



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 106610424 A

(43) 申请公布日 2017. 05. 03

(21) 申请号 201510698795. 2

(22) 申请日 2015. 10. 25

(71) 申请人 复旦大学

地址 200433 上海市杨浦区邯郸路 220 号

(72) 发明人 杨永华 姜小筱 寇鑫晖 包勇
林赵虎 张竹青 孙方卉 刘慧娟

(74) 专利代理机构 上海元一成知识产权代理事
务所(普通合伙) 31268

代理人 吴桂琴

(51) Int. Cl.

G01N 33/533(2006. 01)

G01N 33/574(2006. 01)

权利要求书2页 说明书6页 附图2页

(54) 发明名称

乙酰化热休克蛋白 90 抑制剂的筛选方法

(57) 摘要

本发明属于生物制药领域,涉及乙酰化热休克蛋白 hsp90 抑制剂的筛选方法。该筛选方法围绕 hsp90 分子中 K292 位点的乙酰化可增强 hsp90 和 CDC37 的结合及其分子伴侣功能的特点,破坏它们形成复合物的抑制剂就是乙酰化 hsp90 抑制剂;本发明的核心是 hsp90 的 K292 乙酰化, K292 位点是真实的乙酰化修饰还是 K292Q 模拟乙酰化修饰同等重要。本发明提出了“乙酰化 Hsp90-磷酸化 CDC37 复合物是肿瘤治疗新靶标”的概念,并建立了破坏乙酰化 hsp90-磷酸化 CDC37 复合物形成的乙酰化 Hsp90 抑制剂筛选模型,有助于抗肿瘤中有关热门靶标分子的研究。

1. 乙酰化热休克蛋白 90 抑制剂的筛选方法,其特征在于,其包括,

以肿瘤细胞为对象,建立稳定表达 Renilla 荧光素酶 N-端融合 K292Q-hsp90 及荧光素酶 C-端融合 S13D-CDC37 的细胞株,两种融合蛋白相互作用产生荧光素酶活性;各单一化合物处理 96 孔板中稳定细胞裂解液,依据荧光素酶活性变化程度,筛选阻止 hsp90-CDC37 复合物形成的乙酰化热休克蛋白 90 抑制剂;

或,

建立稳定表达含 K292Q 突变的 Flag-hsp90 及含 S13D 突变的 HA-CDC37 的细胞株,用 PerkinElmer 的 Alpha Technology 技术检测各单一化合物处理 96 孔板中培养的稳定细胞中 hsp90-CDC37 复合物形成产生的荧光强度变化,筛选阻止 hsp90-CDC37 复合物形成的乙酰化热休克蛋白 90 抑制剂;

或,

以肿瘤组织裂解液为对象,联合特异性识别 K292 位点乙酰化的 hsp90 抗体及特异性识别 S13 位点磷酸化的 CDC37 抗体,用 ELISA 技术检测各单一化合物处理 96 孔板中的乙酰化 hsp90-磷酸化 CDC37 复合物形成产生的信号强度变化,筛选阻止 hsp90-CDC37 复合物形成的乙酰化热休克蛋白 90 抑制剂。

2. 按权利要求 1 所述的乙酰化热休克蛋白 90 抑制剂的筛选方法,其特征在于,其中,所述的 K292 位点乙酰化的 hsp90 抗体选自用乙酰化多肽 C-QEELNK(Ac)TKP1W 免疫实验兔产生的多抗,或含 K292 位点乙酰化的任何多肽,或 hsp90 蛋白为抗原产生的抗体。

3. 按权利要求 1 所述的乙酰化热休克蛋白 90 抑制剂的筛选方法,其特征在于,其中,所述的 ELISA 检测方法中,包括采用 S13 磷酸化 CDC37 抗体包被 ELISA 板子,再用酶联 K292 乙酰化 hsp90 抗体检测两蛋白结合强弱,或采用 K292 乙酰化 hsp90 抗体包被 ELISA 板子,用酶联的 S13 磷酸化 CDC37 抗体检测它们结合强弱。

4. 按权利要求 1 所述的乙酰化热休克蛋白 90 抑制剂的筛选方法,其特征在于,其中,所述的 Renilla 荧光素酶法中,采用 K292Q-hsp90 和 NRL 偶联及 S13D-CDC37 和 CRL 偶联作用引起荧光素酶活性,或采用 K292Q-hsp90 和 CRL 偶联而 S13D-CDC37 与 NRL 偶联作用引起荧光素酶活性。

5. 按权利要求 1 所述的乙酰化热休克蛋白 90 抑制剂的筛选方法,其特征在于,采用 Renilla 荧光素酶法筛选的乙酰化 hsp90 抑制剂如下表所示:

表 1

抑制率(%)	化合物库编号	化合物
54	S1014	Bosutinib
97	S1166	Cisplatin
80	S1289	Carmofur
97	S1680	Disulfiram
58	S1748	Nisoldipine

62	S1786	Verteporfin
78	S1917	Crystal violet
97	S1949	Menadione
89	S2499	Phenoxybenzamine HCl
54	S4352	Rolitetraacycline

。

6. 按权利要求 1 所述的乙酰化热休克蛋白 90 抑制剂的筛选方法, 其特征在于, 筛选的乙酰化 hsp90 抑制剂还包括辛伐他丁及美伐他汀药物。

乙酰化热休克蛋白 90 抑制剂的筛选方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物制药领域,涉及乙酰化热休克蛋白 hsp90,尤其涉及乙酰化热休克蛋白 hsp90 抑制剂的筛选方法。

背景技术

[0002] 现有技术公开了目前发现的肿瘤的种类繁多,其特性,重要信号分子及信号途径不尽相同,所述相关的重要分子或其组合等均可能成为治疗靶标,如,肿瘤中 Cyclin D1、CDK4、AKT 或 MYC 等表达失控,或,ZAP-70、p-AKT、Cyclin D1 的短小变体、Cyclin D2、Cyclin D3 等的表达与肿瘤恶化的相关性等,研究显示,这些分子本身的活性、稳定性及其下游信号均依赖于热休克蛋白 Hsp90 的分子伴侣功能。

[0003] 研究表明,Hsp90 是高度保守、以二聚体存在的 ATP 依赖型分子伴侣,在肿瘤细胞中大量表达,其主要功能是帮助细胞的蛋白质折叠,保持蛋白正确的空间结构而发挥正常的生理活性,这些需要 Hsp90 来维持功能的蛋白分子通常被称为 Hsp90 的分子伴侣底物,其稳定性因蛋白 Hsp90 正常的分子伴侣功能而改变。有研究显示,肿瘤中诱导表达的 Hsp90 对维持肿瘤相关蛋白的空间结构及活性是不可或缺的,如肿瘤相关的蛋白激酶、核内激素转录因子的组装和拆分等;越来越多的肿瘤相关蛋白被发现是 Hsp90 的分子伴侣底物,尤其是与肿瘤转移相关的信号分子,如 c-Raf、AKT、ZAP-70、IKK α ; ER(endoplasmic reticulum) 的转膜激酶,如 IRE1(inositol requiring enzyme 1) 和 PERK(double-stranded RNA-activated protein kinase-like ER kinase); cell cycle 调控蛋白,如 cdk4、cyclin D、p21、chk1 及 wee1 等,它们与许多肿瘤的发生、转移有直接的关系,因此,肿瘤中 Hsp90 和所述肿瘤相关蛋白形成复合物并主导它们的功能,这已成为抗肿瘤研究的热门靶标分子。

[0004] 研究还表明,含 Hsp90 的分子伴侣复合物经 ATP 结合、水解循环,Hsp90 在 ATP 和 ADP 之间实现空间转换,完成 hsp90 与分子伴侣底物的结合与分离,最终导致分子伴侣底物以高活性状态存在;其中 ATP 结合部位在 Hsp90 的 N-端的疏水区域,ATP 和 N-端的结合引起 Hsp90 空间结构的变化,影响 Hsp90 和辅助伴侣分子如 p23 和 p50cdc37(如果底物是信号蛋白激酶分子的话)形成伴侣机器(chaperone machine),直接影响与肿瘤转移相关信号分子的活性和稳定性;已知 Hsp90 本身具有 ATPase 的功能,ATP 与 Hsp90 结合的复合物在 ATPase 活性作用下,水解成 ADP 结合的 Hsp90 复合物,该种复合物没有分子伴侣的功能,底物分子在泛素化 E3 连结酶的帮助下被 26S 蛋白酶体降解;对肿瘤细胞而言,维持肿瘤细胞生存的重要蛋白及蛋白激酶多数需要 Hsp90 分子伴侣功能的帮助,因此,Hsp90 对肿瘤细胞至关重要。

[0005] 还有研究基于 Hsp90 的 N-端含有 ATP 的结合部位,影响 ATP 与 Hsp90 结合的小分子化合物可以抑制 Hsp90 的分子伴侣功能,ATP 的结合部位成为目前筛选 Hsp90 抑制剂的主要筛选模型;其中,中间段是分子伴侣底物和 Hsp90 相互作用的部位,许多肿瘤相关蛋白激酶,如 AKT、c-Raf、c-Src 等都和 Hsp90 的中端部位作用;C-端的末尾含有一个 MEEVD 片段,

这一片段对 Hsp90 和含有 TPR 结构蛋白的相互作用至关重要,除去该片段将抑制 Hsp90 的 ATPase 活性,研究显示, Hsp90 结构的任何变化均可能影响 Hsp90 的功能,甚至干扰 Hsp90 和分子伴侣底物的结合,最终引起分子伴侣底物的降解。

[0006] 此外,正常生理条件下的肿瘤细胞 Hsp90 表达水平高达总蛋白的 4%,明显地比正常细胞的 1-2%高得多,这种表达水平的差异也使 Hsp90 成为一个很好的抗肿瘤药物的筛选靶标。

[0007] 格尔德霉素 (Geldanamycin, GA) 是一种天然的 Hsp90 抑制剂,特异性地干扰糖皮质激素受体 (GR)/HSP 复合物的形成,有研究公开了 GA 的衍生物 17-AAG 和 17-DMAG 与 hsp90 有很强的亲和力,它们和 hsp90 的 ATP/ADP 结合部位结合,从而阻止 hsp90 和底物相结合,使底物被蛋白酶体降解,Hsp90 的 ATP 结合部位理所当然地成为筛选 Hsp90 抑制剂的模型,以 Hsp90 的 ATP 结合部位为筛选模型,已筛选到一些 Hsp90 抑制剂,如 17-AAG、17-DMAG 和 AUY922 都促使肿瘤蛋白迅速被蛋白酶体途径降解,达到已知肿瘤细胞的目的,其中有些已进入临床试验,但迄今,尚未见成功地开发为临床用药的 Hsp90 抑制剂。

[0008] ‘蛋白乙酰化’是一种蛋白翻译后修饰,一般指蛋白质链上的 Lys (K) 的氨基接上一个乙酰基基团,而不是指蛋白链末端其他氨基;有研究显示, HATs (组蛋白乙酰化转移酶) 和 HDACs (组蛋白去乙酰化酶) 是分别控制组蛋白 N-端 Lys 乙酰化和去乙酰化的、功能相反的两类酶;乙酰化修饰是由 HDACs 和 HATs 调控的可逆过程,受环境、营养、药物等多种因素影响,乙酰化直接导致蛋白质功能的变化,通常乙酰化促进转录因子的转录活性,如 p53、E2F1、FATA1、RelA、YY1、Bcl-6 等;蛋白乙酰化的研究历史显示了,首先在组蛋白中发现乙酰化修饰,后来在非组蛋白中同样发现乙酰化修饰,由此乙酰化对非组蛋白 P53 和 FoxO1 的功能影响研究使蛋白乙酰化成为研究的热点之一,即在细胞中,蛋白质是主要的信息调控和传递的分子,任何修饰都会对蛋白的功能产生或正或负面的影响,合理利用这些负面影响对肿瘤细胞可能是致命的;HDAC 分为 HDAC-1、11、111 三类,目前发现的 18 个不同的 HDAC 蛋白中,有多个可以抑制 HDAC-1/11/111 的抑制剂,其中 HDAC-1/11 抑制剂显现出较突出的肿瘤防治价值。

[0009] 还有研究报道了 HDAC 抑制剂,如 SAHA (Vorinostat)、LAQ824、LBH 589 增加 p21、p27 的表达,和诱导促凋亡蛋白如 Bax、Bak 和 Bim 的表达,同时影响抗凋亡蛋白如 Bcl-x1、XIAP、AKT、c-Raf 和 Survivin 的水平;具有抑制肿瘤细胞增殖、细胞周期阻滞、诱导细胞分化及促进细胞凋亡的作用的组蛋白去乙酰化酶抑制剂,其中 SAHA、LBH 589 和 FK228 已上市,MS-275、Trichostatin (TSA) 及西达苯胺等多种组蛋白去乙酰化酶抑制剂已进入临床研究。

[0010] 目前, Hsp90 抑制剂的筛选通常基于大肠杆菌表达的 Hsp90 的 ATP 结合片段为模型筛选,筛选的小分子化合物对肿瘤 Hsp90 抑制效果有限,还诱导 hsp70 的表达而使肿瘤细胞产生抗药性;以 hsp90-CDC37 复合物为靶标筛选的 hsp90 抑制剂,可以破坏 hsp90-CDC37 复合物的形成,hsp90 抑制剂一般不诱导 hsp70 的表达,因此比以 ATP 结合部位为靶标的筛选更具优势,尽管 CDC37 对激酶的稳定性及活性必不可少,但 CDC37 必须是经磷酸化激活的形式才能与未成熟的激酶结合,然后在 hsp90-CDC37 复合物作用下使激酶成熟活化。

[0011] 本申请前期研究显示, hsp90 中 7 个位点可被 HDAC 抑制剂 LBH589 诱导产生乙酰化,分别是 K69、K100、K292、K327、K478、K546 和 K558。经过乙酰化模拟突变 K/Q 分析发现,

在 C- 端的乙酰化都破坏 hsp90 的功能 ;但在中间段乙酰化则显示,K292 位于 hsp90 中端起始部位的链接 (hinge) 区域在各种物种中是高度保守的,K292 位点的乙酰化极大地增强了 hsp90 与 ATP、激酶伴侣分子 p50cdc37 及泛素化 E3 连结酶 CHIP 的结合,这意味着 hsp90 如果在 K292 位点上乙酰化的话,将使失活的蛋白激酶更快地降解, hsp90 发挥分子伴侣功能时对 ATP 的浓度要求降低,其分子伴侣功能更强大,这将显著增强肿瘤细胞的抗药性和蛋白激酶的信号,更有利于肿瘤细胞的生长,促使肿瘤细胞的转移扩散。

[0012] 另一个事实是,hsp90 的 K292 位点的乙酰化和肿瘤大小及肿瘤的恶化程度有着紧密的相关性,实验结果显示,肿瘤组织细胞而非正常组织细胞中 Hsp90 的 K292 位点是以乙酰化修饰形式存在,hsp90 中 K292 的乙酰化和肿瘤大小相对应,也与肿瘤恶化程度相对应;一般认为 Hsp90 乙酰化使肿瘤细胞死亡,不同意见则认为不同部位的乙酰化对 hsp90 的功能影响是不同的,不一定导致肿瘤细胞的死亡。

[0013] 基于现有技术研究现状,本申请的发明人拟提出“乙酰化 Hsp90- 磷酸化 CDC37 复合物是肿瘤治疗新靶标”的概念,以此建立破坏乙酰化 hsp90- 磷酸化 CDC37 复合物形成的乙酰化 Hsp90 抑制剂筛选模型。

发明内容

[0014] 本发明的目的是,基于现有技术研究现状,提供乙酰化热休克蛋白 hsp90 抑制剂的筛选方法。

[0015] 该筛选方法围绕 hsp90 分子中 K292 位点的乙酰化可增强 hsp90 和 CDC37 的结合及其分子伴侣功能的特点,破坏它们形成复合物的抑制剂就是乙酰化 hsp90 抑制剂;本发明的核心是 hsp90 的 K292 乙酰化,K292 位点是真实的乙酰化修饰还是 K292Q 模拟乙酰化修饰同等重要。

[0016] 本发明基于乙酰化热休克蛋白 90 (hsp90) 与磷酸化 CDC37 形成保护肿瘤相关蛋白激酶稳定性和活性的复合物,破坏该复合物形成的化合物即乙酰化 hsp90 抑制剂依据,采用特异性识别 K292 位点乙酰化的 hsp90 抗体,以及利用 K292 乙酰化 hsp90 (或 K292Q 模拟乙酰化 hsp90) 与 CDC37 磷酸化 (或 S13D 模拟磷酸化 CDC37) 复合物的解离筛选乙酰化 hsp90 抑制剂。

[0017] 具体而言,本发明提供了一种抑制乙酰化 hsp90- 磷酸化 CDC37 复合物形成的 hsp90 小分子抑制剂筛选模型,该活性小分子化合物阻止磷酸化的 CDC37 与乙酰化的 hsp90 形成复合物,阻断了蛋白激酶成熟的路径,其原理如图 1 所示。

[0018] 本发明中,乙酰化 hsp90 可以是细胞体内或体外经 HDAC 抑制剂等诱导产生,也可以是肿瘤组织中天然存在的含 K292 位点乙酰化的 hsp90,还包括模拟 K292 位点乙酰化的 K292Q-hsp90 ;

[0019] 本发明中,磷酸化的 CDC37 可以是细胞体内或体外含 Ser13 位点磷酸化修饰的 CDC37,也可以是模拟 Ser13 磷酸化的 S13D-CDC37 ;

[0020] 本发明中,采用的测试的指标是乙酰化 hsp90- 磷酸化 CDC37 复合物形成的多少,但该复合物中乙酰化 hsp90 及磷酸化 CDC37 的标记可以是多种多样的,但本发明的目的即目标是建立阻止乙酰化 hsp90- 磷酸化 CDC37 形成复合物的小分子化合物的筛选方法。

[0021] 更具体的,本发明的乙酰化热休克蛋白 90 抑制剂的筛选方法,其通过下述技术方

案实现：

[0022] (1) 以肿瘤细胞为对象,建立稳定表达 Renilla 荧光素酶 N-端融合 K292Q-hsp90 及荧光素酶 C-端融合 S13D-CDC37 的细胞株,两种融合蛋白相互作用时产生荧光素酶活性;各单一化合物处理 96 孔板中稳定细胞裂解液,依据荧光素酶活性变化程度,筛选出阻止 hsp90-CDC37 复合物形成的乙酰化 hsp90 抑制剂;

[0023] (2) 建立稳定表达含 K292Q 突变的 Flag-hsp90 及含 S13D 突变的 HA-CDC37 的细胞株,用 PerkinElmer 的 Alpha Technology 技术检测各单一化合物处理 96 孔板中培养的稳定细胞中 hsp90-CDC37 复合物形成产生的荧光强度变化,由此筛选出阻止 hsp90-CDC37 复合物形成的乙酰化 hsp90 抑制剂;

[0024] (3) 以肿瘤组织裂解液为对象,联合特异性识别 K292 位点乙酰化的 hsp90 抗体及特异性识别 S13 位点磷酸化的 CDC37 抗体,用 ELISA 技术检测各单一化合物处理 96 孔板中的乙酰化 hsp90-磷酸化 CDC37 复合物形成产生的信号强度变化,由此筛选出阻止 hsp90-CDC37 复合物形成的乙酰化 hsp90 抑制剂。

[0025] 本发明的乙酰化热休克蛋白 hsp90 抑制剂的筛选方法基于 hsp90 分子中 K292 位点的乙酰化可增强 hsp90 和 CDC37 的结合及其分子伴侣功能的特点,破坏它们形成复合物的抑制剂即乙酰化 hsp90 抑制剂,提出“乙酰化 Hsp90-磷酸化 CDC37 复合物是肿瘤治疗新靶标”的概念,并建立了破坏乙酰化 hsp90-磷酸化 CDC37 复合物形成的乙酰化 Hsp90 抑制剂筛选模型,有助于抗肿瘤中有关热门靶标分子的研究。

附图说明

[0026] 图 1. 筛选原理示意图,

[0027] 其中, P- 表示磷酸化修饰基团, Ack 表示乙酰化修饰基团。

[0028] 图 2. ack292-hsp90 抗体专一性,

[0029] 其中, ack 表示 C-QEEL NK(Ac)TKP1W 乙酰化多肽, non-ack 表示 C-QEEL NKTKP1W 非乙酰化多肽。

[0030] 图 3. K292 乙酰化 hsp90 在乳腺癌组织中的表达。

[0031] 图 4. K292 乙酰化 hsp90 在乳腺癌发展过程中的表达。

[0032] 图 5. K292 乙酰化增强 hsp90 与辅助分子伴侣的结合。

[0033] 图 6. 荧光素酶法筛选乙酰化 hsp90 抑制剂示意图。

具体实施方式

[0034] 下面结合实验例对本发明进一步详细描述,但不限制本发明。

[0035] 实施例 1. 制备特异性识别 K292 乙酰化 hsp90 抗体

[0036] 分别合成 15mg 的乙酰化多肽 C-QEEL NK(Ac)TKP1W 和非乙酰化多肽 C-QEEL NKTKP1W,每条多肽纯度大于 85%;乙酰化多肽与 KLH 偶联作为免疫抗原,乙酰化多肽及非乙酰化多肽分别与 BSA 偶联作为检测抗原;

[0037] 使用免疫抗原免疫 4 只新西兰白兔,每只兔子免疫 4-5 次后处死,分离血清,然后用乙酰化多肽及非乙酰化多肽分别制备亲和纯化柱,亲和纯化乙酰化特异性抗体 ack292-hsp90。为了检测 ack292-hsp90 抗体的专一性,将乙酰化多肽 (ack) 和非乙酰化

多肽 (Non-ack) 依下图剂量点在硝酸纤维素 (NC) 膜上, 晾干后用 5% 脱脂牛奶封闭, 经 Western 检测 ack292-hsp90 抗体的专一性发现, 该抗体只识别乙酰化多肽而不识别非乙酰化多肽; 图 2 显示了 ack292-hsp90 是特异性识别 K292 乙酰化多肽的专一性抗体。

[0038] 实施例 2. 热休克蛋白 hsp90 的 K292 位点乙酰化与肿瘤发展的相关性实验

[0039] 本实施例中进行了乳腺癌患者临床样本的检测, 结果显示, 癌症患者组织中 K292 位点乙酰化的 hsp90 明显比正常组织中 hsp90 乙酰化水平高 (如图 3 所示),

[0040] 同样, 用 ack292-hsp90 抗体检测小鼠中肿瘤发展过程中的 hsp90 乙酰化情况, 用 10% 的 FBS 培养基培养过夜的 MDA-MB-231 乳腺癌细胞经消化后稀释成含 2×10^7 个 /ml 的细胞悬浮液, Balb/c 裸鼠接种 2×10^6 个 MDA-MB-231 细胞, 接种肿瘤细胞两周后 (肿瘤约长至 100mm^3) 收集小鼠肿瘤样本, 用 ack292-hsp90 抗体检测小鼠肿瘤样本中 hsp90 中 K292 位点的乙酰化水平, 结果显示, CDC37 及活性 CDC37 在乳腺癌发展过程中的表达水平不随肿瘤的发展而变化; 同样, hsp90 的表达水平无明显变化, 但肿瘤组织中 K292 位点乙酰化的 hsp90 随着肿瘤的不断发展, 其表达水平不断升高, 结果表明, K292 乙酰化的 hsp90 和肿瘤的发展呈现正相关 (如图 4 所示)。

[0041] 实施例 3 K292 乙酰化修饰增强 hsp90 与辅助伴侣分子形成复合物

[0042] 构建含 flag- 标签的 hsp90 表达质粒, 在此基础上再用 PCR- 定点突变的方法构建含 K292Q 突变和 K292R 突变的 flag-hsp90 表达质粒, 其中 K292Q 用来模拟乙酰化修饰; 乳腺癌肿瘤细胞 MDA-MB-231 于 37°C 、5% 的 CO_2 培养条件下, 分别转染 flag-hsp90 表达质粒, 继续培养 24 小时, 细胞裂解液用 M2-beads 免疫沉淀后, 检测 hsp90 和辅助分子伴侣形成复合物的能力, 结果显示, K292 位点的乙酰化促进 Hsp90 与辅助分子伴侣的结合, 但并不影响各种辅助分子伴侣在肿瘤细胞中的表达 (如图 5 所示)。

[0043] 实施例 4. Renilla 荧光素酶法筛选乙酰化 hsp90 抑制剂

[0044] 构建 Renilla 荧光素酶的 N- 端 (1-229, NRL) 和含 K292Q 突变 hsp90 的 N- 端融合表达质粒 (NRL-hsp90-K292Q) 及 Renilla 荧光素酶的 C- 端 (230-311, CRL) 和含 S13D 突变 CDC37 的 C- 端融合表达质粒 (CDC37-S13D-CRL), 建立稳定表达 NRL-hsp90-K292Q 及 CDC37-S13D-CRL 的肿瘤细胞株, 两种融合蛋白相互作用时会使荧光素酶活性恢复, 因此, 稳定细胞株以荧光素酶活性强度为选择依据, 选取荧光素酶活性强度最高的用于后面的实验;

[0045] 稳定细胞于 37°C 和 5% 的 CO_2 条件下培养 24 小时后裂解, 将裂解液置于 96 孔板中, 用各单一化合物处理 96 孔板中稳定细胞裂解液, 4°C 孵育 1 小时后检测荧光强度变化, 依据荧光强度变化程度, 筛选出阻止 hsp90-CDC37 复合物形成的乙酰化 hsp90 抑制剂;

[0046] 本实施例中用上述方法筛选含 1080 个 FDA 批准的药品化合物库, 筛选结果显示抑制率大于 50% 的药物如表 1 所示:

[0047] 表 1 荧光素酶筛选结果

[0048]

抑制率 (%)	化合物库编号	化合物
54	S1014	Bosutinib

97	S1166	Cisplatin
80	S1289	Carmofur
97	S1680	Disulfiram
58	S1748	Nisoldipine
62	S1786	Verteporfin
78	S1917	Crystal violet
97	S1949	Menadione
89	S2499	Phenoxybenzamine HCl
54	S4352	Rolitetracycline

[0049] 实施例 5 用 PerkinElmer 的 Alpha Technology 技术检测乙酰化 hsp90 抑制剂

[0050] 构建含 K292Q 突变的 Flag-hsp90 及含 S13D 突变的 HA-CDC37 表达质粒, 建立稳定表达 Flag-hsp90-K292Q 及 HA-CDC37-S13D 的肿瘤细胞株; 稳定细胞于 37℃ 和 5% 的 CO₂ 条件下培养 24 小时后裂解, 将裂解液置于 96 孔板中, 用各单一化合物处理 96 孔板中稳定细胞裂解液, 4℃ 孵育 1 小时后, 用 PerkinElmer 的 Alpha Technology 技术检测各单一化合物处理 96 孔板中 K292Q-hsp90-CDC37-S13D 复合物形成产生的荧光强度变化, 由此筛选出阻止 hsp90-CDC37 复合物形成的乙酰化 hsp90 抑制剂。

[0051] 实施例 6 用 ELISA 技术检测乙酰化 hsp90 抑制剂

[0052] 基于肿瘤组织中 hsp90 的 K292 位点乙酰化修饰程度高的依据, 本实施例以肿瘤组织裂解液为对象, 联合特异性识别 K292 位点乙酰化的 hsp90 抗体及特异性识别 S13 位点磷酸化的 CDC37 抗体, 采用 ELISA 技术筛选乙酰化 hsp90 抑制剂;

[0053] 用小鼠移植瘤或离体的肿瘤患者的肿瘤组织为乙酰化 hsp90 的来源, 将肿瘤组织裂解液置于 96 孔板中, 各单一化合物处理 96 孔板中的乙酰化 hsp90- 磷酸化 CDC37 复合物形成, 4℃ 孵育 1 小时; 将 96 孔板中样品同体积地转移到用 S13 位点磷酸化 CDC37 抗体包被的 ELISA 板中, 37℃ 孵育 1 小时, 再用酶标记的特异性识别 K292 位点乙酰化的 hsp90 抗体 37℃ 孵育 1 小时后, 加入 TMB 底物溶液, 37℃ 继续孵育 10 ~ 30 分钟, 检测各单一化合物处理 96 孔板中的乙酰化 hsp90- 磷酸化 CDC37 复合物形成产生的信号强度变化, 筛选出阻止 hsp90-CDC37 复合物形成的乙酰化 hsp90 抑制剂;

[0054] 本实施例中筛选出的能有效抑制乙酰化 hsp90 和 CDC37 复合物的形成的乙酰化 hsp90 抑制剂如表 1 所示; 还包括辛伐他丁及美伐他汀药物。

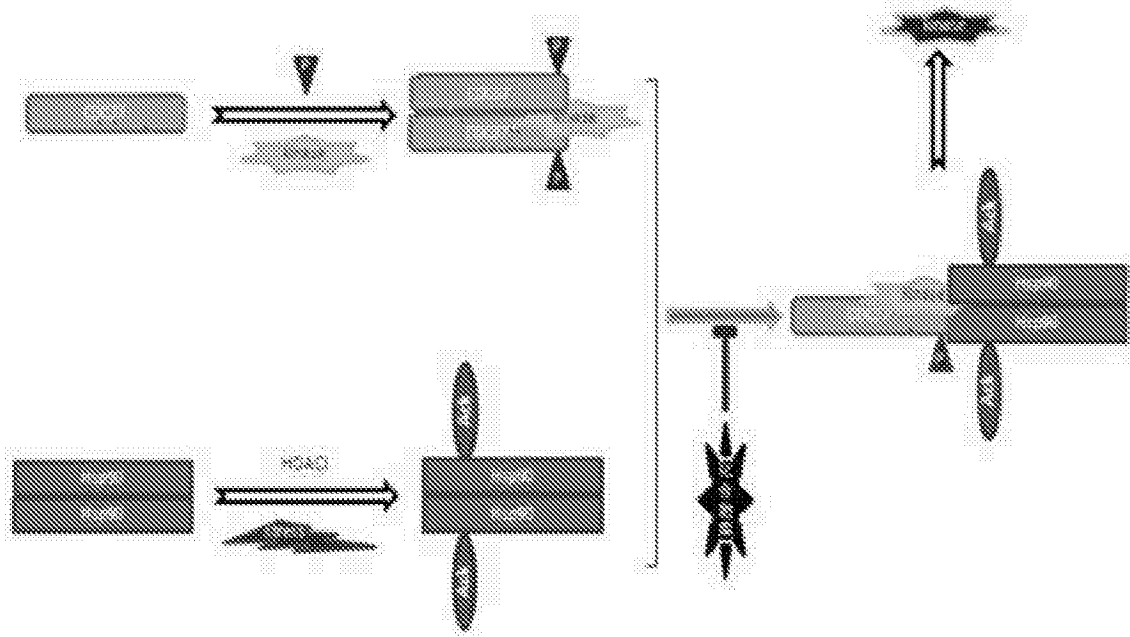


图 1

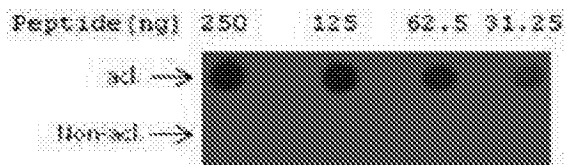
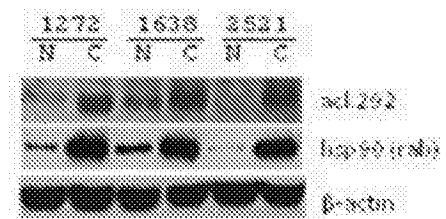


图 2



N: 正常组织; C: 癌症组织

图 3

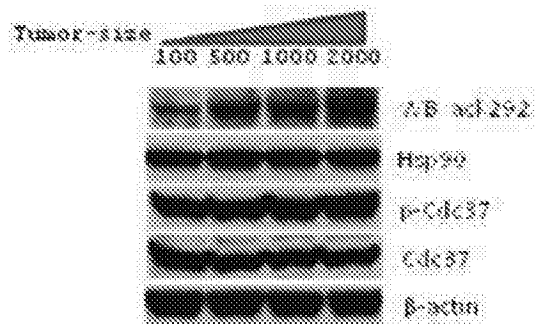


图 4

专利名称(译)	乙酰化热休克蛋白90抑制剂的筛选方法		
公开(公告)号	CN106610424A	公开(公告)日	2017-05-03
申请号	CN201510698795.2	申请日	2015-10-25
[标]申请(专利权)人(译)	复旦大学		
申请(专利权)人(译)	复旦大学		
当前申请(专利权)人(译)	复旦大学		
[标]发明人	杨永华 姜小筱 寇鑫晖 包勇 林赵虎 张竹青 孙方卉 刘慧娟		
发明人	杨永华 姜小筱 寇鑫晖 包勇 林赵虎 张竹青 孙方卉 刘慧娟		
IPC分类号	G01N33/533 G01N33/574		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/57484		
代理人(译)	吴桂琴		
其他公开文献	CN106610424B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于生物制药领域，涉及乙酰化热休克蛋白hsp90抑制剂的筛选方法。该筛选方法围绕hsp90分子中K292位点的乙酰化可增强hsp90和CDC37的结合及其分子伴侣功能的特点，破坏它们形成复合物的抑制剂就是乙酰化hsp90抑制剂；本发明的核心是hsp90的K292乙酰化，K292位点是真实的乙酰化修饰还是K292Q模拟乙酰化修饰同等重要。本发明提出了“乙酰化Hsp90-磷酸化CDC37复合物是肿瘤治疗新靶标”的概念，并建立了破坏乙酰化hsp90-磷酸化CDC37复合物形成的乙酰化Hsp90抑制剂筛选模型，有助于抗肿瘤中有关热门靶标分子的研究。

