



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113456800 A

(43) 申请公布日 2021.10.01

(21) 申请号 202110843220.0

(22) 申请日 2021.07.26

(71) 申请人 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 田宁 莫靖欣 韦载娟

(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)

A61P 35/00 (2006.01)

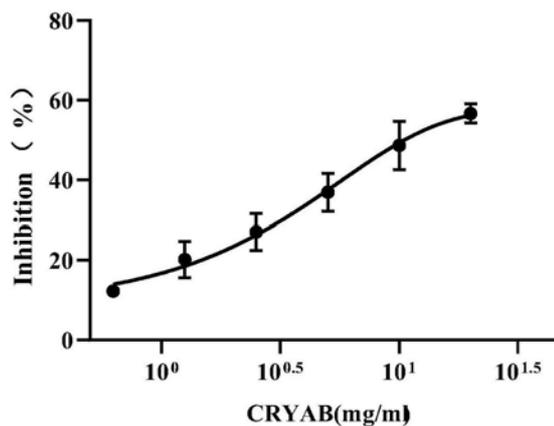
权利要求书1页 说明书3页
序列表2页 附图2页

(54) 发明名称

一种人源CRYAB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,尤其涉及一种人源CRYAB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人源CRYAB蛋白对人黑色素瘤
细胞A375模型的治疗效果进行评价,发现人源CRYAB蛋白具有很好的抗肿瘤
活性。所述人源CRYAB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. 一种人源CRYAB蛋白在制备用于抗肿瘤的藥物中的应用,其特征在於,所述人源CRYAB蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示,所述肿瘤为人源黑色素瘤。

2. 根据权利要求1-2任意一项所述的应用,其特征在於,所述人源CRYAB蛋白以溶剂化物的剂型施用。

3. 根据权利要求3所述的应用,其特征在於,所述溶剂化物为人源CRYAB蛋白的冻干物溶于溶剂中得到。

4. 根据权利要求4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。

6. 一种药物组合物,其特征在於,所述药物组合物包括人源CRYAB蛋白和药学上可接受的载体,所述人源CRYAB蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示。

一种人源CRYAB蛋白在制备用于抗肿瘤的藥物中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及医药领域,尤其涉及一种人源CRYAB蛋白在制备用于抗肿瘤的藥物中的应用。

背景技术

[0002] 黑色素瘤是一种侵袭性强的恶性肿瘤,且是发病率增长最快的恶性肿瘤之一,其恶性程度极高,多数会发生淋巴结或者血液远处的转移,而转移性恶性黑色素瘤患者5年生存率仅5%-10%,所以转移是恶性黑色素瘤患者存活率低的重要原因。恶性黑色素瘤病死率高、预后差,以中老年人为主要发病对象,并且随着年龄增加发生率有升高趋势。

[0003] 目前针对恶性黑色素瘤的治疗仍然以外科手术为主,常规治疗给患者带来身心痛苦的同时也存在很大的副作用。而且术后也需要配合放射疗法以延长患者生存率。因此,寻求新的有效治疗藥物,减少病人痛苦,针对性的治疗恶性黑色素瘤就变得尤为迫切。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于克服现有技术的不足,提供一种人源CRYAB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:一种人源CRYAB蛋白在制备用于抗肿瘤的藥物中的应用,所述人源CRYAB蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示。

[0006] 先前研究表明CRYAB位于线粒体以及核和胞质组分中。我们发现人源CRYAB蛋白对人黑色素瘤模型的治疗可能是通过影响自噬蛋白p62的表达,从而活化caspase-8,达到抑制细胞增殖的目的,同时p62参与MAPK和NF- κ B等信号通路的调节,最终抑制细胞的侵袭和迁移。

[0007] 作为本发明所述的应用的优选实施方式,所述肿瘤为人黑色素瘤。

[0008] 作为本发明所述的应用的优选实施方式,所述人源CRYAB蛋白以溶剂化物的剂型施用。

[0009] 作为本发明所述的应用的优选实施方式,所述溶剂化物为人源CRYAB蛋白的冻干物溶于溶剂中得到。

[0010] 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。

[0011] 作为本发明所述的应用的优选实施方式,所述藥物用于皮下注射、静脉注射、肌肉注射或经鼻给药。

[0012] 本发明还提供了一种藥物组合物,所述藥物组合物包括人源CRYAB蛋白和药学上可接受的载体,所述人源CRYAB蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示。

[0013] 本发明的有益效果:

[0014] 本发明药理活性实验部分针对人源CRYAB蛋白对人源黑色素瘤模型的治疗效果进行评价,发现本发明人源CRYAB蛋白具有很好的抗肿瘤活性。

附图说明

[0015] 图1为本发明用细胞增殖实验(CCK8检测),检测CRYAB蛋白对黑色素瘤细胞A375的增殖抑制作用。

[0016] 图2为本发明用细胞克隆形成实验,检测人源CRYAB蛋白对黑色素瘤细胞A375的增殖抑制作用;其中,*: $p < 0.05$;**: $p < 0.01$ ***: $p < 0.001$ 。

[0017] 图3为本发明用Transwell侵袭实验,检测CRYAB蛋白抑制黑色素瘤细胞A375侵袭作用;其中,*: $p < 0.05$;**: $p < 0.01$ ***: $p < 0.001$ 。

具体实施方式

[0018] 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。

[0019] 实施例1 CRYAB蛋白的表达

[0020] (1) 单克隆菌的构建

[0021] 全基因合成人源CRYAB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。

[0022] (2) CRYAB蛋白表达

[0023] 准备无菌卡那霉素(KA)固体LB培养基,将步骤(1)中得到的单克隆菌涂布,过夜。挑选单克隆菌落到添加KA(50ug/ml)的LB液体培养基10ml,250rpm 37℃过夜摇菌。转接1%过夜菌到1000ml的上述液体培养基,37℃250rpm扩大摇菌3h至对数期,加入IPTG(0.5mM)于20℃、250rpm条件下诱导摇菌12h。7000rpm离心20min收集菌体,PBS清洗一遍,破菌液重悬,超声破碎60%-70%频率,10s超声10s间隔,约30min,直到菌液澄清。12000rpm离心20min,取上清,经Ni层析柱于NAT-200处洗脱。SDS-PAGE(15%),验证CRYAB的大小。7k透析袋PBS透析液16h去盐,BCA测蛋白浓度,过夜冷冻干燥,-80℃保存。

[0024] 实施例2人源CRYAB蛋白对人源黑色素瘤细胞模型的抑制作用

[0025] (1) 细胞增殖检测

[0026] 准备2000个/100u1的黑色素瘤细胞A375悬液,接种到96孔板,培养箱中培养24h(37℃,5%CO₂),CRYAB蛋白给药组(0、1.25、2.5、5、10、20mg/ml)给药24h后,加入10u1 CCK8继续孵育1h,酶标仪450nm检测OD值。计算抑制率。

[0027] 抑制率 = $[(Ac - As) / (Ac - Ab)] \times 100\%$

[0028] As: 实验孔吸光度(含细胞、培养基、CCK-8溶液和药物溶液);

[0029] Ac: 对照孔吸光度(含细胞、培养基、CCK-8溶液,不含药物);

[0030] Ab: 空白孔吸光度(含培养基、CCK-8溶液,不含细胞、药物)。

[0031] 结果如图1所示,表明随着CRYAB蛋白给药剂量的增加A375细胞的增殖抑制率升高,半数致死率IC₅₀=13.165mg/ml。

[0032] (2) 细胞克隆形成实验

[0033] 取对数期生长的黑色素瘤细胞A375,胰酶消化以后计数,500个/皿均匀种植于Φ

60mm皿中,设置对照组,CRYAB蛋白给药组(10mg/ml),待细胞团增殖6代左右,大小在0.1-1.0mm,终止培养,PBS清洗,结晶紫染色。将皿倒扣拍照计数。

[0034] 结果如图2所示,表明A375细胞的CRYAB蛋白给药组相对于对照组细胞克隆形成数量有显著性降低($P<0.1$)。CRYAB蛋白(10mg/ml)抑制了A375细胞的克隆形成。

[0035] (3) Transwell细胞迁移实验

[0036] 取细胞悬液100ul加入Transwell小室,CRYAB蛋白组(10mg/ml)给药培养24h,PBS清洗两次,多聚甲醛固定10min,结晶紫染色10min,PBS冲洗干净,显微镜拍照计数。

[0037] 结果如图3所示,表明A375细胞的CRYAB蛋白给药组相对于对照组的迁移细胞数有显著的降低($P<0.1$)。CRYAB蛋白(10mg/ml)抑制了A375细胞的迁移。

[0038] 最后所应当说明的是,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。

SEQUENCE LISTING

<110> 桂林医学院附属医院

<120> 一种人源CRYAB蛋白在制备用于抗肿瘤的藥物中的应用

<130> 2021.7.26

<160> 2

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 175

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 1

```

Met Asp Ile Ala Ile His His Pro Trp Ile Arg Arg Pro Phe Phe Pro
1           5           10           15
Phe His Ser Pro Ser Arg Leu Phe Asp Gln Phe Phe Gly Glu His Leu
           20           25           30
Leu Glu Ser Asp Leu Phe Pro Thr Ser Thr Ser Leu Ser Pro Phe Tyr
           35           40           45
Leu Arg Pro Pro Ser Phe Leu Arg Ala Pro Ser Trp Phe Asp Thr Gly
           50           55           60
Leu Ser Glu Met Arg Leu Glu Lys Asp Arg Phe Ser Val Asn Leu Asp
65           70           75           80
Val Lys His Phe Ser Pro Glu Glu Leu Lys Val Lys Val Leu Gly Asp
           85           90           95
Val Ile Glu Val His Gly Lys His Glu Glu Arg Gln Asp Glu His Gly
           100          105          110
Phe Ile Ser Arg Glu Phe His Arg Lys Tyr Arg Ile Pro Ala Asp Val
           115          120          125
Asp Pro Leu Thr Ile Thr Ser Ser Leu Ser Ser Asp Gly Val Leu Thr
           130          135          140
Val Asn Gly Pro Arg Lys Gln Val Ser Gly Pro Glu Arg Thr Ile Pro
145          150          155          160
Ile Thr Arg Glu Glu Lys Pro Ala Val Thr Ala Ala Pro Lys Lys
           165          170          175

```

<210> 2

<211> 528

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 2

atggacatcg ccatccacca cccctggatc cgccgcccct tctttccttt ccaactcccc 60
agccgcctct ttgaccagtt cttcggagag cacctggttg agtctgatct tttcccagacg 120
tctacttccc tgagtccctt ctaccttcgg ccacctcct tectgcgggc acccagctgg 180
tttgacactg gactctcaga gatgcgcctg gagaaggaca ggttctctgt caacctggat 240
gtgaagcact tctccccaga ggaactcaaa gttaagggtg tgggagatgt gattgaggtg 300
catggaaaac atgaagagcg ccaggatgaa catggtttca tctccagga gttccacagg 360
aaataccgga tcccagctga tntagacct ctaccatta cttcatcct gtcactgat 420
ggggtcctca ctgtgaatgg accaaggaaa caggtctctg gccctgagcg caccattccc 480
atcacccgtg aagagaagcc tgctgtcacc gcagcccca agaaatag 528

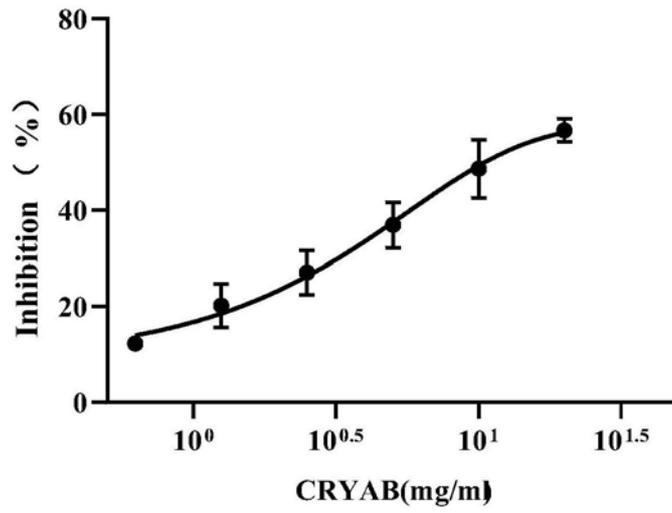


图1

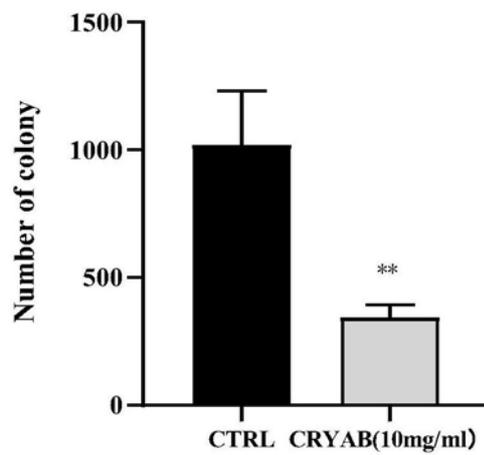
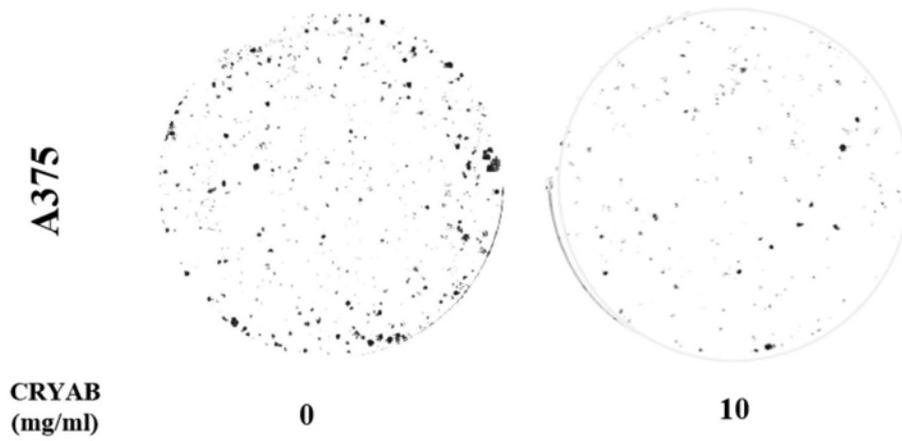


图2

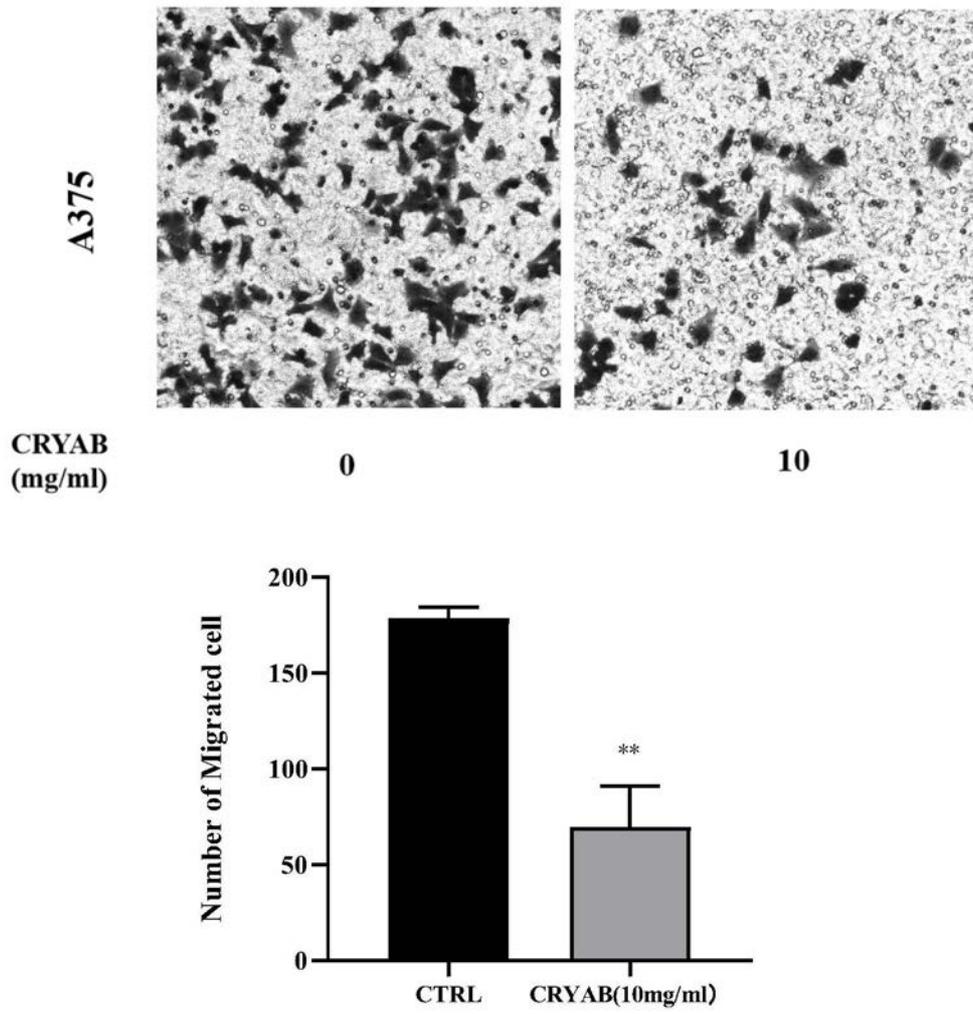


图3