V12};scrib^{-/-}肿瘤果蝇幼虫中Hif 1 α 基因的表达量。

[0020] 图5为本发明不同给药天数后小鼠肿瘤体积;其中,A:小鼠肿瘤体积随时间变化折线图;B:小鼠肿瘤体积实物图;C:模型组与给药组小鼠肿瘤重量柱状图。(注:**出现显著差异* p<0.05;** p<0.01;***p<0.001)

具体实施方式

[0021] 为更好的说明本发明的目的、技术方案和优点,下面将结合附图和具体实施例对本发明作进一步说明。如无特别说明,本发明中的试剂浓度均为质量浓度;如无特别说明,本发明中的实验方法均为常规方法;如无特别说明,本发明中的试剂、材料、细胞、实验动物等均可从市场上或其它公开渠道获得。

[0022] 实施例1果蝇Hsp22蛋白对Ras肿瘤果蝇模型的治疗

[0023] (1) 构建果蝇肿瘤模型

[0024] ① 构建RasV12; scrib^{-/-}果蝇肿瘤模型(致癌蛋白Ras过表达与抑癌基因scrib^{-/-}隐形纯合突变)

[0025] 用选择性在果蝇幼虫眼盘和腹部神经索特异性表达的启动子scrib-GAL4 果蝇与带有GFP荧光标记的RasV12 果蝇杂交(果蝇由上海同济大学生命科学院的薛雷教授赠予),得到的F1代即为RasV12; scrib^{-/-}肿瘤果蝇(致癌蛋白Ras过表达与scrib^{-/-}隐形纯合突变)。

[0026] ② 构建hsp22过表达的RasV12; scrib^{-/-}肿瘤果蝇

[0027] 将hsp22过表达果蝇(基因型为:+/cyo;hsp22 OE/TM2)与RasV12果蝇(基因型为:RasV12/sco;TM3/+)杂交,在F1代中筛选RasV12/cyo; hsp22 OE /TM3果蝇(该果蝇有且只有卷翅及短刚毛性状),将该品系果蝇培养一段时间,挑取其中不带性状的RasV12; hsp22

OE与scrib-GAL4 果蝇杂交,子代即为hsp22过表达的Ras^{V12}; scrib^{-/-}肿瘤果蝇

[0028] (2)检测果蝇肿瘤模型幼虫GFP荧光强度

[0029] 果蝇的Ras肿瘤模型带有GFP标记,在体式荧光显微镜下观察荧光,在荧光显微镜下可以直接观察到肿瘤大小。

[0030] 用荧光体式显微镜分别检测正常对照组(图1A)、Ras^{V12}; scrib^{-/-}肿瘤果蝇(图1B)和hsp22过表达的Ras^{V12}; scrib^{-/-}肿瘤(图1C)果蝇幼虫的荧光强度,结果表明hsp22过表达可以使肿瘤减小,肿瘤情况发生好转。

[0031] (3)RT-PCR检测hsp22过表达的Ras^{V12};scrib^{-/-}肿瘤果蝇幼虫肿瘤相关基因的表达量

[0032] 取步骤(1)构建好的hsp22过表达的Ras^{V12}; scrib^{-/-}肿瘤果蝇幼虫10只,提取RNA,利用荧光定量PCR分别检测肿瘤相关基因Ras、Myc和Hif 1 α 的表达量,并分别与Ras^{V12}; scrib^{-/-}肿瘤果蝇幼虫进行比较。

[0033] 如图2-图4所示,Ras肿瘤组(即Ras^{V12}; scrib^{-/-}果蝇肿瘤模型)与癌症相关的基因表达与正常组相比大量增加,当过表达hsp22后(即hsp22过表达的Ras^{V12}; scrib^{-/-}肿瘤果蝇),RAS基因、肿瘤发生与转归密切相关的MyC基因和缺氧诱导基因(HIF-1 α)表达明显降低。

[0034] 实施例2果蝇Hsp22蛋白对小鼠肝癌的治疗

[0035] (1)单克隆菌的构建

[0036] 全基因合成果蝇Hsp22蛋白基因序列(氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示,核苷酸序列如SEQ ID NO:2所示),通过BamHI与XhoI酶切后,插入到pET28a载体中,得到重组质粒,测序正确后,将重组质粒转化到宿主菌大肠杆菌中,得到单克隆菌。

[0037] (2)果蝇Hsp22蛋白表达

[0038] 配置培养基,灭菌,于晚上将步骤(1)中得到的单克隆菌涂布卡那霉素(KA)平板,过夜。第二天挑选单克隆菌到KA(50ug/ml)液体培养基10ml,250rpm 37 $^{\circ}$ C过夜。于第三天转接1%过夜菌到1000ml的液体培养基,37 $^{\circ}$ C 250rpm扩大摇菌3h至对数期,晚上8点加入IPTG(0.5mM)过夜摇菌20 $^{\circ}$ C、250rpm到下一天8点。于第四天7000rpm离心20min收集菌体,PBS清洗一遍,用破菌液重悬,60%-70%频率,10s超声10s间隔,一共30min,直到菌液澄清。分装1.5ml的EP管,离心12000rpm,20min,取上清,过层析柱(北京博奥龙Ni层介质重力预装柱,BDTL0011-K)。第五天时测得SDS-PAGE(15%),hsp22的位置在26kD。在第六天BCA测蛋白浓度,超滤管10kd浓缩去盐,冷冻干燥,-80 $^{\circ}$ C保存。第八天将果蝇Hsp22蛋白冻干粉溶于无菌生理盐水,BCA再次检测浓度即获得最终浓度。

[0039] (3)小鼠肝癌腹部移植瘤模型的建立

[0040] 将果蝇Hsp22蛋白冻干后,与本发明所述的溶剂配制成不同浓度的溶液进行给药。

[0041] 雄性C57BL/6小鼠,6-8周龄,体重20 \pm 2g,腹腔皮下接种H22肝癌细胞株悬液(含细胞约1 \times 10¹⁰个)后进行持续观察,分别在接种1周后每隔1天腹腔注射果蝇Hsp22蛋白水溶液4 mg/kg,同时检测各组肿瘤体积,并统计造模后各组小鼠的生存率。

[0042] 腹腔皮下接种H22肝癌细胞后,注意观察小鼠的生活和精神状态,饮食情况和体重变化,接种成功之后的小鼠背部出现明显的不规则突起,精神状态不佳,饮食减少,体重减轻或较增加较慢,免疫下降。

[0043] 一个试验周期为十八天,于进行试验的第八天开始给药。hsp22组、肿瘤组+hsp22组给予hsp22(4mg/kg)正常组和肿瘤组给予等体积生理盐水。隔天一次,

[0044] 待实验终止,断髓处死小鼠,剥除瘤体,去除表面脂肪组织,瘤体称重,并置于平板上用游标卡尺测量肿瘤的长度(L)和宽度(W),计算肿瘤体积。

[0045] 肿瘤体积测量公式: $V=(\text{length}\times\text{width}^2)/2$ 。

[0046] (2)实验结果

[0047] 如图5A所示,在给药第六天出现明显差异,4mg/kg的Hsp22治疗组的小鼠肿瘤体积较对照组增长明显减慢。

[0048] 一个试验周期结束(即十八天)取材获得实验结果,如图5B所示,随着时间的推移,在给药的第四天后出现明显差异,4mg/kg的果蝇Hsp22蛋白组小鼠的肿瘤体积较对照组小鼠增长明显减慢,对照组在第四天后肿瘤体积增长较快,小鼠的精神状态有所改善,体重明显增加,进食逐渐稳定趋于正常。

[0049] 如图5C所示,于第八天开始给药,每隔一天给药,待给药结束后,于第十八天经解剖后测量肿瘤体积和重量,发现果蝇Hsp22蛋白能够抑制小鼠模型中的肿瘤生长,4 mg/kg的果蝇Hsp22蛋白能够缩小50 %的肿瘤体积。

[0050] 最后应当说明的是,以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非对本发明保护范围的限制,尽管参照较佳实施例对本发明作了详细说明,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实质和范围。

[0001] SEQUENCE LISTING
 [0002] <110> 桂林医学院附属医院
 [0003] <120> 一种果蝇Hsp22蛋白在制备用于抗肿瘤的药物中的应用
 [0004] <160> 2
 [0005] <170> PatentIn version 3.3
 [0006] <210> 1
 [0007] <211> 174
 [0008] <212> PRT
 [0009] <213> 人工合成
 [0010] <400> 1
 [0011] Met Arg Ser Leu Pro Met Phe Trp Arg Met Ala Glu Glu Met Ala Arg
 [0012] 1 5 10 15
 [0013] Met Pro Arg Leu Ser Ser Pro Phe His Ala Phe Phe His Glu Pro Pro
 [0014] 20 25 30
 [0015] Val Trp Ser Val Ala Leu Pro Arg Asn Trp Gln Gln Ile Ala Arg Trp
 [0016] 35 40 45
 [0017] Gln Glu Gln Glu Phe Ala Pro Pro Ala Thr Val Asn Lys Asp Gly Tyr
 [0018] 50 55 60
 [0019] Lys Leu Thr Leu Asp Val Lys Asp Tyr Ser Glu Leu Lys Val Lys Val
 [0020] 65 70 75 80
 [0021] Leu Asp Glu Ser Val Val Leu Val Glu Gly Lys Ser Glu Gln Gln Glu
 [0022] 85 90 95
 [0023] Ala Glu Gln Gly Gly Tyr Ser Ser Arg His Phe Leu Arg Arg Phe Val
 [0024] 100 105 110
 [0025] Leu Pro Glu Gly Tyr Glu Ala Asp Lys Val Thr Ser Thr Leu Ser Ser
 [0026] 115 120 125
 [0027] Asp Gly Val Leu Thr Ile Ser Val Pro Asn Pro Pro Gly Val Gln Glu
 [0028] 130 135 140
 [0029] Thr Leu Lys Glu Arg Glu Val Thr Ile Glu Gln Thr Gly Glu Pro Ala
 [0030] 145 150 155 160
 [0031] Lys Lys Ser Ala Glu Glu Pro Asn Asp Lys Ala Ala Ser Gln
 [0032] 165 170
 [0033] <210> 2
 [0034] <211> 525
 [0035] <212> DNA
 [0036] <213> 人工合成
 [0037] <400> 2
 [0038] atgcgttctt taccgatggt ttggcgcgatg gccgaggaga tggcacgtat gccacgcctc 60

[0039] tcctcgccgt ttcacgcctt cttccacgag ccgcccgttt ggagtgtggc gctgccgcgt 120
[0040] aactggcagc agattgcccg ctggcaggag caggagtteg ctccgccggc caccgtcaac 180
[0041] aaggatggct acaaactcac cctggacgtc aaggactaca gcgagctgaa ggtcaaggtg 240
[0042] ctggacgaga gcgttgtcct ggtggagggt aaatcagagc agcaggaggc cgaacaaggt 300
[0043] ggctatagct cccgtcactt cctccgccgc ttcgtcctgc cggaaggta cgaggcggac 360
[0044] aaggtgacct caaccctgag cagcgacggc gtcctgacca tcagtgtgcc gaatcctcca 420
[0045] ggcgtgcagg agacactcaa ggagcgtgag gtgaccatcg agcagactgg cgagccggca 480
[0046] aagaagtccg ccgaggagcc aaatgacaaa gccgccagtc agtaa 525

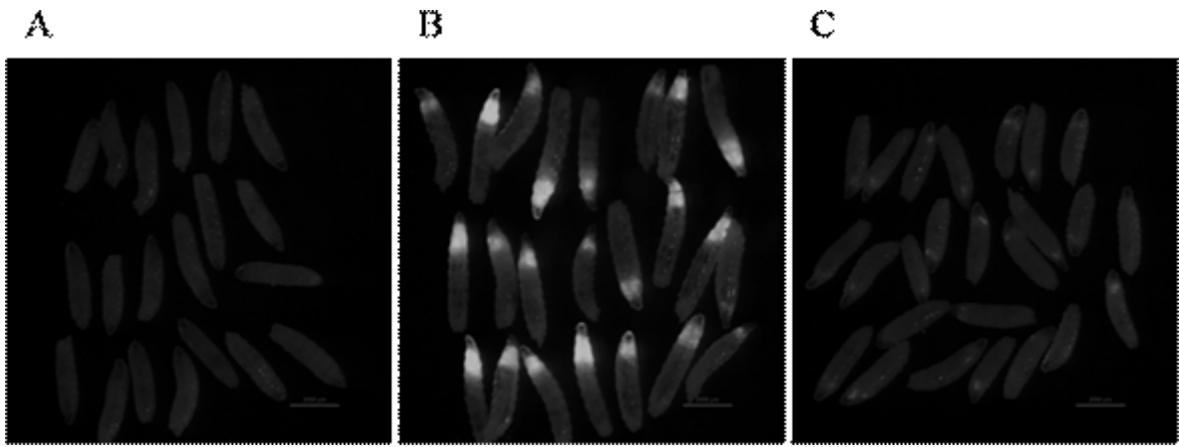


图1

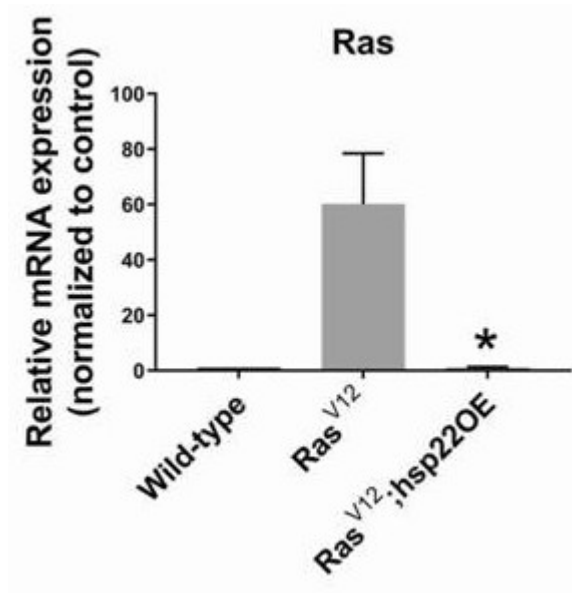


图2

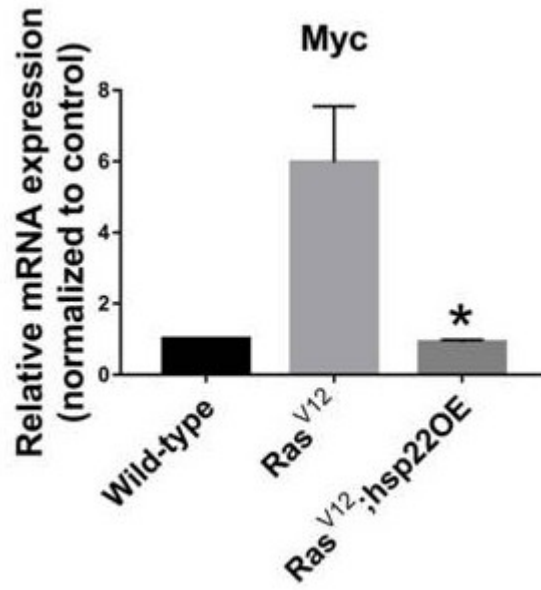


图3

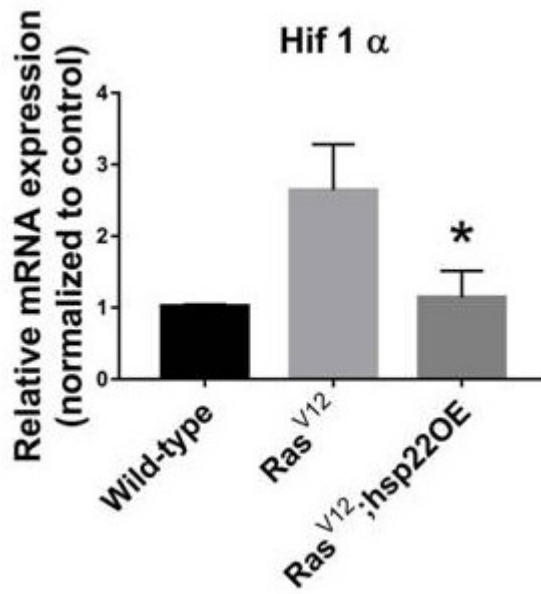


图4

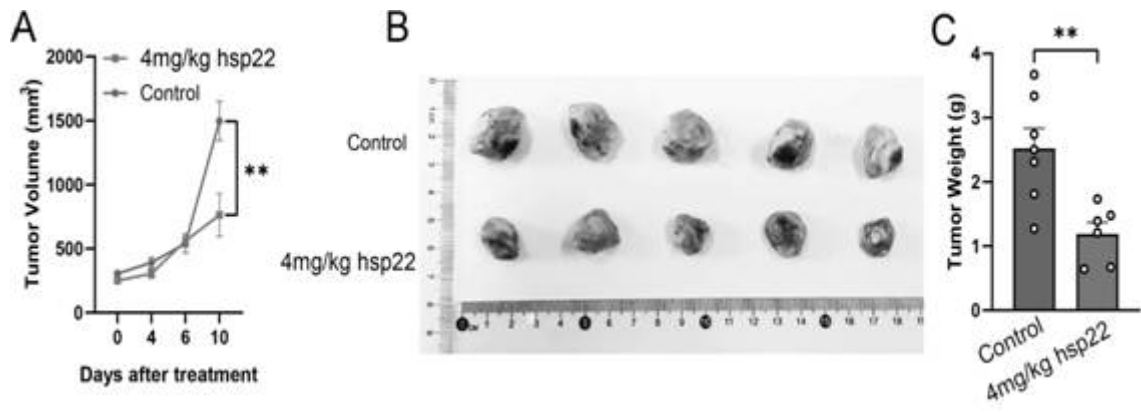


图5