(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 101918843 A
(43)申请公布日 2010.12.15

(21)申请号 200880017561.5

(22)申请日 2008.03.26

(30)优先权数据
60/908,107 2007.03.26 US

(85)PCT申请进入国家阶段日
2009.11.26

(86)PCT申请的申请数据
PCT/US2008/058323 2008.03.26

(87)PCT申请的公布数据
WO2008/118991 EN 2008.10.02

(71)申请人 南加州大学
地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 阿克赛尔·H.·舍恩塔尔
尼科斯·A.·佩塔西斯
佛罗伦斯·M.·霍夫曼
斯坦·G.·路易 托马斯·C.·陈

(74)专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司 11127
代理人 丁香兰 庞东成

(51)Int.Cl.
G01N 33/574(2006.01)
C12N 5/00(2006.01)

权利要求书 3 页 说明书 30 页 附图 16 页

(54)发明名称

用于通过刺激内质网应激来诱导细胞凋亡的方法和组合物

(57)摘要

本发明提供了通过加重ER应激而在选中的细胞中诱导细胞凋亡的方法。通过抑制SERCA(肌浆/内质网钙ATP酶)以特异性方式实现ER应激的加重,从而导致胞质钙浓度水平升高而不抑制COX-2(环氧化酶-2)的活性或引发组胺释放。通过经抑制蛋白酶体或蛋白酶来首先诱导或进一步加重ER应激可以增强对细胞凋亡的诱导。此外,本发明还提供了可用作ER应激加重剂的化合物和组合物、用于筛选、选择、鉴定和设计所述化合物和组合物的方法以及通过经特异性和选择性加重ER应激来诱导细胞凋亡从而治疗疾病状况的方法。

CN 101918843 A

1. 一种诱导或加重细胞内质网 (ER) 中的应激以引发细胞凋亡的方法，所述方法包括：

选择性抑制所述细胞中的 SERCA 活性而不抑制 COX-2 活性；并提高所述细胞中的 CHOP 表达，

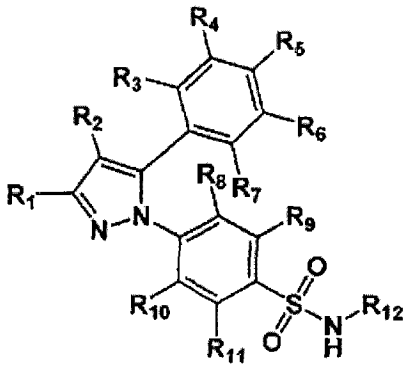
其中，抑制 SERCA 活性和提高 CHOP 表达的组合导致有利于启动所述细胞中的细胞凋亡的情况。

2. 如权利要求 1 所述的方法，其中，以足以将胞质钙浓度升高至显著高于正常水平从而导致细胞凋亡的持续时间，直接或间接地施用药物有效量的能选择性抑制 SERCA 的 ER 应激加重剂，由此来完成所述选择性抑制 SERCA 的步骤。

3. 如权利要求 2 所述的方法，其中，所述 ER 应激加重剂不抑制 COX-2。

4. 如权利要求 2 所述的方法，其中，所述 ER 应激加重剂不引发组胺释放。

5. 如权利要求 3 所述的方法，其中，所述 ER 应激加重剂包括具有下述通式的化合物：



其中，

R_1 是甲基、氟甲基、二氟甲基、三氟甲基、烷基、氟烷基、二氟烷基、三氟烷基、多氟烷基、羟烷基或羧烷基；

R_2 是氢、氟、氯、溴；氟甲基、二氟甲基、三氟甲基、烷基、氟烷基、二氟烷基、三氟烷基、多氟烷基、羟烷基或羧烷基；

R_3 ～ R_7 独立地选自由以下基团组成的组：氢、氟、氯、溴、烷氧基、烷基、氟烷基、二氟烷基、三氟烷基、多氟烷基、羟烷基或羧烷基、芳基和杂芳基；

R_8 ～ R_{11} 独立地选自由以下基团组成的组：氢、氟、氯、溴；氟甲基、二氟甲基、三氟甲基、烷基、氟烷基、二氟烷基、三氟烷基、多氟烷基、羟烷基、羧烷基、烯基、炔基、环烷基、杂环基、芳基或杂芳基；和

R_{12} 是氢、乙酰基、酰基、烷基、氟烷基、二氟烷基、三氟烷基、多氟烷基、羟烷基、羧烷基；氨基酰基、氨基烷基、环烷基、杂环基、芳基或杂芳基。

6. 如权利要求 5 所述的方法，其中，R_1 是三氟甲基。

7. 如权利要求 5 所述的方法，其中，R_2、R_8 ～ R_{12} 是氢。

8. 如权利要求 5 所述的方法，其中，R_4、R_5 和 R_7 是氢。

9. 如权利要求 5 所述的方法，其中，R_1 是三氟甲基，R_2、R_4、R_5、R_7 ～ R_{12} 是氢。

10. 如权利要求 5 所述的方法，其中，R_3 和 R_6 选自由以下基团组成的组：氢、氟、氯、溴；氟甲基、二氟甲基、三氟甲基、烷基、芳基、杂芳基、氟烷基、二氟烷基、三氟烷基、多氟烷基、羟烷基或羧烷基。

11. 如权利要求 2 所述的方法，其中，所述 ER 应激加重剂是 4-[5-(2,5- 二甲基苯

基)-3-(三氟甲基)-1H-吡唑-1-基]苯磺酰胺、4-[5-(2,5-二(三氟甲基)苯基)-3-(三氟甲基)-1H-吡唑-1-基]苯磺酰胺和4-[5-(2,5-二溴苯基)-3-(三氟甲基)-1H-吡唑-1-基]苯磺酰胺或其类似物。

12. 如权利要求2所述的方法,其中,所述ER应激加重剂包括能代谢为SERCA抑制剂的前药。

13. 如权利要求1所述的方法,所述方法还包括施用第二ER应激加重剂的步骤,所述第二ER应激加重剂能增加所述ER中错折叠或受损的蛋白质的浓度。

14. 如权利要求13所述的方法,其中,所述第二ER应激加重剂包括蛋白酶体抑制剂或蛋白酶抑制剂。

15. 如权利要求14所述的方法,其中,所述蛋白酶体抑制剂是硼替佐米或其类似物。

16. 如权利要求14所述的方法,其中,所述蛋白酶抑制剂是选自奈非那韦、阿扎那韦、福沙那韦、利托那韦、茚地那韦或其类似物的HIV蛋白酶抑制剂。

17. 如权利要求1所述的方法,所述方法还包括施用细胞凋亡增强物的步骤。

18. 如权利要求17所述的方法,其中,所述细胞凋亡增强物能够上调CHOP表达、克服GRP78的保护功能并激活半胱天冬酶。

19. 如权利要求17所述的方法,其中,所述细胞凋亡增强物是GRP78用siRNA或GRP78功能的抑制剂。

20. 一种用于筛选、选择或设计能用于诱导或加重细胞中的ER应激以引发细胞凋亡的方法,所述方法包括下述步骤:

获取测试化合物的信息,其中所述信息包括SERCA抑制活性、COX-2抑制活性和组胺释放活性;和

如果所述测试化合物是SERCA抑制剂而不是COX-2抑制剂,则将所述化合物鉴定为潜在的ER应激加重剂。

21. 如权利要求20所述的方法,其中,所述获取步骤包括进行生化测试、基于细胞的测试或在线数据库搜索。

22. 如权利要求20所述的方法,所述方法还包括对多个测试化合物重复所述获取步骤和鉴定步骤。

23. 如权利要求22所述的方法,其中,所述获取、鉴定和重复步骤以高通量筛选形式进行。

24. 如权利要求22所述的方法,其中,所述多个测试化合物取自化学库。

25. 如权利要求22所述的方法,所述方法还包括:

对一组经鉴定为潜在的ER应激加重剂的选定化合物进行定量构效关系(QSAR)分析;

使用所述QSAR分析的结果设计一种或多种新测试化合物;和

对所述新测试化合物进行所述获取步骤和鉴定步骤。

26. 一种药物组合物,所述药物组合物能用于诱导或加重细胞中的ER应激以引发所述细胞的凋亡,且所述药物组合物包含:

ER应激加重剂;和

可药用载体。

27. 如权利要求26所述的药物组合物,其中,所述ER应激加重剂选自权利要求5所述

的化合物。

28. 如权利要求 26 所述的药物组合物，其中，所述 ER 应激加重剂是能被代谢为 SERCA 抑制剂的前药。

29. 如权利要求 26 所述的药物组合物，其中，所述 ER 应激加重剂能增加所述 ER 中错折叠或受损的蛋白的浓度。

30. 如权利要求 29 所述的药物组合物，其中，所述第二 ER 应激是蛋白酶体抑制剂或蛋白酶抑制剂。

31. 一种药物组合物，所述药物组合物包含第一 ER 应激加重剂和能增加所述 ER 中错折叠或受损的蛋白的浓度的第二 ER 应激加重剂，所述第一 ER 应激加重剂是权利要求 5 所述的化合物。

32. 一种治疗患者的疾病状况的方法，所述方法通过诱导或加重选定的患病细胞中的 ER 应激以引发所述细胞的凋亡而进行，且所述方法包括 ：

施用药物有效量的权利要求 26 所述的药物组合物。

33. 如权利要求 32 所述的方法，其中，所述患病细胞在所述施用步骤之前处于 ER 应激状态中。

34. 如权利要求 32 所述的方法，所述方法还包括施用药物有效量的权利要求 18 所述的细胞凋亡增强物。

35. 如权利要求 32 所述的方法，所述方法还包括施用药物有效量的第二药物组合物，所述第二药物组合物含有能增加所述 ER 中错折叠或受损的蛋白的浓度的不同 ER 应激加重剂。

36. 如权利要求 35 所述的方法，其中，所述不同 ER 应激加重剂是蛋白酶体抑制剂或蛋白酶抑制剂。

37. 如权利要求 32 所述的方法，其中，所述疾病状况由细胞凋亡失调造成。

38. 如权利要求 37 所述的方法，其中，所述疾病是癌症。

39. 如权利要求 38 所述的方法，其中，所述癌症是多形性胶质母细胞瘤。

40. 如权利要求 38 所述的方法，其中，所述癌症选自乳腺癌、胰腺癌、伯基特氏淋巴瘤、多发性骨髓瘤、成神经细胞瘤、前列腺癌、结肠直肠癌、复发性癌症、转移性乳腺癌、抗化疗肿瘤和抗药性癌症。

41. 一种加重细胞内质网 (ER) 中的应激以引发细胞凋亡的方法，所述细胞处于低 ER 应激状态，所述低 ER 应激状态经高于正常细胞通常 GRP78 水平的 GRP78 水平而证实，所述方法包括 ：

提供抑制所述细胞中的 SERCA 活性从而导致 CHOP 表达提高的化合物，

其中，抑制 SERCA 活性和提高 CHOP 表达的组合导致有利于启动所述细胞中的细胞凋亡的情况。

42. 如权利要求 41 所述的方法，其中，所述化合物不是 COX-2 抑制剂或组胺释放剂。

43. 如权利要求 41 所述的方法，其中，所述化合物根据权利要求 5 而选择。

用于通过刺激内质网应激来诱导细胞凋亡的方法和组合物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求提交于2007年3月26日的题目为“刺激肿瘤细胞中的内质网(ER)应激响应从而导致肿瘤细胞死亡的化合物的应用(USE OFCHEMICAL COMPOUNDS TO STIMULATE THE ENDOPLASMICRETICULUM(ER)STRESS RESPONSE IN TUMOR CELLS CAUSINGTUMOR CELL DEATH)”的美国临时申请第60/908,107号中公开的发明的权利。本文要求所述美国临时申请的权益。由此通过参考将上述优先权申请并入本文。

技术领域

[0003] 本发明涉及分子医学领域。更具体而言,本发明涉及用于通过加重ER应激响应来选择性诱导细胞凋亡的方法、化合物和组合物。本发明还涉及用于治疗癌症的方法,包括难以治疗的癌症、抗药性癌症和复发性癌症。

背景技术

[0004] 细胞凋亡是与编程性细胞死亡或“细胞自杀”有关的过程,且在生理学条件下细胞凋亡在细胞表面死亡受体被各种基因毒性试剂占据或激活后发生。该过程导致细胞色素C的线粒体释放,这反过来激活促进细胞凋亡的半胱天冬酶。

[0005] 自从1972年Kerr等(1)首次描述了细胞凋亡后,已经积累了很多有关这一重要细胞过程的知识。尽管尚未在分子水平和细胞水平得到对细胞凋亡的全面理解,迄今所积累的知识已使人们意识到,由于所述过程经遗传编程,因此它可能易受突变的影响并因此可能与如病毒感染、自身免疫性疾病和癌症等许多人类疾病的发病机理有关(2,3)。基于这一认识,已经广范认可,任何针对在遭受细胞凋亡失调的患病细胞中(例如,癌症)特异性引发细胞凋亡的治疗策略都可带来可能有希望的治疗。

[0006] 在近期的一篇文章中,Ferreira等(4)对目前的利用细胞凋亡的治疗潜力的策略进行了综述。总的来说,该综述指出现有的基于细胞凋亡的治疗用策略可以被分为两类:促凋亡法和许可凋亡法。表1显示了各类中的示例性方法的列表。

[0007] 促凋亡法是旨在直接诱导细胞凋亡的策略。这些方法试图通过利用如死亡受体和半胱天冬酶等现存细胞参与物和途径或通过导入如凋亡素(apoptin)等外源性促凋亡分子来实现细胞凋亡。促凋亡策略可以涉及:(a)直接导入促凋亡参与物;(b)调节抗凋亡分子;或(c)恢复肿瘤抑制基因的功能。然而,促凋亡策略并非基于正常细胞与癌细胞之间的结构差异。因此,在获得肿瘤细胞特异性的同时使毒性最小化成为这类方法的发展中的巨大障碍。例如,靶向如TNF和Fas等死亡受体的实验疗法已造成数种组织中的缺血性和出血性损害。

[0008] 另一方面,许可凋亡法基于以下前提:通过阻断某些介导在正常条件下有助于保持细胞稳态的存活信息的复杂信号途径可以引发细胞凋亡。这类策略没有促凋亡策略的非特异性毒性问题,但是这类策略的成功发展极大地取决于对促进细胞凋亡的机理的详细认识。迄今为止,对于导致细胞凋亡的次生效应的这类机理的理解和认识仍不完全。

[0009] 因此，仍然需要选择性诱导患病细胞中的细胞凋亡的新策略以及用于实施所述策略的新手段和方法。

发明内容

[0010] 于是，本发明的一个目的是提供用于诱导细胞凋亡的方法，所述方法可以做为新疗法的基础。

[0011] 本发明的另一个目的是提供可用作细胞凋亡诱导剂的化合物和组合物。

[0012] 本发明的再一个目的是提供用于筛选、选择和发现可用作细胞凋亡诱导剂的化合物的方法。

[0013] 本发明的又一个目的是提供用于治疗疾病的基于细胞凋亡的治疗方法。

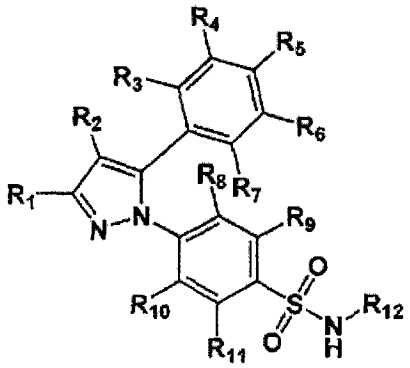
[0014] 连同以下对单独的优选实施方式或其组合的详细描述，本发明的这些目的和其它目的将变得更加显而易见，而对于导致细胞凋亡的新的内质网 (ER) 应激响应机理的出人意料的发现满足了本发明的这些目的和其它目的。

[0015] 在第一方面，本发明提供了诱导或加重细胞 ER 中的应激以引发细胞凋亡的方法。本发明该方面的实施方式通常包括以下步骤：选择性抑制细胞中的肌浆 /ER 钙 ATP 酶 (SERCA) 活性而不抑制环氧化酶 -2(COX-2) 活性；并提高细胞中 CCAAT/ 增强物结合蛋白同源转录因子（也称为 GADD153：可诱导生长停滞和 DNA 损伤的基因 153(CHOP)）的表达。SERCA 活性的抑制和 CHOP 表达的提高的组合造成了有利于启动细胞中细胞凋亡的情况。

[0016] 在第二方面，本发明提供了用于筛选、选择或设计可用于诱导或加重细胞内 ER 应激以引发细胞凋亡的化合物的方法。本发明该方面的实施方式通常包括下述步骤：获取有关测试化合物的信息，并且如果该测试化合物是 SERCA 抑制剂而非 COX-2 抑制剂则将其鉴定为潜在的 ER 应激加重剂。

[0017] 在第三方面，本发明提供了可用作 ER 应激加重剂的化合物，所述化合物具有下述通式：

[0018]



[0019] 其中，

[0020] R_1 是甲基、氟甲基、二氟甲基、三氟甲基、烷基、氟烷基、二氟烷基、三氟烷基、多氟烷基、羟烷基或羧烷基；

[0021] R_2 是氢、氟、氯、溴；氟甲基、二氟甲基、三氟甲基、烷基、氟烷基、二氟烷基、三氟烷基、多氟烷基、羟烷基或羧烷基；

[0022] R_3～R_7 独立地选自由以下基团组成的组：氢、氟、氯、溴、烷氧基 (alloxy)、烷基、氟

烷基、二氟烷基、三氟烷基、多氟烷基、羟烷基或羧烷基、芳基和杂芳基；

[0023] R_8 ～ R_{11} 独立地选自由以下基团组成的组：氢、氟、氯、溴；氟甲基、二氟甲基、三氟甲基、烷基、氟烷基、二氟烷基、三氟烷基、多氟烷基、羟烷基、羧烷基、烯基、炔基、环烷基、杂环基、芳基或杂芳基；和

[0024] R_{12} 是氢、乙酰基、酰基、烷基、氟烷基、二氟烷基、三氟烷基、多氟烷基、羟烷基、羧烷基；氨基酰基、氨基烷基、环烷基、杂环基、芳基或杂芳基。

[0025] 在第四方面，本发明还提供了可用于诱导或加重细胞内 ER 应激以引发细胞凋亡的药物组合物。本发明该方面的实施方式通常包含 ER 应激加重剂；和可药用载体。

[0026] 在第五方面，本发明还提供了用于通过诱导或加重选定患病细胞中的 ER 应激以引发细胞凋亡从而治疗患者的疾病状况的方法。本发明的该方面的实施方式通常包括以下步骤：施用药物有效量的本发明前述方面所述的药物组合物。

[0027] 根据以下描述和所附权利要求，本发明的其它方面和优点将变得显而易见。

附图说明

[0028] 图 1 显示了 ER 应激响应期间的关键事件的简化模型。在严重 ER 应激的情形中（如 SERCA 抑制后），翻译衰减随即发生并参与后续的 ER 应激响应 (ESR) 事件。ESR 由两个对抗性部分组成：(1) 执行确保应激下的细胞存活的防御性过程的保护成分（列于左框内），和 (2) 促凋亡（诱导死亡）成分（列于右框内），所述促凋亡成分在应激极为过度或无法被缓解时（如在 SERCA 抑制剂的持续性存在下）开始占支配地位并引发细胞死亡（细胞凋亡）。在往往存在于肿瘤细胞中的低水平 / 慢性 ER 应激的情形中，左框内的成分保持支配地位并且即使在肿瘤组织中通常存在的不利条件下（低氧水平、低葡萄糖水平）仍支持肿瘤细胞存活；在这些条件下，右框所示成分不存在或仅具有弱活性。然而，当肿瘤细胞遭遇额外的 ER 应激时，如通过对 SERCA 的药理学抑制，则已存在的低水平 ER 应激将被极大地加重并且右框中所示成分被激活并获得支配地位；在这些条件下，左框中的成分的防御效果被压制，而右框中的成分将执行肿瘤细胞死亡。应注意，所列的半胱天冬酶 12 是指该酶的鼠型；其人类直向同源物是半胱天冬酶 4（即，人半胱天冬酶 4 和小鼠半胱天冬酶 12 在 ESR 事件当中执行类似的功能）。

[0029] 图 2 说明了 ER 应激响应体系的三个主要活性水平以及 GRP78 和 CHOP 的对抗防御性 / 促凋亡功能：(A) “无 ER 应激”情况（左）是正常细胞中的默认情况。此处，ER 腔中极低水平的 GRP78 与 PERK、IRE1 和 ATF6 结合并将这些 ER 应激成分维持于其无活性状态。(B) 在癌细胞中，慢性应激（低葡萄糖、缺氧、错折叠的蛋白）产生“低 ER 应激”情况（中）。此处，低水平的连续应激导致 ER 应激响应体系的部分激活，其重点是 GRP78 的水平升高（粗箭头），这提供了 ER 应激体系的保护成分并进而增加肿瘤细胞的化疗抗性。在该情形中，ER 跨膜成分 PERK、IRE1 和 ATF6 显示出低活性水平，可以推测这些跨膜成分受 GRP78 微调和调节。高水平的 GRP78 诸如通过充当错折叠蛋白的分子伴侣的能力来帮助中和初始应激情况的有害影响。(C) 持续性高水平应激产生“严重 ER 应激”情况（右），其特征在于经由 PERK 介导的对翻译起始因子 2α (eIF2α) 的磷酸化（＝失活）而严重（但短暂）抑制蛋白合成（粗线）。在这些条件下，GRP78 的保护效果被压制，而促凋亡 CHOP 的激活和随后的细胞死亡的启动占支配地位（极粗箭头）。我们的研究已表明，在用 DMC 处理肿瘤细胞期间，

“严重 ER 应激”情形出现。在该药物的持续性存在下，尽管 GRP78 水平升高，细胞仍无法中和药物诱导的应激；相反，CHOP 的强诱导和半胱天冬酶 4 的激活启动了细胞凋亡，从而细胞死亡。

[0030] 图 3 显示了塞来昔布和 DMC 在不同癌细胞系中诱导的 CHOP 蛋白水平。将几种不同的癌细胞系（如左侧所示）在塞来昔布 (Cxb；40 μ M 和 60 μ M) 或 DMC(30 μ M 和 50 μ M) 的存在下培养 48 小时 (Co：对照，未经处理的细胞)。制备总细胞裂解物并通过蛋白印迹分析以 CHOP 特异性抗体进行分析。作为等量内参对照，也用肌动蛋白抗体对所有印迹进行分析（底部仅显示了一个这类对照印迹）。右侧指明了各个细胞系的肿瘤类型。

[0031] 图 4 显示同样通过 DMC 和毒胡萝卜素诱导 ER 应激指示物。如图所示，在 1 μ M 毒胡萝卜素 (Tg) 或 60 μ M DMC 的存在下将 U251 胶质母细胞瘤细胞培养不同的时间。制备总细胞裂解物并通过蛋白印迹以对 ER 应激蛋白 GRP78、CHOP 和半胱天冬酶 4(Casp 4) 特异性的抗体进行分析。将肌动蛋白用作内参对照。前 Casp 4 是指无活性的半胱天冬酶 4 酶原，而切割 Casp 4 是指该酶的活化形式；* 是指在这些蛋白印迹中不一致地观察到的快速迁移带。

[0032] 图 5 显示出 DMC 和塞来昔布而非其它昔布类药物或 NSAID（非甾体抗炎药）诱导钙释放入胞质。(A) 用 DMC 或各种昔布类药物和 NSAID 处理 U251 细胞，并如“Materials & Methods（材料和方法）”中所述记录细胞内钙水平的变化。顶部两个系列显示了钙增加的典型峰 (spike)，这与响应于 DMC 或塞来昔布治疗所观察到的现象一致。第三系列显示了对伐地昔布、罗非昔布、氟比洛芬、吲哚美辛和舒林酸的典型响应（即缺乏响应）（仅显示伐地昔布）。箭头指示药物添加的时间点。(B) 图表显示从数次重复所得的响应于不同药物治疗的平均钙增加（平均值 ±SD)。用 LN229 细胞系也获得了基本相似的结果。

[0033] 图 6 显示了 CHOP 和 GRP78 的诱导对塞来昔布和 DMC 具特异性。在 DMC、塞来昔布、罗非昔布或伐地昔布的存在下培养 U251 胶质母细胞瘤细胞，并通过蛋白印迹分析确定 CHOP 和 GRP78 的蛋白水平。所示为 (A) 各种药物在 50 μ M 时的时间动力学，和 (B) 温育 15 小时后的浓度依赖性。Bgr. 是指所观察到的与 GRP78 抗体不一致的背景信号。所有印迹平行进行，从而可以直接对比不同系列之间的信号强度。应当注意，DMC 是最有效的刺激剂，而罗非昔布和伐地昔布在这些条件下无活性。

[0034] 图 7 显示 CHOP 和 GRP78 的诱导对塞来昔布和 DMC 具特异性并且需要钙。在 DMC、塞来昔布、罗非昔布或伐地昔布的存在下培养 U251 胶质母细胞瘤细胞，并通过蛋白印迹分析确定 CHOP 和 GRP78 的蛋白水平。所示为 (A) 各种药物在 50 μ M 时的时间动力学，和 (B) 温育 15 小时后的浓度依赖性。Bgr. 是指用所观察到的与 GRP78 抗体不一致的背景信号。在 (C) 中，在存在或不存在 20 μ M BAPTA-AM 和 0.78mM EGTA（均为有效 Ca^{2+} 螯合剂）的条件下用 60 μ M DMC 处理细胞。A 和 B 中的所有印迹均平行进行，从而可以直接对比不同系列之间的信号强度。

[0035] 图 8 显示了 CHOP 和 GRP78 的诱导与细胞凋亡的增加以及细胞生长和存活的减少相关。用不同药物处理 U251 胶质母细胞瘤细胞，并对比分析细胞生长和细胞死亡的各种参数。将未经处理 (Co) 或仅用溶剂 DMSO 处理的细胞作为对照。(A) 用 30 μ M 或 50 μ M DMC 处理细胞 48 小时并通过各种测试确定对细胞生长 / 存活和细胞死亡的影响。标记为“集落数”的系列显示了来自集落形成测试的结果，其中确定了能够产生新生长细胞的集落的

存活细胞的绝对数目。标记为“细胞生长和存活%”的系列显示了在48小时药物处理期结束时进行的常规MTT测试的结果。标记为“凋亡细胞%”的系列显示了由48小时药物处理后的TUNEL测试所显示的经历凋亡的细胞的百分比。在上述三个系列之下显示了48小时药物处理结束时通过特异性抗体的蛋白印迹分析所确定的ER应激指示物CHOP、GRP78和半胱天冬酶4的表达水平（肌动蛋白充当内参对照）。(B)如图所示，用各种浓度的不同药物处理细胞48小时，并用细胞死亡ELISA试剂盒测定细胞死亡。(C)如图所示，用DMC或各种昔布类药物以及传统NSAID处理细胞48小时，并用常规MTT测试确定细胞生长和存活（将对照、未经处理的细胞设定为100%）。如其它文献(34)所详细描述，在96孔板中使用3.0×10^3～8.0×10^3细胞/孔进行MTT测试。平行地通过蛋白印迹分析确定CHOP和GRP78蛋白的表达水平。应该注意，DMC是最有效的药物，塞来昔布弱得多，而没有任何其它昔布类药物或传统NSAID在这些条件下是有活性的。

[0036] 图9显示GRP78的敲减(knock-down)提高了塞来昔布和DMC的细胞杀伤，而半胱天冬酶4的敲减降低了塞来昔布和DMC的细胞杀伤。用指向GRP78(si-GRP78)或半胱天冬酶4(si-Casp 4)的siRNA瞬时转染U251胶质母细胞瘤细胞。将靶向绿色荧光蛋白的siRNA(si-GFP)用作对照。(A)转染后72小时，在si-GRP78/si-GFP的情形中用40μM塞来昔布(Cxb)和30μM DMC处理平行培养物，或在si-Casp 4/si-GFP的情形中用60μM Cxb和40μM DMC处理平行培养物；在所有情形中，对照培养物不接受药物处理或仅用溶剂(DMSO)处理。药物处理48小时后，除去药物并通过集落形成测试确定存活细胞分数。所示为存活细胞百分比（其中将处在未经药物处理的条件下的集落数设定为100%）。所示p值分别表示接受si-GRP78与接受对照siRNA(si-GFP)的细胞之间的统计学显著性存活差异，以及接受si-Casp 4与接受对照siRNA的细胞之间的统计学显著性存活差异。(B)为了验证siRNA的有效性，进行了靶标蛋白的蛋白印迹分析。应该注意，GRP78的敲减导致CHOP蛋白的水平增加，这正如由其中GRP78信号处于CHOP上游的ER应激模型所预期的。半胱天冬酶4siRNA还下调其靶标（且经切割的半胱天冬酶4变得不可检测），但不影响响应于塞来昔布或DMC的GRP78诱导，这正如由其中半胱天冬酶4处于GRP78信号的下游的ER应激模型所预期的。

[0037] 图10显示DMC和塞来昔布而非罗非昔布在体内刺激肿瘤细胞中的ER应激响应和细胞凋亡。将U87胶质母细胞瘤细胞由皮下植入裸鼠。一旦肿瘤达到500mm^{3}的体积，则每两只动物接受36小时的DMC或罗非昔布(150mg/kg)，或不接受任何药物。其后，将所有6只动物处死并通过免疫组织化学染色分析其肿瘤中的CHOP蛋白，并且通过TUNEL测试分析其细胞死亡/凋亡。左列：CHOP蛋白表达（黑色小方框表示中列所示的同一照片的放大区域）。右列：细胞死亡（箭头指示TUNEL阳性的实例，即，凋亡细胞）。通过增加药物（包括塞来昔布）的日剂量50小时来重复整个实验（见“Materials & Methods(材料和方法)”），获得相似结果。在所有情形中，所示均为代表性部分。

[0038] 图11显示DMC而非罗非昔布在体内抑制肿瘤生长。将U87胶质母细胞瘤细胞由皮下植入裸鼠。一旦形成了可触知的肿瘤，则动物每日接受补充有DMC、罗非昔布或无药物的食物。每隔3天测定肿瘤尺寸。所示为每组($n=5$)的平均肿瘤体积（平均值±SD)。星号(**)：第42天对照与经DMC处理的动物之间的$p<0.01$。

[0039] 图12显示硼替佐米、塞来昔布和DMC降低了胶质母细胞瘤细胞的存活。在递增浓

度的 (A) 硼替佐米 (BZM)、(B) 塞来昔布 (CXB) 或 (C)2,5- 二甲基塞来昔布 (DMC) 的存在下培养 48 小时后通过 MTT 测试确定各个胶质母细胞瘤细胞系的细胞生长和存活。为了与已知的硼替佐米抗多发性骨髓瘤的效果进行比较,在 (A) 中包括有 RPMI/8226 多发性骨髓瘤细胞系。

[0040] 图 13 显示 DMC 和硼替佐米诱导了 ER 应激指示物。在递增浓度的 (A) 硼替佐米 (BZM) 或 (B)DMC 的存在下将 U251 胶质母细胞瘤细胞培养 24 小时。用对泛素、GRP78、CHOP 和半胱天冬酶 4 具特异性的抗体通过蛋白印迹分析总细胞裂解物。将肌动蛋白用作内参对照。Pro-casp-4 表示无活性的半胱天冬酶 4 酶原,而切割的 casp-4 表示该酶的活化形式。出于比较的目的,将用 10nM 硼替佐米处理的细胞与 (B) 中的经 DMC 处理的细胞并排进行分析,表明经硼替佐米处理的细胞中的泛素化的量比经 DMC 处理的细胞中的泛素化的量普遍得多。应该注意,在半胱天冬酶 4 印迹中观察到数个非特异性背景条带 (与文献中的相似观察一致);使用各种对照 (未显示) 并与文献对比鉴定出了特异性条带。

[0041] 图 14 显示塞来昔布和 DMC 增强了由硼替佐米引起的生长抑制和细胞死亡。用硼替佐米 (BZM)、塞来昔布 (CXB) 或 DMC 单独或组合处理胶质母细胞瘤细胞系。(A) 说明药物处理 48 小时后 LN229 和 U251 细胞中的组合药物处理效果的显微照片。所示为代表性部分。(B) 组合药物效果的定量分析。用上述药物处理 LN229 细胞 8 小时、24 小时和 48 小时。通过台盼蓝据染测试法确定细胞活力。用三等份样品进行所述测试,结果代表 3 次独立实验。所示为各条件下的活细胞数 (平均值 ±SD)。(C) 在所示药物的存在下将 U87MG 细胞培养 24 小时,通过细胞死亡 ELISA 确定细胞死亡的程度 (以平均百分比表示 ;n = 4 ;±SD)。(D) 用药物处理 LN229 细胞 48 小时并在其后 2 周确定能产生集落的长期存活细胞数 (集落形成测试)。所示为来自三次实验的存活细胞百分比 (平均值 ±SD)。将由未经药物处理的对照获得的集落数设定为 100%。在 A ～ D 中,使用了以下药物浓度 :LN229 :5nM BZM,60μM CXB,40μM DMC ;U251 :10nM BZM,50μM CXB 或 30μM DMC ;U87MG :5nM BZM,50μM CXB,35μMDMC。星号表明单独药物处理与组合药物处理之间的差异在统计上极为显著 (p < 0.001)。

[0042] 图 15 显示塞来昔布和 DMC 增强了由硼替佐米引起的 ER 应激指示物上调和细胞凋亡。如图所示,在 10nM 硼替佐米 (BZM)、50μM 塞来昔布 (CXB) 或 35μM DMC 单独或组合存在下将 (A)U87MG 细胞和 (B)T98G 细胞培养 24 小时。如图所示,用对 GRP78、CHOP、半胱天冬酶 -3(Casp-3)、半胱天冬酶 -4(Casp-4)、半胱天冬酶 -7(Casp-7)、半胱天冬酶 -9(Casp-9)、PARP 和 JNK 具特异性的抗体通过蛋白印迹分析总细胞裂解物。将肌动蛋白用作内参对照。Pro-casp 表示全长 (无活性) 半胱天冬酶酶原,而切割的 casp 表示这些酶的活化形式。用特异性识别在 Thr183/Tyr185 上被磷酸化的 JNK(p-JNK1/2) 的抗体来确定 JNK1 和 JNK2 的活性。用与所有存在的 JNK 形式反应的抗体确认了等量的 JNK1。

[0043] 图 16 显示 GRP78 的敲减提高了由组合药物处理造成的细胞杀伤。用指向 GRP78 的 siRNA(si-GRP78) 瞬时转染 U251 细胞。将靶向绿色荧光蛋白的 siRNA(si-GFP) 用作对照。(A) 转染 72 小时后,用与 25μM 塞来昔布 (CXB) 或 15μM DMC 组合的 5nM 硼替佐米 (BZM) 处理平行培养物。平行地,转染的对照培养物未接受药物处理或仅以溶剂 (DMSO) 处理。48 小时后,除去药物并通过 12 天～ 14 天的集落形成测试确定存活细胞分数。所示为能生成集落的存活细胞的百分比 (其中,将未经药物处理的条件下的集落数设为 100%)。经药物

处理的 siGRP78 转染细胞中集落数的减少与经药物处理的 siGFP 转染细胞相比在统计上显著 ($p < 0.002$)。(B) 为了验证转染的 siRNA 的有效性和特异性，对经各药物处理的 siGFP 转染细胞和 siGRP78 转染细胞的 GRP78 表达平行进行蛋白印迹分析。同时处理和显影这两组印迹，因此能对其直接并排比较。尽管 GRP78 受其 siRNA 的下调不是 100％有效，然而与用 siGFP 转染的配比对照细胞相比，在各个条件下该蛋白水平一致下降。值得注意的是，在该实验中使用了总体浓度更低的各个药物以便能检测由 siRNA 预处理引起的进一步提高的细胞死亡。

[0044] 图 17 显示 DMC 加强了硼替佐米在体内对 ER 应激和细胞凋亡的影响。用 1mg/kg 硼替佐米 (BZM) 和 7.5mg/kg DMC 单独或组合治疗带有肿瘤的小鼠，或不对其进行治疗。50 小时后，将动物处死并通过免疫组织化学染色对肿瘤的 CHOP(ER 应激指示物）进行分析或通过 TUNEL 分析肿瘤（细胞凋亡指示物）。(A) 上行显示用 CHOP 抗体染色的肿瘤组织，而中间行显示了相同部分的放大区域（由小方框指出）。下行显示 TUNEL 染色；一些选出的 TUNEL 阳性细胞由箭头指明。(B) 在从各个处理组随机选取的 10 个显微区域中确定了 TUNEL 阳性细胞的百分比并以平均值 ±SD 表示。在图表中表明了单独药物治疗与组合药物治疗之间的肿瘤细胞死亡程度具统计学显著性差异。

[0045] 图 18 显示了神经胶质瘤治疗的标准物替莫唑胺 (TMZ) 和通过加重的 ER 应激起作用的非昔布类药物塞来昔布类似物 2,5- 二甲基塞来昔布 (DMC) 的协同效果。结果显示出由 TMZ(300 μM) 和 20 μM DMC 组合治疗 48 小时的肿瘤相关脑内皮细胞 (TuBEC) 的细胞杀伤增加。药物治疗后，将所述细胞在不存在药物的条件下再温育 12 天，以便确定其长期存活；此时用台盼蓝据染技术评估细胞毒性。结果以每组的活细胞数表示。

[0046] 图 19 显示了本发明的实施方式的 3 个相关衍生物诱导人胶质母细胞瘤细胞中细胞凋亡的相对能力。最有效的化合物是 2,5- 二（三氟甲基）衍生物 (DTF3C)。

具体实施方式

[0047] 如发明内容中所述，本发明基于对使用 ER 应激响应机理来诱导细胞凋亡的新策略的出乎意料的发现。根据本发明的策略，本发明的实施方式提供了用于实施所述策略的方法和手段。具体而言，本发明提供了一类新的化学治疗化合物，所述化合物能对诱导积极增殖的癌细胞和休眠的癌细胞中的细胞凋亡（细胞死亡）的内质网应激 (ESR) 进行调节。这些化合物还抑制肿瘤浸润、血管发生 (vasculogenesis) 和血管生成 (angiogenesis)。而且，这些化合物的特征在于高生物可利用性（包括 CNS）、几乎不表现毒性、能通过口服施用并且可以与标准化学治疗剂组合以提高抗癌效果。本发明的某些方面的治疗方法旨在将癌症作为活实体而非畸变细胞的组合进行治疗并且可以被应用于所有癌症。

[0048] 此处提供了对 ER 应激响应机理的简要讨论以帮助全面和完整地理解本发明的策略，但这并非旨在限定于任何特定理论。

[0049] ER 应激响应模型

[0050] 内质网 (ER) 应激响应 (ESR) 由一组能由如未折叠蛋白的积聚、脂质或糖脂的失衡或者 ER 腔的离子条件变化等正常 ER 功能的差别性扰动引发的适应性途径组成（综述见 (5,6)）。ESR 的主要目的是减轻应激性干扰并恢复正确的 ER 稳态；然而，在强烈或持续性 ER 应激的情况下，这些途径将引发编程性细胞死亡 / 细胞凋亡。ESR 的核心促存活调节物之

一是葡萄糖调节蛋白 78(GRP78/BiP)，该蛋白在蛋白折叠和组装、靶向错折叠蛋白以进行降解、ER Ca^{2+} 结合和控制跨膜 ER 应激传感器的激活中具有重要作用 (7)。另一方面，CCAAT/增强物结合蛋白同源转录因子 (CHOP/GADD153) 和半胱天冬酶 4 是 ESR 的促凋亡功能的关键执行者 (8,9)。

[0051] 图 1 说明了 ER 应激响应的简化模型。在该图中，从上到下的排列对应于应激的持续时间 (9)。将不同的信号事件根据其是否对细胞有促凋亡（细胞凋亡）或抗凋亡（存活）效果而从左至右分组。图底部的天平表示这两类信号之间的错综复杂的平衡。在应激响应的早期，发生翻译衰减以减少 ER 应激的负荷。在下一阶段，数组基因被转录诱导以长期适应于 ER 应激。应激诱导的蛋白的新合成避开了一般性翻译衰减。为了应对 ER 中的未折叠蛋白，首先诱导了 ER 分子伴侣以将这些蛋白再折叠，而如果这一响应不当，则诱导 ER 相关降解 (ERAD) 成分来消除所述未折叠蛋白。为了重建 ER，还诱导了如氨基酸输入基因、谷胱甘肽生物合成基因和氧化保护基因等多种基因。为了引起免疫响应和抗凋亡效果，将 NF κ B 激活。另一方面，如果严重 ER 应激情况持续下去，则细胞凋亡信号途径被激活，包括诱导 CHOP 和激活 c-Jun N 端激酶 (JNK 激酶）和半胱天冬酶 12。存活或凋亡的转折点可能取决于存活信号和凋亡信号之间的平衡。

[0052] 图 2 显示了三种 ER 应激情况，即无 ER 应激、低 ER 应激和严重 ER 应激。本发明描述了能够在处于低水平 ER 应激状态中但仍能存活的细胞中诱导细胞凋亡的方法、化合物和组合物。所提供的化合物将这些带有低 ER 应激的细胞“轻推”向严重 ER 应激情况，即使细胞的信号平衡从可存活情况转向凋亡。所提供的化合物单纯加重 ER 应激的能力使得即使其仅表现出中等促凋亡效力仍可以以这种方式使用，这也使通常存在于无 ER 应激的情况下的正常细胞中的凋亡诱导最小化。在典型的低 ER 应激情况下，GRP78 以通常比其在正常细胞中的存在水平高两倍的水平在细胞中表达，而对应的 CHOP 水平不足以启动细胞凋亡。然而，在使用本发明提供的化合物和组合物后，CHOP 的水平增加至足以克服对应的 GRP78 水平的保护效果的水平，从而导致严重应激情况并启动细胞凋亡。实质上，所提供的化合物仅仅通过加重已处于低 ER 应激状态的细胞的 ER 应激而充当“压垮骆驼背的稻草”而并非能够在任何细胞类型中启动 ER 应激并诱导细胞凋亡。所提供的化合物的该关键特点使其具有充当多种病症的耐受良好的潜在治疗剂的能力，所述病症的发病机理涉及处于低 ER 应激状态的细胞并可受益于对所述细胞中的细胞凋亡的诱导。这种情况在许多形式的癌症以及数种其它疾病中都存在。

[0053] ER 应激响应和癌症治疗

[0054] 尽管已经开始认识到 ER 应激与肿瘤生长和存活的相关性，但有关其用于肿瘤治疗的潜在利用仍知之甚少。更重要的是，还没有已知的对 ER 应激响应途径的攻击点或可为可行的治疗方案提供基础的化合物。

[0055] 例如，一种引发 ER 应激响应的可能有效的模式是抑制肌浆 / 内质网 Ca^{2+}-ATP 酶 (SERCA)，该酶是将胞浆 Ca^{2+} 隔离在其胞内 ER 存储室内的胞内膜结合酶。SERCA 的抑制导致被释放到细胞质内并造成严重 ER 应激的激活，从而导致细胞凋亡。尽管已对数种 SERCA 抑制剂进行了描述，但这些 SERCA 抑制剂都没有可用作癌症治疗用促凋亡剂的可接受的治疗概况。例如，最有效的 SERCA 抑制剂天然产物毒胡萝卜素因其高毒性和高组胺释放能力而不适于作为治疗剂。

[0056] 发现的另一种 SERCA 抑制剂化合物是抗炎药塞来昔布(Celebrex®),它是环氧化酶 -2(COX-2) 的抑制剂 (Dannenberg,AJ 和 Subbaramaiah,K,Cancer Cell 2003 ;4 ;431)。然而,COX-2 抑制剂的长期使用与可能威胁生命的心血管风险相关,这导致药物罗非昔布(Vioxx®)的撤回 (Funk,CD 和 Fitzgerald,GA,Journal of Cardiovascular Pharmacology 2007 ;50 ;470)。而且,通常认为,COX-2 抑制剂 (昔布类) 和其它 NSAID 的抗癌活性的基本生化机理是通过对催化前列腺素合成的起始步骤的环氧化酶 (COX) 的抑制 (10)。塞来昔布是称作昔布类药物的 COX-2 特异性抑制剂的一员的事实使其抗癌活性可能也与 COX-2 抑制有关的可能性悬而未决。

[0057] 在一些近期研究中,已经注意到用包括塞来昔布在内的各种 NSAID 处理培养的细胞产生了增加的胞内钙水平 ($[Ca^{2+}]_i$) 和随后的 ER 应激响应的激活 (参考文献 11 ～ 16)。尽管这些观察结果暗示着 NSAID 作为一类可以通过 ER 应激响应途径来诱导细胞凋亡的药物的可能性,但引起这种效果所需的高水平 NSAID 浓度 (0.1mmol/L ～＞ 1.0mmol/L) 使得这种偶然联系极具猜测性。在这些浓度下,如 COX-2 抑制等 NSAID 的其它效果很可能占据主导,使其不太可能是具有高特异性的细胞凋亡诱导用工具的候选物。

[0058] 令人惊讶的是,在一系列报道中,发现塞来昔布在不存在任何明显的 COX-2 参与时仍能发挥有效的抗增殖和促凋亡效果 (参考文献 17 ～ 23)。尽管这些观察结果表明塞来昔布可能具有导致癌细胞中细胞凋亡的不依赖于 COX-2 的第二靶标,但其基本机理尚未被了解。

[0059] 本发明的发明人已进行实验来研究该未知机理并且已出乎意料地发现塞来昔布的不依赖于 COX-2 的抗肿瘤活性实际上是经由 ER 应激响应途径。而且,发现存在在体外和体内都表现出有效的 ER 应激诱导活性的塞来昔布的结构类似物 (支持实验和数据见“实施例”)。尽管已知 NSAID 能在高浓度时刺激 ER 应激响应并引发促存活 GRP78 和促凋亡 CHOP 蛋白的表达,但显而易见,塞来昔布的效果造成强 ER 应激,强 ER 应激导致 CHOP 表达升高从而压制了 GRP78 的保护效果,而这反过来激活了半胱天冬酶 4 并使细胞凋亡。

[0060] 定义

[0061] 如本文所用,短语“ER 应激”总体指可能损害 ER 中的蛋白合成的各种生理情况和病理情况。

[0062] 如本文所用,术语“SERCA”是肌浆 / 内质网 Ca^{2+}-ATP 酶的首字母缩写,所述酶是均以相似方式充当钙跨膜泵的一小族高度保守蛋白 (同种型)。

[0063] 如本文所用,术语“COX-2”是指环氧化酶 -2,也称前列腺素内过氧化酶 (前列腺素 G/H 合成酶和环氧化酶)。

[0064] 如本文所用,术语“CHOP”是指 CCAAT/ 增强物结合蛋白同源转录因子,也称生长停滞和 DNA 损伤可诱导基因 153(GADD153)。

[0065] 如本文所用,短语“ER 应激加重剂”是指能直接或间接地诱导或加重 ER 中的应激的试剂。这类试剂的构成不受特别限制,本质上可以为化学方式或物理方式。物理剂的实例可包括但不限于温度、辐射和声音。化学剂的实例可包括但不限于细胞信号分子、细胞毒性试剂、毒素或其它代谢物。另外,如缺氧、低 pH、缺乏营养等特定细胞微环境条件也可能引发 ER 应激。

[0066] 如本文所用,术语“前药”是指其中母体分子无活性或具有极小活性的药理学物质

（药物）。

[0067] 如本文所用，术语“协同”或“协同效果”是指这样的药物组合：其中所得药理效果的活性比单独使用的药物活性大两倍（即，组合大于其各部分的总和）。

[0068] 如本文所用，根据本领域技术人员通常所理解来使用烷基、烷氧基、羰基等命名。

[0069] 如本说明书中所用，烷基可以包括含有多达约 20 个碳或 1 ～ 16 个碳的直链、支化的烷基和环烷基，且为直链或支化的。本文的示例性烷基包括但不限于甲基、乙基、丙基、异丙基、异丁基、正丁基、仲丁基、叔丁基、异戊基、新戊基、叔戊基和异己基。如本文所用，低级烷基是指具有约 1 个或约 2 个碳最多达约 6 个碳的碳链。合适的烷基可以为饱和的或不饱和的。此外，烷基还可以由取代基在一个或多个碳原子上取代一次或多次，所述取代基选自由 C1 ～ C15 烷基、烯丙基、联烯基、烯基、C3 ～ C7 杂环、芳基、卤素、羟基、氨基、氰基、氧代、硫代、烷氧基、甲酰基、羧基、甲酰胺基、磷酰基、膦酸基、磷酰胺基、磺酰基、烷基磺酸基、芳基磺酸基和磺酰胺组成的组。另外，烷基可以含有多达 10 个杂原子，在某些实施方式中烷基可含 1、2、3、4、5、6、7、8 或 9 个杂原子取代基。合适的杂原子包括氮、氧、硫和磷。

[0070] 如本文所用，“环烷基”是指单环或多环体系，在某些实施方式中为 3 ～ 10 个碳原子，在其它实施方式中为 3 ～ 6 个碳原子。环烷基的环体系可以由一个环或以稠合、桥联或螺联方式连接起来的两个以上的环构成。

[0071] 如本文所用，“芳基”是指含有 3 ～ 16 个碳原子的单环或多环基团。如本说明书中所用，芳基是可以含有多达 10 个杂原子、在某些实施方式中含有 1、2、3 或 4 个杂原子的芳基。可选地，芳基还可以由芳基或低级烷基取代一次或多次、在某些实施方式中取代 1 ～ 3 次或 4 次，并且芳基还可与其它芳基或环烷基环稠合。合适的芳基包括例如苯基、萘基、甲苯基、咪唑基、吡啶基、吡咯基、噻吩基、嘧啶基、噻唑基和呋喃基。

[0072] 如本说明书中所用，环被定义为具有可包含一个或多个氮、氧、硫或磷原子的多达 20 个原子，只要所述环可以具有选自由氢、烷基、烯丙基、烯基、炔基、芳基、杂芳基、氯、碘、溴、氟、羟基、烷氧基、芳氧基、羧基、氨基、烷基氨基、二烷基氨基、酰氨基、甲酰氨基、氰基、氧代、硫代、烷基硫代、芳基硫代、酰基硫代、烷基磺酸基、芳基磺酸基、磷酰基、膦酸基、磷酰胺基和磺酰基组成的组的一个或多个取代基即可，此外只要所述环还可包含包括碳环、杂环、芳环或杂芳环的一个或多个稠环即可。

[0073] 如本文所用，如果未具体指明，则烯基和炔基碳链含有 2 ～ 20 个碳或 2 ～ 16 个碳，且为直链或支化的。在某些实施方式中，2 ～ 20 个碳的烯基碳链含有 1 ～ 8 个双键，在某些实施方式中，2 ～ 16 个碳的烯基碳链含有 1 ～ 5 个双键。在某些实施方式中，2 ～ 20 个碳的炔基碳链含有 1 ～ 8 个三键，在某些实施方式中，2 ～ 16 个碳的炔基碳链含有 1 ～ 5 个三键。

[0074] 如本文所用，“杂芳基”是指在某些实施方式中为约五元～约十五元的单环或多环的芳香环体系，其中所述环体系中的一个或多个原子、在一个实施方式中 1 ～ 3 个原子是包括但不限于氮、氧或硫的杂原子（即碳以外的元素）。可选地，杂芳基可以与苯环稠合。杂芳基包括但不限于呋喃基、咪唑基、吡咯烷基、嘧啶基、四唑基、噻吩基、吡啶基、吡咯基、N- 甲基吡咯基、喹啉基和异喹啉基。

[0075] 如本文所用，“杂环基”是指单环或多环的非芳香环体系，所述非芳香环体系在一个实施方式中为三元～十元非芳香环，在另一个实施方式中为四元～七元非芳香环，在再

一个实施方式中为五元～六元非芳香环，其中所述环体系中的一个或多个原子、在一个实施方式中 1 ～ 3 个原子是包括但不限于氮、氧或硫的杂原子（即碳以外的元素）。在其中杂原子是氮的实施方式中，氮可选地由烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基、芳烷基、杂芳烷基、环烷基、杂环基、环烷基烷基、杂环烷基、酰基、胍基取代，或所述氮可以被季胺化以形成其中的取代基选自上述基团的铵基。

[0076] 下面对本发明的示例性实施方式进行说明。

[0077] 1. 用于在细胞 ER 中诱导或加重应激以引发细胞凋亡的方法

[0078] 在第一方面，本发明提供了在细胞的内质网 (ER) 中诱导或加重应激以引发细胞凋亡的方法。

[0079] 如上所述，本发明该方面的方法基于以下发现 :通过以足够的强度和持续时间诱导或加重 ER，升高的 CHOP 表达的促凋亡效果将压倒 GRP78 的保护效果，导致如半胱天冬酶 4 和 / 或半胱天冬酶 7 等半胱天冬酶的激活，从而使细胞凋亡。所述方法还基于以下发现 : 存在能特异性诱导或加重选中细胞中的 ER 应激而不导致其它非靶标细胞中的伴发副作用的试剂。

[0080] 具体而言，本发明该方面的优选实施方式通常包括以下步骤 :1) 在所述细胞中选择性抑制 SERCA 活性而不抑制 COX-2 活性 ;和 2) 提高所述细胞中的 CHOP 表达，其中，抑制 SERCA 活性的和提高 CHOP 表达的组合造成了有利于启动细胞中的细胞凋亡的情况。

[0081] 可以预见，可以用任何合适的被开发以抑制 SERCA 和诱导细胞凋亡的本领域已知的试剂或将来鉴定的试剂来通过 SERCA 抑制实现 ER 应激的加重。

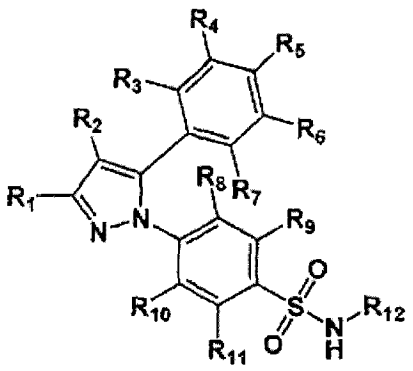
[0082] 优选的是，所述试剂的特异性使其不抑制 COX-2 活性或引发组胺的释放。

[0083] 在一个优选实施方式中，在足以使胞质钙浓度升高到显著高于正常水平从而导致细胞凋亡的持续时间内，通过直接或间接地施用药物有效量的能选择性抑制 SERCA 的 ER 应激加重剂来实现 SERCA 活性的选择性抑制。在该实施方式中，CHOP 表达的提高可能因加重的 ER 应激而共同实现，或可能受 CHOP 表达增强物 / 诱导物的特异性诱导。示例性的 CHOP 表达增强物 / 诱导物可以包括但不限于基于质粒的构建体的转染或采用病毒表达构建体的感染。

[0084] 1.1 其中 ER 应激加重剂是化合物或药物组合物的实施方式

[0085] 在某些优选实施方式中，所述 ER 应激加重剂是具有以下通式的化合物或包含具有以下通式的化合物的药物组合物 :

[0086]



[0087] 其中，

[0088] R_1 是甲基、氟甲基、二氟甲基、三氟甲基、烷基、氟烷基、二氟烷基、三氟烷基、多氟烷基、羟烷基或羧烷基；

[0089] R_2 是氢、氟、氯、溴；氟甲基、二氟甲基、三氟甲基、烷基、氟烷基、二氟烷基、三氟烷基、多氟烷基、羟烷基或羧烷基；

[0090] R_3 ～ R_7 独立地选自由以下基团组成的组：氢、氟、氯、溴、烷氧基、烷基、氟烷基、二氟烷基、三氟烷基、多氟烷基、羟烷基或羧烷基、芳基和杂芳基；

[0091] R_8 ～ R_{11} 独立地选自由以下基团组成的组：氢、氟、氯、溴；氟甲基、二氟甲基、三氟甲基、烷基、氟烷基、二氟烷基、三氟烷基、多氟烷基、羟烷基、羧烷基、烯基、炔基、环烷基、杂环基、芳基或杂芳基；和

[0092] R_{12} 是氢、乙酰基、酰基、烷基、氟烷基、二氟烷基、三氟烷基、多氟烷基、羟烷基、羧烷基；氨基酰基、氨基烷基、环烷基、杂环基、芳基或杂芳基。

[0093] 在某些更优选的实施方式中，R_1 是三氟甲基。

[0094] 在其它优选实施方式中，R_2、R_8 ～ R_{12} 是氢，或 R_4、R_5 和 R_7 是氢。在一个实施方式中，R_1 是三氟甲基且 R_2、R_4、R_5、R_7 ～ R_{12} 都是氢。

[0095] 在另一个优选实施方式中，所述加重剂是 4-[5-(2,5- 二甲基苯基)-3-(三氟甲基)-1H- 吡唑 -1- 基] 苯磺酰胺、4-[5-(2,5- 二 (三氟甲基) 苯基)-3-(三氟甲基)-1H- 吡唑 -1- 基] 苯磺酰胺、4-[5-(2,5- 二溴苯基)-3-(三氟甲基)-1H- 吡唑 -1- 基] 苯磺酰胺或其类似物。

[0096] 对于含有至少一个如 CF_3 基团等含氟官能团的化合物而言，所提供的化合物使得能够通过使用核磁共振图像形成对其体内作用进行监测和图像形成。这对于如脑癌等难以治疗且难以监测的疾病是非常有价值的特点。

[0097] 1.2 其中加重剂是前药的实施方式

[0098] 如上所述，本发明还包括了其中直接或间接抑制 SERCA 并因而加重 ER 应激的实施方式。在一个示例性实施方式中，所述加重剂是可以通过新陈代谢或其它转化方式转化为能抑制 SERCA 的活性化合物的前药。例如，在其中所述加重剂为重组分子的实施方式中，可以连接转运肽以允许所述试剂跨膜转运。在其它实施方式中，所提供的化合物含有在代谢氧化、蛋白水解切割或水解时将所提供的化合物转化为活性 ER 加重剂的官能团。本领域技术人员可以认识到这些官能团包括但不限于甲基或烷基、酯基、碳酸酯基、酰胺基、肽或它们的环化或聚合型衍生物。

[0099] 1.3 采用加重剂组合的实施方式

[0100] 本发明某些实施方式的方法还可以包括施用额外的一种或多种 ER 应激加重剂的步骤。优选的是，所述额外的一种或多种 ER 应激加重剂通过不同的应激诱导机理起作用。

[0101] 本发明的另一个出乎意料的发现是当组合使用不同的 ER 应激加重策略时可以获得协同效果。

[0102] 例如，在一个实施方式中，当将药物硼替佐米 (通过抑制蛋白酶体 26S 诱导细胞凋亡) 与塞来昔布共同使用时，ER 应激水平升高且凋亡速率显著增加 (见实施例 2)。

[0103] 于是，可以预见，可将表 1 中所列的任何细胞凋亡诱导策略与本发明的策略 (即通过 ER 应激加重来诱导细胞凋亡) 有利地组合以在诱导细胞凋亡中获得协同效果。

[0104] 在某些优选实施方式中，可以将能选择性抑制 SERCA 活性而不抑制 COX-2 或引发

组胺释放的第一 ER 应激加重剂与能增加 ER 中的错折叠或受损的蛋白的浓度的第二 ER 应激加重剂组合。适于用作第二 ER 应激加重剂的示例性试剂可以包括蛋白酶体抑制剂（例如，硼替佐米或其类似物）或蛋白酶抑制剂（例如，奈非那韦、阿扎那韦、福沙那韦、利托那韦、茚地那韦或其类似物）。

[0105] 1.4 采用细胞凋亡增强物的实施方式

[0106] 在本发明的某些其它实施方式中，可以通过进一步对细胞施用细胞凋亡增强物来协助 ER 应激加重剂。在本发明的背景下，细胞凋亡增强物是放大与细胞凋亡诱导有关的 ER 应激的效果的增强物。优选的是，细胞凋亡增强物是能上调 CHOP 表达、克服 GRP78 的保护效果并激活如半胱天冬酶 4 和 / 或半胱天冬酶 7 等半胱天冬酶的化学试剂或生物试剂。示例性的细胞凋亡增强物可以包括但不限于 GRP78 的 siRNA 或 GRP78 功能的抑制剂。另外，细胞凋亡增强物还可以是合成的或天然的化合物，包括但不限于如 ABT-737 等阻断 Bcl-2 家族的抗凋亡蛋白的活性的 BH3 模拟物。

[0107] 2. 可用作 ER 应激加重剂的化合物的筛选、选择或设计方法

[0108] 在第二方面，本发明提供了用于筛选、选择或设计可用于诱导或加重细胞中的 ER 应激以诱导所述细胞中的凋亡的方法。

[0109] 本发明该方面的实施方式具有以下一般步骤 :1) 获取测试化合物的信息 ;2) 如果测试化合物是 SERCA 抑制剂而非 COX-2 抑制剂，则将该测试化合物鉴定为潜在的 ER 应激试剂。优选的是，所鉴定的化合物也不引发组胺的释放。在获取步骤中，所获取的测试化合物的信息可以包括该化合物的 SERCA 抑制活性、该化合物的 COX-2 抑制活性和该化合物的组胺释放活性。

[0110] 细胞中 ER 应激的证据可以通过以高于正常组织中 GRP78 水平的两倍水平出现的高 GRP78 水平的存在而确定。本领域技术人员可以使用如实施例中所述的那些普通技术来确定 GRP78 水平。

[0111] 测试化合物可以源自任何本领域已知的普通来源，包括但不限于商业化学品销售商、通过组合化学产生的化学库或经修饰的已知 SERCA 抑制剂类似物。

[0112] 在有关测试化合物的所需信息未知或不可用的情况下，信息获取步骤可能涉及进行表征测试化合物的测试。在这种情况下，可以使用本领域中的任何公知测试，包括但不限于化学测试和基于细胞的测试。优选的是，所选测试应该产生易于与其它化合物比较的可量化的结果。

[0113] 由于新化合物的筛选必然是反复尝试 (trial-and-error) 的过程，因而对每种测试化合物重复进行信息获取步骤、鉴定来自测试化合物的有前景的候选化合物的步骤。

[0114] 在某些优选实施方式中，使用了大量测试化合物并以高通量模式进行获取、鉴定和重复步骤。高通量药物筛选的一般原理是本领域内公知的（近期综述见 Walters 等，Nat Rev Drug Discov. 2003 年 4 月，2(4) :259-266，此处通过参考并入其内容）。

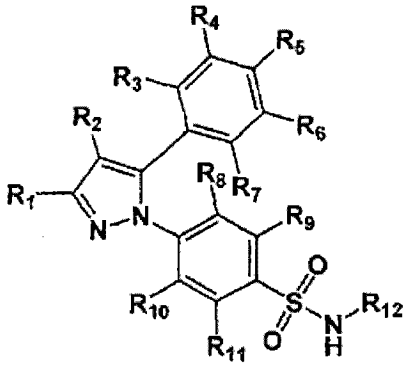
[0115] 除筛选现存化合物源以外，一旦测试并鉴定出足够数量的化合物，还可以采用计算分析来进一步优化或产生适合用作 ER 应激加重剂的新候选化合物。可以将任何公知的计算药物发现方法有利地改造以用于这一任务。优选使用基于配体的方法学（有关基于配体的药物设计的近期综述见 Bacilieri 等，Current Drug Discovery Technologies，第 3 卷，第 3 期，2006 年 9 月，第 155-165 页 (11)，此处通过参考并入其内容）。

[0116] 在一个优选实施方式中，进行了定量构效关系 (QSAR) 分析（有关高通量筛选的计算方法学的改造和引入的综述见 Davies 等，Curr Opin ChemBiol. 2006 年 8 月；10(4)：343-351. 2006 年 7 月 5 日电子出版，此处通过参考并入其内容）。

[0117] 3. 可用作 ER 应激加重剂的化合物

[0118] 在第三方面，本发明还提供了具有以下通式的可用作 ER 应激加重剂的化合物：

[0119]



[0120] 其中，

[0121] R_1 是甲基、氟甲基、二氟甲基、三氟甲基、烷基、氟烷基、二氟烷基、三氟烷基、多氟烷基、羟烷基或羧烷基；

[0122] R_2 是氢、氟、氯、溴；氟甲基、二氟甲基、三氟甲基、烷基、氟烷基、二氟烷基、三氟烷基、多氟烷基、羟烷基或羧烷基；

[0123] R_3 ～ R_7 独立地选自由以下基团组成的组：氢、氟、氯、溴、烷氧基、烷基、氟烷基、二氟烷基、三氟烷基、多氟烷基、羟烷基或羧烷基、芳基和杂芳基；

[0124] R_8 ～ R_{11} 独立地选自由以下基团组成的组：氢、氟、氯、溴；氟甲基、二氟甲基、三氟甲基、烷基、氟烷基、二氟烷基、三氟烷基、多氟烷基、羟烷基、羧烷基、烯基、炔基、环烷基、杂环基、芳基或杂芳基；和

[0125] R_{12} 是氢、乙酰基、酰基、烷基、氟烷基、二氟烷基、三氟烷基、多氟烷基、羟烷基、羧烷基；氨基酰基、氨基烷基、环烷基、杂环基、芳基或杂芳基。

[0126] 优选实施方式是其中 R_1 是三氟甲基的化合物，而其它优选实施方式是其中 R_2、R_8 和 R_9 是氢的化合物或其中 R_4、R_5 和 R_7 是氢的化合物，以及其中 R_1 是三氟甲基而 R_2、R_4、R_5、R_7、R_8 和 R_9 是氢的化合物。

[0127] 其它优选实施方式是其中 R_3 和 R_6 选自由氢、氟、氯、溴；氟甲基、二氟甲基、三氟甲基、烷基、芳基、杂芳基、氟烷基、二氟烷基、三氟烷基、多氟烷基、羟烷基或羧烷基组成的组的化合物。

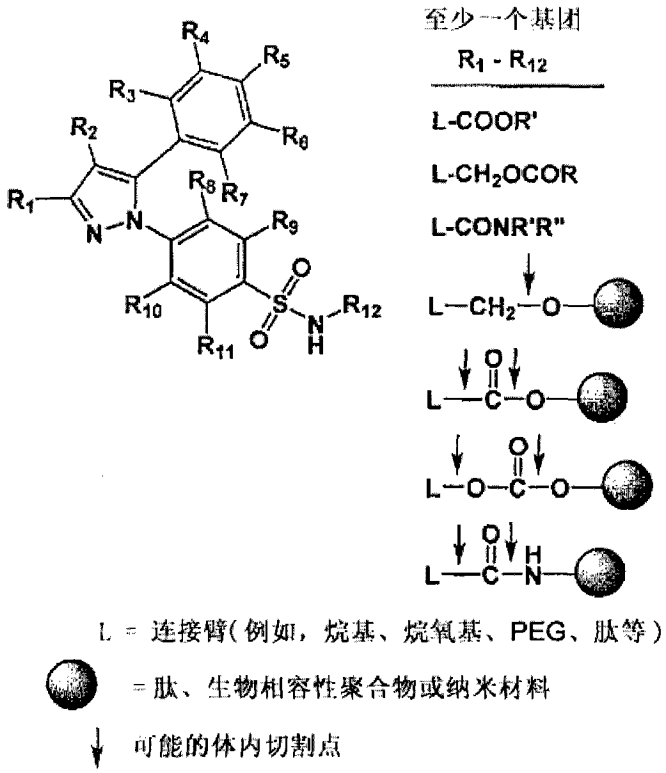
[0128] 优选实施方式的一个实例是作为 4-[5-(2,5- 二甲基苯基)-3-(三氟甲基)-1H- 吡唑 -1- 基] 苯磺酰胺的结构类似物的化合物，如：4-[5-(2,5- 二（三氟甲基）苯基)-3-(三氟甲基)-1H- 吡唑 -1- 基] 苯磺酰胺和 4-[5-(2,5- 二溴苯基)-3-(三氟甲基)-1H- 吡唑 -1- 基] 苯磺酰胺。

[0129] 参考图 19，本发明的两个示例性化合物已显示出与 DMC 相比惊人的有效细胞杀伤效果。在该图中，DMC 代表 4-[5-(2,5- 二甲基苯基)-3-(三氟甲基)-1H- 吡唑 -1- 基] 苯磺酰胺；DBrC 代表 4-[5-(2,5- 二溴苯基)-3-(三氟甲基)-1H- 吡唑 -1- 基] 苯磺酰胺；而

DTF3C 代表 4-[5-(2,5- 二（三氟甲基）苯基)-3-(三氟甲基)-1H- 吡唑 -1- 基]苯磺酰胺。

[0130] 在另一个优选实施方式中，所述化合物是可以在体内转化为能充当 SERCA 抑制剂的 ER 应激加重剂的前药化合物。本领域技术人员可以认识到这类化合物具有以下一般结构：

[0131]



[0132] 其中 R_1 ～ R_{12} 的至少一个基团具有选自如上所示的连接臂基团的侧链。

[0133] 4. 可用作 ER 应激加重剂的药物组合物

[0134] 在第四方面，本发明还提供了可用于诱导或加重细胞中的 ER 应激以引发细胞凋亡的药物组合物。本发明的实施方式通常包含 ER 应激加重剂和可药用载体。

[0135] 可以适当配制如上所述的任何化学类 ER 应激加重剂以协助活性成分的施用。在优选实施方式中，ER 应激加重剂是具有也如以上第一方面所述的通式的化合物或其可药用的稳定盐。

[0136] 对于所述载体而言，可以适当使用与所选活性成分相容的任何公知载体。所述载体优选为适用于口服制剂的载体。

[0137] 5. 治疗方法

[0138] 在第五方面，本发明还提供了通过诱导或加重选定患病细胞中的 ER 应激以引发所述细胞中的细胞凋亡来治疗患者的疾病状况的方法。

[0139] 本发明该方面的实施方式包括施用药物有效量的本发明上述第四方面所述的药物组合物的一般步骤。可以将本发明第一方面所述的实施方式中的任何用于诱导或加重 ER 应激的方法适当地改造从而用于本发明的治疗方法。

[0140] 在优选实施方式中，在施用所述药物组合物之前患病细胞处在 ER 应激状态中。

[0141] 本文所述的治疗方法是可用于各种形式的疾病而不论其发病机理是否包括细胞

凋亡失调作为起作用的机理的通用方法。在优选实施方式中，癌症是本发明的治疗方法的优选疾病。可用的示例性癌症包括但不限于多形性胶质母细胞瘤、乳腺癌、胰腺癌、伯基特氏淋巴瘤、多发性骨髓瘤、成神经细胞瘤、前列腺癌、结肠直肠癌、转移性乳腺癌、复发性癌症和抗药性癌症。

[0142] 本发明的另一个实施方式涉及通过抑制浸润、血管发生和血管生成来治疗抗化疗肿瘤。在抗化疗肿瘤细胞中，肿瘤脉管系统对包括最常用于多形性胶质母细胞瘤 (GBM) 治疗的制剂替莫唑胺 (TMZ) 在内的许多治疗药物都不响应。肿瘤脉管系统提供养分、氧和肿瘤生长环境。因此破坏这些细胞的试剂将对治疗残留或复发肿瘤非常有用。

[0143] 在又一个实施方式中，本发明提供了用于治疗癌症的周边坏死边缘的方法，所述方法涉及单独通过 ER 应激响应调节或将其与常规化学治疗结合来诱导细胞凋亡。更具体而言，本发明可用于治疗如多形性胶质母细胞瘤 (GBM) 等对化学治疗响应较差的尤其难治的癌症。许多癌症的生长快过其血液供给，其后果是发展出坏死中心。处在“坏死边缘”的癌细胞通常是暴露于低氧合、低 pH 和低葡萄糖的不利微环境下的休眠细胞。做为此应激性环境的后果，这些细胞具有高水平的 ESR。为了在这种不利环境中成长，表达了高抗性水平的 GRP78 以便存活。这些周边坏死癌细胞对通常靶向快速增殖细胞的化学治疗或放射治疗的治疗尤其抵抗。

[0144] 本发明为无法采用常规化学治疗的脑肿瘤的治疗提供了独特的益处。血脑屏障尽管在血液 - 肿瘤界面处未受损，但仍然阻碍了化学治疗剂自由进入肿瘤。而且，传统的细胞毒性化学治疗靶向快速增殖的癌细胞。而 GBM 在性质上是异源性的。在病理学上，GBM 的特征是坏死中心、周边坏死边缘和侵袭性脉管化外周。在病理学上将所述周边坏死边缘描述为见于胶质母细胞瘤的病理标本中的假栅栏 (Brat DJ 等，Cancer Res 2004，64 :920-927)。化学治疗和放射线通常靶向正常脑组织和肿瘤组织的界面中的脉管化良好的增殖肿瘤细胞。相反，脑肿瘤的周边坏死边缘的恶性细胞虽然有被激活的可能性但仍进行较少增殖并保持休眠。一旦增殖肿瘤细胞被化学治疗或放射线杀死，周边坏死区中的休眠胶质母细胞瘤细胞就开始生长并再次侵袭，从而重复所述过程。所述休眠细胞激活机理与雨林中树木生长的概念非常相似。雨林中有不同高度的树木。如果将最高的树（类似于脉管化良好的肿瘤区）砍倒，则较低高度的树木（类似于周边坏死区细胞）将随着其接受大量阳光而长高。最终结果是 GBM 重新出现且对正常脑的侵袭增加。此前已对周边坏死区的胶质母细胞瘤细胞进行过表征。这些细胞响应于周边坏死区中存在的低氧张力而分泌更高水平的蛋白和血管生成因子。周边坏死细胞比处在脉管化良好的外周的胶质母细胞瘤细胞增殖得显著更少并显示出更多的细胞死亡。而且，这些肿瘤细胞表现出迁移增加和与细胞侵袭相关的特定酶的分泌增加 (Brat DJ 等，Cancer Res2004，64 :920-927，此处通过参考并入其全部内容）。

[0145] 对本发明进行了一般性描述后，可以通过参考某些具体实施例来获得对本发明更进一步的理解，除非另外指明，此处提供所述具体实施例仅出于说明的目的而并非旨在进行限制。

[0146] 实施例

[0147] 实施例 1 :由塞来昔布的非昔布类类似物 2，5- 二甲基塞来昔布 (DMC) 诱导的作为肿瘤细胞死亡的主要成因的钙激活 ER 应激

[0148] 材料和方法

[0149] 材料

[0150] 塞来昔布是4-[5-(4-甲基苯基)-3-(三氟甲基)-1H-吡唑-1基]苯磺酰胺(24)。DMC是一种相近结构的类似物,其中通过用2,5-二甲基苯基替代4-甲基苯基而改变了5-芳基部分,从而得到4-[5-(2,5-二甲基苯基)-3-(三氟甲基)-1H-吡唑-1基]苯磺酰胺(20,19)。在本实验室中根据此前发表的方法合成了这两种化合物(塞来昔布见参考文献24,DMC见参考文献19)。将每种药物以100mmol/L溶解于DMSO中(储备溶液)。对于伐地昔布(25)和罗非昔布(26),分别将来自Bextra(Pfizer,纽约,纽约州)和Vioxx(Merck,Whitehouse Station,新泽西州)的商购药片悬浮于H_2O中以使赋形剂崩解,并将活性成分以25mmol/L溶解于DMSO中。另外,还使用了在本实验室中根据已确立的方法(27)合成的纯罗非昔布粉末。所有传统NSAID均以粉末形式购自Sigma(圣路易斯,密苏里州)并以100mmol/L溶解于DMSO中。毒胡萝卜素和BAPTA-AM获自Sigma并溶解于DMSO中。以保持最终溶剂(DMSO)浓度<0.5%的方式将所有药物添加至细胞培养基中。

[0151] 细胞系和培养条件

[0152] 大多数细胞系获自美国标准培养物收藏中心(American Type CultureCollection,马纳萨斯,弗吉尼亚洲)并在37℃、5%CO_2氛围中的湿润培养箱中的DMEM或RPMI 1640(Life Technologies,Grand Island,纽约州)中繁殖,在DMEM或RPMI 1640中补充有10%的胎牛血清、100单位/mL的青霉素和0.1mg/mL的链霉素。胶质母细胞瘤细胞系U251和LN229由Frank B.Furnari和Webster K.Cavenee(Ludwig癌症研究所,La Jolla,加利福尼亚州)提供。

[0153] 免疫印迹和抗体

[0154] 通过用放射免疫沉淀测试缓冲液裂解细胞来制备总细胞裂解物(28),并用二辛可宁酸蛋白测试试剂(Pierce,罗克福德,伊利诺斯州)来确定蛋白浓度。对于蛋白印迹分析而言,如(29)所述处理50Ag的各种样品。一抗购自Cell Signaling Technologies(贝弗利,马萨诸塞州)、CaymanChemical(安阿伯,密歇根州)或Santa Cruz Biotechnology,Inc.(圣克鲁斯,加利福尼亚州)并根据制造商建议使用。将二抗与山葵过氧化物酶偶联并使用来自Pierce的SuperSignal West底物通过化学发光进行检测。将所有的免疫印迹重复进行至少一次以确认结果。

[0155] 免疫组织化学

[0156] 使用Vectastain抗生物素蛋白-生物素复合物法试剂盒(VectorLaboratories,伯林格姆,加利福尼亚州)根据制造商说明书对肿瘤组织中的蛋白表达进行免疫组织化学分析。该方法采用生物素化的二抗和已被称为抗生物素蛋白-生物素复合物法技术的预先形成的抗生物素蛋白-生物素化酶复合物。使用在2%普通山羊阻断血清中以1:100稀释的抗CHOP抗体作为一抗。

[0157] 细胞凋亡测定

[0158] 采用末端脱氧核苷酸基转移酶介导的dUTP缺口末端标记测试定量测定了肿瘤切片中的细胞凋亡(30)。用于该方法的所有成分均来自ApopTag原位细胞凋亡检测试剂盒(Chemicon,Temecula,加利福尼亚州),根据制造商说明书对其进行使用。

[0159] 通过根据制造商说明书使用细胞死亡检测ELISA试剂盒(RocheDiagnostics,印

第安纳波利斯，印第安纳州）来确定体外的细胞培养物中的细胞凋亡。该免疫测试特异性检测细胞凋亡期间释放的单核小体和寡核小体的组蛋白区 (H1、H2A、H2B、H3 和 H4)。以 1,000 细胞 / 孔接种 96 孔板并在微孔板自动读数器 (EL 311SX 型 ;Bio-Tek Instruments, Inc.，Winooski，佛蒙特州）中于 405nm 读数。

[0160] 集落形成测试

[0161] 用小干扰 RNA(siRNA) 转染 24 小时后，将细胞以 200 细胞 / 孔接种至 6 孔板内。细胞完全粘附后，对细胞进行药物处理 48 小时。其后，除去药物，添加新鲜的生长培养基，并将细胞在培养物中不受干扰地保持 12 ～ 14 天，其间存活细胞产生了增殖细胞集落。通过用 1％亚甲蓝（甲醇溶液）染色 4h 使集落可见然后计数。

[0162] siRNA 转染

[0163] 根据制造商说明书使用 LipofectAMINE 2000(Invitrogen，卡尔斯巴德，加利福尼亚州）在 6 孔板中转染细胞。不同的 siRNA 在南加州大学 /K.Norris Jr. 综合癌症中心的微量化学核心实验室合成，且其序列如下 ：靶向绿色荧光蛋白的 siRNA(si-GFP)，5′ -CAAGCUGACCCUGAAGUUCTT-3′（有义）和 5′ -GAACUUCAGGGUCAGCUUGTT-3′（反义）；si-GRP78，5′ -GGAGCGCAUUGAUACUAGATT-3′（有义）和 5′ -UCUAGUAUCAAUGCGCUCCTT-3′（反义）；和 si- 半胱天冬酶 4，5′ -AAGUGGCCUCUUCACAGUCAUTT-3′（有义）和 5′ -AAAUGACUGUGAAGAGGCCACTT-3′（反义）。

[0164] 胞质钙图像形成

[0165] 通过将细胞与 4Amol/L Fura-2/AM(Invitrogen) 在含有 138mmol/LNaCl、5.6mmol/L KCl、1.2mmol/L $MgCl_2$、2.6mmol/L $CaCl_2$、10mmol/LHEPES 和 4mmol/L 葡萄糖的外部溶液 (pH7.4) 中于室温温育 30 分钟来对细胞加载。加载后，将细胞清洗并转移至图像形成装置。用各种药物处理细胞 10 秒，使用 Polychromator V(TILL Photonics GmbH, Grafelfing，德国）通过带有 Zeiss Fluar 40× 油物镜的 Zeiss Axiovert 100 显微镜 (CarlZeiss，耶拿，德国）提供光源，以在 350nm 与 380nm 之间交替的激发波长引发荧光。用由 MetaFluor 软件 (Molecular Devices，桑尼维尔，加利福亚州）控制的 Cascade 512B CCD 相机 (Photometries，图森，亚利桑那州）以 0.5Hz 的采集频率拍摄照片。根据 Grynkiewicz 等开发的原理 (31)，使用在 350nm 和 380nm 激发获得的照片之比来表现胞质钙浓度的变化。

[0166] 对裸鼠的药物治疗

[0167] 4 ～ 6 周龄雄性无胸腺 nu/nu 小鼠获自 Harlan（印第安纳波利斯，印第安纳州）并如其它文献所述 (32) 将 5×10^5U87 胶质母细胞瘤细胞植入皮下。为了确定数周持续药物治疗期间的肿瘤生长，将 DMC 或罗非昔布与日常饲料混合 (DMC 为 150mg/kg ；罗非昔布为 40mg/kg)，并如 (32) 所述监测并记录肿瘤生长。为了分析药物在体内对 CHOP 表达和肿瘤细胞死亡的短期效果，以及为了确定血浆和肿瘤组织中的药物浓度，将带肿瘤的动物以每日 30mg/kg、90mg/kg、150mg/kg 或 180mg/kg 的药物治疗 50h ；通过用不锈钢球形头饲针 (Popper 和 Sons，Inc.，New Hyde Park，纽约州）直接施用至胃使每只动物每 12h 接受一半日剂量的各个药物。在最后一次药物施用后 2h 处死所有动物，并收集肿瘤和血液用于分析。在所有实验中，对动物的体重、食物消耗和毒性临床表现进行密切监测 ；没有检测到未用药物治疗的对照动物与经药物治疗的动物之间的差异。

[0168] 提取血浆用于液相色谱质谱分析

[0169] 采用对裸鼠的心脏穿刺将血液收集到肝素化注射器中。将血液在室温放置 30 分钟，接着在 4℃于 2,000rpm 离心 5 分钟。将血浆从细胞中分离出来并转移至新管。为了建立标准参照，将 25μL 的 1.0μg/mL DMC 或塞来昔布添加至来自未经治疗的对照动物的 50μL 血浆中。对于测试样品而言，将等量 DMC 作为内标添加至来自于已用塞来昔布治疗的动物的血浆，而将等量塞来昔布作为内标添加至来自于已用 DMC 治疗的动物的血浆。充分涡旋后，用 425μL 乙腈使血浆蛋白沉淀并涡旋 1 分钟。将全部混合物在 4,500rpm 离心 5 分钟以分离蛋白沉淀，并将 400μL 上清液转移至新管中。用稳定空气流使样品挥发，并用 150μL 流动相（由 80 ： 20（体积 / 体积）的甲醇 :10mmol/L 乙酸铵构成，pH4.5）使干燥后的残留物恢复溶液状。为除去任何未溶解的沉淀，将样品在 4,500rpm 再次离心 5 分钟，并将上清液转移至新管。通过液相色谱质谱分析 10 毫升的各样品，重复两次。

[0170] 为了确定各样品中的药物量，使用了与 Sciex API 3000 三级四极杆串联质谱仪 (Applied Biosystems，福斯特城，加利福尼亚州）联用的 Agilent1100 高压液相色谱系统 (Agilent Technologies，圣克拉拉，加利福尼亚州）。为分离分析物，采用 Thermo HyPURITY C18 柱 (50×4.6mm，3 微米 ;Thermo Fisher Scientific，Inc.，沃尔瑟姆，马萨诸塞州）。流动相由 80 ： 20（体积 / 体积）甲醇 :10mmol/L 乙酸铵组成 (pH4.5)。分离分析物的流速为 350μL/ 分钟，其中 DMC 和塞来昔布的保留时间分别为 3.50 分钟和 3.10 分钟。然后将分析物导入设定为负离子模式的 Sciex API 3000。DMC 和塞来昔布的水平分别使用了过渡离子 394.0 → 330.2 和 380.0 → 316.2。该测试的较低定量水平确立为 5ng/mL。

[0171] 结果

[0172] DMC 是缺乏 COX-2 抑制能力的塞来昔布的近似结构类似物。为了研究该化合物是否能诱导 ESR，用 DMC 或以平行方式用塞来昔布处理各种肿瘤细胞系，并确定 CHOP 蛋白的表达水平。CHOP 是 ESR 的促凋亡成分并且密切参与 ER 应激后细胞死亡的启动 ;因此，在本实验体系中将其用作已良好确定的 ESR 指示物。如图 3 所示，DMC 和塞来昔布都能有效诱导胶质母细胞瘤、乳腺癌、胰腺癌、伯基特氏淋巴瘤和多发性骨髓瘤细胞系中的 CHOP。因此，两种药物似乎均可刺激 ESR，尽管在胶质母细胞瘤和伯基特氏淋巴瘤细胞系中塞来昔布似乎在某种程度上不如 DMC 有效。

[0173] 为了评估 DMC 处理后的 ESR 程度，对 ESR 的额外指示物进行分析并将效果与用毒胡萝卜素所获得的效果进行比较，毒胡萝卜素是常用作强 ESR 模型诱导物的肌浆 /ER Ca^{2+}-ATP 酶抑制剂。以不同的时间用 DMC 或毒胡萝卜素平行处理细胞，并分析 CHOP、GRP78 和半胱天冬酶 4(ESR 特异性半胱天冬酶）的表达水平。图 4 显示 DMC 和毒胡萝卜素以相似方式刺激三种选定的 ESR 指示物。CHOP 和 GRP78 均显著升高，注意到 6h 时间点及之后的增加较显著。由半胱天冬酶 4 的切割（活化）形式的出现指示的半胱天冬酶 4 的激活于药物处理约 24h 时首次出现并一直持续到较晚的 (36h) 时间点。因此，DMC 与模型诱导物毒胡萝卜素之间的 ESR 刺激极为相似，表明 DMC 的效果在该环境下相当有效。

[0174] ESR 的显著特点是总体蛋白合成的一般性暂时下调，伴随有如 GRP78 等 ER 应激蛋白的翻译的选择性增加 (33,34)。因此，本发明人研究了 DMC 和塞来昔布是否通过决定将 35S- 蛋氨酸引入新翻译的蛋白而损害细胞翻译。如图 5 所示，两种药物都以浓度依赖的方式严重减小了翻译速率，且可以注意到 DMC 更为有效。在处理 2h 时，60μmol/L DMC 和

80μmol/L 塞来昔布与毒胡萝卜素同样有效，并且几乎与有效的翻译抑制剂环己酰亚胺同样有效，并将正在进行的翻译减少了约 90%。这种抑制效果是短暂的，因为即使 DMC 或塞来昔布持续存在，在 18h 时细胞仍返回至不受限制且完全活化的蛋白合成（图 5；塞来昔布数据未显示）。另外，可以在经 DMC 和塞来昔布处理的细胞中检测到 GRP78 翻译的极大增加（图 5；塞来昔布数据未显示）。这些结果共同显示出 DMC 和塞来昔布造成了经药物处理的细胞中的 ESR 的典型特点。

[0175] 由于 DMC/ 塞来昔布的效果和毒胡萝卜素的效果之间的惊人相似性，已知这会使钙从 ER 泄露并在胞质中产生钙峰 (calcium spike)，因而接着确定了 DMC 和与之对比的数种昔布类药物及 NSAID 是否也会诱导这类响应。为此，用 Fura-2/AM 对细胞加载，将细胞暴露于 100μmol/L 的各药物并测定胞质钙水平的增加。如图 6 所示，DMC 和塞来昔布导致了明显的钙峰，这可在各个和所有受测细胞中观察到。相反，其它昔布类药物（罗非昔布和伐地昔布）和传统 NSAID（氟比洛芬、吲哚美辛和舒林酸）都没能引起胞质钙水平的升高。因而似乎唯独 DMC 和塞来昔布能模拟毒胡萝卜素的这一方面，并且由这些药物引起的胞质内钙水平的有力升高与如上图 3 ～ 5 所记载的 ESR 的产生完全一致。由 DMC 造成的平均最大钙峰（图 6B）在某种程度上高于对塞来昔布所测定的平均最大钙峰，但这一差异在统计上不显著；然而 DMC 的总体钙释放（图 6A；曲线下方面积）始终要多 30% ～ 50%。

[0176] 为进一步证实 DMC 和塞来昔布与其它昔布类药物和 NSAID 相比的独特性，接着研究了如何将对这两种药物所观察到的效果与用其它昔布类药物和传统 NSAID 所观察到的效果进行比较。首先，将细胞用 DMC 以及三种昔布类药物塞来昔布、罗非昔布和伐地昔布处理并确定 ER 应激指示蛋白 CHOP 的表达水平。DMC 在 50μmol/L 产生了对 CHOP 的明显诱导，这在早至药物处理开始后 4h 就可被检测到并持续增加直至 24h（图 6A）。用 50μmol/L 的塞来昔布处理细胞导致了相似的 CHOP 诱导动力学，尽管与 DMC 相比整体水平明显更低。相反，罗非昔布和伐地昔布均未在相同浓度下造成任何可检测的 CHOP 表达（图 7A）。

[0177] 为了研究是否有可能在罗非昔布和伐地昔布的更高浓度实现 ESR 诱导，用浓度进一步增加的各药物处理细胞。然而，如图 7B 所示，即使在 75μmol/L 或 100μmol/L 的浓度，罗非昔布和伐地昔布均仍无法刺激任何可检测到的 CHOP 或 GRP78 蛋白的增加。相反，DMC 和塞来昔布均有力诱导了上述两种蛋白的表达。

[0178] 接着对 ER 应激诱导与细胞死亡的关系进行了研究。图 8A 显示，如 CHOP、GRP78 的明显诱导和半胱天冬酶 4 切割 / 激活所指示，30μmol/L 和 50μmol/L 的 DMC 有效刺激了 ESR。平行地研究了三种细胞生长和细胞死亡变量。首先，进行了集落形成测试；该测试是揭示能够存活并产生新细胞生长集落的个体细胞百分比的长期存活指标。其次，使用传统 3-(4,5- 二甲基噻唑 -2- 基)-2,5- 二苯基溴化四唑测试来确定主要由整个细胞群体的代谢活动所指示的短期生长和存活。第三，进行了末端脱氧核苷酸基转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记测试以对经历细胞凋亡的细胞分数进行定量。如图 6A 所示，DMC 对 ESR 的诱导与集落形成测试中极大降低的存活、3-(4,5- 二甲基噻唑 -2- 基)-2,5- 二苯基溴化四唑测试中细胞活性的降低以及显著增加的细胞凋亡密切相关。

[0179] 塞来昔布也能诱导细胞死亡 / 凋亡（图 8B）并降低细胞培养物的活力（图 8C），但其效力明显不如 DMC（如对更高浓度的需求所指示）。然而，其它昔布类药物（罗非昔布和伐地昔布）或传统 NSAID（氟比洛芬、吲哚美辛和舒林酸）对细胞生长和存活都没有任何可检

测到的效果并且即使在高达 100μmol/L 的浓度仍无法诱导细胞凋亡（图 8B 和 C）。因而，这些结果共同表明，塞来昔布因其刺激 ESR 和启动肿瘤细胞死亡的优异效力而从这些昔布类药物 /NSAID 中脱颖而出；另外，其衍生物 DMC 似乎更加有效，这明显论证了实现上述效果不需要对 COX-2 的抑制

[0180] 接着对 ESR 响应于 DMC 或塞来昔布的处理而减少肿瘤细胞生长的贡献进行了研究。为此，应用特定 siRNA 以敲减 GRP78（代表 ESR 的保护分支）或半胱天冬酶 4（代表促凋亡分支）的表达。将胶质母细胞瘤细胞用这些 siRNA 转染并用药物处理 48h，并用集落形成测试确定存活细胞百分比（图 9A）。si-GFP 作为对照包括在这些实验中；此外，通过对半胱天冬酶 4 和 GRP78 蛋白的蛋白印迹分析确定了各个具体 siRNA 对靶标的敲减效率（图 9B）。对于 GRP78-siRNA，当 GRP78 水平下降时细胞变得更敏感并且存活细胞更少。对于半胱天冬酶 -siRNA，观察到相反的情况：发现细胞对药物处理的敏感性显著下降（即，当半胱天冬酶 4 的表达被 siRNA 减少时以塞来昔布或 DMC 处理后的细胞存活增加）。因而，这些结果与现有 ESR 模型相符，其中 GRP78 代表保护臂，而半胱天冬酶 4 是促凋亡性的并且对于 ER 应激后细胞死亡的执行是必需的；结果表明 DMC 和塞来昔布压制了 GRP78 的保护效果并通过刺激半胱天冬酶 4 活性来诱导细胞死亡。

[0181] 为了试图确定在 DMC 的体内抗肿瘤活动期间 ER 应激是否相关，采用异种移植的裸鼠肿瘤模型并研究了来自以 DMC 或罗非昔布治疗的动物的肿瘤组织中的 CHOP 表达。如图 10 所示，在来自对照动物（即不存在任何药物治疗）的肿瘤组织中勉强可检测到 CHOP 蛋白。相反，当用 DMC 喂饲动物 50h 时，其肿瘤组织中的 CHOP 蛋白表达大大增加。相比之下，当动物接受罗非昔布时没有观察到这样的增加（图 10）。另外，DMC 处理后高度升高的 CHOP 蛋白量与肿瘤组织中显著增加的细胞凋亡相关，然而来自经罗非昔布治疗的动物的肿瘤没有显示出升高的细胞凋亡水平（图 10）。此外，对于用 DMC 或罗非昔布对带有肿瘤的动物的长期治疗，显然，仅 DMC 造成肿瘤生长显著减少（图 11），这表明 DMC 对 ESR 和细胞凋亡的诱导实际上转化为该异种移植模型中肿瘤生长的总体减少。

[0182] 最后，作为对裸鼠中 DMC 和塞来昔布的早前药代动力学 / 药效学测定的扩展 (20)，对来自本实验的动物的血液和肿瘤组织中的药物 (DMC 和塞来昔布）浓度进行了测定。以 30mg/kg ～ 180mg/kg 的日剂量的 DMC 或塞来昔布对带有肿瘤的动物治疗 2 天，并通过液相色谱质谱确定各药物的绝对水平 (C_{max})。如表 2 中所示，血浆和肿瘤组织中的最大药物浓度随着日剂量的增加而增加并在来自用 180mg/kg 的最高剂量治疗的动物的血浆中达到 45μmol/L 的峰值水平。然而非常有趣的是，肿瘤组织中的浓度比相应的血浆浓度要低两个数量级；在接受 180mg/kg 的最高日剂量的动物中，仅达到约等于 0.25μmol/L 的肿瘤组织浓度。尽管如此，在所有这些肿瘤组织中都观察到了 CHOP 表达水平的增加，而来自未经药物治疗或由罗布昔布治疗 (30mg/kg ～ 180mg/kg) 的动物的肿瘤组织则对该 ER 应激指示蛋白始终为阴性（见图 10）。通常，来自用最低剂量的 DMC 或塞来昔布治疗的动物的肿瘤组织对 CHOP 为阳性，尽管来自暴露于高得多的浓度的这些动物的肿瘤对该蛋白的染色更强烈。重要的是，这些结果显示，尽管体外使用的药物浓度和体内测得的药物浓度之间存在巨大差异，但在两种情况下，都实现了 ER 应激和随后的肿瘤细胞死亡。

[0183] 实施例 2：由硼替佐米与塞来昔布或其非昔布类似物 2,5- 二甲基塞来昔布的组合加重的内质网应激是增强胶质母细胞瘤细胞杀伤的基础

[0184] 材料和方法

[0185] 材料

[0186] 硼替佐米以悬浮于 3.5mL 盐水中的 3.5mg Velcade(MillenniumPharmaceuticals) 形式获自药房。塞来昔布以胶囊形式获自药房或在本实验室中根据此前发表的方法 (24) 合成。DMC 是塞来昔布的近似结构类似物，其中通过用 2,5- 二甲基苯基替代 4- 甲基苯基而改变了 5- 芳基部分；在本实验室中根据此前发表的方法 (19) 合成了该化合物。将塞来昔布和 DMC 以 100mmol/L 溶解于 DMSO 中（储备溶液）并以保持溶剂最终浓度低于 0.1％的方式添加至细胞培养物中。使用纯化的 COX-2 蛋白在体外确认了新合成的塞来昔布的 COX-2 抑制活性和 DMC 对该活性的缺乏（见例如，参考文献 42）。

[0187] 细胞系和培养条件

[0188] 所有细胞在 37℃、5％ CO_2 氛围中的湿润培养箱中的 DMEM(CellGro) 中繁殖，在 DMEM 中补充有 10％的胎牛血清、100 单位 /mL 的青霉素和 0.1mg/mL 的链霉素。使用了 4 种人胶质母细胞瘤细胞系 (LN229、U251、T98G 和 U87MG) 和一种多发性骨髓瘤细胞系 (RPMI/8226)。T98G、U87MG 和 RPMI/8226 获自美国标准培养物收藏中心。LN229 和 U251 获自 Frank B. Furnari(Ludwig 癌症研究所，La Jolla，加利福尼亚州）。这些细胞中的 COX-2 表达水平和药物对前列腺素生成的影响已在别处发表。

[0189] 3-(4,5- 二甲基噻唑 -2- 基)-2,5- 二苯基溴化四唑测试

[0190] 如别处详述 (19)，采用 3.0×10^3 ～ 8.0×10^3 细胞 / 孔在 96 孔板上进行了 3-(4,5- 二甲基噻唑 -2- 基)-2,5- 二苯基溴化四唑测试。

[0191] 细胞死亡 ELISA

[0192] 以 1,000 细胞 /mL(100μL/ 孔）将细胞平板接种至 96 孔板中，一式四份。次日，对其用药物处理 24h 并用商购 ELISA 试剂盒 (Roche Diagnostics) 根据制造商说明书分析组蛋白复合的 DNA 片段的存在。以特异性地对细胞凋亡而非坏死进行定量的方式使用该试剂盒。

[0193] 免疫印迹和免疫组织化学染色

[0194] 如前所述制备总细胞裂解物并通过蛋白印迹分析进行分析 (19)。如前所述用 Vectastain 抗生物素蛋白 - 生物素复合物法试剂盒 (VectorLaboratories) 对肿瘤组织中的蛋白表达进行了免疫组织化学分析 (32)。一抗购自 Cell Signaling Technology 或 Santa Cruz Biotechnology，Inc. 且根据制造商建议进行使用。重复所有免疫印迹和染色至少一次以验证结果。

[0195] 肿瘤组织的末端脱氧核苷酸基转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记染色

[0196] 使用末端脱氧核苷酸基转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记 (TUNEL) 测试对肿瘤切片中的细胞凋亡进行定量测定。该方法的所有成分均来自 ApopTag 原位细胞凋亡检测试剂盒 (Chemicon)，根据制造商说明书使用该试剂盒。从放大 200 倍时拍摄的 10 张随机显微照片中确定各个肿瘤切片的 TUNEL 阳性细胞百分比。

[0197] 转染和集落形成测试

[0198] 不同的小干扰 RNA(siRNA) 合成于南加州大学 /Norris 综合癌症中心的微量化学核心实验室；其序列如参考文献 32 中所述。用这些 siRNA 对细胞的转染和随后通过集落形成测试对细胞存活的分析已在别处详细描述 (32)。

[0199] 裸鼠的药物治疗

[0200] 4～6周龄雄性无胸腺nu/nu小鼠获自Harlan并将5×10^5个U87胶质母细胞瘤细胞植入其皮下。一旦发展出约300mm^{3}的肿瘤，则让动物接受药物治疗。将Velcade通过尾部静脉注射以单一剂量给药。将DMC通过用不锈钢球形头饲针(Popper and Sons，Inc.)直接施用至胃内而每日给药两次(每12h给予一半的日剂量)。共50h后，将动物处死，并收集肿瘤用于分析。在所有实验中，对动物的体重、食物消耗和毒性临床表现进行密切监测；没有检测到未经药物治疗的对照动物与经药物治疗的动物之间的差异。

[0201] 结果

[0202] 多形性胶质母细胞瘤代表预后极差的极其难治的癌症类型。由于急需更有效的疗法，故选择各种人胶质母细胞瘤细胞系为模型来研究所选药物的组合效果。为了确立将导致50％的细胞生长抑制的各种药物的浓度(IC_{50})，首先用硼替佐米、塞来昔布或非昔布类塞来昔布类似物DMC单独处理各细胞系。用硼替佐米处理48h后所得IC_{50}对于U251、U87MG和T98G胶质母细胞瘤细胞系为约10nmol/L，而对LN229胶质母细胞瘤细胞系略低于5nmol/L(图12A)。由于硼替佐米被开发用于多发性骨髓瘤治疗并且在这些肿瘤细胞系中具有高细胞毒性，因此出于比较目的，也在代表性多发性骨髓瘤细胞系RPMI/8226中确定了其IC_{50}。如图12A所示，且正如预期，RPMI/8226细胞展示出对硼替佐米的高敏感性；然而，该细胞类型并不比胶质母细胞瘤细胞系更敏感。这一发现证实胶质母细胞瘤细胞对硼替佐米非常敏感，而这支持了本发明人对该药物作为潜在的胶质母细胞瘤疗法的研究的理论依据。

[0203] 此外还确定了塞来昔布和DMC在所有四种胶质母细胞瘤细胞系中的IC_{50}(图12A和B)。塞来昔布在U251、U87MG和T98G细胞中显示出约50μmol/L的IC_{50}，而DMC在某种程度上更为有效，其IC_{50}略低于40μmol/L。LN229细胞系(显示出对硼替佐米的最高敏感性；图12A)对于塞来昔布或DMC总体上敏感性略低(图12A和B)。

[0204] 为了确定硼替佐米、塞来昔布和DMC诱导胶质母细胞瘤细胞中的ESR的能力，用递增浓度的各个药物处理U251细胞增加了GRP78和CHOP的表达，表明ESR被引发。另外，该药物还刺激与ER应激相关的半胱天冬酶4酶原的激活，如该酶的切割(即活化)形式的出现所指示。为了验证硼替佐米在所用浓度发挥其已确立的功能(即对蛋白酶体的抑制)，还研究了多泛素化蛋白的积聚。如图13A所示，ER应激标记物的诱导与极大升高的多泛素化蛋白水平的出现相一致，从而表明对蛋白酶体的抑制与对ER应激的诱导相关。

[0205] 在用塞来昔布或DMC处理细胞后研究了同样的靶标。在所有实验中，塞来昔布和DMC均产生相同结果，不同之处是DMC稍微更加有效[为此，且还由于早前已对塞来昔布对ER应激的诱导进行了报道，故主要关注由DMC获得的结果]。如图3B所示，DMC治疗导致GRP78和CHOP的强烈诱导以及半胱天冬酶4的激活，表明该药物引发ER应激。然而，该药物不造成多泛素化蛋白的显著积聚，这与对其作用机理与硼替佐米不同的预期相一致。

[0206] 接着检验了组合药物治疗对胶质母细胞瘤细胞生长和存活的影响。为此，将硼替佐米与塞来昔布或DMC组合，浓度采取近似IC_{50}值从而使潜在增强效果变得更为显著。图14A描绘了对细胞数目和形态的直观展示，而图14B显示了定量结果。图14A显示出单独药物处理导致细胞数目的增加较小且有丝分裂像的存在较少；相反，组合药物治疗导致明显的细胞损失和显著的细胞死亡。通过在药物处理过程中(8h、24h和48h)对活细胞数进行

计数而对这些直观印象进行了补充。如图 14B 所示，单一药物处理允许初始细胞增殖（即在 8h 至 24h 之间细胞数目增加）然后发挥其设想的细胞抑制效果（即在 24h 至 48h 之间总细胞数没有变化）。相反，当将药物组合施用时，在 24h 时间点处细胞数目没有增加并且在 24h 至 48h 之间活细胞显著损失，表现出有效的细胞毒性效果。

[0207] 通过细胞死亡 ELISA 和集落形成测试进一步研究了药物诱导的细胞死亡和存活的程度，其中细胞死亡 ELISA 对整个培养物中的细胞凋亡量进行定量，而集落形成测试确定了能长期存活于药物处理中并产生克隆子代的集落的个体细胞数。图 14C 显示用单独药物处理胶质母细胞瘤细胞造成凋亡性细胞死亡小幅增加，而用硼替佐米和塞来昔布或 DMC 组合治疗则造成细胞死亡极大增加。在集落形成测试中，5nmol/L 的硼替佐米使出现的集落数减少约 50％（图 14D）。选定浓度的塞来昔布和 DMC 自身仅发挥较小的抑制效果（使集落数减少约 10％～ 15％）。相反，当用硼替佐米和塞来昔布或 DMC 组合处理细胞时，集落存活量大大减少，分别减少了＞ 90％和 97％。

[0208] 将图 14 中所用的各个测试应用于数种不同胶质母细胞瘤细胞系并且使用了不同浓度的药物组合（数据未显示）。在所有情况下，获得了非常相似的结果，这清楚地表明这些药物的组合与单独使用各药物处理相比导致细胞毒性的极大增加和细胞存活的显著减少。此外，由常规 MTT 测试计算了组合指数 (CI)，其中将递增浓度的各药物组合（数据未显示）并获得 CI ＜ 1，这揭示药物组合效果是协同性的。

[0209] 接着研究了 ESR 对上述组合药物效果的可能贡献。用如上所述的相同药物组合处理 U87MG 和 T98G 细胞，并分析 ESR 系统和细胞死亡体系的各种成分。如图 15 所示，单独药物处理导致 GRP78 表达增加，而组合药物处理使该蛋白的表达增加得更多。促凋亡 CHOP 蛋白的水平因单一药物处理而略有提高，因组合处理而更强地升高。用特异性识别 c-Jun NH2 端激酶 (JNK，一种关键的 ESR 促凋亡成分）的磷酸化（即活性）形式的抗体研究了该酶的活性。发现组合药物处理而非单独药物处理导致 JNK 活性的极大增加（图 15A）。这些结果共同表明当硼替佐米与塞来昔布或 DMC 组合时比任一种单独药物造成更强的 ESR 诱导。使用 LN229 和 U251 细胞也获得了相似结果（数据未显示）。

[0210] 为了确定药物诱导的 ER 应激和细胞凋亡仅相互关联还是有因果关系，特别减少了 ESR 成分 GRP78 的表达。如果药物诱导的细胞死亡由 ESR 控制，则可以预期充当 ESR 的主要保护成分的 GRP78 水平的下降会导致细胞死亡的进一步增加。用针对 GRP78 的 siRNA 转染 U251 细胞；作为对照，用针对哺乳动物细胞中不存在的靶标（例如，绿色荧光蛋白 (GFP)）的 siRNA 转染细胞。siGRP78 转染细胞和 siGFP 转染细胞均用硼替佐米和塞来昔布或 DMC 的组合进行处理，并通过集落形成测试确定存活细胞数。如图 16A 所示，在带有降低水平的 GRP78 的细胞中细胞存活显著减少 ($P < 0.002$)；在用 siGFP 转染的细胞中药物处理后的细胞存活为 63％～ 68％，但在用 siGRP78 转染的细胞中药物处理后的细胞存活减少至 40％～ 42％。通过蛋白印迹分析确认了 siGRP78 对 GRP78 表达的下调；然而，尽管 siGRP78 的存在使 GRP78 的基本水平降至低于检出限，siRNA 也不能完全阻断药物处理对 GRP78 的诱导，这是由于仍能检测到较低水平的诱导 GRP78 蛋白（图 16B）。尽管如此，在所有情况下，siGRP78 转染细胞中的 GRP78 蛋白总量仍低于 siGFP 转染细胞中的 GRP78 蛋白总量。同时，siGRP78 转染细胞表现出显著增加的化疗敏感性，这表明 ESR 在引发由硼替佐米与塞来昔布或 DMC 的组合诱导的细胞死亡中起着因果作用。

[0211] 最后，确定了上述体外事件是否也会在体内发生。将 U87MG 细胞植入裸鼠皮下，并在形成了一定大小的肿瘤后，动物保持不受治疗或用药物对其进行治疗。由于此前的研究已经显示塞来昔布在体内有效刺激 ESR，因而本实验中不包括该药物；此外，所有已知的 DMC 与塞来昔布的对比实验已经显示出两种药物在体外和体内都可靠地获得了相同的肿瘤抑制结果，不同之处在于 DMC 始终表现出某种程度上更高的凋亡诱导效力。因此，决定将 DMC 作为更有效的药物选择用于在体内与硼替佐米的组合实验。

[0212] 此前已显示，DMC 自身相当有效地引发体内肿瘤组织中的 ER 应激 (39)，并且这一效果在大于 10mg/kg 的剂量时开始出现。考虑到这些早期结果，对该组合实验选择 7.5mg/kg 作为可能有用的剂量；其理由是次优的 DMC 剂量将允许组合效果的出现。用 DMC 或硼替佐米单独或组合治疗带肿瘤的动物 2 天（由于想要关注初始细胞死亡的早期机理而非在肿瘤细胞濒死或已死时起主导作用的后期状况，因而选择了相对较短的治疗期）。分析肿瘤组织的 CHOP（作为 ER 应激的标记物）表达并通过 TUNEL 染色（以使凋亡性细胞死亡的程度可见）。

[0213] 发现 DMC 在该极低剂量时既没有导致大量提高的 CHOP 表达也未显著增加 TUNEL 染色（图 17A）。硼替佐米治疗自身造成了更大的 CHOP 阳性细胞分数，伴随增加的 TUNEL 染色。相比之下，当将硼替佐米与 DMC 共同给药时，出现可以在每个细胞中检测到的非常强的 CHOP 诱导，和大得多的 TUNEL 阳性细胞数的增加（图 17A）。当对不同治疗组中的 TUNEL 阳性细胞数进行定量时，显而易见的是组合治疗比单独药物治疗导致显著更多的细胞死亡（图 17B）；即，响应于硼替佐米和 DMC 的治疗的细胞死亡比单独用 DMC 或硼替佐米治疗的动物中的细胞死亡分别高出 4.9 倍和 3.0 倍。因而，组合药物治疗比单独药物治疗造成了显著更高的 ER 应激水平和更大量的细胞死亡，并且证实在体内也能实现加重的 ER 应激和增强的胶质母细胞瘤细胞杀伤。

[0214] 实施例 3：加重的内质网应激是由替莫唑胺与非昔布类塞来昔布类似物 2,5- 二甲基塞来昔布 (DMC) 的组合增强的肿瘤相关脑内皮细胞的细胞杀伤的基础

[0215] 材料和方法

[0216] 用 TMZ(300μM) 和 20μM DMC 处理肿瘤相关脑内皮细胞 (TuBEC)48 小时。除去药物并将细胞再温育 12 天；届时用台盼蓝据染技术评估细胞毒性。结果以每组的活细胞数表示。

[0217] 结果

[0218] 神经胶质瘤的治疗标准物替莫唑胺 (TMZ) 对抗肿瘤细胞非常有效。然而，该药对肿瘤相关脑内皮细胞 (TuBEC) 几乎没有造成细胞毒性。总结于图 18 中的实验显示出 ER 加重剂 DMC 增加了肿瘤血管内皮细胞易受 TMZ 影响的的易感性。因而 DMC 通过使这些细胞对已知治疗药物化学增敏而充当抗血管生成剂。

[0219] 尽管已经从具体示例性实施方式和实施例方面对本发明进行了描述，但可以理解本文公开的实施方式仅用于说明性目的，本领域技术人员可以在不背离所附权利要求所述的本发明的主旨和范围的情况下进行各种修改和变化。

[0220] 表 1. 引发细胞凋亡的策略

[0221]

策略	靶标	方法	发展阶段
促凋亡法			
导入促凋亡参与物	TRAIL	重组蛋白	计划临床试验
	凋亡素	基因治疗	临床前
	半胱天冬酶	基因治疗	临床前
调节抗凋亡基因或途径	线粒体：		
	促凋亡分子(Bax、BCL-X)	基因治疗	临床前
	下调抗凋亡分子(Bcl-2、Bcl-XL)	ODN	II/III 期
	对线粒体的直接影响	氯尼达明、亚砷酸盐	III 期
	对孔的直接影响	PK11195	临床前
恢复或控制肿瘤抑制基因	p53	基因治疗	II/III 期
	视网膜神经胶质瘤	基因治疗	临床前
	FHIT	基因治疗	计划临床试验
许可(凋亡)法致癌基因	PI3k	LY294002	临床前
	Ras	小分子、ODN	II/III 期
	BCR-ABL	小分子(STI-571)	III 期
	NFκB	ODN	I/II 期
	蛋白酶体抑制剂	PS-341	II 期
	c-raf	ODN	II 期
	c-myb	ODN	临床前
	细胞周期调节物	UCN-01、夫拉平度	III 期

[0222] 表 2. 血浆和肿瘤组织中的药物浓度

[0223]

动物编号	药物和剂量 mg/kg/日	最大血浆水平*, μg/L (μmol/L)	肿瘤组织水平*，ng/mg (大概的 μmol/L)
1	不经药物治疗	<0.5†	<0.2‡
2	Cxb 30	6.950 (18.2)	17.53 (0.046)
3	Cxb 90	9,450 (24.8)	44.03 (0.116)
4	Cxb 150	14,000 (36.8)	61.23 (0.161)
5	Cxb 180	17,000 (44.6)	94.78 (0.249)
6	DMC 30	3,035 (7.6)	8.27 (0.021)
7	DMC 90	3,190 (8.0)	14.44 (0.037)
8	DMC 150	9,500 (23.8)	39.04 (0.099)
9	DMC 180	18,200 (45.5)	110.42 (0.280)

[0224] 缩写：Cxb，塞来昔布。

[0225] * 两次测定的平均值。

[0226] †血液中的检出限约为 5μg/L。

[0227] ‡肿瘤组织中的检出限约为 5ng/mg。

[0228] 参考文献

[0229] 1.Kerr, J.F., Wyllie, A.H. 和 Currie, A.R.Apoptosis:a basic biologicalphenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics(细胞凋亡:在组织动力学中有广泛意义的基本生物现象).Br.J.Cancer,26:239-257,1972.

[0230] 2.Hengartner M.O.The biochemistry of apoptosis(细胞凋亡的生物化学).Nature,407:770-776,2000.

[0231] 3.Thompson C.B.Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease(疾病的发病机理和治疗中的细胞凋亡).Science,267:1456-1462,1995.

[0232] 4.Ferreira G.C.等,Clinical Cancer Research Vol.8,2024-2034,2002年7月。

[0233] 5.Boyce M, Yuan J.Cellular response to endoplasmic reticulum stress:a matter of life or death(细胞对内质网应激的响应:生或死的问题).CellDeath Differ 2006;13:363-373.

[0234] 6.Wu J, Kaufman RJ.From acute ER stress to physiological roles of theunfolded protein Response(从急性ER应激到未折叠蛋白响应的生理学作用).Cell Death Differ 2006;13:374-384.

[0235] 7.Ulrich CM, Bigler J, Potter JD.Non-steroidal anti-inflammatorydrugs for cancer prevention:promise, perils, and pharmacogenetics(癌症预防用非甾体抗炎药:前景、危险和药物遗传学).Nat Rev Cancer 2006,6:130-40.

[0236] 8.Hitomi J, Katayama T, Eguchi Y 等, Involvement of caspase-4 inendoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and Ah-induced cell death(半胱天冬酶4参与内质网应激诱导的细胞凋亡和Ah诱导的细胞死亡).JCell Biol 2004;165:347-356.

[0237] 9.Oyadomari S, Mori M.Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmicreticulum stress(CHOP/GADD153在内质网应激中的作用).Cell DeathDiffer 2004;11:381-389.

[0238] 10.Parente L,Perretti M.Advances in the pathophysiology ofconstitutive and inducible cyclooxygenases:two enzymes in the spotlight(组成型和诱导型环氧化酶的病理生理学进展:两种受到瞩目的酶).BiochemPharmacol 2003;65:153-159.

[0239] 11.Yoshida H, Okada T, Haze K, Yanagi H, Yura T, Negishi M和MoriK(2001) Endoplasmic reticulum stress-induced formation of transcriptionfactor complex ERSF including NF-Y(CBF)and activating transcriptionfactors 6alpha and 6beta that activates the mammalian unfolded proteinresponse (内质网应激诱导的包括NF-Y(CBF)以及激活哺乳动物未折叠蛋白响应的激活转录因子6α和6β的转录因子复合物ERSF的形成).Mol.Cell.Biol.21:1239-1248.

[0240] 12.Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T和Mori K(2001)XBP1 mRNA is induced by ATF6and spliced by IRE1 in response to ERstress to produce a highly active transcription factor(XBP1 mRNA响应于ER应激而受ATF6诱导并被IRE1剪接从而产生高活性转录因子).Cell107:881-891.

[0241] 13.Calfon M, Zeng H, Urano F, Till JH, Hubbard SR, Harding HP, Clark SG和Ron D(2002)IRE1 couples endoplasmic reticulum load tosecretory capacity by

processing the XBP-I mRNA(IRE1 通过加工 XBP-ImRNA 而将内质网负荷与分泌能力相联系).Nature 415 :92-96.

[0242] 14.Lee K, Tirasophon W, Shen X, Michalak M, Prywes R, Okada T, Yoshida H, Mori K 和 Kaufman RJ(2002)IRE1-mediated unconventionalmRNA splicing and S2P-mediated ATF6 cleavage merge to regulate XBP1 insignaling the unfolded protein response(转导未折叠蛋白响应时 IRE1 介导的非常规 mRNA 剪接和 S2P 介导的 ATF6 切割融合以调节 XBP1).GenesDev.16 :452-466

[0243] 15.Wang Y, Shen J, Arenzana N, Tirasophon W, Kaufman RJ 和 Prywes R(2000) Activation of ATF6 and an ATF6 DNA binding site by theendoplasmic reticulum stress response(通过内质网应激响应激活 ATF6 和 ATF6 DNA 结合位点).J.Biol. Chem.275 :27013-27020

[0244] 16.Ubeda M 和 Habener JF(2000)CHOP gene expression in responseto endoplasmic-reticular stress requires NFY interaction with differentdomains of a conserved DNA-binding element(响应于内质网应激的 CHOP 基因表达需要 NFY 与保守 DNA 结合片段的不同域的相互作用).NucleicAcids Res.28 :4987-4997

[0245] 17.Arico S, Pattingre S, Bauvy C 等, Celecoxib induces apoptosis byinhibiting 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 activity in thehuman colon cancer HT-29cell line(塞来昔布通过抑制人结肠癌 HT-29 细胞系中的 3- 磷脂酰肌醇依赖性蛋白激酶 1 的活性而诱导细胞凋亡).J BiolChem 2002 ;277 : 27613-27621.

[0246] 18.Hanif R,Pittas A,Feng Y 等,Effects of nonsteroidalanti-inflammatory drugs on proliferation and on induction of apoptosis incolon cancer cells by a prostaglandin-independent pathway(非甾体抗炎药通过非前列腺素依赖性途径对结肠癌细胞的增殖和细胞凋亡诱导的影响).Bio chem Pharmacol 1996 ;52 :237-245.

[0247] 19.Kardosh A, Blumenthal M, Wang WJ 等, Differential effects ofselective COX-2 inhibitors on cell cycle regulation and proliferation ofglioblastoma cell lines(选择性 COX-2 抑制剂对细胞周期调节和胶质母细胞瘤细胞系增殖的差异性效果).Cancer Biol Ther 2004 ;3 :9-16.

[0248] 20.Kulp SK, Yang YT, Hung CC 等,3-Phosphoinositide-dependentprotein kinase-1/Akt signaling represents a major cyclooxygenase-2-independent target for celecoxib in prostate cancer cells(3- 磷脂酰肌醇依赖性蛋白激酶 1/Akt 信号代表前列腺癌细胞中的塞来昔布的主要环氧化酶 -2 无关性靶标).Cancer Res 2004 ;64 : 1444-1451.

[0249] 21.Shureiqi I,Chen D,Lotan R 等,15-Lipoxygenase-1 mediatesnonsteroidal antiinflammatory drug-induced apoptosis independently ofcyclooxygenase-2 in colon cancer cells(15- 脂氧合酶 -1 介导结肠癌细胞中与环氧化酶 -2 无关的非甾体抗炎药诱导的细胞凋亡).Cancer Res 2000 ;60 :6846-6850.

[0250] 22.Tegeder I, Pfeilschifter J, Geisslinger G.Cyclooxygenase-independent actions of cyclo oxygenase inhibitors(环氧化酶抑制剂的环氧化酶无关性作

用).FASEB J 2001;15:2057-2072.

[0251] 23.Zhang X,Morham SG,Langenbach R 等,Malignant transformationand antineoplastic actions of nonsteroidal antiinflammatory drugs(NSAIDs)on cyclooxygenase-null embryo fibroblasts(非甾体抗炎药(NSAID)对缺乏环氧化酶的胚胎成纤维细胞的恶性转化和抗肿瘤作用).J Exp Med 1999;190:451-459.

[0252] 24.Penning TD,Talley JJ,Bertenshaw SR 等,Synthesis and biologicalevaluation of the 1,5-diarylpyrazole class of cyclooxygenase-2 inhibitors:identification of 4-[5-(4-methylphenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl]benzenesulfonamide(SC-58635,celecoxib)(1,5-二芳基吡唑类环氧化酶-2抑制剂的合成和生物学评估:4-[5-(4-甲基苯基)-3-(三氟甲基)-1H-吡唑-1-基]苯磺酰胺(SC-58635,塞来昔布)的鉴定).J Med Chem 1997;40:1347-1365.

[0253] 25.Talley JJ,Brown DL,Carter JS 等,4-[5-Methyl-3-phenylisoxazol-4-yl]-benzenesulfonamide,valdecoxib:a potent and selective inhibitor ofCOX-2(4-[5-甲基-3-苯基异噁唑-4-基]苯磺酰胺——伐地昔布:一种有效的选择性 COX-2 抑制剂).J Med Chem 2000;43:775-777.

[0254] 26.Chan CC,Boyce S,Brideau C 等,Rofecoxib[Vioxx,MK-0966;4-(4′-methylsulfonylphenyl)-3-phenyl-2-(5H)-furanone]:a potent and orallyactive cyclooxygenase-2 inhibitor.Pharmacological and biochemical profiles.(Rofecoxib[Vioxx,MK-0966;4-(4′-甲基磺酰基苯基)-3-苯基-2-(5H)-呋喃酮]:一种有效的口服活性的环氧化酶-2抑制剂。药理学和生物化学概述).J Pharmacol Exp Ther 1999;290:551-560.

[0255] 27.Prasit P,Wang Z,Brideau C 等,The discovery of rofecoxib,[MK966,Vioxx,4-(4′-methylsulfonylphenyl)-3-phenyl-2(5H)-furanone],an orallyactive cyclooxygenase-2-inhibitor(Rofecoxib[MK 966,Vioxx,4-(4′-甲基磺酰基苯基)-3-苯基-2(5H)-呋喃酮],一种口服活性环氧化酶-2抑制剂的发现).Bioorg Med Chem Lett 1999;9:1773-1778.

[0256] 28.Harlow E,Lane D.Using antibodies:a laboratory manual(抗体使用:实验室手册).Cold Spring Harbor,NY:Cold Spring Harbor LaboratoryPress,1999.267页-309页.

[0257] 29.Wu R-C,Schonthal AH.Activation of p53-21waf1 pathway inresponse to disruption of cell-matrix interactions(响应于细胞基质相互作用的破坏的p53-21waf1途径激活).J Biol Chem 1997;272:29091-29098.

[0258] 30.Heatwole VM.TUNEL assay for apoptotic cells(用于凋亡细胞的TUNEL测试).Methods Mol Biol 1999;115:141-148.

[0259] 31.Grynkiewicz G,Poenie M,Tsien RY.A new generation of Ca^{2+}indicators with greatly improved fluorescence properties(带有极大改善的荧光性质的新一代 Ca^{2+} 指示物).J Biol Chem 1985;260:3440-3450.

[0260] 32.Pyrko P,Soriano N,Kardosh A等,Downregulation of survivingexpression and concomitant induction of apoptosis by celecoxib and itsnon-cyclooxygenas

e-2-inhibitory analog, dimethyl-celecoxib(DMC), intumor cells in vitro and in vivo(塞来昔布及其非环氧化酶-2抑制性类似物二甲基塞来昔布(DMC)在体外和体内的肿瘤细胞中对存活表达的下调和伴随的对细胞凋亡的诱导).Mol Cancer 2006;5:19.

[0261] 33.Luo S,Baumeister P,Yang S等,Induction of Grp78/BiP bytranslational block:activation of the Grp78 promoter by ATF4 through andupstream ATF/CRE site independent of the endoplasmic reticulum stresselements(通过翻译阻断的Grp78/BiP诱导:与内质网应激要素无关的通过ATF4经ATF/CRE位点及其上游的Grp78启动子的激活).J Biol Chem2003,278:37375-37385.

[0262] 34.Ma Y,Hendershot LM.The role of the unfolded protein response intumour development:friend or foe?(未折叠蛋白响应在肿瘤发展中的作用:朋友还是敌人?)Nat Rev Cancer 2004,4:966-977.

[0263] 35.Kim SH,Hwang CI,Park WY等,GADD153 mediates celecoxibinduced apoptosis in cervical cancer cells(GADD153介导宫颈癌细胞中经塞来昔布诱导的细胞凋亡).Carcinogenesis 2006;28:223-231.

[0264] 36.Trifan OC,Durham WF,Salazar VS等,Cyclooxygenase-2inhibition with celecoxib enhances antitumor efficacy and reduces diarrheaside effect of CPT-11(塞来昔布对环氧化酶-2的抑制提高CPT-11的抗肿瘤疗效并降低腹泻副作用).Cancer Res 2002,62:5778-5784.

[0265] 37.Roh JL,Sung MW,Park SW等,Celecoxib can prevent tumorgrowth and distant metastasis in postoperative setting(塞来昔布能在术后防止肿瘤生长和远处转移).Cancer Res 2004;64:3230-3235.

[0266] 38.Williams CS,Watson AJ,Sheng H等,Celecoxib prevents tumorgrowth in vivo without toxicity to normal gut:lack of correlation between invitro and in vivo models(塞来昔布防止体内肿瘤生长而对正常肠道无毒性:体外模型和体内模型缺乏相关性).Cancer Res 2000,60:6045-6051.

[0267] 39.Tegeder I,Pfeilschifter J,Geisslinger G.Cyclooxygenase-independent actions of cyclooxygenase inhibitors(环氧化酶抑制剂的环氧化酶无关性作用).FASEB J 2001,15:2057-2072.

[0268] 40.Backhus LM,Petasis NA,Uddin J等,Dimethyl-celecoxib as a novelnon-COX-2 therapy in the treatment of lung cancer(二甲基塞来昔布作为肺癌治疗中的新型非COX-2疗法).J Thorac Cardiovasc Surg 2005,130:1406-1412.

[0269] 41.Johnson AJ,Song X,Hsu A等,Apoptosis signaling pathwaysmediated by cyclooxygenase-2 inhibitors in prostate cancer cells(前列腺癌细胞中由环氧化酶-2抑制剂介导的细胞凋亡信号转导途径).Adv EnzymeRegul 2001;41:221-235.

[0270] 42.Schonthal AH.Antitumor properties of dimethyl celecoxib,aderivative of celecoxib that does not inhibit cyclooxygenase-2:implicationsfor glioblastoma therapy(不抑制环氧化酶-2的塞来昔布衍生物二甲基塞来昔布的抗肿瘤性质:对于胶质母细胞瘤治疗的意义).Neurosurgical Focus2006;20:1-10.

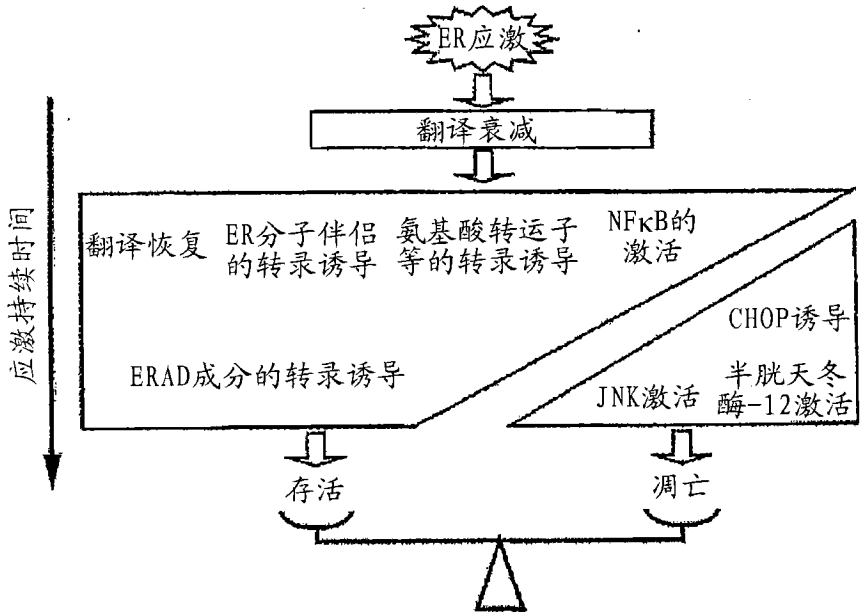

ER应激
翻译衰减
应激持续时间
翻译恢复
ER分子伴侣的转录诱导
氨基酸转运子等的转录诱导
NFκB的激活
CHOP诱导
ERAD成分的转录诱导
JNK激活
半胱天冬酶-12激活
存活
凋亡

图 1

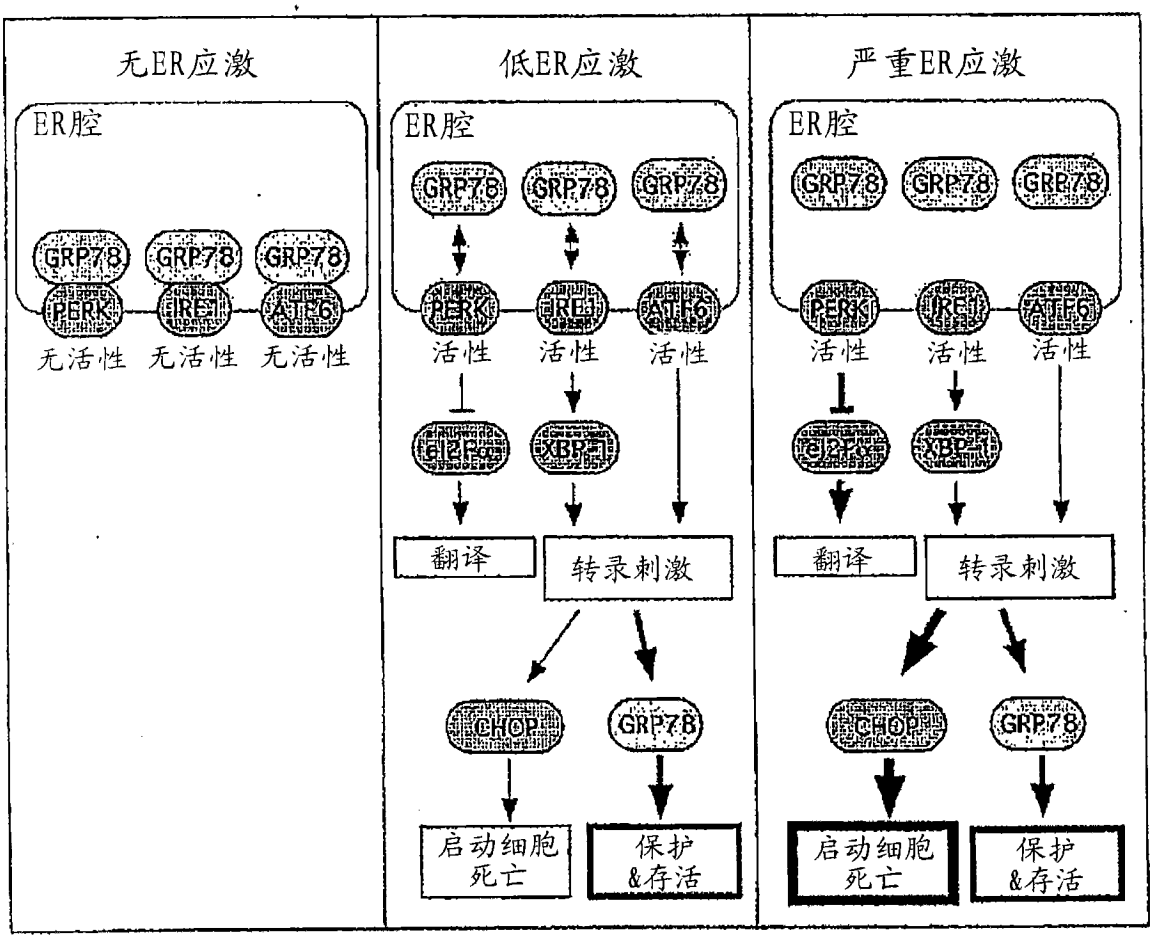

无ER应激
ER腔
GRP78
GRP78
GRP78
PERK
IRE1
ATF6
无活性
无活性
无活性
低ER应激
ER腔
GRP78
GRP78
GRP78
PERK
IRE1
ATF6
活性
活性
活性
eIF2α
XBP-1
翻译
转录刺激
CHOP
GRP78
启动细胞死亡
保护&存活
严重ER应激
ER腔
GRP78
GRP78
GRP78
PERK
IRE1
ATF6
活性
活性
活性
eIF2α
XBP-1
翻译
转录刺激
CHOP
GRP78
启动细胞死亡
保护&存活

图 2

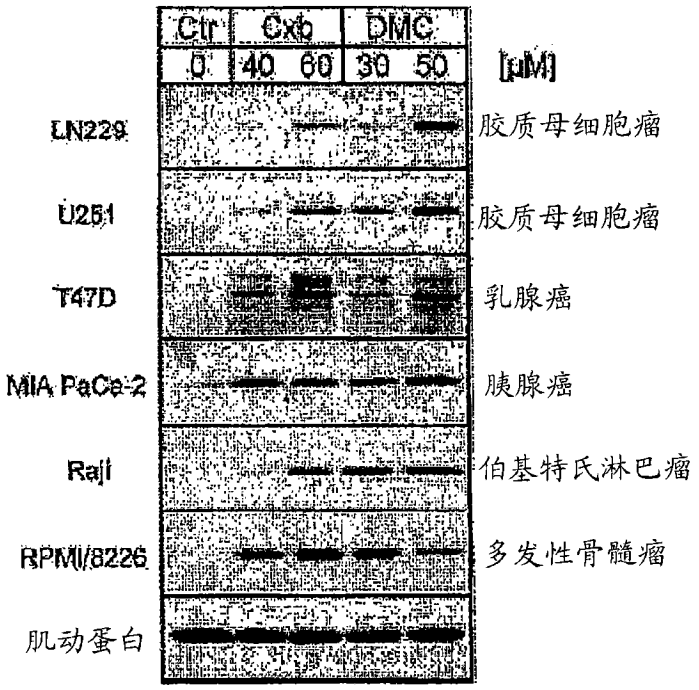

Ctr
Cx6
DMC
0
40
60
30
50
[μM]
LN229
胶质母细胞瘤
U251
胶质母细胞瘤
T47D
乳腺癌
MIA PaCa-2
胰腺癌
Raji
伯基特氏淋巴瘤
RPMI/8226
多发性骨髓瘤
肌动蛋白

图 3

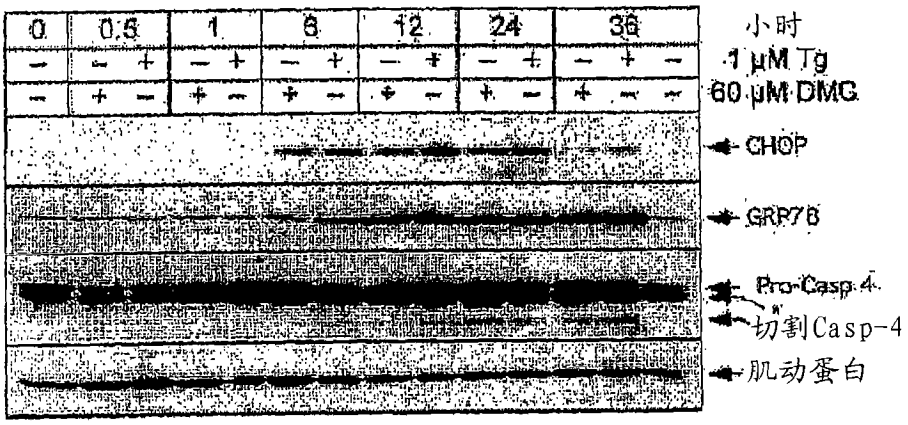

0
0.5
1
8
12
24
36
小时
1 μM Tg
60 μM DMG
CHOP
GRP78
Pro-Casp-4
切割Casp-4
肌动蛋白

图 4

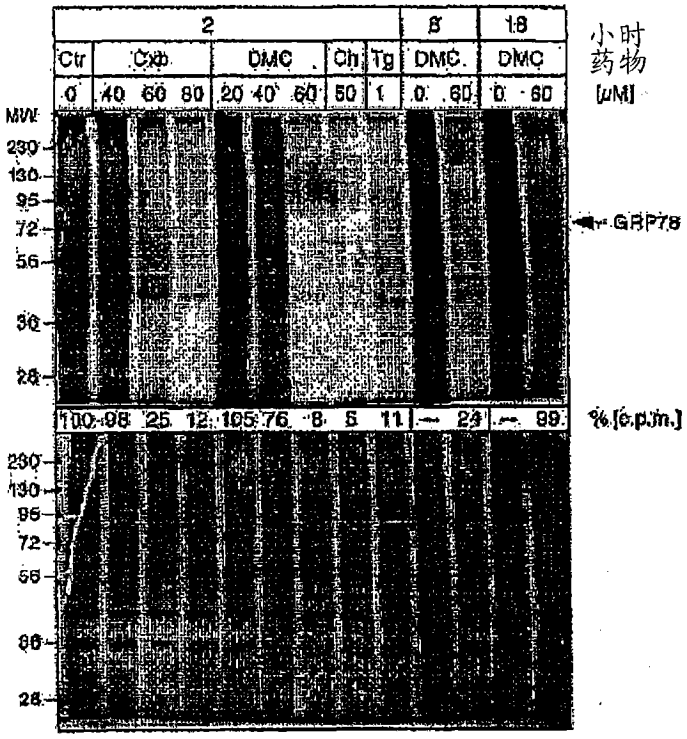

2
8
18
小时
Ctr
Cxb
DMC
Ch
Tg
DMC
DMC
药物
0
40 60 80
20 40 60
50
1
0 60
0 60
[μM]
MW
230
130
95
72
56
36
28
GRP78
100 98 25 12 105 76 8 5 11
24
99
%[c.p.m.]
230
130
95
72
56
36
28

图 5

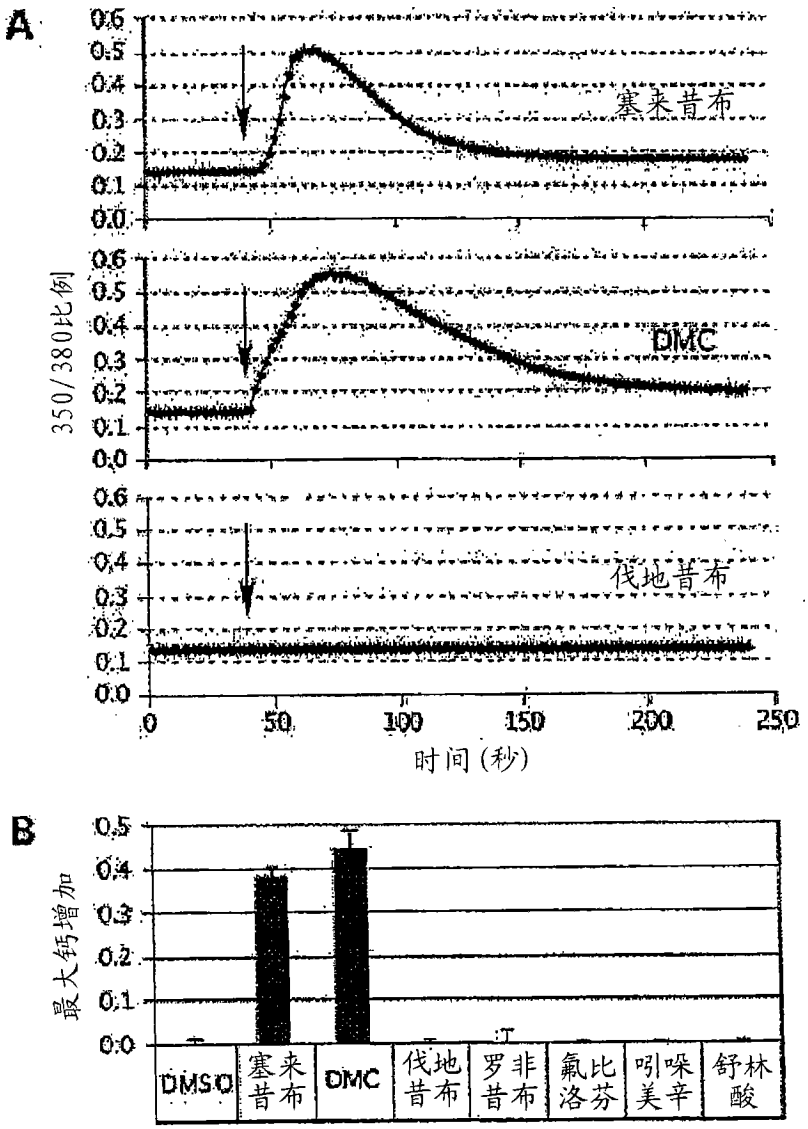

A
塞来昔布
DMC
伐地昔布
350/380比例
时间(秒)
B
最大钙增加
DMSO
塞来昔布
DMC
伐地昔布
罗非昔布
氟比洛芬
吲哚美辛
舒林酸

图 6

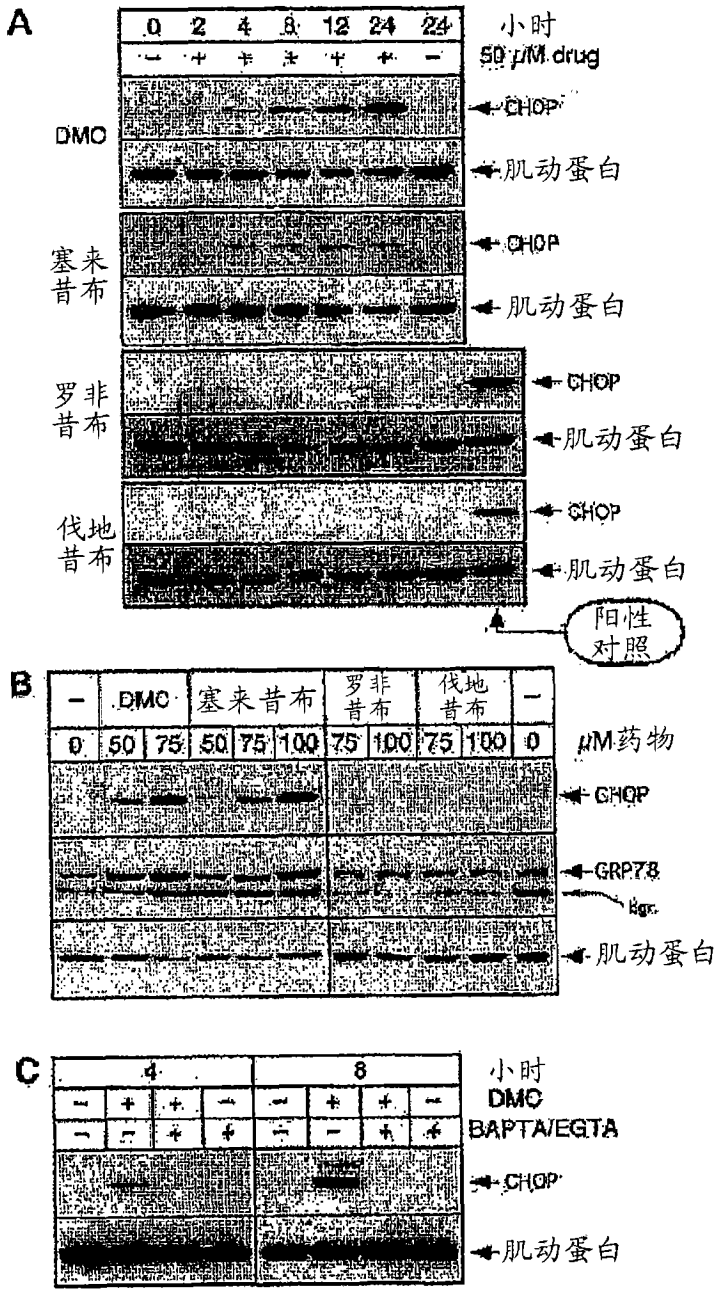

A
0 2 4 8 12 24 24
小时
50 μM drug
DMC
CHOP
肌动蛋白
塞来昔布
CHOP
肌动蛋白
罗非昔布
CHOP
肌动蛋白
伐地昔布
CHOP
肌动蛋白
阳性对照
B
– DMC 塞来昔布 罗非昔布 伐地昔布 –
0 50 75 50 75 100 75 100 75 100 0
μM 药物
CHOP
GRP78
肌动蛋白
C
4 8
小时
DMC
BAPTA/EGTA
CHOP
肌动蛋白

图 7

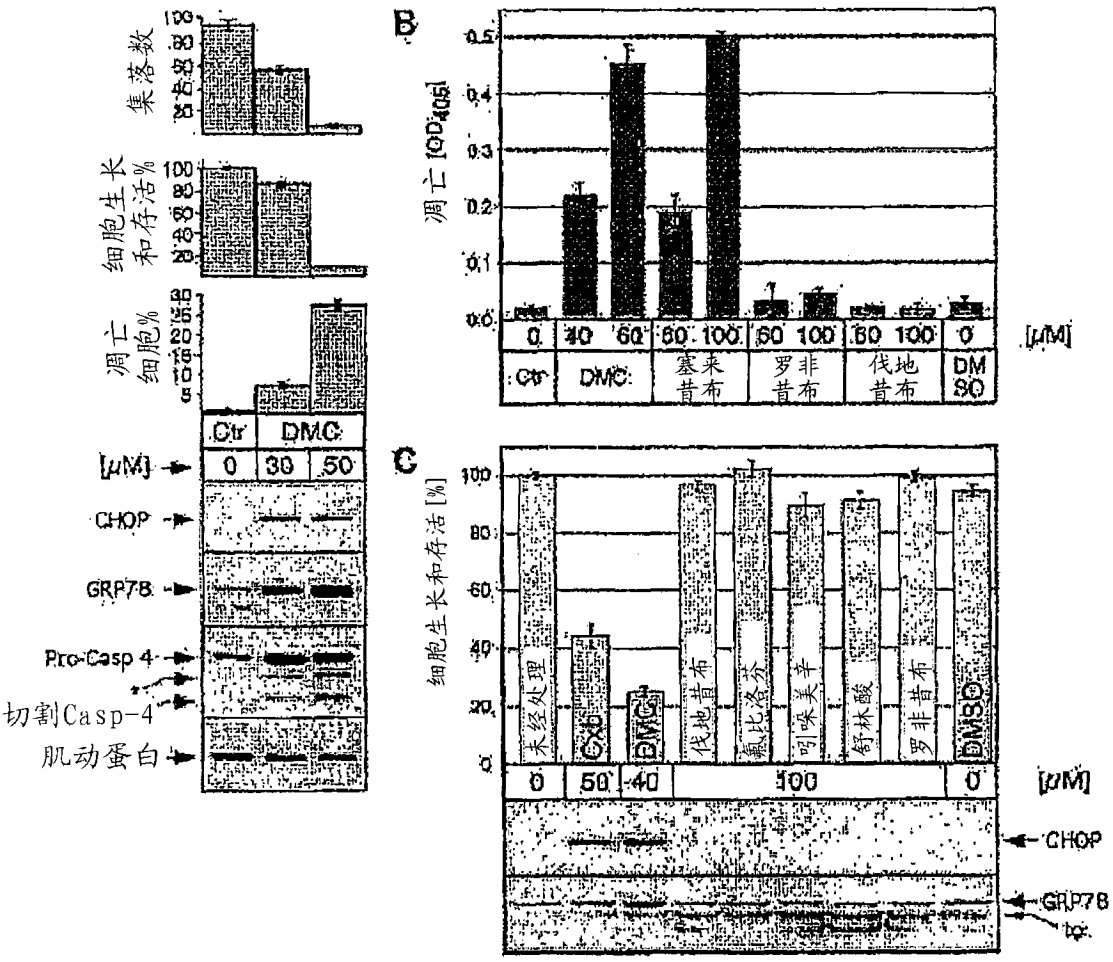

集落数
细胞生长和存活%
凋亡细胞%
Ctr
DMC
[μM]
0
30
50
CHOP
GRP78
Pro-Casp 4
切割Casp-4
肌动蛋白
B
凋亡 [OD405]
0
40
60
60
100
60
100
80
100
0
[μM]
Ctr
DMC
塞来昔布
罗非昔布
伐地昔布
DMSO
C
细胞生长和存活 [%]
未经处理
CXD
DMC
伐地昔布
氟比洛芬
吲哚美辛
舒林酸
罗非昔布
DMSO
0
50
40
100
0
[μM]
CHOP
GRP78
bc.

图 8

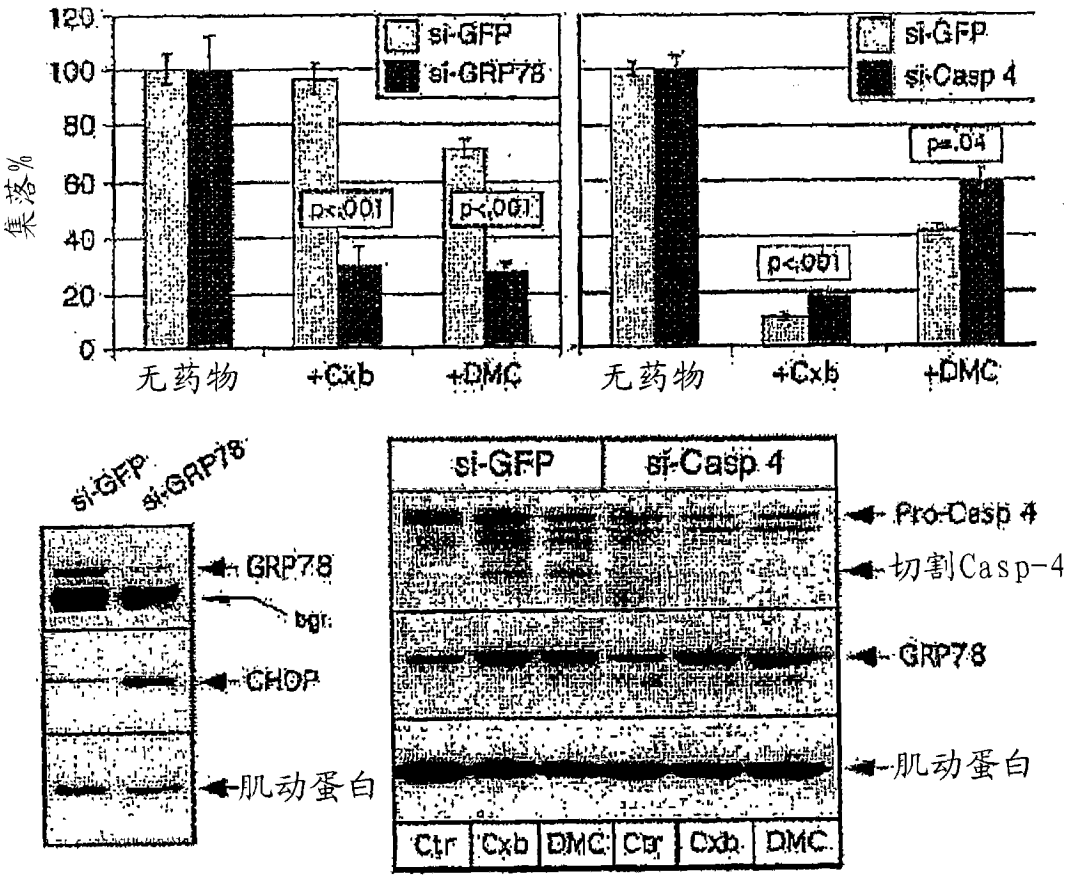

集落%
si-GFP
si-GRP78
si-Casp 4
p<.001
p=.04
无药物
+Cxb
+DMC
GRP78
CHOP
肌动蛋白
Pro-Casp 4
切割Casp-4
Ctr
Cxb
DMC

图 9

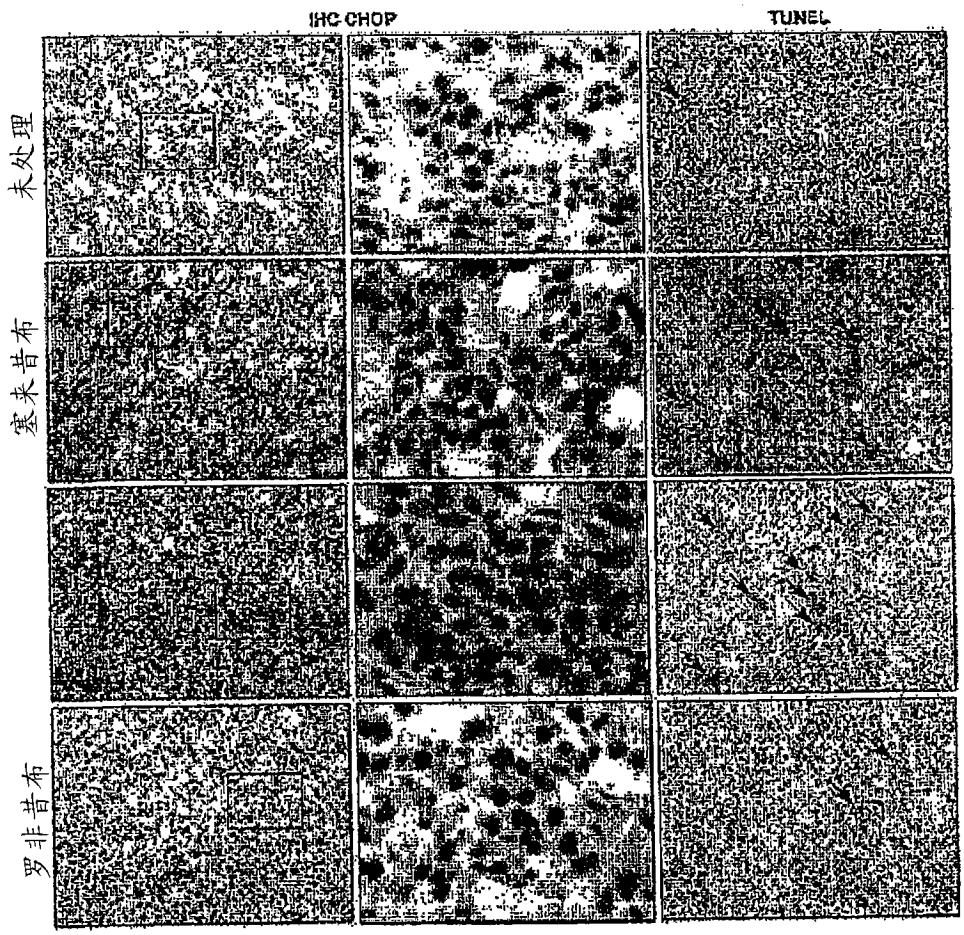


图 10

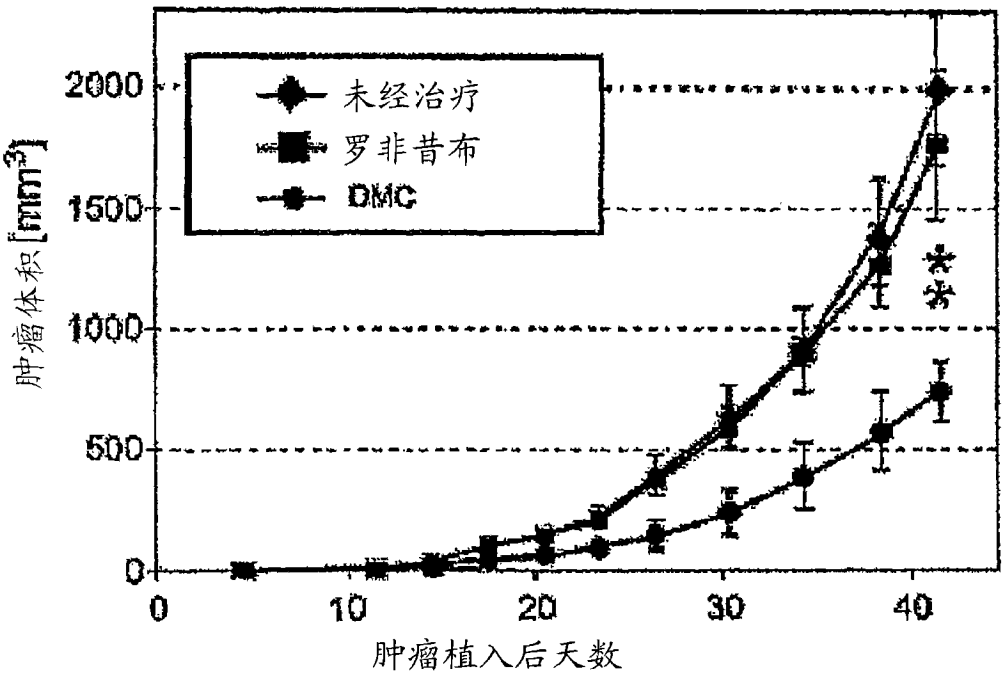

未经治疗
罗非昔布
DMC
肿瘤体积[mm³]
2000
1500
1000
500
0
0
10
20
30
40
肿瘤植入后天数

图 11

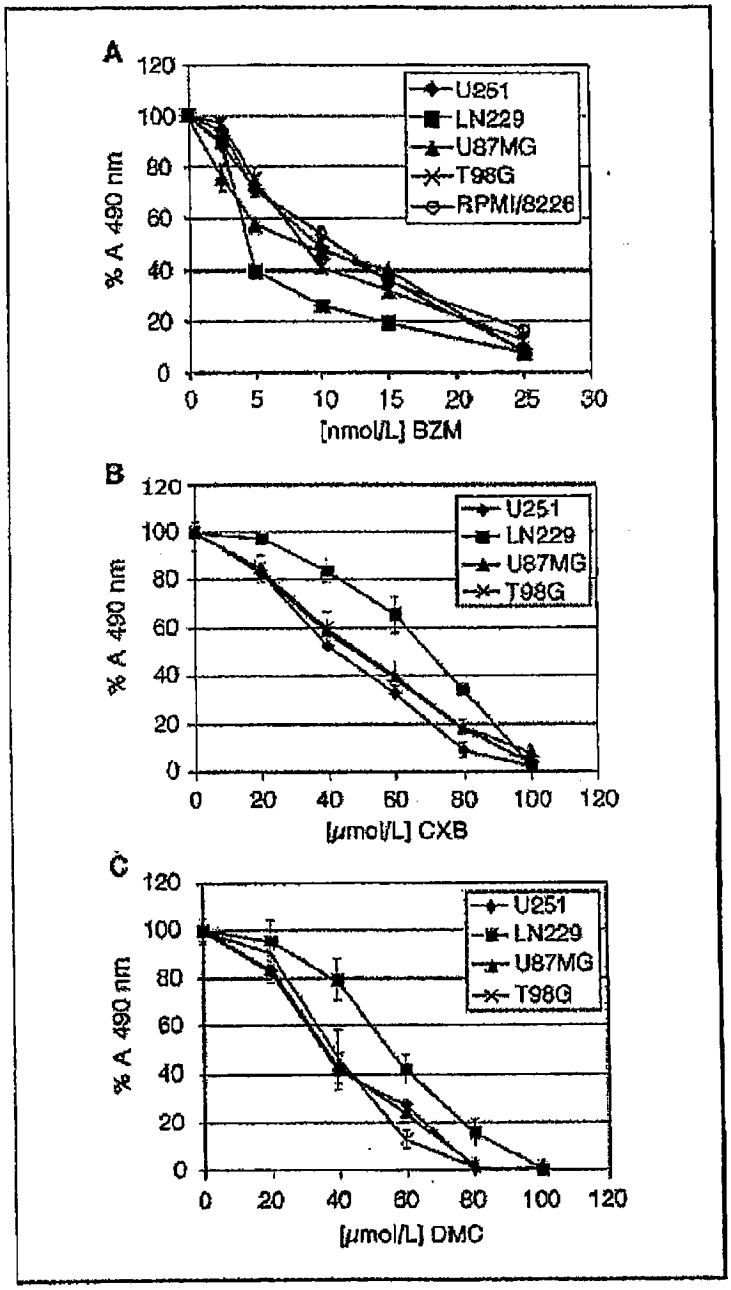

A
% A 490 nm
[nmol/L] BZM
U251
LN229
U87MG
T98G
RPMI/8226
B
% A 490 nm
[μmol/L] CXB
U251
LN229
U87MG
T98G
C
% A 490 nm
[μmol/L] DMC
U251
LN229
U87MG
T98G

图 12

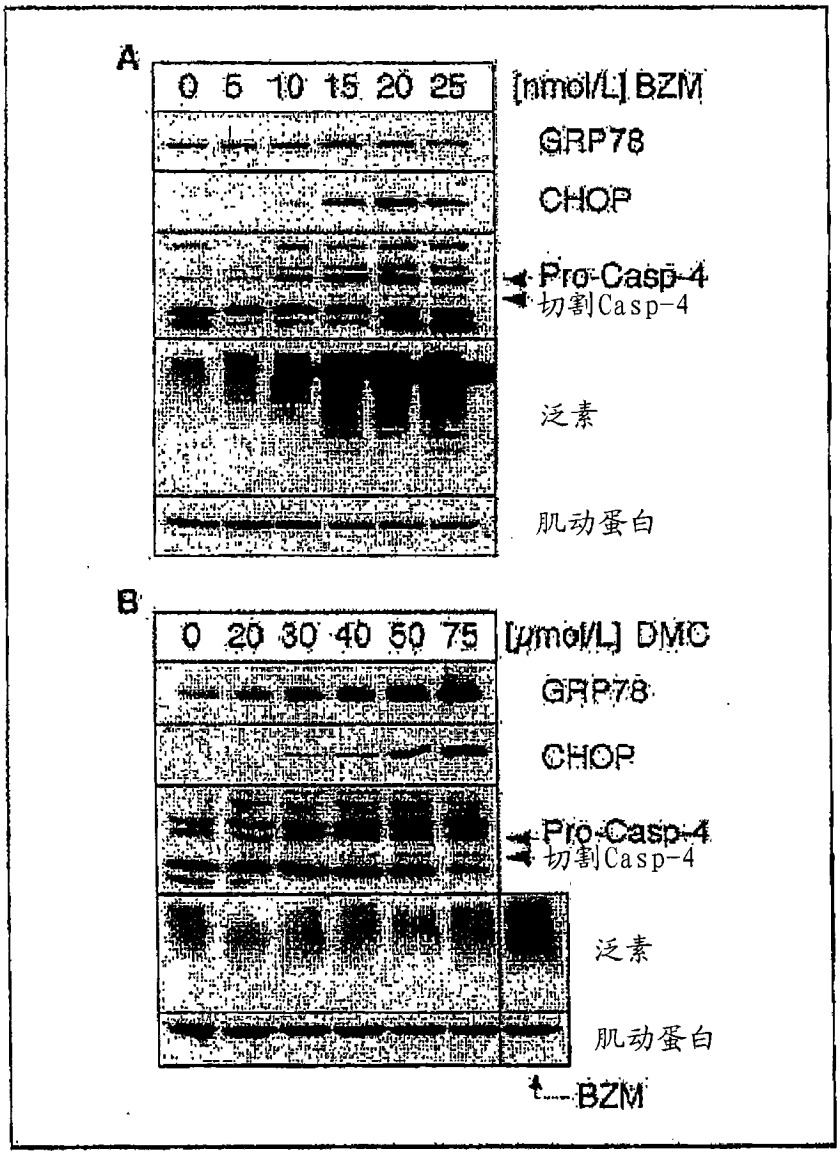

A
0 5 10 15 20 25
[nmol/L] BZM
GRP78
CHOP
Pro-Casp-4
切割Casp-4
泛素
肌动蛋白
B
0 20 30 40 50 75
[μmol/L] DMC
GRP78
CHOP
Pro-Casp-4
切割Casp-4
泛素
肌动蛋白
BZM

图 13

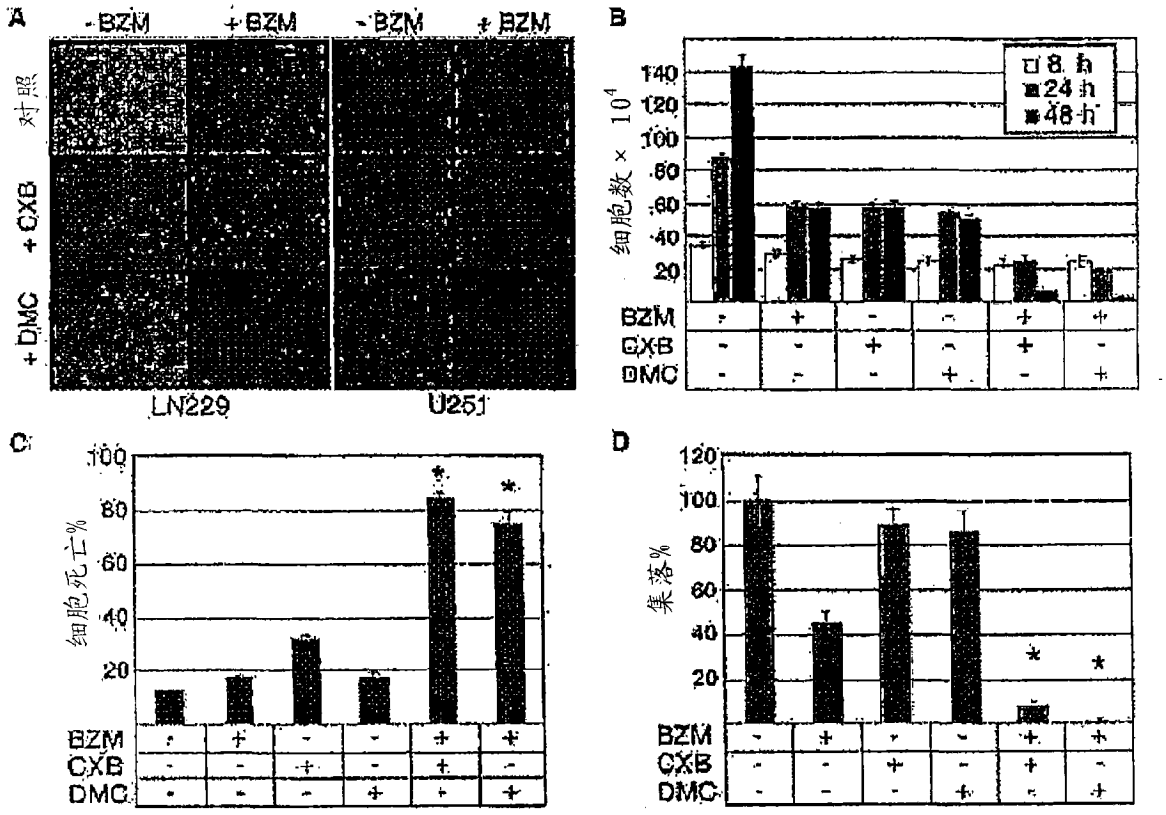

A
-BZM
+BZM
-BZM
+BZM
对照
+CXB
+DMC
LN229
U251
B
8 h
24 h
48 h
细胞数 × 10^4
BZM
CXB
DMC
C
细胞死亡%
D
集落%

图 14

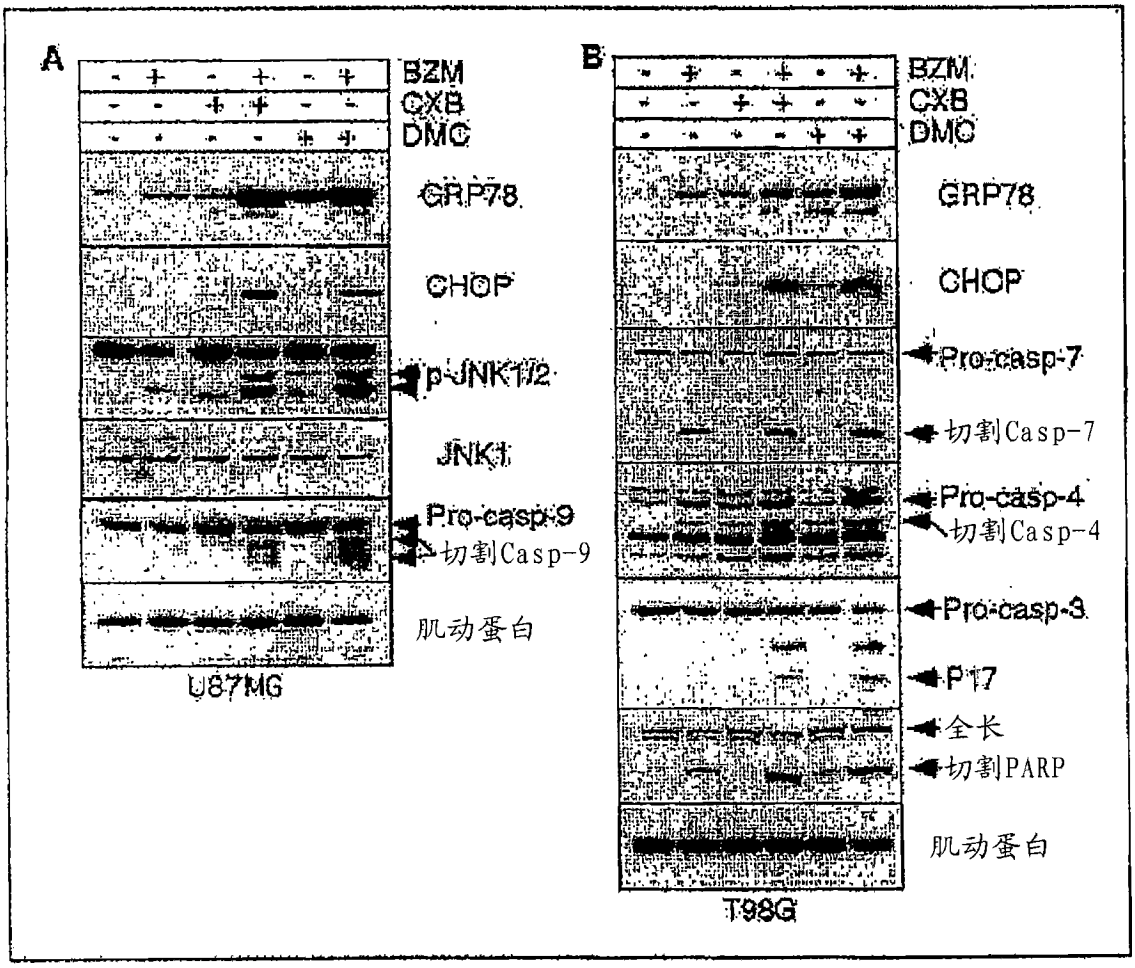

A
BZM
CXB
DMC
GRP78
CHOP
p-JNK1/2
JNK1
Pro-casp-9
切割Casp-9
肌动蛋白
U87MG
B
BZM
CXB
DMC
GRP78
CHOP
Pro-casp-7
切割Casp-7
Pro-casp-4
切割Casp-4
Pro-casp-3
P17
全长
切割PARP
肌动蛋白
T98G

图 15

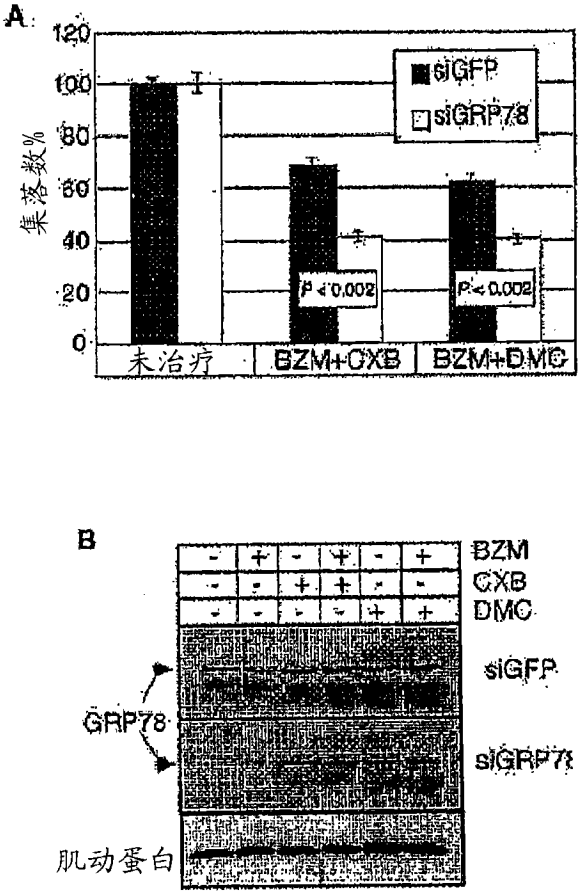

A
集落数%
siGFP
siGRP78
P < 0.002
P < 0.002
未治疗
BZM+CXB
BZM+DMC
B
BZM
CXB
DMC
siGFP
siGRP78
GRP78
肌动蛋白

图 16

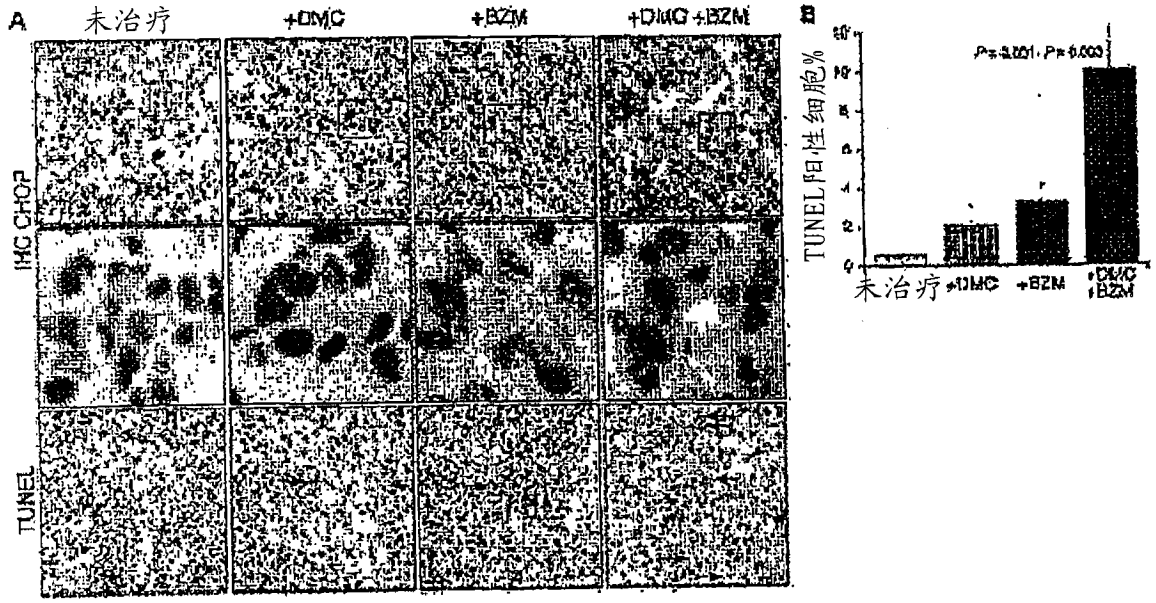

A
未治疗
+DMC
+BZM
+DMC+BZM
IHC CHOP
TUNEL
B
TUNEL阳性细胞%
未治疗
+DMC
+BZM
+DMC +BZM

图 17

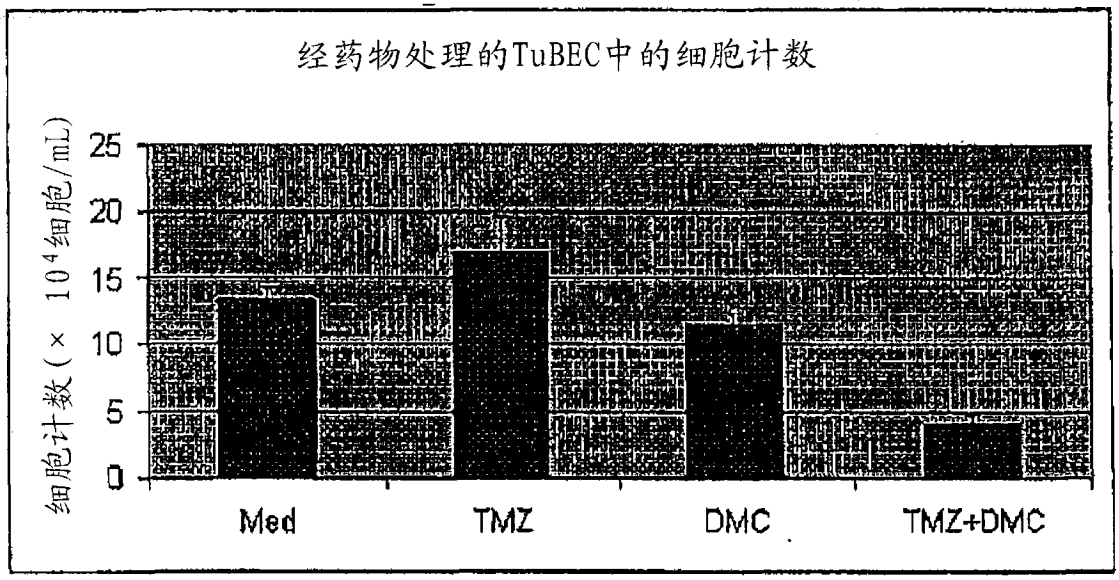

经药物处理的TuBEC中的细胞计数
细胞计数(× 10^4细胞/mL)
25
20
15
10
5
0
Med
TMZ
DMC
TMZ+DMC

图 18

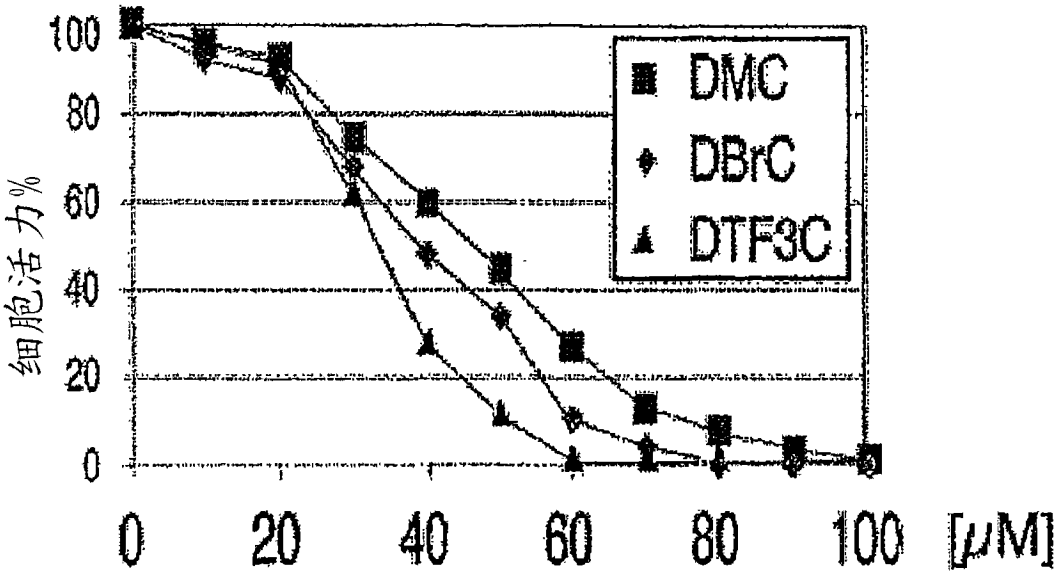

细胞活力%
100
80
60
40
20
0
DMC
DBrC
DTF3C
0
20
40
60
80
100
[μM]

图 19