



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102427814 A

(43) 申请公布日 2012. 04. 25

(21) 申请号 201080020866. 9

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2010. 03. 12

A61K 31/519 (2006. 01)

(30) 优先权数据

A61K 31/343 (2006. 01)

61/210, 053 2009. 03. 12 US

A61P 35/00 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 11. 11

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2010/000754 2010. 03. 12

(87) PCT申请的公布数据

W02010/104598 EN 2010. 09. 16

(71) 申请人 佛罗里达大学研究基金会公司

地址 美国佛罗里达州

(72) 发明人 S. N. 霍赫瓦尔德

D. A. 奥斯特罗夫 W. G. 坎斯

E. 库伦诺瓦

(74) 专利代理机构 北京尚诚知识产权代理有限公司

公司 11322

代理人 龙淳 李巍

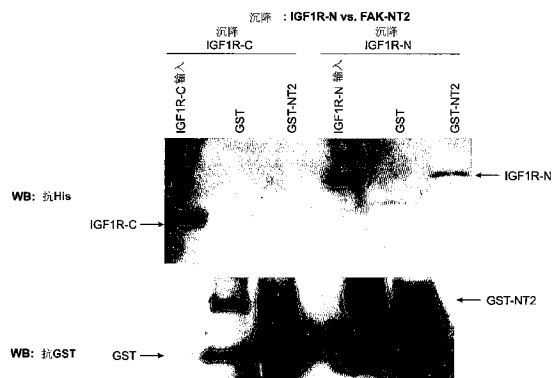
权利要求书 5 页 说明书 46 页 附图 46 页

(54) 发明名称

激酶蛋白结合抑制剂

(57) 摘要

本发明提供能治疗患有或易患有细胞增殖病症(特别是癌症)的受试者的化合物,以及鉴定和使用该化合物、其药物组合物和试剂盒的方法。



1. 一种治疗患有或易患有癌症的受试者的方法,所述方法包括对其所述受试者施用有效量的能调节 FAK 与 IGF-1R 之间的结合相互作用的化合物。

2. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述癌症是乳腺癌、呼吸道癌、脑癌、生殖器官癌、消化道癌、泌尿道癌、眼癌、肝癌、皮肤癌、头颈癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌或实体瘤的远距离转移的癌。

3. 如权利要求 2 所述的方法,其中所述癌症是胰腺癌、黑素瘤癌或食道癌。

4. 如权利要求 3 所述的方法,其中所述癌症是胰腺癌。

5. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述化合物选自

a) 2-(羟甲基)-6-亚氨基-2,3,3a,9a-四氢-6H-咪唑并[2,3:4,5][1,3]噁唑并[3,2-a]嘧啶-3-基磷酸二氢酯;

b) 4-(甲硫基)-7-(5-O-磷酸-D-咪唑核糖基)-{7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶};

c) 1,1'-(1,7,9-三羟基-8,9b-二甲基-3-氧代-4a-(苯硫基)-3,4,4a,9b-四氢二苯并-[b,d]咪唑-2,6-二基)二乙酮;

d) 3-甲基-2,4-二磺基戊二酸;和

e) 1-氨基丙烷-1,3-二基二磷酸;

或其药学上可接受的盐。

6. 如权利要求 5 所述的方法,其中所述化合物是 4-(甲硫基)-7-(5-O-磷酸-D-咪唑核糖基)-{7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶}或其药学上可接受的盐。

7. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述方法还包括对其所述受试者施用额外的治疗剂。

8. 如权利要求 7 所述的方法,其中所述额外的治疗剂是化疗剂。

9. 如权利要求 8 所述的方法,其中所述额外的治疗剂选自天门冬酰胺酶、博莱霉素、钙黄绿素-AM、卡铂、卡莫司汀、苯丁酸氮芥、顺铂、L-天冬酰胺酶、环磷酰胺、阿糖胞苷、氮烯唑胺、放线菌素 D、柔红霉素、多烯紫杉醇、阿霉素(亚德里亚霉素)、表柔比星、依托泊甙、ET-743、厄洛替尼、5-氟尿嘧啶、吉西他滨、吉非替尼、六甲三聚氰胺、羟基脲、异环磷酰胺、伊立替康、亚叶酸、洛莫司汀、氮芥、6-巯嘌呤、美司钠、氨甲喋呤、丝裂霉素 C、米托蒽醌、NVP-AEW541、紫杉醇、泼尼松龙、强的松、甲基苄肼、雷洛昔芬、罗丹明-123、链佐星、TAE226、他莫西酚、硫鸟嘌呤、拓扑替康、长春碱、长春新碱、长春地辛和 Zalypsis。

10. 如权利要求 7 所述的方法,其中所述额外的治疗剂选自 5-氟尿嘧啶(5-FU)、吉西他滨、氟嘧啶、核苷胞苷类似物、NVP-AEW541、铂类似物、拓扑异构酶抑制剂、TAE-226、抗微管剂、PI3 激酶抑制剂、蛋白酶体抑制剂、维生素 D 类似物、花生四烯酸途径抑制剂、组蛋白去乙酰剂抑制剂和法尼基转移酶抑制剂。

11. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述方法还包括用选自外科手术、化疗、放疗、免疫治疗、单克隆抗体治疗和表皮生长因子受体治疗中的至少一种疗法治疗其所述受试者。

12. 如权利要求 11 所述的方法,其中所述方法包括用化疗和/或放疗治疗其所述受试者。

13. 一种治疗患有或易患有癌症的受试者的方法,所述方法包括对其所述受试者施用有效量的化合物,所述化合物选自

a) 2-(羟甲基)-6-亚氨基-2,3,3a,9a-四氢-6H-咪唑并[2,3:4,5][1,3]噁唑并[3,

2-a] 嘧啶 -3- 基磷酸二氢酯；

b) 4-(甲硫基)-7-(5-O- 磷酰 -D- 呋喃核糖基)-{7H- 吡咯并 [2,3-d] 嘧啶 }；

c) 1,1' -(1,7,9- 三羟基 -8,9b- 二甲基 -3- 氧代 -4a-(苯硫基)-3,4,4a,9b- 四氢二苯并 -[b,d] 呋喃 -2,6- 二基) 二乙酮；

d) 3- 甲基 -2,4- 二磺基戊二酸；和

e) 1- 氨基丙烷 -1,3- 二基二磷酸；

或其药学上可接受的盐。

14. 如权利要求 13 所述的方法，其中所述化合物是 4-(甲硫基)-7-(5-O- 磷酰 -D- 呋喃核糖基)-{7H- 吡咯并 [2,3-d] 嘧啶 } 或其药学上可接受的盐。

15. 如权利要求 13 所述的方法，其中所述癌症是胰腺癌、黑素瘤癌或食道癌。

16. 如权利要求 13 所述的方法，其中所述方法还包括对所述受试者施用额外的治疗剂。

17. 如权利要求 13 所述的方法，其中所述方法还包括用外科手术、化疗、放疗、免疫治疗、单克隆抗体治疗或表皮生长因子受体治疗来治疗其所述受试者。

18. 一种调节 FAK 与 IGF-1R 之间的结合相互作用的方法，所述方法包括使 FAK 与能够与 FAK 或其特定结构域结合或联合的化合物接触。

19. 如权利要求 18 所述的方法，其中所述化合物能抑制 FAK 的酪氨酸磷酸化。

20. 如权利要求 18 所述的方法，其中所述化合物是选自以下的化合物

a) 2-(羟甲基)-6- 亚氨基 -2,3,3a,9a- 四氢 -6H- 呋喃并 [2,3:4,5] [1,3] 噁唑并 [3,2-a] 嘧啶 -3- 基磷酸二氢酯；

b) 4-(甲硫基)-7-(5-O- 磷酰 -D- 呋喃核糖基)-{7H- 吡咯并 [2,3-d] 嘧啶 }；

c) 1,1' -(1,7,9- 三羟基 -8,9b- 二甲基 -3- 氧代 -4a-(苯硫基)-3,4,4a,9b- 四氢二苯并 -[b,d] 呋喃 -2,6- 二基) 二乙酮；

d) 3- 甲基 -2,4- 二磺基戊二酸；和

e) 1- 氨基丙烷 -1,3- 二基二磷酸；

或其药学上可接受的盐。

21. 如权利要求 18 所述的方法，其中所述化合物能与 FAK 氨基端片段 (NT2) 结合或联合。

22. 一种调节 FAK 与 IGF-1R 之间的结合相互作用的方法，所述方法包括使 IGF-1R 与能够与 IGF-1R 或其特定结构域结合或联合的化合物接触。

23. 如权利要求 18 所述的方法，其中所述化合物能抑制 IGF-1R 的酪氨酸磷酸化。

24. 如权利要求 22 所述的方法，其中所述化合物是选自以下的化合物

a) 2-(羟甲基)-6- 亚氨基 -2,3,3a,9a- 四氢 -6H- 呋喃并 [2,3:4,5] [1,3] 噁唑并 [3,2-a] 嘧啶 -3- 基磷酸二氢酯；

b) 4-(甲硫基)-7-(5-O- 磷酰 -D- 呋喃核糖基)-{7H- 吡咯并 [2,3-d] 嘧啶 }；

c) 1,1' -(1,7,9- 三羟基 -8,9b- 二甲基 -3- 氧代 -4a-(苯硫基)-3,4,4a,9b- 四氢二苯并 -[b,d] 呋喃 -2,6- 二基) 二乙酮；

d) 3- 甲基 -2,4- 二磺基戊二酸；和

e) 1- 氨基丙烷 -1,3- 二基二磷酸；

或其药学上可接受的盐。

25. 一种治疗患有或易患有癌症的受试者的方法,所述方法包括对其所述受试者施用能降低 IGF-1R 和 AKT 磷酸化并诱导癌细胞凋亡的化合物。

26. 如权利要求 25 所述的方法,其中所述化合物选自

a) 2-(羟甲基)-6-亚氨基-2,3,3a,9a-四氢-6H-咪唑并[2,3:4,5][1,3]噁唑并[3,2-a]嘧啶-3-基磷酸二氢酯;

b) 4-(甲硫基)-7-(5-O-磷酸-D-咪唑核糖基)-{7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶};

c) 1,1'-(1,7,9-三羟基-8,9b-二甲基-3-氧代-4a-(苯硫基)-3,4,4a,9b-四氢二苯并-[b,d]咪唑-2,6-二基)二乙酮;

d) 3-甲基-2,4-二磺基戊二酸;和

e) 1-氨基丙烷-1,3-二基二磷酸;

或其药学上可接受的盐。

27. 如权利要求 26 所述的方法,其中所述化合物是 4-(甲硫基)-7-(5-O-磷酸-D-咪唑核糖基)-{7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶}或其药学上可接受的盐。

28. 一种调节不受控制的细胞增殖的方法,所述方法包括使进行不受控制的增殖的细胞与能调节 FAK 和 IGF-1R 之间的结合相互作用的化合物接触。

29. 如权利要求 28 所述的方法,其中所述化合物选自

a) 2-(羟甲基)-6-亚氨基-2,3,3a,9a-四氢-6H-咪唑并[2,3:4,5][1,3]噁唑并[3,2-a]嘧啶-3-基磷酸二氢酯;

b) 4-(甲硫基)-7-(5-O-磷酸-D-咪唑核糖基)-{7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶};

c) 1,1'-(1,7,9-三羟基-8,9b-二甲基-3-氧代-4a-(苯硫基)-3,4,4a,9b-四氢二苯并-[b,d]咪唑-2,6-二基)二乙酮;

d) 3-甲基-2,4-二磺基戊二酸;和

e) 1-氨基丙烷-1,3-二基二磷酸;

或其药学上可接受的盐。

30. 如权利要求 29 所述的方法,其中所述化合物是 4-(甲硫基)-7-(5-O-磷酸-D-咪唑核糖基)-{7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶}或其药学上可接受的盐。

31. 一种治疗患有或易患有细胞增殖病症的受试者的方法,所述方法包括对其所述受试者施用有效量的能调节 FAK 与 IGF-1R 之间的结合相互作用的化合物。

32. 如权利要求 31 所述的方法,其中所述化合物选自

a) 2-(羟甲基)-6-亚氨基-2,3,3a,9a-四氢-6H-咪唑并[2,3:4,5][1,3]噁唑并[3,2-a]嘧啶-3-基磷酸二氢酯;

b) 4-(甲硫基)-7-(5-O-磷酸-D-咪唑核糖基)-{7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶};

c) 1,1'-(1,7,9-三羟基-8,9b-二甲基-3-氧代-4a-(苯硫基)-3,4,4a,9b-四氢二苯并-[b,d]咪唑-2,6-二基)二乙酮;

d) 3-甲基-2,4-二磺基戊二酸;和

e) 1-氨基丙烷-1,3-二基二磷酸;

或其药学上可接受的盐。

33. 如权利要求 32 所述的方法,其中所述化合物是 4-(甲硫基)-7-(5-O-磷酸-D-咪

喃核糖基)-{7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶}或其药学上可接受的盐。

34. 一种用于治疗患有或易患有细胞增殖病症的受试者的试剂盒,所述试剂盒包括有效量的能调节 FAK 与 IGF-1R 之间的结合相互作用的化合物。

35. 如权利要求 34 所述的试剂盒,其中所述化合物选自

a) 2-(羟甲基)-6-亚氨基-2,3,3a,9a-四氢-6H-咪喃并[2,3:4,5][1,3]噁唑并[3,2-a]嘧啶-3-基磷酸二氢酯;

b) 4-(甲硫基)-7-(5-O-磷酸-D-咪喃核糖基)-{7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶};

c) 1,1'-(1,7,9-三羟基-8,9b-二甲基-3-氧代-4a-(苯硫基)-3,4,4a,9b-四氢二苯并-[b,d]咪喃-2,6-二基)二乙酮;

d) 3-甲基-2,4-二磺基戊二酸;和

e) 1-氨基丙烷-1,3-二基二磷酸;

或其药学上可接受的盐。

36. 如权利要求 35 所述的试剂盒,其实所述化合物是 4-(甲硫基)-7-(5-O-磷酸-D-咪喃核糖基)-{7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶}或其药学上可接受的盐。

37. 如权利要求 34 所述的试剂盒,其中所述细胞增殖病症是癌症。

38. 如权利要求 37 所述的试剂盒,其中所述癌症是乳腺癌、呼吸道癌、脑癌、生殖器官癌、消化道癌、泌尿道癌、眼癌、肝癌、皮肤癌、头颈癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌或实体瘤的远距离转移的癌。

39. 如权利要求 38 所述的试剂盒,其中所述癌症是胰腺癌、黑素瘤癌或食道癌。

40. 如权利要求 39 所述的试剂盒,其中所述癌症是胰腺癌。

41. 如权利要求 34 所述的试剂盒,还包括额外的治疗剂。

42. 如权利要求 41 所述的试剂盒,其中所述额外的治疗剂选自天门冬酰胺酶、博莱霉素、钙黄绿素-AM、卡铂、卡莫司汀、苯丁酸氮芥、顺铂、L-天冬酰胺酶、环磷酰胺、阿糖胞苷、氮烯唑胺、放线菌素 D、柔红霉素、多烯紫杉醇、阿霉素(亚德里亚霉素)、表柔比星、依托泊甙、ET-743、厄洛替尼、5-氟尿嘧啶、吉西他滨、吉非替尼、六甲三聚氰胺、羟基脲、异环磷酰胺、伊立替康、亚叶酸、洛莫司汀、氮芥、6-巯嘌呤、美司钠、氨甲喋呤、丝裂霉素 C、米托蒽醌、NVP-AEW541、紫衫醇、泼尼松龙、强的松、甲基苄肼、雷洛昔芬、罗丹明-123、链佐星、TAE226、他莫西酚、硫鸟嘌呤、拓扑替康、长春碱、长春新碱、长春地辛和 Zalypsis。

43. 一种治疗患有或易患有癌症的受试者的药物组合物,所述组合物包括有效量的能调节 FAK 和 IGF-1R 之间的结合相互作用的化合物、和药学上可接受的载体或稀释剂。

44. 如权利要求 43 所述的药物组合物,其中所述化合物选自

a) 2-(羟甲基)-6-亚氨基-2,3,3a,9a-四氢-6H-咪喃并[2,3:4,5][1,3]噁唑并[3,2-a]嘧啶-3-基磷酸二氢酯;

b) 4-(甲硫基)-7-(5-O-磷酸-D-咪喃核糖基)-{7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶};

c) 1,1'-(1,7,9-三羟基-8,9b-二甲基-3-氧代-4a-(苯硫基)-3,4,4a,9b-四氢二苯并-[b,d]咪喃-2,6-二基)二乙酮;

d) 3-甲基-2,4-二磺基戊二酸;和

e) 1-氨基丙烷-1,3-二基二磷酸;

或其药学上可接受的盐。

45. 如权利要求 44 所述的药物组合物,其中所述化合物是 4-(甲硫基)-7-(5-O-磷酸-D-呋喃核糖基)-{7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶}或其药学上可接受的盐。

46. 如权利要求 43 所述的药物组合物,其中所述癌症是胰腺癌、黑素瘤癌或食道癌。

激酶蛋白结合抑制剂

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求以下于 2009 年 3 月 12 日提交的美国临时申请第 61/210,053 号的优先权,其内容引入本文以供参考。

[0003] 对受联邦政府资助的研究中所作出的发明的权益声明

[0004] 本工作部分得到美国国家卫生研究院 /NCI 资助金的支持,资助金号 CA 113766(S. N. H.)。政府在本发明中享有一定权利。

背景技术

[0005] 细胞增殖病症是包括不希望的或不受控制的细胞增殖的病症。细胞增殖病症的具体实例是癌症。癌症是全世界的严重的健康问题。癌症影响所有年龄的人,甚至胎儿。据世界卫生组织 2007 年报道,癌症导致所有死亡中的约 13%。2007 年全球约 760 万人死于癌症。根据美国癌症协会估计,仅在美国每年将会诊断出 425,000 起这些癌症的新病例。

[0006] 癌症可在各种各样的不同的器官、组织和细胞类型中发展。术语“癌症”是指千种以上的不同疾病的集合。一个实例是胰腺癌,其是胰腺的恶性肿瘤。胰腺癌是居美国癌症死亡第四大原因的致命性疾病。胰腺癌特别是局部晚期的胰腺癌的治疗是一项临床挑战,其中位生存期约为 10-12 个月。标准治疗策略包括放疗和 / 化疗。遗憾的是,局部控制差,据估计 1 年和 2 年的局部进展率分别为 36%和 62%,局部进展的中位时间为 6.4 个月。控制原发性肿瘤的失败与例如疼痛、胃出口和十二指肠梗阻、以及上消化道溃疡和出血的症状相关。因此,对于发现能获得改善的患者结果(例如总存活率、无病存活率、局部控制、副作用和生活质量)的治疗途径存在迫切的需要。

[0007] 粘着斑激酶 (FAK) 是非受体蛋白酪氨酸激酶,位于细胞与其胞外基质之间的接触点(黏着斑),并且是来自整合素(integrin)、生长因子和激酶的许多信号传导通路的汇聚点(参见 McLean GW 等人, Nature Reviews 2005 ;5(7) :505-15)。FAK 在介导基本的细胞过程中起着重要作用,例如细胞生长、存活和迁移。FAK 在正常组织中低水平表达,但在许多癌症类型中,例如在胰腺癌患者的多数肿瘤中过表达(参见 Liu W. 等人, Carcinogenesis, 2008 ;29(6) :1096-107 ;和 WO 2005/049852)。已显示在胰腺癌细胞和异种移植模型中,使 FAK 基因沉默促进凋亡并抑制转移(参见 Liu W. 等人, Carcinogenesis, 2008 ;29(6) :1096-107)。因此,FAK 是癌症治疗的可行靶点。开发靶向 FAK 的药物会是对许多现有的癌症治疗的自然补充。

[0008] 胰岛素样生长因子 1 受体 (IGF-1R) 是在细胞增殖中起重要作用的受体酪氨酸激酶,还联系到肿瘤发生(参见 Vincent AM 等人, Growth Hormone and IGF Research. 2002 ;12 :193-197)。该受体介导 IGF-1 的作用, IGF-1 是分子结构与胰岛素相似的多肽蛋白激素。IGF-1R 在许多人类癌症中过表达,刺激细胞增殖,促使致癌性转化并抑制细胞凋亡。IGF-1/IGF-1R 自分泌环在多种人肿瘤细胞中表达,并且已显示在几种肿瘤类型包括胰腺癌中激活这条轴线以促进转移。此外,已显示 IGF-1R 信号传导的抑制在许多动物模型中引起肿瘤生长抑制。

[0009] 然而,尽管存在以下事实:本领域内呈现的数据表明 FAK 和 / 或 IGF-1R 可能是发展癌症治疗的可行靶点,但尚未得到具有理想的特异性的激酶抑制剂。特别是医学领域内可获得极少关于 FAK 和 IGF-1R 对胰腺癌的恶性行为的贡献的信息。

[0010] 因此,对于发展具有理想的特异性的新癌症疗法和治疗癌症的新策略,存在尚未满足的临床需求。

发明内容

[0011] 本发明的一个方面提供治疗患有或易患有癌症的受试者的方法;该方法包括对受试者施用能调节 FAK 与 IGF-1R 之间的结合相互作用的化合物。

[0012] 在一个实施方式中,该化合物能调节 FAK-NT 和 IGF-1R 之间的结合相互作用。在另一个实施方式中,该化合物能调节 FAK-NT2 和 IGF-1R 之间的结合相互作用。

[0013] 在某些实施方式中,该化合物是 a) 2-(羟甲基)-6-亚氨基-2,3,3a,9a-四氢-6H-咪唑并[2,3:4,5][1,3]噁唑并[3,2-a]嘧啶-3-基磷酸二氢酯;b) 4-(甲硫基)-7-(5-O-磷酸-D-咪唑核糖基)-{7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶};c) 1,1'-(1,7,9-三羟基-8,9b-二甲基-3-氧代-4a-(苯硫基)-3,4,4a,9b-四氢二苯并-[b,d]咪唑-2,6-二基)二乙酮;d) 3-甲基-2,4-二磺基戊二酸;或 e) 1-氨基丙烷-1,3-二基二磷酸;或其药学上可接受的盐、酯或前药。具体实例是 4-(甲硫基)-7-(5-O-磷酸-D-咪唑核糖基)-{7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶},或其药学上可接受的盐、酯或前药。

[0014] 本发明还提供通过对其受试者施用有效量的化合物来治疗患有或易患有癌症的受试者的方法,该化合物选自 a) 2-(羟甲基)-6-亚氨基-2,3,3a,9a-四氢-6H-咪唑并[2,3:4,5][1,3]噁唑并[3,2-a]嘧啶-3-基磷酸二氢酯;b) 4-(甲硫基)-7-(5-O-磷酸-D-咪唑核糖基)-{7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶};c) 1,1'-(1,7,9-三羟基-8,9b-二甲基-3-氧代-4a-(苯硫基)-3,4,4a,9b-四氢二苯并-[b,d]咪唑-2,6-二基)二乙酮;d) 3-甲基-2,4-二磺基戊二酸;和 e) 1-氨基丙烷-1,3-二基二磷酸;或其药学上可接受的盐、酯或前药。该化合物的具体实例是 4-(甲硫基)-7-(5-O-磷酸-D-咪唑核糖基)-{7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶},或其药学上可接受的盐、酯或前药。

[0015] 在一个实施方式中,癌症是乳腺癌、呼吸道癌、脑癌、生殖器官癌、消化道癌、泌尿道癌、眼癌、肝癌、皮肤癌、头颈癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌或实体瘤的远距离转移癌。在某些实施方式中,癌症是胰腺癌、黑素瘤癌或食道癌。在一个实施方式中,癌症是胰腺癌。

[0016] 在一个实施方式中,本发明的方法还包括对受试者施用额外的治疗剂。在一个实施方式中,额外的治疗剂是化疗剂。在某些实施方式中,额外的治疗剂选自 5-氟脲嘧啶(5-FU)、吉西他滨(gemcitabine)、氟嘧啶、核苷胞苷类似物、NVP-AEW541、铂类似物、TAE226、拓扑异构酶抑制剂、抗微管剂、磷脂酰肌醇 3 激酶抑制剂(PI3 激酶抑制剂)、蛋白酶体抑制剂、维生素 D 类似物、花生四烯酸途径抑制剂、组蛋白去乙酰剂抑制剂、和法尼基转移酶抑制剂。在某些实施方式中,额外的治疗剂是 TAE226、NVP-AEW541、渥曼青霉素或 LY294002。

[0017] 在某些实施方式中,额外的治疗剂是天门冬酰胺酶(asparaginase)、博莱霉素(bleomycin)、钙黄绿素-AM(calcein-AM)、卡铂(carboplatin)、卡莫司汀(carmustine)、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、顺铂(cisplatin)、L-天冬酰胺酶(colaspase)、环磷酸

胺 (cyclophosphamide)、阿糖胞苷 (cytarabine)、氮烯唑胺 (dacarbazine)、放线菌素 D(dactinomycin)、柔红霉素 (daunorubicin)、多烯紫杉醇 (docetaxel)、阿霉素 (亚德里亚霉素) (doxorubicin(adriamycin))、表柔比星 (epirubicin)、依托泊甙 (etoposide)、ET-743、厄洛替尼 (erlotinib)、5-氟尿嘧啶 (5-fluorouracil)、吉西他滨 (gemcitabine)、吉非替尼 (gefitinib)、六甲三聚氰胺 (hexamethylmelamine)、羟基脲 (hydroxyurea)、异环磷酰胺 (ifosfamide)、伊立替康 (irinotecan)、亚叶酸 (leucovorin)、洛莫司汀 (lomustine)、氮芥 (mechlorethamine)、6-巯嘌呤 (6-mercaptopurine)、美司钠 (mesna)、氨甲喋呤 (methotrexate)、丝裂霉素 C(mitomycin C)、米托蒽醌 (mitoxantrone)、NVP-AEW541、紫杉醇 (paclitaxel)、泼尼松龙 (prednisolone)、强的松 (prednisone)、甲基苄肼 (procarbazine)、雷洛昔芬 (raloxifen)、罗丹明-123 (rhodamine-123)、链佐星 (streptozocin)、TAE226、他莫西酚 (tamoxifen)、硫鸟嘌呤 (thioguanine)、拓扑替康 (topotecan)、长春碱 (vinblastine)、长春新碱 (vincristine)、长春地辛 (vindesine)、或 Zalypsis。

[0018] 在另一个实施方式中,本发明的方法还包括使用至少一种额外的疗法治疗有需要的受试者。治疗可以是,但不限于外科手术、化疗、放疗、免疫治疗、单克隆抗体治疗和表皮生长因子受体治疗。

[0019] 在一个实施方式中,额外的治疗是化疗。在另一个实施方式中,额外的治疗是放疗。在一个实施方式中,该方法包括通过化疗和放疗的组合治疗受试者。

[0020] 本发明的另一方面提供治疗患有或易患有癌症的受试者的方法;该方法包括对需要的受试者施用能降低 IGF-1R 和 AKT 磷酸化并诱导癌细胞凋亡的化合物。示例性的化合物在本文中描述。

[0021] 本发明的又一方面呈现调节不受控制的细胞增殖的方法。该方法包括使经历不受控制的增殖的细胞与鉴定为能调节 FAK 与 IGF-1R 之间的结合相互作用的化合物接触。在一个实施方式中,该化合物是本文所述的化合物。

[0022] 一方面,本发明提供治疗患有或易患有细胞增殖病症的受试者的方法。该方法包括对受试者施用有效量的能调节 FAK 与 IGF-1R 之间的结合相互作用的化合物。在一个实施方式中,该化合物是本文所述的化合物。

[0023] 本发明还提供通过使 FAK 与能够和 FAK 或其特定结构域结合或联合的化合物接触,来调节 FAK 与 IGF-1R 之间的结合相互作用的方法。在一个实施方式中,该化合物能抑制 FAK 的酪氨酸磷酸化,从而中断 FAK 和 IGF-1R 之间的结合相互作用。在一个实施方式中,该化合物是本文所述的化合物。另一个实施方式提供能与 FAK 氨基端片段 (NT2) 结合或联合的化合物。

[0024] 另一方面,调节 FAK 与 IGF-1R 之间的结合相互作用的方法包括使 IGF-1R 与能够 and IGF-1R 或其特定结构域结合或联合的化合物接触。在一个实施方式中,该化合物能抑制 IGF-1R 的酪氨酸磷酸化,从而中断 FAK 和 IGF-1R 之间的结合相互作用。示例性的化合物在本文中描述。一个实施方式提供能与 IGF-1R 的激酶结构域结合或联合的化合物。

[0025] 本发明还提供用于治疗患有或易患有细胞增殖病症的受试者的试剂盒。具体地,该试剂盒包括有效量的能调节 FAK 与 IGF-1R 之间的结合相互作用的化合物。在一个实施方式中,试剂盒中所含的化合物是本文所述的化合物。

[0026] 在一个实施方式中,细胞增殖病症是癌症。在某些实施方式中,癌症是乳腺癌、呼吸道癌、脑癌、生殖器官癌、消化道癌、泌尿道癌、眼癌、肝癌、皮肤癌、头颈癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌或实体瘤的远距离转移的癌。在某些实施方式中,癌症是胰腺癌、黑素瘤癌或食道癌。一个具体的实例是胰腺癌。

[0027] 在某些实施方式中,该试剂盒还包括额外的治疗剂。在某些实施方式中,额外的治疗剂是上文所述的制剂。

[0028] 本发明还提供治疗患有或易患有癌症的受试者的药物组合物。具体地,该组合物包括有效量的能调节 FAK 与 IGF-1R 之间的结合相互作用的化合物,以及药学上可接受的载体或稀释剂。在一个实施方式中,癌症是胰腺癌、黑素瘤癌或食道癌。在另一个实施方式中,化合物是本文所述的化合物。该药物组合物可进一步包括额外的治疗剂。额外治疗剂的实例在上文中描述。

[0029] 本发明还提供设计、评价和鉴定结合到 FAK、IGF-1R 或其特定结构域的化合物、或能调节 FAK 与 IGF-1R 之间的结合相互作用的化合物的方法。本发明的其它实施方式在下文中公开。

附图说明

[0030] 图 1 显示 FAK 和 IGF-1R 蛋白构建体 (construct) 之间的蛋白质沉降 (pull down) 检定的结果;

[0031] 图 2 描述用 NSC 344553 处理 24 小时的细胞裂解物 (来源于 C8161 黑素瘤癌细胞) 的免疫沉淀和蛋白质印迹结果;

[0032] 图 3 描述 75 μ M 的 NSC 344553 对 C8161 黑素瘤癌细胞测试的免疫沉淀和蛋白质印迹结果;

[0033] 图 4 描述用 1 μ M 的 NSC 344553 处理 C8161 黑素瘤癌细胞的蛋白质印迹结果;

[0034] 图 5 描述用 5 μ M 的 NSC 344553 和 PI3 激酶抑制剂处理 C8161 黑素瘤癌细胞 24 小时的蛋白质印迹结果;

[0035] 图 6 描述用 NSC 344553 处理胰腺细胞和黑素瘤细胞 72 小时的细胞存活检测结果;

[0036] 图 7 描述 2 μ M 的 NSC 344553 处理对 IGF-1R+/- 细胞的作用;

[0037] 图 8 描述 NSC 344553 处理对 FAK+/- 细胞的作用;

[0038] 图 9 描述用 NSC 344553 处理的 Panc-1 癌细胞的蛋白质印迹分析;

[0039] 图 10 描述 NSC 344553 处理对 FAK 野生型和裸细胞 (null cell) 及 IGF-1R 野生型和裸细胞的 MTT 细胞滴定 96 (MTT cell titer 96) 检定结果;

[0040] 图 11 描述采用 MTT 检定经 NSC 344553 处理的 A375 和 C8161 黑素瘤癌细胞的细胞存活结果;

[0041] 图 12 描述经 NSC 128687 处理 24 小时的胰腺 (MiaPaCa-2) 细胞的免疫沉淀和蛋白质印迹结果;

[0042] 图 13 描述 MiaPaCa-2 癌细胞对 72 小时的 NSC 250435 处理的剂量响应曲线;

[0043] 图 14 示出经 NSC 344553 处理的黑素瘤 (A375 和 C8161) 癌细胞和胰腺 (Panc-1 和 MiaPaCa-2) 癌细胞的蛋白质印迹结果;

[0044] 图 15 描述 FAK 与 IGF-1R 相互作用、INT2-31 (NSC 344553) 的结构和 FAK 与 IGF-1R 相互作用中断的 (in silico) 计算机模拟。A. 基于计算机模拟,证实了 FAK 与 IGF-1R 相互作用的建议位点。在对应于 FAK 与 IGF-1R 相互作用位点的 FAK 上的口袋中 (aa 127-243) 模拟 INT2-31。INT2-31 的结构显示在右上方。B. 随着 INT2-31 剂量升高, IGF-1R β 的 GST-FAK-NT2 沉降减少。C. 随着 INT2-31 剂量升高, C8161 黑素瘤细胞中 FAK 与 IGF-1R 的共免疫沉淀减少。D. 随着 INT2-31 剂量升高, A375 黑素瘤细胞中 FAK 与 IGF-1R 的共免疫沉淀减少。显示 IGF-1R 与 FAK 的比例的密度测定在图 15B、15C 和 15D 中蛋白质印迹以下显示。附图表示重复三次进行的实验。

[0045] 图 16 描述 INT2-31 对黑素瘤细胞存活和增殖的作用。A. INT2-31 在 72 小时内以剂量依赖性的方式抑制正常的黑素细胞和三种黑素瘤细胞系的细胞存活。B. FAK、IGF-1R、Akt 和 ERK 在三种黑素瘤细胞系和黑素细胞中的表达。C. 在剂量增加的 INT2-31 或 TAE-226 (双重 FAK 和 IGF-1R 激酶抑制剂) 存在的条件下, A375 黑素瘤细胞 (左) 和 C8161 黑素瘤细胞 (右) 的 CSFE 细胞增殖检定。D. 在 INT2-31 或 TAE 226 存在的条件下的 C8161 黑素瘤细胞计数。附图表示重复三次进行的实验。

[0046] 图 17 证实 INT2-31 的作用是 FAK 和 IGF-1R 特异性的。A. 显示通过 FAK shRNA 敲除 FAK 的蛋白质印迹。B. 显示与亲代细胞和模拟转染的细胞相比, FAK 敲除的 C8161 细胞中对 INT2-31 处理的敏感性下降的 MTT 检测。C. FAK 特异性。显示相比于裸 (nu11) 成纤维细胞, INT2-31 (31) 或 NVP AEW541 (IGF-1R 激酶抑制剂, NVP) 对 FAK 野生型的作用提高的 MTT 检测。* $p < 0.05$ 。D. IGF1R 特异性。显示相比于裸成纤维细胞, INT2-31 (31) 或 NVP AEW541 (IGF-1R 激酶抑制剂, NVP) 对 IGF-1R 野生型的作用提高的 MTT 检测。* $p < 0.05$ 。附图表示重复三次进行的实验。

[0047] 图 18 证实 INT2-31 诱导脱附 (detachment) 和凋亡。A. 用 5 μ M INT2-31 处理细胞 72h 时, 脱附有少量但不显著的增加。使用 TAE (TAE226) 在 48h 和 72h 时观察到更大的效应 (相对于对照 * $p < 0.05$)。B. 经 INT2-31 处理的细胞的 Hoescht 染色。C. 经 48h 的 INT2-31 或 TAE226 处理的活化的半胱天冬氨酸酶 (caspase) 3/7 检测。D. 凋亡途径的生化标志物的蛋白质印迹分析。附图表示重复三次进行的实验。

[0048] 图 19 证实 INT2-31 中断依赖 FAK-IGF-1R 的信号传导并取消依赖 IGF 的 Akt 激活而不抑制激酶活性。在有和无 IGF-1 刺激的情况下, 增加 INT2-31 的剂量在 24h 后对 C8161A、A375B、和 SK-MEL-28C 细胞中信号传导的作用。附图表示重复三次进行的实验。D. INT2-31 不显著抑制这 12 种激酶的激酶活性。E. 将 C8161 细胞平铺于 6 孔板上, 并用 5 μ M INT2-31 处理 24、48、72 小时。F. 和 G. FAK-NT2 片段的过表达使 IGF-1 诱导的 AKT 磷酸化降低。经 FAK N 端的 3 个 GFP 片段 (FAK NT1、FAK NT2 和 FAK NT3) 转染的 C8161 细胞。

[0049] 图 20 证实 INT2-31 使黑素瘤异种移植物中的肿瘤 p-Akt 和生长下降。用 A. C8161 或 B. A375 肿瘤细胞对动物皮下接种, 并相对于 PBS, 通过腹膜内注射用 15mg/kg INT2-31 对其处理。动物重量在生长曲线下显示 (* $p < 0.05$)。肿瘤生长图表示重复三次进行的实验。C. 相对于 PBS 对照, 经 INT2-31, 15mg/kg 处理的 C8161 肿瘤的 Ki67 染色。反应细胞的百分比示于左上图。染色强度示于左下图 (* $p < 0.05$)。实验结束时被切除的肿瘤的 TUNEL 染色示于右部 (* $p < 0.05$)。D. INT2-31 (15mg/kg) 在体内对 AKT 磷酸化的作用。p-Akt/Akt/

GAPDH 比率的密度测定分析示于图的下部。其显示相对于 PBS 对照, p-Akt/Akt 比率在来源于经 INT2-31 处理的动物的肿瘤中显著下降。E. INT2-31 对源于肿瘤样本的 FAK 和 IGF-1R 共免疫沉淀的作用。下图显示 IGF-1R 与 FAK 信号比的密度测定。

[0050] 图 21 INT2-31 使食道癌细胞对化疗敏感。MTT 检测显示经浓度增加的 INT2-31、5-FU 或组合处理 72 小时的 A) KYSE70 和 B) KYSE140 食道癌细胞系的存活。

[0051] 图 22 INT2-31 使胰腺癌细胞对化疗敏感。A) MTT 检测显示经浓度增加的 INT2-31、5-FU 或组合处理 72 小时的 Panc-1 细胞系的存活。

[0052] 图 23 INT2-31 对直接的 (direct) 食道癌患者 #5 样本的作用。A) MTT 检测显示增加 INT2-31 的浓度抑制食道患者 #5 细胞的细胞存活。B) 相对于 PBS, 通过腹膜内注射用 50mg/kg 的 INT2-31 处理食道患者 #5 异种移植。在肿瘤移植后第 10 天开始处理。动物体重示于生长曲线下。* $p < 0.05$ 。C) 经 Ki67 抗体染色的反应细胞的百分比以处理相对于对照异种移植物的形式显示。* $p < 0.05$ 。

[0053] 图 24 INT2-31 对原位胰腺小鼠模型的作用。A) 相对于 PBS, 通过腹膜内注射用 50mg/kg 的 INT2-31 处理 Miapaca-2 异种移植。在肿瘤移植后第 7 天开始处理。B) 相对于 PBS, 通过皮下注射用 15mg/kg INT2-31 治疗 Panc-1 异种移植。在肿瘤移植后第 15 天开始处理。

具体实施方式

[0054] 本发明提供化合物作为能抑制癌细胞存活或增加凋亡的新的癌症疗法。一方面在于, 本发明的化合物能调节 (例如抑制) FAK 和 IGF-1R 之间的结合相互作用。另一方面是本发明的化合物能靶向 (例如联合或结合到) FAK 和 / 或 IGF-1R 的相互作用位点, 从而阻断 FAK 和 IGF-1R 之间的结合相互作用。本发明还提供能抑制 FAK 和 / 或 IGF-1R 的酪氨酸磷酸化的化合物, 从而阻断 FAK 和 IGF-1R 之间的结合相互作用。

[0055] 本发明还提供使用本发明的化合物来治疗患有或易患有细胞增殖病症的受试者的方法。在某些实施方式中, 细胞增殖病症是癌症。

[0056] 本发明基于, 至少部分基于以下发现: 在癌细胞 (例如胰腺癌细胞) 中 FAK 与 IGF-1R 在物理上相互作用。目前, 据信 FAK 和 IGF-1R 之间的相互作用取决于两种激酶的磷酸化状态, 且抑制任一种激酶的酪氨酸磷酸化阻断此相互作用 (参见 W. Liu 等人, *Carcinogenesis*, 29, 6, 2008, 1096-1107)。

[0057] 已进行了用 GST 和 HIS 标签的纯化蛋白质的基于非细胞 (non-cell based) 的检测。结果显示 FAK 氨基端片段 (NT) (更具体地, NT2) 和 IGF-1R 的激酶结构域之间存在直接的物理相互作用 (图 1)。据信, FAK 和 IGF-1R 之间的此相互作用为癌细胞, 包括胰腺癌细胞, 提供基本的生存信号。

[0058] 根据本发明, 已进行计算机模拟以及结构分析。根据 Lipinski 规则, 使用 DOCK5.1 计算机程序将约 250,000 个具有已知的准确结构的小分子化合物以 100 种不同的取向对接至 FAK 与 IGF-1R 之间的相互作用的位点。然后从美国国家癌症研究院发展治疗计划 (NCI/DTP) 获得具有高度可能性结合到 FAK NT2 并阻断与 IGF-1R 的相互作用的小分子以进行功能检测。鉴定靶向 FAK 与 IGF-1R 的相互作用位点的先导 (lead) 化合物。接着在基于多细胞的检测中对先导化合物阻断纯化的 FAK 与 IGF-1R 蛋白之间的结合、抑制癌细胞存活、降

低 IGF-1R 和 AKT 磷酸化、和 / 或诱导凋亡的能力进行评价。使用一些先导化合物检测数种癌细胞系,包括食道 (KYSE 140) 癌细胞系、胰腺 (Panc-1) 癌细胞系和黑素瘤 (C8161) 癌细胞系。初步结果显示,先导化合物 4-(甲硫基)-7-(5-O-磷酸-D-呋喃核糖基)-{7H-吡咯并 [2,3-d] 嘧啶} 抑制肿瘤细胞存活,改变 FAK 和 IGF-1R 信号传导,并抑制体内肿瘤生长。

[0059] 本发明提供小分子抑制剂作为新的癌症治疗剂。这些抑制剂能调节(例如抑制或阻断)FAK 与 IGF-1R 之间的结合相互作用。本发明还提供新的有效的治疗策略以治疗癌症。

[0060] 在一个实施方式中,本发明的抑制剂具有以下功能中的至少一种:降低癌细胞(例如黑素瘤细胞)的存活、抑制癌细胞增殖(例如黑素瘤细胞)、诱导凋亡、降低 Akt 活化而不抑制激酶活性、减少肿瘤 p-Akt 和降低黑素瘤异种移植物中的生长。

[0061] I. 定义

[0062] 在进一步描述本发明之前,为了本发明可以更易于理解,为了方便首先将某些术语定义并汇总到这里。

[0063] 术语“给药”或“施用”包括将本发明的化合物引入受试者以实施它们的预定功能的途径。可以使用的给药途径的例子包括注射(皮下注射、静脉注射、肠胃外注射、腹膜内注射、鞘内注射)、口服、吸入、直肠和经皮。可以将药物制剂通过适于各种给药途径的形式给予。例如,这些制剂以片剂或胶囊形式给药、通过注射剂、吸入剂、洗眼剂、软膏剂、栓剂等形式通过注射、输注或吸入给药;通过洗剂或软膏剂局部给药;及通过栓剂直肠给药。优选口服给药。注射可以是推注(bolus)或连续式输注。根据给药的途径,可以将本发明的化合物用选定的材料包衣或置于选定的材料中,以保护其不受自然条件的影响,所述自然条件可以不利地影响化合物实施其预定的功能的能力。本发明的化合物可以单独给药,或与上述另一种药物、或与药学上可接受的载体、或与这两者共同给药。本发明的化合物可以在其他药物给药之前、同时或之后给药。而且,本发明的化合物也可以以在体内转化成其活性代谢物或更具有活性的代谢物的前体药物的形式给药。

[0064] 术语“烷基”是指饱和脂肪族基团,包括直链烷基、支链烷基、环烷基(脂环族基团)、烷基取代的环烷基以及环烷基取代的烷基。术语烷基还包括烷基基团,其可以进一步包括替代烃骨架中的一个或多个碳的氧、氮、硫或磷原子,例如氧、氮、硫或磷原子。在某些实施方式中,直链或支链烷基在其骨架中具有 30 个或更少的碳原子(例如直链为 C_1-C_{30} , 支链为 C_3-C_{30})、26 个或更少的碳原子、20 个或更少的碳原子、或 4 个或更少的碳原子。同样地,环烷基在其环结构中可具有 3-10(例如 3、4、5、6) 个碳原子。

[0065] 除非对碳的数目另作说明,本文所用的“低级烷基”表示如上定义的烷基,但是在其直链或支链的骨架结构上具有 1 至 10 个碳,或 1 至 6 个,或 1 至 4 个碳原子。低级烷基的例子包括:甲基、乙基、正丙基、异丙基、叔丁基、己基、庚基、辛基等等。在一个实施方式中,术语“低级烷基”包括在其骨架上具有 4 个或更少碳原子的直链烷基,例如 C_1-C_4 烷基。

[0066] 术语“凋亡”是指可在多细胞生物体中发生的程序性细胞死亡(PCD)的过程。程序性细胞死亡包括一系列导致特征性细胞形态和死亡的生物化学事件,更具体地,一系列导致各种形态变化的生物化学事件,例如,诸如失去膜不对称性和附着性的细胞膜变化、细胞皱缩、核断裂、染色质凝集和染色体 DNA 断裂。

[0067] 术语“联合(associating with)”是指化学实体或化合物或其部分与蛋白质上的结合口袋或结合位点之间接近的状态。联合可以是非共价的(其中毗邻是通过氢键或范德

华力或静电相互作用在能量上有利的)或共价的。

[0068] 本文所用的术语“结合口袋”是指分子或分子复合物的区域,由于其形状而有利地与另一化学实体或化合物联合。

[0069] 本发明的化合物的术语“生物活性”包括由本发明的化合物在响应细胞中引起的所有活性。它包括通过这些化合物引起的基因组和非基因组活性。

[0070] “生物组合物”或“生物样品”是指含有或源自于细胞或生物聚合物的组合物。含有细胞的组合物包括,例如:哺乳动物的血液、红细胞浓缩物、血小板浓缩物、白细胞浓缩物、血细胞蛋白质、血浆、富血小板血浆、血浆浓缩物、来自任意血浆分级的沉淀、来自于任意血浆分级的上清液、血浆蛋白部分、纯化或部分纯化的血蛋白或其他组分、血清、精液、哺乳动物初乳、乳、唾液、胎盘提取物、冷沉淀物、冷上清液、细胞溶胞产物、哺乳动物细胞培养液或培养基、发酵产物、腹水、在血细胞中诱导的蛋白质、在细胞培养物中通过正常或转化细胞(例如通过重组 DNA 或单克隆抗体技术)产生的产物。生物组合物可以不含有细胞。在一个实施方式中,合适的生物组合物或生物样品是红细胞悬浮液。在一些实施方式中,血细胞悬浮液包括哺乳动物血细胞。血细胞可以从人、非人类灵长类动物、狗、猫、马、牛、山羊、绵羊或猪获得。在某些实施方式中,血细胞悬浮液包括红细胞和/或血小板和/或白细胞和/或骨髓细胞。

[0071] 术语“癌症”是指一类疾病,其中一组细胞呈现出受控制的生长、侵染和转移。该术语意在包括,但不限于乳腺癌、呼吸道癌、脑癌、生殖器官癌、消化道癌、泌尿道癌、眼癌、肝癌、皮肤癌、头颈癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌或实体瘤的远距离转移的癌。癌症的一些具体的实例包括,但不限于乳腺癌、膀胱癌、结肠直肠癌、大肠癌、皮肤黑素瘤、子宫内膜癌、肾癌、肺癌、卵巢癌、胰腺癌、骨肉瘤、前列腺癌、淋巴瘤、白血病、皮肤癌、甲状腺癌和肉瘤。

[0072] 术语“细胞增殖病症”包括涉及不期望的或不可控制的细胞增殖的疾病。这些病症的例子包括但不限于:肿瘤或癌症(例如,肺癌(小细胞型和非小细胞型)、甲状腺癌、前列腺癌、胰腺癌、乳腺癌或结肠癌)、肉瘤或黑素瘤。

[0073] 术语“化疗”是指利用杀死细胞、特别是微生物或癌症细胞的化学制品的疾病治疗。在本申请中,此术语是指用来治疗癌症的抗癌治疗剂或用于细胞毒性的标准化治疗方案的这些药物的组合。

[0074] 术语“手性”是指具有与其镜像伙伴不重合的性质的分子,而术语“非手性”是指与其镜像伙伴重合的分子。

[0075] 术语“细胞毒性”和“毒性”是指对细胞有毒的性质。毒剂可以是化学物质、免疫细胞或某些类型的毒物。

[0076] 术语“非对映体”是指具有两个或多个不对称中心、并且其分子彼此不互为镜像的立体异构体。

[0077] 术语“远距离转移”指疾病通过淋巴或血液从一个器官或部位扩散至另一个不相邻的器官或部位。为了本申请的目的,术语“转移”是指能从原发性肿瘤扩散,进入淋巴管和血管,通过血液流动循环,并在体内别处的正常组织内定居而生长的癌细胞。

[0078] 术语“有效量”是指“治疗有效的抗增殖量”或“预防有效的抗增殖量”。该术语包括就剂量和必要的时间周期而言,有效获得期望的结果例如足以治疗细胞增殖病症的量。本发明的化合物的有效量可以根据例如如下的因素而不同:受试者的疾病状态、年龄和体

重、及本发明的化合物在受试者中引起期望的响应的能力。可以调节剂量方式以提供最佳的治疗反应。有效量也是本发明的化合物的治疗有益效果胜于任何毒性或不良作用（例如副作用）的量。

[0079] 本发明的化合物的治疗有效量（即有效剂量）可以在约 0.001 至 100mg/kg 体重的范围内。某些实例为约 0.01 至 30mg/kg 体重、约 0.1 至 20mg/kg 体重、约 1 至 10mg/kg 体重、2 至 9mg/kg、3 至 8mg/kg、4 至 7mg/kg、或 5 至 6mg/kg 体重。本领域的技术人员应当理解的是某些因素可影响有效治疗受试者所需的剂量，其包括但不限于受试者患有或易患有的疾病或病症的类型、疾病或病症的阶段、疾病或病症的严重程度、在先的治疗、受试者的一般健康状况和 / 或年龄、及其他存在的疾病。而且，用治疗有效量的本发明的化合物治疗受试者可以包括单一治疗，或可以包括系列治疗。在一个实施例中，利用本发明的化合物，以范围在约 0.001 至约 100mg/kg 体重之间的剂量每天一次地治疗受试者。还应理解，用于治疗的本发明的化合物的有效剂量可以在具体的治疗期间增加或降低。

[0080] 术语“对映异构体”是指彼此互为不重合镜像的化合物的两个立体异构体。两个对应异构体的等摩尔混合物称为“外消旋混合物”或“外消旋体”。

[0081] 术语“表皮生长因子受体治疗”是指靶向于表皮生长因子受体 (EGFR) 的癌症疗法。EGFR 是经常在上皮肿瘤中表达的受体酪氨酸激酶受体。临床中现有的某些抗 EGFR 剂包括，例如吉非替尼和厄洛替尼。

[0082] 词语“FAK 结合配偶体”是指与 FAK 一起被募集到复合物的蛋白质（例如，全长、N 端、C 端、羧基端、激酶结构域、FERM 结构域、FAT 结构域）。

[0083] 术语“稳态”是领域内公知的，是指内环境中静态的或恒定的状态的维持。

[0084] 术语“异构体”或“立体异构体”是指化学组成相同但是原子或基团在空间排列上不同的化合物。

[0085] 术语“免疫治疗”是指通过调节接受治疗的受试者的免疫系统而治疗癌症的治疗。在某些实施方式中，用于癌症治疗的免疫治疗目的在于刺激受试者体内肿瘤特异性的适应性免疫应答。

[0086] 词语“改善的生物性质”是指本发明的化合物固有的任何活性，其在体内效力增强。在一个实施方式中，该术语是指本发明的化合物的任何定性或定量改善的治疗性质，例如降低的细胞毒性。

[0087] 术语“有丝分裂灾难 (mitotic catastrophe)”是指有丝分裂过程中由于 DNA 损伤或错乱的纺锤体形成而发生的细胞死亡形式。与此伴随的是不同的检验点机制（最显著地，p53）的调节异常，检验点机制通常会阻滞进入有丝分裂的进程，从而阻止灾难事件直至已完成修复。这样引起微核化和核分裂，其导致细胞死亡。

[0088] 术语“调节”是指：响应与本发明的化合物接触，例如提高或降低细胞增殖的能力，例如提高或降低在动物内的至少一种细胞亚群的增殖的抑制，以致获得期望的最终结果，例如治疗结果。

[0089] 术语“单克隆抗体治疗”是指使用单克隆抗体（或 mAb）特异性地靶向癌细胞的治疗。目的是通过阻断特异的细胞受体刺激受试者的免疫系统攻击恶性肿瘤细胞并阻止肿瘤生长。这种治疗的实例包括放射免疫疗法、抗体定向的酶前药疗法、利用免疫 - 脂质体的药物和基因治疗。某些治疗的单克隆抗体包括，但不限于阿仑单抗 (alemtuzumab)、贝

伐单抗 (bevacizumab)、西妥昔单抗 (cetuximab)、依法珠单抗 (efalizumab)、替伊莫单抗 (ibritumomab tiuxetan)、111in- 卡罗单抗 (111in-capromab)、英西单抗 (imciromab)、潘尼单抗 (panitumumab)、吉妥珠单抗奥唑米星 (gemtuzumab ozogamicin)、利妥昔单抗 (rituximab)、托西莫单抗 (tositumomab) 和曲妥珠单抗 (trastuzumab)。

[0090] 类如“获得能够调节(或抑制)FAK与IGF-1R之间的结合相互作用的化合物”的词语中的术语“获得”意在包括购买、合成或其它方式得到化合物。

[0091] 本文所用的短语“肠胃外给药”和“非经肠胃地给药”表示除了经肠和局部给药之外的给药模式,通常通过注射,且其包括但不限于静脉内、肌内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、心内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、下颌关节突点内(intraarticulare)、囊下、蛛网膜下、脊柱内和胸骨内注射以及输注。

[0092] 术语“前药”或“前体药物”包括具有可以在体内代谢的部分的化合物。通常,前药通过酯酶或通过其它机理在体内代谢成活性药物。前药及其用途的例子在本领域已公知(参见例如Berge等人(1977)“Pharmaceutical Salts”, J. Pharm. Sci. 66:1-19)。前药可以在化合物最终分离和纯化期间原位制备,或者通过使纯化的化合物以其游离酸形式或羟基单独与合适的酯化试剂反应而制备前体药物。羟基可以通过用羧酸处理转换成酯。前药部分的实例包括取代和未取代的、支链或无支链的低级烷基酯部分(例如丙酸酯)、低级烯基酯、二-低级烷基-氨基低级烷基酯(例如二甲基氨基乙基酯)、酰基氨基低级烷基酯(例如乙酰氧基甲基酯)、酰氧基低级烷基酯(例如新戊酰氧基甲基酯)、芳基酯(苯基酯)、芳基低级烷基酯(例如苯甲基酯)、取代的(例如被甲基、卤素或甲氧基取代基取代)芳基和芳基低级烷基酯、酰胺、低级烷基酰胺、二低级烷基酰胺和羟基酰胺。在某些实施方式中,前药部分是丙酸酯和酰基酯。本发明也包括在体内通过其他机理转化成活性形式的前药。

[0093] 化合物的短语“预防有效量”是指本发明的或在本文以其它方式描述的化合物的量,其在以单剂量或多剂量对被鉴定为需要的受试者给药时,在预防或治疗细胞增殖病症中有效。

[0094] 术语“放射治疗”(或放射疗法)是指医疗使用电离辐射作为治疗的一部分以控制恶性细胞。某些实施方式中,放射疗法用于治疗的或辅助的癌症治疗。

[0095] 词语“降低的毒性”意在包括当体内给药时,由本发明的化合物所引起的任何不期望的副作用的降低。

[0096] 术语“药学上可接受的盐”是指相对无毒的、本发明的化合物的无机或有机的酸加成盐。例如,参见S. M. Berge, 等人, “Pharmaceutical Salts”, J. Pharm. Sci. 1977, 66, 1-19。药学上可接受的盐包括通过使作为碱起作用的主要化合物与无机酸或有机酸反应以形成盐而得到的那些,例如,盐酸、硫酸、磷酸、甲磺酸、樟脑磺酸、草酸、马来酸、琥珀酸和柠檬酸的盐。药学上可接受的盐还包括以下化合物:其中主要化合物作为酸起作用并与适合的碱反应以形成例如钠、钾、钙、镁、铵和氯(choline)盐。本领域的技术人员将进一步认识到,要求保护的化合物的酸加成盐可利用许多已知方法中的任意一种,通过使化合物与适当的无机酸或有机酸反应而制备。或者,利用许多已知方法,通过使本发明的化合物与适合的碱反应制备本发明的酸性化合物的碱盐和碱土金属盐。

[0097] 本发明的化合物的代表性盐包括传统的无毒的盐和季铵盐,其通过,例如本领域已知的方法从无机的或有机的酸或碱形成。例如,这样的酸加成盐包括醋酸盐、己二酸盐、

藻酸盐、抗坏血酸盐、天冬氨酸盐、苯甲酸盐、苯磺酸盐、硫酸氢盐、丁酸盐、柠檬酸盐、樟脑酸盐 (camphorate)、樟脑磺酸盐、肉桂酸盐、环戊丙酸盐、二葡萄糖酸盐、十二烷基硫酸盐、乙磺酸盐、延胡索酸盐、葡庚糖酸盐 (glucoheptanoate)、甘油磷酸盐、半硫酸盐、庚酸盐、己酸盐、盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐、2- 羟基乙磺酸盐、衣康酸盐、乳酸盐、马来酸盐、扁桃酸盐、甲磺酸盐、2- 萘磺酸盐、烟酸盐、硝酸盐、草酸盐、双羟萘酸盐、果胶酸盐 (pectinate)、过硫酸盐、3- 苯基丙酸盐、苦味酸盐、新戊酸盐、丙酸盐、琥珀酸盐、磺酸盐、酒石酸盐、硫氰酸盐、甲苯磺酸盐和十一烷酸盐。碱盐包括碱金属盐如钾盐和钠盐、碱土金属盐如钙盐和镁盐、和与有机碱如二环己基胺和 N- 甲基 -D- 葡萄糖胺形成的铵盐。此外，碱性含氮基团也可以被诸如以下试剂季铵化：低级烷基卤化物，如甲基、乙基、丙基和丁基 - 氯化物、- 溴化物和 - 碘化物；二烷基硫酸盐如二甲基、二乙基、和二丁基硫酸盐；和二戊基硫酸盐，长链卤化物如癸基、月桂基、肉豆蔻基和硬脂基 - 氯化物、- 溴化物和 - 碘化物，芳烷基卤化物如苄基和苯乙基溴化物等。

[0098] 术语“溶剂合物”是指包括溶剂和本发明的化合物的呈固态的复合物。示例性的溶剂合物将包括，但不限于本发明的化合物与乙醇或甲醇的复合物。水合物是溶剂合物的一种特殊形式，其中溶剂为水。

[0099] 术语“受试者”包括能患有细胞增殖病症或可以以其他方式受益于施用本发明的化合物的生物体，比如人类和非人类的动物。优选的人包括本文所述的患有或易患有细胞增殖病症或相关症状的人类患者。本发明的术语“非人类的动物”包括所有的脊椎动物，例如哺乳动物，例如啮齿类动物，例如小鼠，以及非哺乳动物，比如非人类灵长类动物，例如绵羊、狗、牛、鸡、两栖动物、爬行动物等。

[0100] 术语“易患有细胞增殖病症”意在包括有形成例如癌症的细胞增殖病症风险的受试者，即患有具有癌症病毒的病毒感染的受试者、已暴露于电离辐射或致癌化合物的受试者、具有癌症的家族史或医疗史的受试者、和类似受试者。

[0101] 本文所用的短语“全身给药”、“全身地给药”、“外周给药”和“外周地给药”表示施用本发明的化合物、药物或其他物质，以致于其进入患者体系并因此发生代谢及其他相似的过程，例如皮下给药。

[0102] 本发明的化合物的短语“治疗有效量”是指以单剂量或多剂量对患者给药的药物量，其有效地抑制细胞增殖和 / 或细胞增殖病症的症状，或有效地将患有这种细胞增殖病症的患者的生存性延长至超过没有这种治疗的预期的生存性。

[0103] 对于手性中心的命名法，术语“d”和“l”构型通过 IUPAC 命名法 (IUPAC Recommendation) 定义。对于下述术语的应用，非对映异构体、外消旋体、差向异构体和对映异构体将以其常见含义 (context) 用于描述制剂的立体化学。

[0104] II. 本发明的化合物

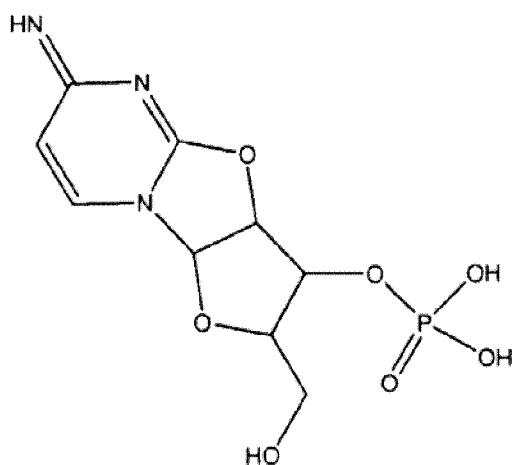
[0105] 一方面，本发明提供能治疗患有或易患有细胞增殖病症特别是癌症的受试者的化合物。在一个实施方式中，癌症是胰腺癌、黑素瘤癌或食道癌。据信，本发明的化合物能直接或间接地调节 (例如抑制) FAK 和 / 或 IGF-1R 活性。在一个实施方式中，本发明提供能调节 FAK 和 IGF-1R 之间的结合相互作用的化合物；及其药学上可接受的酯、盐和前药。

[0106] 在一个实施方式中，本发明的化合物包括本文具体描述的化合物：

[0107] 1) 2-(羟甲基)-6- 亚氨基 -2, 3, 3a, 9a- 四氢 -6H- 咪唑并 [2, 3:4, 5] [1, 3] 噻唑并

[3,2-a] 嘧啶 -3- 基磷酸二氢酯 (也称为“NSC 128687”) :

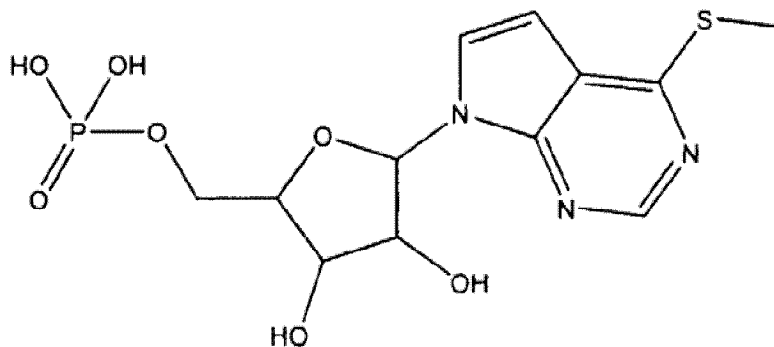
[0108]



;

[0109] 2) 4-(甲硫基)-7-(5-O-磷酸-D-呋喃核糖基)-{7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶} (也称为“NSC 344553”) :

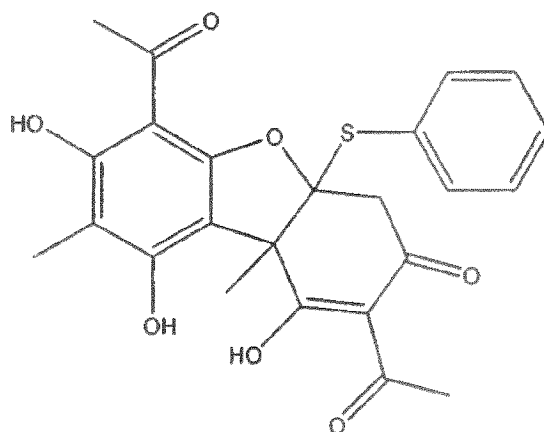
[0110]



;

[0111] 3) 1,1'-(1,7,9-三羟基-8,9b-二甲基-3-氧代-4a-(苯硫基)-3,4,4a,9b-四氢二苯并-[b,d]呋喃-2,6-二基)二乙酮 (也称为“NSC 250435”) :

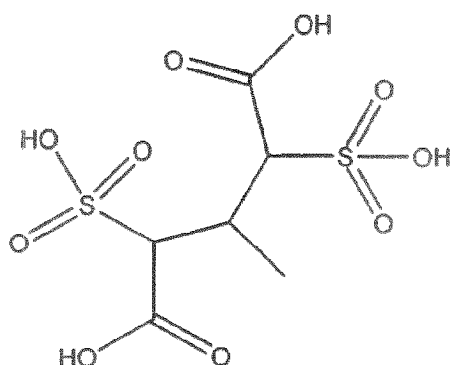
[0112]



;

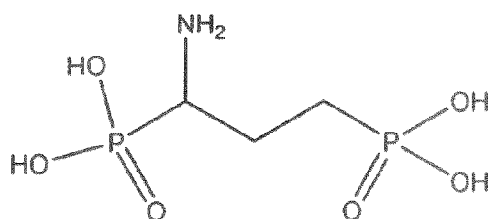
[0113] 4) 3-甲基-2,4-二磺基戊二酸 (也称为“NSC 243620”) :

[0114]



[0115] 5) 1-氨基丙烷-1,3-二基二磷酸 (也称为“NSC 133881”)

[0116]



[0117] 各上述化合物的化学名称和结构明确地包括该化合物的所有非对映异构体。

[0118] 本发明还提供本发明的化合物的药学上可接受的盐、酯、水合物、溶剂合物、络合物 (clathrate)、多晶型物和前药。

[0119] 本发明的化合物可以含有一个或多个不对称中心,因此作为外消旋体和外消旋混合物、单一对映异构体、单独非对映异构体和非对映异构混合物。这些化合物的所有这些异构体形式明确地包括在本发明中。本发明的化合物还可以以多互变异构的形式表示,在这种情况下,本发明明确地包括本文所述的化合物的所有互变异构形式。这些化合物的所有这些异构形式明确地包括在本发明中。本文所述的化合物的所有结晶形式明确地包括在本发明中。

[0120] 天然出现的或合成的异构体可以以本领域已知的数种方式分离。分离两种对映异构体的外消旋混合物的方法包括使用手性固定相的色谱法 (参见,例如“Chiral Liquid Chromatography,” WJ. Lough, Ed. Chapman and Hall, New York(1989))。对映异构体也可以通过经典的拆分技术 (resolution techniques) 分离。例如,非对映异构盐的形成和分步结晶可以用于分离对映异构体。对于羧酸的对映异构体的分离,可以通过加成光学纯手性碱比如马钱子碱、奎宁、麻黄素、番木鳖碱等形成非对映异构盐。或者,可以用光学纯手性醇比如薄荷醇形成非对映异构酯,随后分离非对映异构酯并水解以产生游离的、光学活性光学异构体富集的 (enantiomerically enriched) 羧酸。对于氨基化合物的光学异构体的分离,手性羧酸或磺酸比如樟脑磺酸、酒石酸、扁桃酸苦杏仁酸或乳酸可以导致非对映异构盐的形成。

[0121] 获得本发明的化合物的方法包括购买、合成或以其它方式得到化合物。合成本发明的化合物在本领域普通化学技术人员的方法范围内。优化反应条件的方法,如果需要使最小化竞争副产物最小化,是本领域已知的。为了最终完成本文的化合物的合成,所述方法也可以在本文具体描述的步骤之前或者之后额外地包括步骤以添加或去除合适的保护基

的步骤。此外,各种合成步骤可以以交替的顺序或次序进行以得到期望的化合物。用于合成可用的化合物的合成化学转化和保护基方法学(保护和去保护)是本领域已知的,且包括,例如,R.Larock, *Comprehensive Organic Transformations*, VCH Publishers(1989); T.W.Greene and P.G.M.Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3rd Ed., John Wiley and Sons(1999); L.Fieser and M.Fieser, *Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis*, John Wiley and Sons(1994); and 和 L.Paquette, ed., *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*, John Wiley and Sons(1995) 和其后续版本里描述的方法。

[0122] 另一方面,本发明提供与 FAK 或其特定的结构域联合或结合的化合物,从而中断 FAK 与 IGF-1R 之间的结合相互作用。在一个实施方式中,该化合物能抑制 FAK 的酪氨酸磷酸化,从而中断 FAK 与 IGF-1R 之间的结合相互作用。

[0123] 另一方面,本发明提供与 IGF-1R 或其特定的结构域联合或结合的化合物,从而中断 FAK 与 IGF-1R 之间的结合相互作用。在一个实施方式中,该化合物能抑制 IGF-1R 的酪氨酸磷酸化,从而中断 FAK 与 IGF-1R 之间的结合相互作用。

[0124] 本发明还提供能降低 IGF-1R 和 AKT 磷酸化,并诱导癌细胞凋亡的化合物。

[0125] 本发明还提供可用于筛选治疗细胞增殖病症的化合物的多肽。这样的多肽包括,例如 FAK、FAK 的结构域、IGF-1R 的结构域。在一个实施方式中,FAK 结构域包括 FAK-NT。在另一个实施方式中,FAK 结构域是 FAK-NT2。在一个单独的实施方式中,IGF-1R 的结构域包括 IGF-1R 的激酶结构域。

[0126] 这样的多肽可以是融合蛋白,例如与可检测的报告部分比如绿色荧光蛋白融合、或用可检测的标签比如荧光标签、放射标签等标记的结合口袋部分。这样的融合蛋白可用于筛选能调节 FAK 与 IGF-1R 之间的结合相互作用的化合物。

[0127] 不希望受限于任何理论,本发明的化合物能抑制癌细胞的存活,从而治疗患有或易患有癌症的受试者。

[0128] III. 本发明的化合物的用途

[0129] 本发明提供治疗患有或易患有癌症的受试者的方法。该方法包括对需要的受试者施用有效量的本发明的化合物。在某些实施方式中,癌症是乳腺癌、呼吸道癌、脑癌、生殖器官癌、消化道癌、泌尿道癌、眼癌、肝癌、皮肤癌、头颈癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌或实体瘤的远距离转移的癌。具体的实例是胰腺癌、黑素瘤癌和食道癌。

[0130] 本发明的一方面提供使用本发明的化合物及其组合物来治疗患有或易患有细胞增殖病症的受试者的方法。细胞增殖病症的一个具体实例是癌症。在一个实施方式中,本发明的方法包括对需要的受试者施用有效量的能直接或间接调节 FAK 与 IGF-1R 之间的结合相互作用的化合物;从而治疗患有或易患有不希望的或不期望的细胞增殖或细胞增殖病症的受试者。

[0131] 本发明的化合物的有效量是足以降低受试者的疾病/病症(的发病率或严重度)的量。可以以一次或系列给药(或剂量)提供有效量的本发明的化合物。本发明的化合物的有效量通常由医生基于个案决定,并且在本领域技术人员的能力范围内。

[0132] 给药可以通过药学领域已知的任何给药途径。受试者可以被诊断有(例如癌症),可以具有形成细胞增殖病症的风险,可以表现出细胞增殖病症的症状,或可以在预计的或

不预计的暴露于能增加对细胞增殖病症的易感性的条件下之前需要预防治疗。对需要治疗细胞增殖病症（例如癌症）的那些受试者的鉴定是在本领域技术人员的能力和知识范围内。鉴定受试者具有形成可通过本发明的方法治疗的细胞增殖病症的风险的某些方法在医学领域是被认可的，例如家族史、以及受试者中是否存在与该疾病 / 病症状态发展相关的风险因素。临床领域的技术人员可通过使用例如临床测试、身体检查和医学 / 家族史容易地鉴别这些候选受试者。

[0133] 在某些实施方式中，受试者是哺乳动物，例如灵长类，如人类。

[0134] 在某些实施方式中，癌症是乳腺癌、呼吸道癌、脑癌、生殖器官癌、消化道癌、泌尿道癌、眼癌、肝癌、皮肤癌、头颈癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌或实体瘤的远距离转移的癌。在一个实施方式中，癌症是胰腺癌、黑素瘤癌或食道癌。

[0135] 本发明还提供评价或监测治疗受试者的效力的方法，包括通过本领域的公知方法（例如当细胞增殖病症是癌症时，确定肿瘤大小或筛选肿瘤标志物）确定细胞增殖病症（特别是癌症）的治疗前程度，然后对受试者施用有效量的本发明的化合物。施用化合物适当的时间之后（例如 1 天、1 周、2 周、1 个月、6 个月），再次确定病症程度。对疾病 / 病症的程度或严重度的调节（例如降低）表明治疗的效力。可在治疗中定期确定病症的程度或严重度。例如，可每几小时、几天或几周检查病症的程度或严重度，以评价进一步的治疗效力。疾病 / 病症的程度或严重度的降低表明治疗是有效的。所述方法可用于筛选或选择可受益于使用本发明的化合物治疗的患者。

[0136] 如果病情的调节表明受试者对治疗可具有有利的临床反应，则该受试者可用该化合物治疗。例如，可以对受试者施用治疗有效剂量（一剂或多剂）的该化合物。

[0137] 本发明的方法可包括结合一种或多种额外的治疗剂，对被鉴定为需要的受试者施用有效量的本发明的化合物。这些治疗剂的实例包括治疗癌症已知的药物，例如抗癌剂、抗增殖剂和化疗剂。

[0138] 在一个实施方式中，治疗剂是化疗剂。在另一个实施方式中，药剂包括 5- 氟脲嘧啶 (5-FU)、吉西他滨、氟嘧啶、核苷胞苷类似物、NVP-AEW541、铂类似物、TAE226、拓扑异构酶抑制剂、抗微管剂、PI3 激酶抑制剂、蛋白酶体抑制剂、维生素 D 类似物、花生四烯酸途径抑制剂、组蛋白去乙酰剂抑制剂和法尼基转移酶抑制剂。

[0139] 治疗剂的实例包括，但不限于天门冬酰胺酶、博莱霉素、钙黄绿素 -AM、卡铂、卡莫司汀、苯丁酸氮芥、顺铂、L- 天冬酰胺酶、环磷酰胺、阿糖胞苷、氮烯唑胺、放线菌素 D、柔红霉素、多烯紫杉醇、阿霉素（亚德里亚霉素）、表柔比星、依托泊甙、ET-743、厄洛替尼、5- 氟脲嘧啶、吉西他滨、吉非替尼、六甲三聚氰胺、羟基脲、异环磷酰胺、伊立替康、亚叶酸、洛莫司汀、氮芥、6- 巯嘌呤、美司钠、氨甲喋呤、丝裂霉素 C、米托蒽醌、NVP-AEW541、紫杉醇、泼尼松龙、强的松、甲基苄肼、雷洛昔芬、罗丹明 -123、链佐星、TAE226、他莫西酚、硫鸟嘌呤、拓扑替康、长春碱、长春新碱、长春地辛或 Zalypsis。

[0140] 可利用的额外治疗剂可在 Harrison' s Principles of Internal Medicine, 17th Edition, Eds. T. R. Harrison 等人, McGraw-Hill N. Y., NY ;和 the Physicians Desk Reference 62nd Edition 2008, Oradell New Jersey, Medical Economics Co. 中找到，其全部内容明确地引入本文以作参考。可以以相同的药物组合物或以不同的药物组合物（同时或不同时）对受试者施用本发明的化合物和额外的治疗剂。

[0141] 本发明的方法还可包括用一种或多种抗细胞增殖疗法治疗受试者。具体地,治疗是癌症治疗。传统的癌症治疗包括但不限于,外科手术、化疗、放疗、免疫治疗、单克隆抗体治疗和表皮生长因子受体治疗。癌症治疗的一个实例是放疗。另一个实例是化疗。在一个实施方式中,该方法包括结合化疗和放疗对受试者进行治疗。

[0142] 本发明的方法可在培养基中的细胞上实施,例如体外或先体外后体内,或者在存在于动物受试者中的细胞上实施,例如体内。本发明的化合物可以使用增殖细胞例如转化的细胞、肿瘤细胞系等的原代培养物在体外初步检测。或者,可以用动物模型在体内表征本发明的化合物的效力。

[0143] 本发明还提供调节(例如抑制)不受控制的细胞增殖的方法。该方法包括使本发明的化合物与进行不受控制的增殖的细胞接触。其中化合物可直接或间接地调节 FAK 的活性、IGF-1R 的活性、或 FAK 与 IGF-1R 之间的结合相互作用。本发明的化合物与细胞之间的此接触抑制细胞增殖或诱导细胞凋亡。接触细胞或对受试者施用本发明的化合物是治疗患有或易患有细胞增殖病症的细胞或受试者的一种方法。

[0144] 在一个实施方式中,可以在体外,例如通过向细胞周围的液体加入化合物,例如向细胞生存或存在的生长介质中加入化合物而进行接触。也可以通过直接使化合物与细胞接触而进行接触。或者,可以在体内,例如通过使化合物经过受试者而进行接触;例如给药后,取决于给药途径,化合物可经消化道或血流输送或者直接应用于或施用至需要治疗的细胞。

[0145] 本发明还提供方法以鉴定能治疗患有或易患有癌症的受试者的化合物。具体地,该化合物能调节 FAK 与 IGF-1R 之间的结合相互作用。

[0146] 另一方面,本发明提供通过使 FAK 和 / 或 IGF-1R 与本发明的化合物接触来调节 FAK 与 IGF-1R 之间的结合相互作用的方法。在某些实施方式中,该化合物能抑制 FAK 和 / 或 IGF-1R 的酪氨酸磷酸化,从而阻断 FAK 与 IGF-1R 之间的结合相互作用。在另一个实施方式中,该方法还包括使用显性负性构建体 (FAK-CD) 或小干扰 RNA。

[0147] 在某些实施方式中,本发明的化合物能与 FAK 或其特定结构域联合或结合,从而阻断 FAK 与 IGF-1R 之间的结合相互作用。在一个实施方式中,该化合物能抑制 FAK 的酪氨酸磷酸化。在一个实施方式中,该化合物能与 FAK 氨基端片段 (NT2) 结合或联合。

[0148] 在另一个实施方式中,本发明的化合物能与 IGF-1R 或其特定结构域联合或结合,其由此阻断 FAK 与 IGF-1R 之间的结合相互作用。在一个实施方式中,该化合物能抑制 IGF-1R 的酪氨酸磷酸化。在一个实施方式中,该化合物能与 IGF-1R 的激酶结构域结合或联合。

[0149] 本发明的方法还可包括使用显性负性构建体 (FAK-CD) 或小干扰 RNA。

[0150] 本发明还提供鉴定能降低 IGF-1R 和 AKT 磷酸化并诱导癌细胞凋亡的化合物的方法。

[0151] 该方法可包括在存在和 / 或不存在测试化合物的条件下,获得 FAK、IGF-1R、或其特定结构域的结晶结构(任选地蛋白形式 (apo form) 或复合形式 (complexed)) 或获得与 FAK、IGF-1R、或其特定结构域的结晶结构(任选地蛋白形式或复合形式) 相关的信息。这些特定结构域的实例包括 FAK NT2 和 IGF-1R 的激酶结构域。然后可将化合物计算机模拟在 FAK、IGF-1R、或其特定结构域的结晶结构的结合位点中,以预测测试化合物与 FAK、IGF-1R、

或其特定结构域之间的相互作用的稳定性。一旦识别出潜在的调节化合物,可采用细胞检定比如本文确认的方法以及本领域已知的竞争检定对该化合物进行筛选。以此方式鉴定的化合物可用作治疗剂。

[0152] 在一个实施方式中,方法还包括对测试化合物进行评价,包括 1) 使 FAK、IGF-1R、或其特定结构域与测试化合物(复合物)接触,和 2) 对接触之后的结合相互作用进行评价,其中复合物的稳定性相对于参照值的变化表明测试化合物调节复合物的稳定性。

[0153] 在一个实施方式中,FAK、IGF-1R、或其特定结构域的复合物可通过计算机模拟,或者其可以是细胞中的、从细胞分离的、重组表达的、从细胞或重组表达系统中纯化或分离的、或从细胞或重组表达系统中部分纯化或分离的复合物。

[0154] 在又一方面,本发明提供本发明的化合物单独或与一种或多种额外的治疗剂一起在药物制备中的用途,作为单一组合物或作为独立剂型,用于治疗或预防受试者的本文所述的疾病、病症或症状。本发明的另一方面是本发明的化合物用于治疗或预防受试者的本文所述的疾病、病症或其症状。

[0155] 本文所述的方法包括其中受试者被鉴定为需要具体所述的治疗的那些。鉴定受试者需要这样的治疗可以是受试者或者卫生保健专家的判断,且可以是主观的(例如,意见)或客观的(例如,通过测试或诊断方法可测量的)。

[0156] IV. 剂量

[0157] 作为本领域技术人员的医生或兽医(“主治医师”)可以通过使用已知的技术和通过在相似的情形下观察所获得的结果而容易地确定本发明化合物的合适剂量。

[0158] 根据主治医师对患者需求的判断;待治疗的病症的严重程度、待治疗的病症的阶段及采用的具体化合物,剂量可以不同。在确定抗增殖治疗有效量或剂量和抗增殖预防有效量或剂量中,主治医师考虑许多因素,包括但不限于:相关的具体的细胞增殖病症;具体制剂的药效学性质及其给药模式和途径;期望的治疗时程;哺乳动物的种类;其大小、年龄及一般健康状况;相关的具体的疾病;疾病的程度或牵涉状况或严重度;个体患者的反应;具体的给药的化合物;给药的模式;给药制剂的生物利用度性质;选定的剂量方式;协同治疗(即本发明的化合物与其他一起给药的治疗药物的相互作用)的种类;及其他相关情况。

[0159] 可查阅规范教科书,例如分别引入本文以作参考的 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 17th edition, Mack Publishing Company 和 the Physician's Desk Reference 来制备给药用合适的组合物和剂量。考虑本文描述的使用参数确定适当的剂量是在本领域技术人员的能力范围内。

[0160] 治疗可以从较小剂量开始。然后,以小增量增加剂量直至达到在该情形下的最佳效果。为方便起见,若需要可将给药期间的总剂量分份并在该期间内按份给药。

[0161] 本发明的化合物的剂量可在每天约 0.01mg 至约 5,000mg 之间变化。在一些实例中,剂量在每天约 100mg 至约 4000mg,或每天约 1000mg 至约 3000mg 之间变化。确定剂量范围在本领域技术人员的能力范围内。在某些实施方式中,本发明的化合物的剂量可在从约 0.001 至约 100mg/Kg 体重的范围内。某些范围为约 0.01 至约 30mg/Kg 体重、约 0.1 至 20mg/Kg 体重、约 1 至 10mg/Kg、约 2 至 9mg/Kg、约 3 至 8mg/Kg、约 4 至 7mg/Kg、或约 5 至 6mg/Kg 体重。例如,根据是否给予多次给药、组织类型和给药途径、个体状况、期望的目标和本领域技术人员已知的其它因素,该剂量可以不同。给药可以经常进行,例如依照常规的每日一次

或每周一次,直至检测到期望的可测量的参数,例如疾病症状的减少。然后可以减少给药,例如依照两周一次或每月一次。

[0162] 确定为有效防止或治疗动物如狗、鸡和啮齿类动物的细胞增殖病症的化合物还可用于治疗人类肿瘤。基于动物研究中所获得的数据,治疗人类肿瘤的本领域技术人员将知道该对人施用该化合物的剂量和途径。

[0163] V. 药物组合物和剂型

[0164] 本发明还提供含有有效量的本发明的化合物的药物组合物。该药物组合物还可包括药学上可接受的载体或稀释剂。该组合物可以配制用于治疗患有或易患有细胞增殖病症(例如癌症)的受试者,并且与说明书一起包装以治疗患有或易患有该疾病/病症的受试者。有效量对治疗前述的疾病/病症是有效的。

[0165] 在一个实施方式中,本发明的化合物使用药学上可接受的制剂对受试者给药,例如对受试者施用药学上可接受的制剂后,该药学上可接受的制剂向受试者持续递送本发明的化合物至少 12 小时、24 小时、36 小时、48 小时、一周、两周、三周或四周。

[0166] 在某些实施方式中,这些药物组合物适于对受试者局部或口服给药。在其他实施方式中,如下文所详述,可以将本发明的药物组合物特别配制用于以固体或液体形式给药,包括适合于下列的形式:(1) 口服给药,例如浸液(drench,水性或非水性溶液或混悬液)、片剂、大丸剂、粉剂、颗粒剂、糊剂;(2) 肠胃外给药,例如以例如无菌溶液或混悬液通过皮下注射、肌内注射或静脉注射;(3) 局部应用,例如作为应用于皮肤的乳剂、软膏剂或喷雾剂;(4) 阴道内或直肠内给药,例如作为阴道栓、乳剂或泡沫剂;或(5) 气溶胶,例如,作为含有该化合物的水性气溶胶、脂质体制剂或固体颗粒剂。

[0167] 短语“药学上可接受的”是指本发明的这些化合物、含有这些化合物的组合物、和/或剂型,其在合理的医学判断范围之内,适合用于与人类或动物的组织接触,并没有过多的毒性、刺激性、过敏反应或其他问题或并发症,具有合理的收益/风险比。

[0168] 短语“药学上可接受的载体”包括药学上可接受的物质、组合物或媒介物,例如液体或固体填料、稀释剂、赋形剂、溶剂或包封物质,其涉及将受试化学物质从身体的一个器官或部位携带或转运至身体的另一器官或部位。各种载体是“可接受的”是指其可以与制剂的其他组分相容且不会对患者造成伤害。一些可用作药学上可接受的载体的物质的实例包括:(1) 糖,例如乳糖、葡萄糖和蔗糖;(2) 淀粉,例如玉米淀粉和马铃薯淀粉;(3) 纤维素及其衍生物,比如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和醋酸纤维素;(4) 粉末状西黄蓍胶;(5) 麦芽;(6) 明胶;(7) 滑石;(8) 赋形剂,比如可可脂和栓剂蜡;(9) 油,比如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油;(10) 二醇,比如丙二醇;(11) 多元醇,比如甘油、山梨醇、甘露醇和聚乙二醇;(12) 酯,比如油酸乙酯和月桂酸乙酯;(13) 琼脂;(14) 缓冲剂,例如氢氧化镁和氢氧化铝;(15) 藻酸;(16) 无热原水;(17) 等渗盐水;(18) 林格氏溶液;(19) 乙醇;(20) 磷酸缓冲液;及(21) 其他用于药物制剂中的非毒性可相容物质。

[0169] 润湿剂、乳化剂和润滑剂比如月桂硫酸钠和硬脂酸镁、以及着色剂、脱模剂、包衣料、甜味剂、调味剂和芳香剂、防腐剂以及抗氧化剂也可以存在于组合物中。

[0170] 药学上可接受的抗氧化剂的例子包括:(1) 水溶性抗氧化剂,比如抗坏血酸、盐酸半胱氨酸、硫酸氢钠、焦亚硫酸钠、亚硫酸钠等;(2) 油溶性抗氧化剂,例如抗坏血酸棕榈酸盐、叔丁对甲氧酚(BHA)、二叔丁对甲酚(BHT)、卵磷脂、没食子酸丙酯、 α -生育酚等;及(3)

金属螯合剂,例如柠檬酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、山梨醇、酒石酸、磷酸等。

[0171] 含有本发明的化合物的组合物包括那些适于口服给药、经鼻给药、局部给药(包括口腔和舌下给药)、直肠给药、阴道给药、气溶胶给药和/或肠胃外给药的组合物。该组合物可以方便地以单位剂量形式存在,并且可通过在药学领域内已知的任何方法制备。取决于待治疗的主体、具体的给药模式,可与载体物质结合以产生单一剂型的活性成分的量可以不同。可与载体物质结合以产生单一剂型的活性成分的量通常是产生治疗作用的化合物的量。通常,除了100%外,该活性成分的量的范围为从约1%至约99%,优选从约5%至约70%,更优选从约10%至约30%。

[0172] 制备这些组合物的方法包括将本发明的化合物与载体以及任选的一种或多种辅助成分联合的步骤。通常,制剂通过将本发明的化合物与液体载体或细分的固体载体或两者均匀且紧密地联合而制备,然后如果需要将产物成型。

[0173] 适于口服给药的本发明的组合物可以是胶囊、扁胶囊、丸剂、片剂、锭剂(使用香料基体,通常是蔗糖和阿拉伯胶或黄耆胶)、粉剂、颗粒剂、或在水性或非水性液体中的溶液或混悬液、或水包油或油包水液体乳剂、或酞剂或糖浆、或软锭剂(使用惰性基质,比如明胶和甘油,或蔗糖和阿拉伯胶)和/或漱口剂等,各种均含有预定量的作为活性成分的本发明的化合物。化合物也可以作为大丸剂、药糖剂或糊剂给药。

[0174] 在用于口服给药的本发明的固体剂型(胶囊、片剂、丸剂、糖锭剂、粉剂、颗粒剂等)中,活性成分与一种或多种药学上可接受的载体混合,比如柠檬酸钠或磷酸二钙,和/或下述中的任何一种:(1) 填料或膨胀剂,比如淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇和/或硅酸;(2) 粘合剂,例如羧甲基纤维素、藻酸盐、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖和/或阿拉伯胶;(3) 保湿剂,比如甘油;(4) 崩解剂,例如琼脂、碳酸钙、马铃薯或木薯淀粉、藻酸、某些硅酸盐和碳酸钠;(5) 溶液阻滞剂,例如石蜡;(6) 吸收促进剂,例如季铵盐化合物;(7) 润湿剂,例如乙酰基醇和单硬脂酸甘油酯;(8) 吸收剂,比如高岭土和膨润土;(9) 润滑剂,比如滑石、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、月桂硫酸钠及其混合物;及(10) 着色剂。在胶囊、片剂和丸剂的情况中,药物组合物还可以含有缓冲剂。在使用了比如乳糖(lactose或milk sugars)及高分子量的聚乙二醇等作为赋形剂的软和硬填充胶囊中,相似类型的固体组合物也可以用作填料。

[0175] 片剂可以任选地与一种或多种辅助成分通过压制或模制而制备。压制片可以使用粘合剂(例如明胶或羟丙甲基纤维素)、润滑剂、惰性稀释剂、防腐剂、崩解剂(例如羧甲基淀粉钠或交联羧甲基纤维素钠)、表面活性剂或分散剂制备。模制片可以通过在合适的机器中模压用惰性液体稀释剂润湿的粉末状活性成分的混合物而制备。

[0176] 本发明的药物组合物的片剂和其他固体剂型,比如糖锭剂、胶囊剂、丸剂和颗粒剂,可以任选地用包衣和外壳刻痕(scored)或制备,比如肠溶包衣和其他药剂学领域已知的包衣。也可以使用例如提供期望的释放曲线(profile)的不同比例的羟丙甲基纤维素、其他聚合物基质、脂质体和/或微球,配制以便提供其中活性成分的缓释或控释。可以将它们进行灭菌,例如通过细菌截留滤器(bacteria-retaining filter)过滤,或者通过引入可以溶于无菌水的无菌固体组合物形式的灭菌剂,或者在使用前即刻引入一些其它的无菌可注射介质。这些组合物也可以任选地含有遮光剂,并任选地以延迟方式,可以是仅在或优先在胃肠道的某个部位释放活性成分的组合物。可以使用的植入式组合物的例子包括聚合物

质和蜡。活性成分与,如果合适的话,一种或多种上述赋形剂,也可以是微囊形式。

[0177] 本发明的化合物的用于口服给药的液体剂型包括药学上可接受的乳剂、微乳剂、溶液、混悬剂、糖浆和酞剂。除了活性成分外,液体剂型还可以含有本领域常用的惰性稀释剂,例如水或其它溶剂,增溶剂和乳化剂,比如乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苜醇、苯甲酸苜酯、丙二醇、1,3-丁二醇、油(特别是棉籽油、花生油、玉米油、胚芽油、橄榄油、蓖麻油和芝麻油)、甘油、四氢呋喃甲醇、聚乙二醇、和山梨聚糖的脂肪酸酯,及其混合物。

[0178] 除惰性稀释剂外,口服组合物可以包括佐剂,比如润湿剂、乳化剂和助悬剂、甜味剂、调味剂、着色剂、芳香剂和防腐剂。

[0179] 除了本发明的活性化合物外,混悬剂还可以含有助悬剂,例如乙氧基化异硬脂醇、聚氧乙烯山梨醇和山梨聚糖酯、微晶纤维素、偏氢氧化铝(aluminum metahydroxide)、膨润土、琼脂和黄蓍胶及其混合物。

[0180] 用于直肠和阴道给药的本发明的药物组合物可以以栓剂形式存在,该栓剂可通过将一种或多种本发明化合物与一种或多种包含例如可可脂、聚乙二醇、栓剂蜡或水杨酸酯的合适的非刺激性赋形剂或载体混合而制备,该栓剂在室温是固态,但是在体温是液态,因此其会在直肠或阴道腔中熔化并释放活性药物。

[0181] 适用于阴道给药的本发明的组合物还包括阴道栓剂、止血塞、乳膏剂、凝胶剂、糊剂、泡沫剂或喷雾剂,其含有在本领域内已知为合适的那些载体。

[0182] 本发明的化合物用于局部或经皮给药的剂型包括粉剂、喷雾剂、软膏剂、糊剂、乳膏剂、洗剂、凝胶剂、溶液、贴剂和吸入剂。本发明的活性化合物可以在无菌条件下与药学上可接受的载体及任何需要的防腐剂、缓冲剂或推进剂混合。

[0183] 软膏剂、糊剂、乳膏剂和凝胶剂除含有本发明的化合物之外,还可以含有赋形剂,比如动物和植物脂肪、油、蜡、石蜡、淀粉、黄蓍胶、纤维素衍生物、聚乙二醇、硅酮、膨润土、硅酸、滑石和氧化锌或其混合物。

[0184] 粉剂和喷雾剂除含有本发明的化合物外,还可以含有赋形剂,比如乳糖、滑石、硅酸、氢氧化铝、硅酸钙和聚酰胺粉末或这些物质的混合物。喷雾剂可以额外地含有常规的推进剂,比如氯氟烃和挥发性未取代烃,比如丁烷和丙烷。

[0185] 或者,本发明的化合物可以通过气溶胶给药。这通过制备含有该化合物的水性气溶胶、脂质体制剂或固体颗粒而实现。可以使用非水(例如碳氟化合物推进剂)混悬剂。因为声波喷雾器(sonic nebulizer)将药物与可以导致化合物降解的剪切力的接触降至最低,所以是优选的。

[0186] 通常,水性气溶胶通过一起配制药物的水溶液或混悬液连同常规的药学上可接受的载体和稳定剂而制备。载体和稳定剂随着具体化合物的需要可以不同,但通常包括非离子型表面活性剂(Tweens、Pluronic 或聚乙二醇)、无毒蛋白质如血清白蛋白、山梨糖醇酯、油酸、卵磷脂、氨基酸比如甘氨酸、缓冲液、盐、糖或糖醇。气溶胶通常由等渗溶液制备。

[0187] 透皮贴剂具有向机体控制递送本发明的化合物的额外优势。该剂型可以通过将药物溶解或分散于合适的介质中制备。吸收促进剂也可以用于增加活性成分跨皮肤的透入(flux)。所述透入的速率可以通过提供控制速率的膜或将活性成分分散于聚合物基质或凝胶中来控制。

[0188] 眼制剂、眼软膏剂、粉剂、溶液等也在本发明的考虑范围之内。

[0189] 适于肠胃外给药的本发明的药物组合物包含一种或多种本发明的化合物结合一种或多种药学上可接受的无菌等渗水性或非水性溶液、分散剂、混悬剂或乳剂、或在使用之前可以重新组成无菌可注射溶液或分散剂的无菌粉剂,该组合物可以含有抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂、使得制剂与目标接受者的血液等渗的溶质、或助悬剂或增稠剂。

[0190] 可以在本发明的药物组合物中采用的合适的水性和非水性载体的例子包括:水、乙醇、多元醇(比如甘油、丙二醇、聚乙二醇等)及其合适的混合物、植物油比如橄榄油、及可注射有机酯比如油酸乙酯。合适的流动性可以通过例如以下方式维持:使用包衣材料比如卵磷脂、通过在分散剂的情况下维持所需的粒径、和通过使用表面活性剂。

[0191] 这些组合物还可以含有佐剂,比如防腐剂、润湿剂、乳化剂和分散剂。通过加入下述各种抗细菌剂和抗真菌剂可以确保对微生物作用的预防:例如对羟基苯甲酸酯、氯代丁醇、苯酚山梨酸等。也可以期望的是,本发明的组合物包括等渗剂,比如糖、氯化钠等。此外,通过引入延迟吸收的试剂比如单硬脂酸铝和明胶能引起可注射药物剂型的吸收的延长。

[0192] 在一些情况下,为延长药物的作用,期望减缓从皮下注射或肌肉注射的药物的吸收。这可以通过使用具有较差水溶性的结晶或无定形物质的液体混悬剂而实现。此时,药物的吸收速率取决于其溶解速率,而溶解速率又取决于其结晶粒度和晶型。或者,肠胃外给药剂型的延迟吸收可以通过将药物溶解于或悬浮于油性媒介物中实现。

[0193] 可注射贮存剂型通过在可生物降解的聚合物比如聚交酯-聚乙交酯中形成本发明化合物的微囊基质而制备。取决于药物与聚合物的比例以及所采用的具体聚合物的性质,可以控制药物的释放速率。其他可生物降解的聚合物的例子包括聚(原酸酯)和聚(酞)。贮存可注射剂型也可以通过将药物封装于与机体组织相容的脂质体或微乳剂中制备。

[0194] 当本发明的化合物作为药物对人和动物给药时,其可以自身给药或作为含有例如 0.1 至 99.5% (更优选 0.5 至 90%) 的活性成分结合药学上可接受的载体的药物组合物给药。

[0195] 不管选定的给药途径,可以以合适的水合形式使用的本发明的化合物和/或本发明的药物组合物通过本领域技术人员已知的常规方法配制成药学上可接受的剂型。

[0196] 在本发明的药物组合物中的活性成分的实际剂量水平及给药时程可以不同,以便获得一定量的活性成分,其有效地实现针对特定患者、组合物和给药方式的预期治疗反应,且对患者没有毒性。示例性的剂量范围是 0.1 至 10mg/天。

[0197] 本发明的化合物的合适剂量是患者可以承受且不形成严重副作用的最大量。例如,本发明的化合物以约 0.001 毫克至约 100 毫克每千克体重、约 0.001 至约 10 毫克每千克体重或约 0.001 毫克至约 100 毫克每千克体重的浓度给药。剂量范围的其它实例在上文中讨论。

[0198] 本发明的药物组合物还可包括先前讨论的额外的治疗剂。在一个实施方式中,额外的治疗剂是化疗剂。在另一个实施方式中,额外的治疗剂选自 5-氟脲嘧啶(5-FU)、吉西他滨、氟嘧啶、核苷胞苷类似物、NVP-AEW541、铂类似物、TAE226、拓扑异构酶抑制剂、抗微管剂、PI3 激酶抑制剂、蛋白酶体抑制剂、维生素 D 类似物、花生四烯酸途径抑制剂、组蛋白去乙酰剂抑制剂和法尼基转移酶抑制剂。

[0199] 额外的治疗剂的某些实例包括,但不限于天门冬酰胺酶、博莱霉素、钙黄绿素-AM、

卡铂、卡莫司汀、苯丁酸氮芥、顺铂、L-天冬酰胺酶、环磷酰胺、阿糖胞苷、氮烯唑胺、放线菌素 D、柔红霉素、多烯紫杉醇、阿霉素（亚德里亚霉素）、表柔比星、依托泊甙、ET-743、厄洛替尼、5-氟脲嘧啶、吉西他滨、吉非替尼、六甲三聚氰胺、羟基脲、异环磷酰胺、伊立替康、亚叶酸、洛莫司汀、氮芥、6-巯嘌呤、美司钠、氨甲喋呤、丝裂霉素 C、米托蒽醌、NVP-AEW541、紫杉醇、泼尼松龙、强的松、甲基苄肼、雷洛昔芬、罗丹明-123、链佐星、TAE226、他莫西酚、硫鸟嘌呤、拓扑替康、长春碱、长春新碱、长春地辛或 Zalypsis。

[0200] 当本发明的化合物作为药物对人和动物给药时，其可以自身给药或作为含有例如 0.1 至 99.5%（或 0.5 至 90%）的活性成分结合药学上可接受的载体的药物组合物给药。

[0201] 不管选定的给药途径，可以以合适的水合形式使用的本发明的化合物和 / 或本发明的药物组合物通过本领域技术人员已知的常规方法配制成药学上可接受的剂型。

[0202] 在本发明的药物组合物中的活性成分的实际剂量水平及给药时程可以不同，以便获得一定量的活性成分，其有效地实现针对特定患者、组合物和给药方式的预期治疗反应，且对患者没有毒性。

[0203] VI. 试剂盒

[0204] 本发明还提供用于治疗本文所述的病症 / 疾病的试剂盒。典型的本发明的试剂盒包括本文件所述的化合物、药物制剂或组合物，和使用说明书。使用说明书可包括剂量、递送方法、试剂盒的存储等信息。在某些实施方式中，试剂盒包括施用本发明的化合物、制剂或组合物的说明书。

[0205] 试剂盒可包括用于鉴定需要治疗的受试者的说明书和 / 或信息。在某些实施方式中，试剂盒可包括治疗患有或易患有细胞增殖病症的受试者的说明书。在一个实施方式中，疾病是癌症。在某些实施例中，癌症是乳腺癌、呼吸道癌、脑癌、生殖器官癌、消化道癌、泌尿道癌、眼癌、肝癌、皮肤癌、头颈癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌或实体瘤的远距离转移的癌。具体的实例是胰腺癌、黑素瘤癌和食道癌。

[0206] 在一个实施方式中，试剂盒还包括治疗或预防受试者的细胞增殖病症的使用说明书。使用说明书可包括该试剂盒的剂量、递送方法、储存等信息。

[0207] 试剂盒含有的化合物的有效量如以上讨论。通常，本发明的化合物的有效量是比在被治疗的受试者中产生严重的副作用所需剂量低的剂量。在某些实施例中，试剂盒包括剂量在约 0.001mg/Kg 和约 100mg/Kg 之间的本发明的化合物。

[0208] 在一些实施方式中，试剂盒还包括额外的治疗剂。在一个实施方式中，额外的治疗剂是化疗剂。在另一个实施方式中，额外的治疗剂选自 5-氟脲嘧啶 (5-FU)、吉西他滨、氟嘧啶、核苷胞苷类似物、NVP-AEW541、铂类似物、拓扑异构酶抑制剂、TAE226、抗微管剂、PI3 激酶抑制剂、蛋白酶体抑制剂、维生素 D 类似物、花生四烯酸途径抑制剂、组蛋白去乙酰剂抑制剂和法尼基转移酶抑制剂。在某些实施方式中，额外的治疗剂是 TAE226、NVP-AEW541、渥曼青霉素或 LY294002。

[0209] 额外的治疗剂的实例包括，但不限于天门冬酰胺酶、博莱霉素、钙黄绿素-AM、卡铂、卡莫司汀、苯丁酸氮芥、顺铂、L-天冬酰胺酶、环磷酰胺、阿糖胞苷、氮烯唑胺、放线菌素 D、柔红霉素、多烯紫杉醇、阿霉素（亚德里亚霉素）、表柔比星、依托泊甙、ET-743、厄洛替尼、5-氟脲嘧啶、吉西他滨、吉非替尼、六甲三聚氰胺、羟基脲、异环磷酰胺、伊立替康、亚叶酸、洛莫司汀、氮芥、6-巯嘌呤、美司钠、氨甲喋呤、丝裂霉素 C、米托蒽醌、NVP-AEW541、紫杉

醇、泼尼松龙、强的松、甲基苄肼、雷洛昔芬、罗丹明-123、链佐星、TAE226、他莫西酚、硫鸟嘌呤、拓扑替康、长春碱、长春新碱、长春地辛或 Zalypsis。

[0210] 该试剂盒也可包括试剂，例如测试化合物、缓冲剂、培养基（比如细胞生长培养基）、细胞等。测试化合物可包括已知的化合物或新发现的化合物，例如化合物的组合库。

[0211] 本发明的试剂盒还可包括用以施用本发明的化合物的设备。此设备的实例包括，但不限于静脉插管设备、注射器、滴注袋、贴剂、局部用凝胶、泵、防止光降解的容器、自动注射器和吸入器。

[0212] 本发明的试剂盒也可包括可用来施用一种或多种活性成分的药学上可接受的媒介物。例如，如果活性成分是以必须重组而用于肠胃外给药的固体形式提供，试剂盒可包括合适媒介物的密封容器，其中活性成分可被溶解以形成适于肠胃外给药的无颗粒的无菌溶液。药学上可接受的媒介物的实例包括，但不限于：注射用水 USP；水性媒介物比如，但不限于氯化钠注射液、林格注射液 (Ringer's Injection)、葡萄糖注射液、葡萄糖和氯化钠注射液、和乳酸化林格注射液；水混溶性媒介物比如，但不限于乙醇、聚乙二醇和聚丙二醇；和无水媒介物比如，但不限于玉米油、棉籽油、花生油、芝麻油、油酸乙酯、肉豆蔻酸异丙酯和苯酸苄酯。

[0213] 可将一个或多个本发明的试剂盒一起包装，例如，可将用于评价细胞增殖病症（例如癌症）的治疗效力的试剂盒与用于监测根据本发明被治疗的受试者的细胞增殖病症进展的试剂盒一起包装。

[0214] VII. 筛选方法和系统

[0215] 另一方面，本发明提供可机读存储介质，其包含本文鉴定的结合口袋的结构坐标或形状相似的同源结合口袋的结构坐标或两者的结构坐标。用这些数据编码的该存储介质能够在计算机屏幕或相似的显示设备上显示包含这些结合口袋的分子或分子复合物的三维图示。

[0216] 本发明还提供设计、评价和鉴定与上述结合口袋结合的化合物的方法。因此，计算机产生了包含结合口袋的分子或分子复合物的三维图形结构。

[0217] 在另一个实施方式中，本发明提供用于产生由 FAK、IGF-1R、或其特定结构域的结构坐标定义的分子或分子复合物的三维图示的计算机，或用于产生所述分子或分子复合物的同源物的三维图示的计算机，其中所述同源物包括结合口袋，其自氨基酸的骨架原子的均方根偏差不大于 2.0 埃（更优选不大于 1.5 埃）。在一个实施方式中，使用的结构与 FAK 氨基端片段 (NT)、或 IGF-1R 的激酶结构域配位。在另一个实施方式中，使用的结构与 FAK-NT2 配位。

[0218] 在示例性的实施方式中，计算机或计算机系统可以包括本领域常规的部件，例如在美国专利第 5,978,740 和 / 或 6,183,121 号（引入本文以供参考）中所公开的部件。例如，计算机系统可以包括计算机，其包括中央处理器（“CPU”）、工作存储器（其可以是例如 RAM（随机存取存储器）或“磁芯”存储器）、大容量存储器（比如一个或多个磁盘驱动器或 CD-ROM 驱动器）、一个或多个阴极射线管 (CRT) 或液晶显示器 (LCD) 显示终端、一个或多个键盘、一个或多个输入线路以及一个或多个输出线路，所有的这些通过常规的系统总线互相连接。

[0219] 本发明的可机读数据可以经使用一个调制解调器或通过数据线连接的多个调制

解调器输入至计算机。或者或额外地,输入硬件可以包括 CD-ROM 驱动器、磁盘驱动器或闪存。键盘在与显示终端连接时也可以用作输入装置。

[0220] 通过输出线耦联至计算机的输出硬件可以通过常规的设备相似地实现。作为例子,输出硬件可以包括 CRT 或 LCD 显示终端,其用于使用比如 QUANTA 或 PYMOL 的程序显示本发明的结合口袋的图示。输出硬件也可以包括打印机或磁盘驱动器以存储系统输出用于以后的用途。

[0221] 在运行过程中,CPU 协调各种输入和输出设备的使用,协调来自大容量存储器的数据访问以及向和来自工作存储器的数据访问,并决定数据处理步骤的顺序。许多程序可以用于处理本发明的可机读的数据,包括市售的软件。

[0222] 用于存储根据本发明所述的可机读数据的磁性存储介质可以是常规的。磁性数据存储介质可以用可通过比如上述计算机系统之类的系统执行的可机读数据编码。该介质可以是常规的软盘或硬盘,其具有合适的可以为常规的基板、及合适的也可以是常规的涂层,在其一面或两面上含有磁畴,该磁畴的极性或取向可以磁性改变。该介质也可以具有开口(未显示)用于接收磁盘驱动器或其他数据存储设备的主轴(spindle)。

[0223] 将介质的磁畴极化或定向,以便于以可以是常规的方式编码比如本文所述的可机读数据,通过比如本文所述的计算机系统的系统执行。

[0224] 光学可读数据存储介质也可以用可机读数据或一系列指令编码,其可以通过计算机系统执行。该介质可以是常规的光盘只读存储器(CD-ROM)或可擦写介质比如光学可读且磁-光可写的磁光盘。

[0225] 在 CD-ROM 的情况下,众所周知的是,磁盘涂层是反射性的,并被压制多个凹坑以编码可机读数据。凹坑的排列通过从涂层表面反射的激光读取。保护涂层提供于反射涂层的顶部,其优选是基本上透明的。

[0226] 在磁光盘的情况下,众所周知的是,数据记录涂层不具有凹坑但是具有多个磁畴,当如通过激光加热至高于某温度时,该磁畴的极性或取向可以磁性改变。畴的取向可以通过测量从涂层反射的激光的极性读取。畴的排列编码上述数据。

[0227] 结构数据当与配备了软件的计算机一起使用以将那些坐标翻译成包含结合口袋的分子或分子复合物的三维结构时,其可用于多种目的,比如药物发现。

[0228] 在一个实施方式中,DOT 是用于预测分子或分子复合物的软件。DOT 对围绕第二个分子平移和旋转的一个分子进行系统的刚体搜索。计算由此搜索产生的所有构象的分子间能量作为静电能和范德华能之和。对这些能量项作为相关函数进行评价,其通过快速傅里叶变换(Fast Fourier Transforms)有效计算。在典型的运行中,可在几个小时内计算两个分子约 1080 亿种构象的能量。

[0229] 例如,通过数据编码的结构可以计算地评估其与化学实体的结合能力。与 FAK、IGF-1R、或其特定结构域的结合口袋结合的化学实体是潜在的药物候选物。某些 FAK 结构域包括 FAK-NT。在一个实施方式中,由数据编码的结构与 FAK-NT2 或 IGF-1R 的激酶结构域配位。在另一个实施方式中,由数据编码的结构与 FAK aa 126-243 或 IGF-1Raa 959-1266 配位。通过数据编码的结构可以在计算机屏幕上以三维图示显示。这允许肉眼观察结构,以及肉眼观察该结构与化学实体的结合。

[0230] 因此,根据另一个实施方式,本发明涉及用于评估化学实体与以下结构结合的潜

能的方法 :a) 包含 FAK、IGF-1R、或其特定结构域的结合口袋的分子或分子复合物,或 b) 所述分子或分子复合物的同源物,其中所述同源物包含结合口袋,其自所述氨基酸的骨架原子的均方根偏差不大于 2.0 埃(更优选不大于 1.5 埃)。

[0231] 该方法包括如下步骤:

[0232] i) 采用计算方法进行化学实体与分子或分子复合物的结合口袋之间的配合(fitting)操作;及

[0233] ii) 分析配合操作的结果以量化化学实体与结合口袋之间的结合。本文所用的术语“化学实体”是指化合物、至少两个化合物的复合物、及这些化合物或复合物的片段。

[0234] 根据本发明,设计与 FAK 和 IGF-1R 之间的相互作用位点结合或联合的化合物,或者结合或抑制 FAK、IGF-1R、或其特定结构域的化合物,通常需要考虑一些因素。首先,该实体必须能与部分或所有 FAK、IGF-1R、或其特定结构域、或 FAK 与 IGF-1R 之间的相互作用位点在物理上和结构上联合。在此联合中很重要的非共价键分子间相互作用包括氢键、范德华相互作用、疏水相互作用和静电相互作用。第二,该实体必须能够呈现一种构象,使得其与 FAK、IGF-1R、或其特定结构域、或 FAK 与 IGF-1R 之间的相互作用位点直接联合。尽管所述实体的某些部分将不会直接参与这些联合,但是该实体的这些部分仍然会影响分子的总体构象。这反过来对效能具有重要的影响。这种构象要求包括:与所有或部分结合口袋有关的化学实体的总体三维结构和取向、或包括数个直接与结合口袋或其同源物相互作用的化学实体的实体的官能团之间的间隔。

[0235] 化学实体对 FAK、IGF-1R、或其特定结构域、或 FAK 与 IGF-1R 之间的相互作用位点的潜在的抑制或结合作用可以在其实际合成和测试之前通过使用计算机模拟技术分析。如果给定的实体的理论结构表明其与靶结合口袋之间的相互作用或联合不充分,则排除对该实体的测试。然而,如果计算机模拟表明相互作用强,则可以合成该分子并测试其与 FAK、IGF-1R、或其特定结构域的结合能力,或其与 FAK 和 IGF-1R 之间的相互作用位点的联合能力。在一个实施方式中,可测试该分子与 FAK-NT(或 FAK-NT2)、或 IGF-1R 的激酶结构域结合能力。在另一个实施方式中,根据其于 FAK aa 126-243 和 / 或 IGF-1R aa959-1266 结合的能力而选择化合物。例如,这可以通过测试该分子抑制 FAK、IGF-1R、或其特定结构域活性,或调节 FAK 与 IGF-1R 之间的结合相互作用的能力而实现,例如使用本文所述的或本领域已知的检定方法。以这种方式,可以避免合成无效的化合物。

[0236] FAK、IGF-1R、或其特定结构域、或 FAK 和 IGF-1R 之间的结合相互作用的潜在抑制剂可以借助于一系列步骤计算地评价,其中化学实体或片段针对其与 FAK、IGF-1R、或其特定结构域、或 FAK 和 IGF-1R 之间的相互作用位点的结合能力进行筛选和选择。在一个实施方式中,可对潜在抑制剂与 FAK-NT(或 FAK-NT2) 结构域、或 IGF-1R 的激酶结构域结合的能力进行评价。例如,在此过程中可利用 FAK aa126-243 和 / 或 IGF-1R aa 959-1266。

[0237] 针对化学实体或片段与 FAK、IGF-1R、或其特定结构域、或 FAK 和 IGF-1R 之间的相互作用位点的结合能力,本领域技术人员可以使用数种方法之一对化学实体或片段进行筛选。基于 FAK、IGF-1R、其特定结构域、或 FAK 和 IGF-1R 的复合物的结构,或基于由可机读存储介质所产生的、定义相似形状的其他坐标,此方法可始于在计算机屏幕上肉眼观察例如 FAK、IGF-1R、或其特定结构域(例如 FAK NT2 结构域、或 IGF-1R 的激酶结构域)、或 FAK 和 IGF-1R 之间的相互作用位点。然后将选定的片段或化学实体以多种取向放置或对

接 (dock) 在如上定义的结合口袋内。对接可以使用比如 Quanta 和 DOCK 的软件完成, 随后以比如 CHARMM 和 AMBER 的标准分子力学力场进行能量最小化及分子动力学。

[0238] 专门的计算机程序 (例如本领域已知的和 / 或市售的和 / 或本文所述的) 也可辅助选择片段或化学实体的过程。

[0239] 一旦选定了合适的化学实体或片段, 可将其组装成单一的化合物或复合物。可以通过肉眼观察在计算机屏幕上显示的与靶结合口袋的结构坐标相关的三维图像的各个片段之间的关系而进行组装。

[0240] 作为如上所述的以逐步方式一次以片段或化学实体构建结合口袋的抑制剂的代替, 抑制化合物或其他结合化合物可使用空的结合位点或任选地包括已知的 (一种或多种) 抑制剂的部分 (一部分或多个部分) 整体设计或“重新 (de novo)”设计。有许多本领域已知的重新设计的配体设计方法, 其中一些是市售的 (例如从 Tripos Associates, St. Louis, Mo. 可得的 LeapFrog)。

[0241] 根据本发明也可以采用其他分子模拟技术 (参见 N. C. Cohen 等人, “Molecular Modeling Software and Methods for Medicinal Chemistry”, J. Med. Chem., 33, pp. 883-894(1990); 还参见 M. A. Navia 和 M. A. Murcko, “The Use of Structural Information in Drug Design”, Current Opinions in Structural Biology, 2, pp. 202-210(1992); L. M. Balbes 等人, “A Perspective of Modern Methods in Computer-Aided Drug Design”, in Reviews in Computational Chemistry, Vol. 5, K. B. Lipkowitz 及 D. B. Boyd, Eds., VCH, New York, pp. 337-380(1994); 也参见 W. C. Guida, “Software For Structure-Based Drug Design”, Curr. Opin. Struct. Biology, 4, pp. 777-781(1994))。

[0242] 一旦已经设计或选定了化合物, 实体与结合口袋的结合效率可以通过计算地评估进行测试和优化。

[0243] 在本领域中可获得特定的计算机软件以评价化合物变形能和静电相互作用。设计用于这些用途的程序例子包括: AMBER; QUANTA/CHARMM (Accelrys, Inc., Madison, WI) 等。这些程序可以例如使用市售的图形工作站来执行。其他硬件系统和软件包为本领域技术人员所知。

[0244] 另一种技术涉及例如本文所述的化合物的虚拟数据库的计算机筛选 (in silico screening)。可以快速筛选数以千计的化合物并能够选定最好的虚拟化合物用于进一步筛选 (例如通过合成和体外测试)。可以筛选小分子数据库以得到能与 FAK、IGF-1R、或其特定结构域中的结合口袋整体或部分地结合, 或与 FAK 和 IGF-1R 之间的相互作用位点联合的化学实体或化合物。在此筛选过程中, 该实体与结合位点的配合质量可以通过形状的互补性或估算的相互作用能量而判断。

[0245] 实施例

[0246] 通过下列实施例进一步说明本发明, 这些实施例意在说明本发明但不限制本发明的范围。

[0247] 材料

[0248] 细胞系和培养基——Panc-1 和 MiaPaca-2 细胞从美国模式培养物保藏所 (American Type Culture Collection) 获得。将 Panc-1 细胞保持在添加了 10% 胎牛血清

(FBS) 和 $1\ \mu\text{g/ml}$ 青霉素 / 链霉素的 Dulbecco' s 改良 Eagle' s 培养基中。将 MiaPaca-2 细胞保持在添加了 10% FBS、2.5% 马血清和 $1\ \mu\text{g/ml}$ 青霉素 / 链霉素的 Dulbecco' s 改良 Eagle' s 培养基中。从德克萨斯大学 MD 安德森癌症中心 (the University of Texas MD Anderson Cancer Center) 获得 L. 3. 6p1 细胞系, 并将其保持在添加了 10% FBS、 $1\ \mu\text{g/ml}$ 青霉素 / 链霉素、维生素、 1mmol/l 丙酮酸钠、 2mmol/l L- 谷氨酰胺和非必需氨基酸的改良 Eagle' s 培养基中。所有细胞系在 37°C 在 5% CO_2 湿润的培养箱中培育。

[0249] 通过北卡罗来纳大学的基因治疗中心病毒载体核心实验室 (Gene Therapy Center Virus Vector Core Facility) 繁殖带有 LacZ 或编码 FAK 的氨基酸 693-1052 (Ad-FAK-CD) 的显性负性 FAK 构建体的重组腺病毒。

[0250] A375、SK-MEL-28 细胞从美国模式培养物保藏所 (Rockville, MD) 获得。C8161、FAK+/+ 和 FAK-/- 小鼠胚胎成纤维细胞 (MEF) 细胞系由 William Cance 博士 (Roswell Park Cancer Institute, Buffalo, NY) 友好提供。IGF-1R+/+ 和 -/-MEFs 由 Renato Baserga (Thomas Jefferson University, Philadelphia, PA) 友好提供。从 Lifeline Cell Technology 获得黑素细胞, 并将其保持在 DermaLife[®] M 黑素细胞培养基 (Lifeline Cell Technology, Walkersville, MD) 中。

[0251] 食道癌细胞系

[0252] TE 和 KYSE 组细胞系由 Yutaka Shimada 博士 (University of Toyama, Toyama, Japan) 友好提供。将食道癌细胞系保持在添加了 10% FBS 和 $1\ \mu\text{g/ml}$ 青霉素 - 链霉素的 RPMI 1640 中。所有细胞系在 37°C 在 5% CO_2 湿润的培养箱中培育。

[0253] 胰腺癌细胞系

[0254] As-PC1、Bx-PC3、Panc-1 和 MiaPaca-2 细胞从美国模式培养物保藏所 (Rockville, MD) 获得。将 Panc-1 细胞保持在添加了 10% 胎牛血清 (FBS) 和 $1\ \mu\text{g/ml}$ 青霉素 - 链霉素的 Dulbecco' s 改良 Eagle' s 培养基中。将 MiaPaca-2 细胞保持在添加了 10% FBS、2.5% 马血清和 $1\ \mu\text{g/ml}$ 青霉素 - 链霉素的 Dulbecco' s 改良 Eagle' s 培养基中。将 As-PC1 和 Bx-PC3 细胞系保持在添加了 10% FBS 和 $1\ \mu\text{g/ml}$ 青霉素 - 链霉素的 RPMI 1640 中。人胰导管上皮 (HPDE) 细胞由 Carol Otey 博士 (University of North Carolina, Chapel Hill, NC) 友好提供, 并将其保持在添加了 L- 谷氨酰胺、EGF&BPE 和大豆胰蛋白酶抑制剂 (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA) 的角化细胞 - SFM 无血清培养基 (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA) 中。所有细胞系在 37°C 在 5% CO_2 湿润的培养箱中培育。

[0255] 其它细胞系

[0256] FAK 敲除的小鼠胚胎成纤维细胞 (FAK-/-MEFs) 由 William Cance 博士 (Roswell Park, Buffalo, NY) 友好提供, 并被保持在添加了 10% 胎牛血清 (FBS) 和 $1\ \mu\text{g/ml}$ 青霉素 - 链霉素的 Dulbecco' s 改良 Eagle' s 培养基中。IGF-1R 敲除的小鼠胚胎成纤维细胞 (IGF-1R-/-MEF) 由 Renato Baserga 博士 (Kimmel Cancer Center, Thomas Jefferson University, Philadelphia, PA) 友好提供, 并被保持在添加了 10% 胎牛血清 (FBS) 和 $1\ \mu\text{g/ml}$ 青霉素 - 链霉素的 Dulbecco' s 改良 Eagle' s 培养基中。使用 200mg/ml 的潮霉素 B (Hygromycin B) 筛选 IGF-1R-/- 克隆。MCF7、MCF10A 和 BT474 细胞购自美国模式培养物保藏所 (ATCC, Rockville, MD)。将 BT474 保持在含有 10% 胎牛血清和 $250\ \mu\text{g/ml}$ 胰岛素的 RPMI-1640 中。将 MCF7 细胞保持在含有 10% 胎牛血清、 $1\times$ 非必需氨基酸 (Cellgro,

Herndon, VA)、1mM 丙酮酸钠和 500 μ g/ml 胰岛素的改良最小 Eagle's 培养基 (Modified minimum Eagle's media) 中。在添加了 5% 马血清、氢化可的松 (0.5 μ g/ml)、胰岛素 (10 μ g/ml)、表皮生长因子 (20ng/ml) 和青霉素 - 链霉素 (各 100 μ g/ml) 的 Dulbecco's 改良 Eagle's 培养基与 F12 培养基 (DMEM-F12) 的 1 : 1 混合物中培养 MCF10A, 一种永生化的乳腺上皮细胞系。

[0257] 试剂和抗体: FAK siRNA 购自 Dharmacon RNA Technologies (Lafayette, CO)。NVP-AEW 541 和 TAE226 从 Novartis (East Hanover, NJ) 获得。抗 FAK 单克隆的 (4.47) 和抗磷酸化酪氨酸单克隆的 (4G10) 抗体从 Upstate (Lake Placid, NY) 获得。抗 IGF-1R 抗体来源于 Calbiochem (San Diego, CA)。抗磷酸化 FAK (Tyr397) 和抗磷酸化 Src 的抗体来源于 Biosource (Camarillo, CA)。抗磷酸化 EGFR、抗 EGFR、抗磷酸化 Akt、抗 Akt、抗磷酸化 ERK1/2、抗 ERK1/2、抗 cyclin B1 和抗 Aurora B 来源于 Cell Signaling Technology (Beverly, MA)。抗半胱天冬氨酸酶 3 和抗 PARP 抗体来源于 BD Biosciences (San Jose, CA, 目录 #611038)。抗肌动蛋白抗体来源于 Sigma (St Louis, MO)。抗甘油醛 3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 抗体来源于 Advanced Immunochemical (Long Beach, CA)。而且, 实验中使用的不同的 IGF-1R 和 FAK 的蛋白构建体在本发明者的实验室中制备。

[0258] TAE226 从 Novartis (East Hanover, NJ) 获得。抗 FAK (4.47) 和抗磷酸化酪氨酸单克隆的 (4G10) 抗体从 Upstate (Lake Placid, NY) 获得。抗 FAK (C20) 和抗 IGF-1R β 抗体 (C20) 来源于 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)。抗 His 和抗 GST 抗体来源于 Sigma (Saint Louis, MS)。抗磷酸化 IGF-1R 和抗 IGF-1R 抗体来源于 Calbiochem (San Diego, CA)。抗磷酸化 FAK (Tyr397) 来源于 Biosource (Camarillo, CA)。抗半胱天冬氨酸酶 8、抗半胱天冬氨酸酶 9、抗磷酸化 Akt、抗 Akt、抗磷酸化 ERK1/2、抗 ERK1/2 抗体来源于 Cell Signaling Technology (Beverly, MA)。抗半胱天冬氨酸酶 3/7 和抗 PARP 抗体来源于 BD Biosciences (目录 #611038, San Jose, CA, 识别 PARP 的全长未裂解形式)。抗 β -肌动蛋白抗体来源于 Sigma (St Louis, MO)。抗甘油醛 3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 抗体来源于 Advanced ImmunoChemical (Long Beach, CA)。

[0259] MTT 试剂购自 Promega (Madison, WI)。CFSE 购自 Molecular Probes (Eugene, OR)。TAE226 从 Novartis (East Hanover, NJ) 获得。吉西他滨 (Gemzar) 购自 Eli Lilly (Indianapolis, IN, USA)。5-氟尿嘧啶 (5-FU) 由 Sigma-Aldrich Chemical (Poole, UK) 提供。重组人 IGF-1 购自 R&D (Minneapolis, MN)。抗 FAK 单克隆的 (4.47) 和抗磷酸化酪氨酸单克隆的 (4G10) 抗体从 Upstate (Lake Placid, NY) 获得。抗 FAK (C20) 抗体和抗 IGF-1R β 抗体 (C20) 从 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA) 获得。抗 His 抗体和抗 GST 抗体从 Sigma (Saint Louis, MS) 获得。抗磷酸化 IGF-1R 和抗 IGF-1R 抗体来源于 Calbiochem (San Diego, CA)。抗磷酸化 FAK (Tyr397) 和抗磷酸化 Src 抗体来源于 Biosource (Camarillo, CA)。抗 src、抗半胱天冬氨酸酶 8、抗半胱天冬氨酸酶 9、抗磷酸化 Akt、抗 Akt、抗磷酸化 ERK1/2、抗 ERK1/2 来源于 Cell Signaling Technology (Beverly, MA)。抗半胱天冬氨酸酶 3/7 和抗 PARP 抗体来源于 BD Biosciences (目录 #611038, San Jose, CA)。该 PARP 抗体识别 PARP 的全长、未裂解形式。抗 β -肌动蛋白抗体来源于 Sigma (St Louis, MO)。抗甘油醛 3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 抗体来源于 Advanced ImmunoChemical (Long Beach, CA)。

[0260] 细胞存活 (MTT) 和 CFSE 增殖检定:将细胞铺于 96 孔板中,并使其粘附过夜。细胞处理后,通过 3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基溴化四唑鎓 (MTT) 检定 (CellTiter 96® Aqueous, Promega, Madison, WI) 来测定细胞存活。

[0261] 在脱附检定中,在血球计中分别收集脱附的和吸附的细胞并计数。通过将脱附的细胞数除以细胞总数来计算脱附百分比。

[0262] 为了用 CFSE (Molecular Probes, Eugene, OR) 染色,将 1×10^7 /ml 的细胞悬浮于 PBS 中,并与 $10 \mu\text{M}$ 的 CFSE 一起在 37°C 培育 5 分钟。将染色的细胞仅与培养基或与抑制剂一起培养 24、48 和 72 小时,固定并通过 FACS Calibur 细胞仪 (Becton Dickinson, San Jose, CA) 分析。

[0263] 计算机对接:将 FAK 的 N 端结构域 (PDB code 2AL6) (22) 和 IGF-1R 的激酶结构域 (PDB 1P40A) (23) 的晶体结构用于其相互作用的计算机分子模拟,如前所述。将从美国国家癌症研究院发展治疗计划 (NCI/DTP) 的数据库获得的化合物 NSC344553 (INT2-31) 的三维坐标,对接到 FAK 的氨基端 (氨基酸 127-243) 与 IGF-1R (21) 的胞质内部分的预测界面上。所有的对接计算通过 University of California-San Francisco DOCK 5.1 程序进行,使用集团匹配算法 (clique-matching algorithm) 用描述 FAK (37) 上的靶位点的一组范围 (sphere) 将小分子结构定位。在靶位点为 NSC344553 建立 100 个方向,并使用计算机程序的 grid-based scoring 功能对其打分。对接计算在佛罗里达大学的高性能计算超级计算群 (High Performance Computing supercomputing cluster) 上进行 (<http://hpc.ufl.edu>)。计算 NSC 344553 在结合到 FAK-NT2 的过程中所有构象的分子间能量作为静电能和范德华能之和。对这些能量项作为相关函数进行评价,其通过快速傅里叶变换有效计算。

[0264] 生产 GST 融合蛋白:FAK-GST 质粒构建体 (pGEX 载体) 由 Elena Kurenova 博士 (Roswell Park Cancer Institute, Buffalo, NY) 友好提供。加 His 标签的 IGF-1R 蛋白购自 Blue Sky Biotechnology (Worcester, MA)。通过在 37°C 与 0.2mM 异丙基 b-D-吡喃半乳糖苷 (IPTG) 一起培育 6h,使 GST 融合蛋白 (FAK 片段) 在 BL21 (DE3) 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 中表达。超声裂解细菌,并使用谷胱甘肽-琼脂糖 4B 球珠 (GE Healthcare, NJ) 纯化融合蛋白。

[0265] 沉降检定:为进行沉降结合检定,用固定于谷胱甘肽-琼脂糖 4B 球珠上的 GST 对加 His 标签的 IGF-1R 片段蛋白质 (200ng) 进行预清除 (precleared)。预清除的加 His 标签的蛋白质与固定于谷胱甘肽-琼脂糖 4B 球珠上的 $0.2 \mu\text{g}$ GST-FAK 融合蛋白一起在 4°C 培育 1h,随后用 PBS 洗涤三次。每次结合检定使用等量的 GST 融合蛋白。结合的蛋白在 $6 \times \text{Laemmli}$ 缓冲液中煮沸,并用 SDS-PAGE 和蛋白质印迹进行分析。

[0266] 免疫沉淀和蛋白质印迹:用冰冷的 $1 \times \text{PBS}$ 洗涤细胞两次,并在含有 20mM Tris, pH 7.4、 150mM NaCl、 1% NP-40、 5mM EDTA 酸、蛋白酶抑制剂 (Complete™ Protease Inhibitor, Roche, NJ) 和磷酸酶抑制剂 (Calbiochem, CA) 的缓冲液中裂解。对于免疫沉淀, $100\text{--}200 \mu\text{g}$ 的总细胞提取物用于各个样品。将提取物与 $1 \mu\text{g}$ 抗体一起在 4°C 培育过夜。接着,加入 $25 \mu\text{l}$ 的蛋白质 A/G 琼脂糖球珠,并在 4°C 培育样品 2h。用裂解缓冲液洗涤沉淀 4 次,并通过 SDS-PAGE 溶解含有 $30 \mu\text{g}$ 蛋白质的样品。通过 scion 图像分析软件程序检测蛋白质印迹中的条带强度。

[0267] 细胞的小发卡 RNA 转染:对照 shRNA (模拟) 和 FAK shRNAs 从 Open Biosystems

获得。针对人 FAK 的小发卡 RNA 的序列为:(5' -CCGGCCGATTGGAAACCAACATATACTCGAGTATA TGTTGGTTTCCAATCGTTTTG-3' ;5' -CCGGGCCAGAAGAAGGAATCAGTTCTCGAGAACTGATTCTTCTTCT GGGCTTTTTG-3'),对照 shRNA(模拟)(5' -TCCGAACGTGTACGTTCTTGAACGTGACACGTTCCGGA GA-3')。为了转染,在转染前一天将细胞(2×10^5 细胞/孔)接种于 6 孔板 2ml 培养基之中。根据制造商的方案,采用 Lipofectamine 2000 试剂(Invitrogen, CA)转染细胞。

[0268] GFP 融合的 FAK 构建体和细胞转染

[0269] 采用基因特异性的引物通过 PCR 扩增 FAK-NT1(a. a. 1-126)、FAK-NT2(a. a. 127-243)和 FAK-NT3(a. a. 244-415),并将其克隆到 pEGFP-C2 载体(Clontech, Mountain View, CA)中。所有序列均通过自动测序(ICBR Sequencing Facility, University of Florida)确定。为了过表达 FAK 片段,根据供应商的说明书,用 Lipofectamine 2000(Invitrogen, CA)将质粒 pEGFP-FAK-NT1、pEGFP-FAK-NT2 和 pEGFP-FAK-NT3 转染到细胞中。

[0270] 稳定的细胞系转导

[0271] 胰腺癌细胞系 Panc-1 和 Mia paca-2 的感染在 Lung-ji Chang 博士的实验室中完成。用于荧光素酶表达的慢病毒载体(lentiviral vector)佛罗里达大学 RD-0637 和 RD-0633 协议上登记。

[0272] 使胰腺癌细胞系胰蛋白酶化并记数。然后将细胞铺于 24 孔盘中,并在 37°C、湿润的 5% CO₂-95% 空气下培育直至 60-80% 汇合(confluent)。在各孔中,向培养基中加入体积为 10 μ l 的萤火虫荧光素酶和含有慢病毒颗粒的红色荧光蛋白(RFP)。轻柔旋动平板以混合之后,在 5% CO₂ 的气氛下,在 37°C 湿润的培养箱中培育细胞,以实现最佳转导效率。四小时后,用新的培养基替换含病毒的培养基。根据 RFP 蛋白的表达和流式细胞仪对细胞的分选,得到转导细胞的纯种群。脱附检定:在有和没有化合物的条件下涂布细胞至 24、48 和 72 小时,并在血球计中对粘附和脱附的细胞计数。通过将脱附的细胞数除以细胞总数来计算脱附百分比,实验重复进行三次。

[0273] 凋亡检定:处理后,对吸附和脱附的细胞进行收集和计数,并通过使用 APO-BRDU 试剂盒(BD Pharmingen, San Diego, CA)制备细胞以进行末端尿苷脱氧核苷酸转移酶(TUNEL)检定,用 FACSCalibur 细胞仪(Becton Dickinson, San Jose, CA)对细胞进行分析。此外,通过 Hoechst 33342 染色(1 μ g/ml)分析凋亡的细胞。以凋亡细胞与细胞总数的比率计算凋亡细胞的百分比。为进行半胱天冬氨酸酶 3/7 活化检测,将 2000 个细胞平铺到玻璃底、涂有 2% 明胶的平板上,并通过共聚焦显微镜对荧光激活进行评价。

[0274] Hoechst 染色

[0275] 此外,还通过 Hoechst 染色对凋亡细胞进行分析。向上述制备的细胞中加入 Hoechst 33342(1 μ g/ml),在黑暗中室温条件下培育 10 分钟,并将样品置于盖玻片上。在 Zeiss 显微镜下观察玻片中的凋亡的细胞核。以凋亡细胞与细胞总数的比率计算凋亡细胞的百分比。对每个样品中 300 个以上的细胞进行分析。

[0276] 半胱天冬氨酸酶 3/7 凋亡检定

[0277] 为了检测活化的半胱天冬氨酸酶 3/7 酶,其作为被处理的细胞中细胞凋亡的证明,使用 Apo-ONE[®]半胱天冬氨酸酶 -3/7 试剂盒(Promega, Madison, WI)。将 2000 个细胞铺于 96 孔玻璃底板中,并用不同浓度的化合物进行处理。处理 24、48 和 72h 后,

将细胞与 $10 \mu\text{l}$ 荧光前 (profluorescent) 半胱天冬氨酸酶 -3/7 共有底物, 罗丹明 110 双-(N-CBZ-L-天冬氨酰基-L-谷氨酰基-L-缬氨酰基-天冬酰胺)(Z-DEVD-R110), 一起在黑暗中室温条件下培育 30 分钟。DEVD 肽底物序列中的天冬氨酸残基的 C 端侧被半胱天冬氨酸酶 -3/7 裂解时, 罗丹明 110 在 498nm 波长处受激发时开始发荧光。最大发射波长是 521nm。产生的荧光产物的量表示样品中存在的活性半胱天冬氨酸酶 -3/7 的量。采用 $40\times$ 油浸物镜 (oil objective), 通过 Leica TCS SP5 激光扫描共聚焦显微镜使用 LAS-AF 成像软件成像。

[0278] 激酶剖析程序 (profiler) 筛选: 通过 Invitrogen 的 SelectScreen® 激酶剖析服务 <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Services/Discovery-Research/SelectScreen-Profiling-Service/SelectScreen-Kinase-Profiling-Service.html> 进行激酶特异性筛选。根据 Z'-LYTE™ 激酶检定, 利用 $1 \mu\text{M}$ 化合物 INT2-31、 $10 \mu\text{M}$ ATP 和激酶底物对 10 种重组激酶进行筛选。对于 PI3 激酶活性, 按照 Invitrogen Adapta® Universal Kinase Assay 方案利用 $100 \mu\text{M}$ ATP 和激酶底物。

[0279] 裸鼠体内的肿瘤生长: 六周龄的无胸腺的雌性裸鼠购自 Harlan Laboratory。将小鼠保持在动物实验室中, 并遵照 NIH 动物使用指南根据 IACUC 认可的方案进行所有的实验。皮下注射黑素瘤细胞, 5×10^6 细胞。当肿瘤大小达到 100mm^3 时, 通过腹膜内注射以每天 $15\text{mg}/\text{kg}$ 的剂量引入 INT2-31 共 21 天。用测径器测量肿瘤直径, 并采用下式来计算肿瘤体积 (mm^3): $[(\text{宽度})^2 \times \text{长度}] / 2$ 。实验结束时, 测定肿瘤重量和体积。

[0280] 黑素瘤异种移植

[0281] 对于黑素瘤研究, 佛罗里达大学 IACUC 通过了以下协议 (IACUC 研究 #200801077)。皮下注射黑素瘤细胞, 5×10^6 细胞。当肿瘤大小达到 100mm^3 时, 通过腹膜内注射以每天 $15\text{mg}/\text{kg}$ 的剂量引入 INT2-31。用测径器测量肿瘤直径, 并采用下式来计算肿瘤体积 (mm^3): $[(\text{宽度})^2 \times \text{长度}] / 2$ 。实验结束时, 测定肿瘤重量和体积。

[0282] 患者和异种移植

[0283] 本研究中使用人受试者是为了获得实体食道肿瘤组织和胰腺肿瘤组织以进行审查过的研究这个唯一的目的, 并且已经得到佛罗里达大学卫生中心机构审查审查会 (University of Florida Health Center Institution Review Board, IRB) 在 #276-2008 和 321-2005 协议下的具体批准。

[0284] 对于来自患有食道癌或胰腺癌的人患者的肿瘤样本, 佛罗里达大学 IACUC 通过了以下协议 (IACUC 研究 #2000902767)。10 个患有胰腺癌且 15 个患有食道癌, 共 25 个患者样本被鉴定并被植入裸鼠。起初, 来源于新鲜胰腺和食道的人肿瘤样本的小片 ($0.3 \times 0.3 \times 0.3\text{cm}$) 从在佛罗里达大学尚兹医院 (University of Florida Shands Hospital) 进行手术的患者的手术标本获得, 对各患者样本以每组 2 只小鼠皮下植入。对于食道癌样本, 当其中一个达到 1.5cc 时, 将其切除并切成 ($0.3 \times 0.3 \times 0.3\text{cm}$) 的小片, 并皮下移植到另 10 只小鼠中。当肿瘤达到 $\sim 100\text{mm}^3$ 时, 将小鼠随机分成以下 2 组, 每组 5 只小鼠:

[0285] • 第 1 组: 对照: 不作处理

[0286] • 第 2 组: INT2-31 (化合物 31): 以 $50 \mu\text{L}$, $50\text{mg}/\text{kg}/\text{天}$ 通过 i.p 给药 21 天。在此之前我们实验室已经对这些药物进行测试, 在此剂量条件下没有可测量的毒性。

[0287] 接种肿瘤后 30-40 天使小鼠安乐死,并收集肿瘤和组织。为了抑制我们的皮下模型中的肿瘤生长,每日包括周末和假期对肿瘤体积(长度 X 宽度 X 高度 X $\pi/6$)和体重进行测量,以监测肿瘤生长并评价总体的临床症状,考虑体重减轻和疼痛、痛苦或异常行为和生理的迹象。当平均对照肿瘤体积为 1.5cc(约 30-40 天)时,终止实验。

[0288] 抗肿瘤活性表示为 T/C%(受治疗的动物的肿瘤体积的平均增长除以对照动物的肿瘤体积的平均增长乘以 100)。

[0289] 胰腺癌的原位模型

[0290] 对胰腺癌的原位模型,佛罗里达大学 IACUC 通过了以下协议(IACUC 研究 #200801506)。采用荧光素酶-RFP(红色荧光蛋白)报告基因稳定地转染胰腺癌细胞系,Mia paca-2 和 Panc-1 细胞,以对异种移植物进行体内成像。对 RFP 阳性细胞扩增和分选后,细胞在培养基中扩增,并将 5×10^6 个肿瘤细胞植入 20 只小鼠的胰腺中。为了在胰腺内植入细胞,采用 ACS 提供并维护的啮齿动物安乐死仪器使用异氟烷使小鼠安乐死。在无菌手术条件下,通过 1.0cm 的皮肤、腹壁和腹膜的切口,脾脏收缩,并用 29- 规格的注射针将 30 μ L 体积的细胞注射到胰腺尾部。采用 5.0 可被吸收的手术缝合线缝合腹壁和腹膜,并用医用胶(多抹棒(dermabond))使皮肤闭合。术后镇痛是手术后每 8-12 小时皮下注射 0.05mg/kg 的丁丙诺啡。

[0291] 当肿瘤达到 $\sim 100\text{cm}^3$ 时,将小鼠随机分成以下 4 组,每组 3 只小鼠:

[0292] • 第 1 组:对照:不作处理。

[0293] • 第 2 组:吉西他滨:每 5 天以 40mg/kg,50 μ L 处理,通过腹膜内(i.p)给药 3 周。

[0294] • 第 3 组:INT2-31:通过 i.p 给药,15mg/kg/天,50 μ L。

[0295] • 第 4 组:吉西他滨和 INT2-31 处理的结合。

[0296] 腹膜内注射之前束缚小鼠四肢。肿瘤接种 6 周后,使小鼠安乐死,并收集肿瘤和组织。如下所述,使用 IVIS lumina 成像仪每周对小鼠成像,并通过生物发光信号评估肿瘤大小。

[0297] 小鼠体内成像

[0298] 在表达生物发光标签的所有有肿瘤的小鼠中进行非侵入性的成像。对表达荧光素酶报告基因的肿瘤使用 IVIS lumina 平台。为了实现成像,采用 ACS 提供并维护的啮齿动物安乐死仪器使用异氟烷使小鼠安乐死。使用低温冷冻的 IVIS 成像系统(Xenogen)和活体成像采集和分析软件(版本 2.11,Xenogen)来检测小鼠中的生物发光信号。对于表达荧光素酶报告基因的有肿瘤的小鼠,成像之前使用 25-27g 注射针以 100 μ L、每 kg 体重 150mg 荧光素(Xenogen Corp., Alameda, Calif.) 对小鼠进行腹膜内注射或皮下注射。采用标准手术消毒剂清洁注射区域,所有溶液是无菌的且符合佛罗里达大学的药物政策。10 分钟后,如上所述,使小鼠安乐死,并将其置于热的样品架上。成像系统首先在弱光下在腔室中摄影成像;接着进行发光图像采集。1 分钟的积分时间用于对所有小鼠肿瘤模型进行发光图像采集。活体成像软件用于对从小鼠中得到的总体生物发光信号(按照光子计数)进行积分。IVIS 成像系统的体外检测极限是 1,000ES-2/luc 细胞。

[0299] 在六周时间中至多每周对各动物进行研究。根据发光信号,容易估计肿瘤大小。在第 42 天或肿瘤大小达到 1.5cc 大小时,将小鼠安乐死。

[0300] 免疫组织化学:在 10%福尔马林中固定异种移植肿瘤组织并将其包埋在石蜡中。

为了 Ki-67 染色,样品经过去石蜡化和抗原修复,并与初级抗体 Ki-67(Dako M7240) 以 1 : 200 的浓度在 4℃ 培育过夜。用色原 DAB(chromogen DAB) 对组织染色并用苏木精和 1% TBS 对其复染色。

[0301] 为了评价凋亡的细胞,根据来源于制造商的说明书,利用 Dead End™ Calorimetric TUNEL System(Promega, Madison, WI) 进行染色。通过在高倍视野中对至少 400 个细胞计数而确定凋亡细胞的百分比。

[0302] 统计分析

[0303] 进行 Student' s t 检验以确定显著性。认为 $p < 0.05$ 的数据间差异是显著的。

[0304] ELISA 检验

[0305] 进行两种不同的酶联免疫吸收检定以研究 IGF-1R 的 β 亚基和 FAK-NT 间的结合。第一种检定涉及 IGF-1R 与固定的 FAK-NT 的相互作用;第二种检定涉及 FAK-NT 与固定的 IGF-1R 的相互作用。

[0306] 在第一种情况下,在 4℃ 使用在 50 μ l PBS(NaCl 137mM、KCl 2.7mM、 Na_2HPO_4 4.3mM、 KH_2PO_4 1.4mM) 中的纯化的融合 GST 的 FAK 的 FERM 结构域涂覆 96 微量滴定板孔过夜。然后用洗涤缓冲液(PBS, 0.05% Tween) 漂洗小孔,并在 37℃ 用 200 μ l 封闭缓冲液(PBS, 1% BSA) 封闭 3h。用洗涤缓冲液漂洗 3 次后,在有或没有化合物的条件下,向孔中加入 100 μ l 含有 0.2 μ M 纯化的 IGF-1R 全蛋白的结合缓冲液(PBS、0.05% Tween、1% BSA),并使其在 37℃ 反应 1h。再次漂洗孔 3 次,加入 100 μ l 含有 200ng/ml 初级抗体抗 IGT-1R(sc-613 Santa Cruz) 的结合缓冲液并在 37℃ 培育 1h。再次漂洗三次后,加入 100 μ l 含有二级 HRP 抗兔抗体的相同的缓冲液,并在 37℃ 再培育 1 小时。最后,使用 100 μ l 的 ABTS 底物(2, 2' - 联氮双[3- 乙基苯并噻唑啉-6- 磺酸]-二铵盐),并在暗处保存平板直至阳性对照的颜色强度最大,且阴性对照不发生非特异性的反应(6-10 分钟)。在 Biotech ELISA 测读仪中 450nm 处扫描 ELISA 板。

[0307] 对于第二种检测,应用相同的方法,但 IGF-1R 固定在孔中,并与 FAK-NT 一起培育。采用初级抗体抗 FAK-4.47(05-537, Upstate) 以显现结合反应。

[0308] BIACORE 分析

[0309] 采用 Biacore T100 技术连同 ELISA 分析来表征小分子化合物靶向 FAK 和 IGF-1R 的相互作用位点的热力学结合参数。

[0310] 采用 Biacore T100 光学生物传感器进行所有实验(<http://www.biacore.com>)。S 系列的 CM5 传感器芯片、N- 羧基琥珀酰亚胺(NHS)、N- 乙基-N' -(3- 二甲氨基丙基) 碳二亚胺(EDC)、乙醇胺盐酸盐和仪器特定的耗材和配件由佛罗里达大学的 ICBR 所提供。

[0311] FAK-NT 固定

[0312] 为了再利用 FAK 和 IGF-1R 的传感器芯片,将抗鼠二级抗体固定到传感器芯片表面。这样使得初级抗体被用于将配体蛋白固定到表面上,也排除了在芯片表面固定蛋白质的过程中掩盖蛋白质的相互作用位点的可能性。

[0313] 采用 Hepes 缓冲盐水(HBS :10mM Hepes 和 150mM NaCl, pH 7.4) 作为运行缓冲液,进行固定过程。用两个 6-s 脉冲,各 100mM HCl、50mM NaOH 和 0.1% 十二烷基磺酸钠(SDS) 以 100 μ l/min 的流速对传感器器芯片表面进行第一预处理。在 30℃ 以 10 μ l/min 的流速采用胺偶合化学制备抗鼠抗体表面。注入 NHS/EDC 15 分钟以活化表面,注入 100 μ g/ml 抗

体（溶于 10mM 乙酸钠中，pH 4.5）10 分钟，最终注入乙醇胺 7 分钟以封闭残余的活化基团。此固定过程产出 5000 至 7000 个共振单位（RU）的固定抗体。固定后，用分析运行缓冲液（50mM Tris-HCl、150mM NaCl、10mM MgCl₂、0.1% Tween 20、0.1% Brij-35 和 5% 二甲亚砜 [DMSO]，pH 8.0）彻底灌注（prime）仪器。抗鼠抗体固定后，注入 100 μg/ml 鼠抗 FAK 4.47 抗体（05-537, Upstate）（溶于 10mM 乙酸钠中，pH 4.5）10 分钟，并用三次 5-s 脉冲，各 100mM HCl、50mM NaOH 和 0.1% 十二烷基磺酸钠（SDS）以 100 μl/min 的流速洗涤传感器芯片表面以除去未结合的抗体。此固定过程产出 15000 至 20000 个共振单位（RU）的固定的初级抗体。最后，注入 200 μg/ml 的 FAK-NT（溶于 10mM 乙酸钠中，pH 4.5）至 10 分钟，并用三次 5-s 脉冲，各 100mM HCl、50mM NaOH 和 0.1% 十二烷基磺酸钠（SDS）以 100 μl/min 的流速洗涤传感器芯片表面。此固定过程产出 30000 至 40000 个共振单位（RU）的固定的 FAK-NT。

[0314] 捕获 IGF-1R

[0315] 在 -80℃ 下将 IGF-1R 的等分试样保持冰冻直至使用。注入大量的新配制的 200 μg/ml 的 IGF-1R（溶于 10mM 乙酸钠中，pH 4.5）10 分钟，并使溶液两次通过快速脱盐柱（用 50mM Tris-HCl、150mM NaCl 和 10mM MgCl₂，pH 8.0 平衡）而除去未结合的蛋白。在 25℃ 下捕获步骤通常向 FAK-NT 表面上产出 2000 至 4000RU 的密度。保存初级抗体结合表面用作参照。

[0316] 制备分析物溶液

[0317] 对于贮备液，将化合物溶于 100% 的 DMSO 中至 10mM 的浓度；在分析前即刻进行在 DMSO 和 / 或运行缓冲液中进一步稀释化合物贮备液。为了使分析物和运行缓冲液的 DMSO 含量准确地相匹配，通过在 DMSO 中将化合物稀释至以下浓度而制备较低浓度的二级储液：向 1ml 的 50mM Tris-HCl、150mM NaCl、10mM MgCl₂、0.1% Tween 20 和 0.1% Brij-35 (pH 8.0) 中加入 50 μl 此二级储液，得到的化合物浓度比用于分析的选定的高浓度高 9 倍。在分析运行缓冲液中将该初始浓度稀释 9 倍以得到高浓度。再将该样品稀释 9 倍得到低浓度。高分析物浓度和低分析物浓度的浓度传播误差 (propagated error) 计为约 3.0%。

[0318] 分析参数

[0319] 在各温度下，先注射 5 次空白缓冲液以完全平衡仪器。采用 50 μl/min 的流速，注入化合物 30-60s，并对解离监测 1-20 分钟。（选定的注射和解离时间在初步结合试验中确定。）对于紧密结合的复合物，需要再生步骤。在 4 至 11℃ 下，用 10 次 100-s 脉冲的 60% 乙二醇使表面再生；在 16 至 18℃ 下，40% 乙二醇；在 22 至 28℃ 下，30% 乙二醇；在 32 至 39℃ 下，50mM Tris-HCl、150mM NaCl、10% 乙二醇、15mM ATP、15mM MgCl₂、5% DMSO 和 0.1% Tween 20 (pH 8.0)。数据采集频率为 10Hz。

[0320] 数据分析

[0321] 将采用 Scrubber 2 (BioLogic Software, Australia) 处理和生物传感器数据拟合至简单的 1 : 1 模型 ($A+B = AB$) 或包括传质项的 1 : 1 相互作用模型 ($A_0 = A$, $A+B = AB$) 中。将 Scrubber 中确定的平衡解离常数拟合至范特霍夫方程 (van 't Hoff equation) $\ln(KD) = \Delta H^\circ / RT - \Delta S^\circ / R$ 中。（尽管考虑过使用包括 ΔC_p° 项的范特霍夫方程的完整形式，但 $\ln(KD)$ 相对于 $1/T$ 的绘图中缺少曲率，表明采用这种方法是不必要的。） ΔH° 和 ΔS° 的值直接采用 Microsoft Excel 中的 Solver macro 得到。 ΔH° 和 ΔS° 的值也采用 Excel 中的回归函数，通过 $\ln(KD)$ 相对于 $1/T$ 绘图的线性回归分析而间

接确定,其中斜率和截距分别对应于 $\Delta H^\circ /R$ 和 $-\Delta S^\circ /R$ 。采用可下载的称为 SolverAid 的宏 (macro) 获得 Solver 中的 ΔH° 和 ΔS° 的拟合误差 (<http://www.bowdoin.edu/~rdelevie/excellaneous>)。回归程序 (Regression routine) 的参数 ΔH° 和 ΔS° 的误差直接从 Microsoft Excel 中的统计读数 (statistical readout) 得到。两种方法得到的值较好地吻合。根据 Excel 中的通式 $\Delta z^2 = (\partial f / \partial x)^2 \Delta x^2 + (\partial f / \partial y)^2 \Delta y^2 + \dots$ 推演出标准误差。首先使用可下载的宏 Propagate 检验编程公式 (也可在 <http://www.bowdoin.edu/~rdelevie/excellaneous> 得到)。

[0322] 实施例 1

[0323] 小分子数据库

[0324] NCI/DTP 保存了约 250,000 个非专利的样本库 (即,平铺的化合物组 (plated compound set)),并向研究界提供以发现和开发治疗癌症、AIDS 或困扰癌症或 AIDS 患者的随机感染的新药。在 MDL SD 格式中得到 NCI/DTP 平铺的化合物组的三维坐标 (http://www.chm.tu-dresden.de/edv/vamp65/REFERS/vr_03d.htm),并通过 DOCK 实用程序 SDF2MOL2 将其转换成 mol2 格式。采用 SYBDB 计算配体的部分原子电荷、溶剂化能和范德华参数,并添加到平铺的化合物组 mol2 文件中。

[0325] 实施例 2

[0326] 数据库筛选以鉴定潜在的 FAK/IGF-1R 的小分子抑制剂

[0327] 使用结合分子计算机对接和多功能测试的基于结构的方法替代实施高通量筛选。具有已知的三维结构的化合物的大的化学库位于由 SPHGEN (UCSF) 选定的结构口袋中,在人 FAK (PDB 代号 1K05) 的晶体结构上。采用 DOCK5.1 计算机程序 (UCSF) 将具有类药特征 (遵循 Lipinski 规则) 的 250,000 个小分子化合物以 100 个不同的方向对接至 FAK 和 IGF-1R 间的相互作用位点上。DOCK 的一般特征包括配体对受体球的刚性定向、AMBER 能打分、GB/SA 溶剂化打分、接触打分、内部未结合能打分、配体柔性、以及刚性和扭转的单纯最小化 (simplex minimization)。

[0328] 对于选择作为 FAK 和 / 或 IGF-1R 抑制剂的化合物的模型,利用以下序列。

[0329] FAK aa 126-243 :

[0330] ssvr ekyelahppe ewkyelriry lpkgflnqft edkptlnffyy qqvksdymle iadqvdeia
lklgcleirr sywemrgnal ekksnyevle kdvglkrffp kllldsvkak tlr

[0331] IGF-1R aa 959-1266 :

[0332] hrkrnnsrlng vlyasvnpay fsaadvyvdp ewevarekit msrelgqgsf gmvyegvakg
vkdpetrv aiktveaas mreriefne asvmkefnch hvvrllgvvs qgqptlvime lmrtdlksy
lrsrlpemen npvlapps ls kmiqmageia dgmaylnank fvhrdlaarn cmvaedftvk igdfgmtrdi
yetdyrkgg kglpvrwms peslkdgvft tysdvwsfgv vlweiatlae qpyqglsneq vlrfvmeggl
ldkpdncpdm lfelmrncwq ynpkmrpsfl eiissi

[0333] 对预测的各化合物和相互作用位点之间的相互作用的结合能进行评价,最高打分的化合物给出每摩尔 -17.7kcal 的 DOCK 分数。具有最高分的最高打分化合物需要进行 NCI/DTP 的功能测试。在食道癌细胞 (KYSE 140)、黑素瘤癌细胞 (C8161、A375) 和胰腺癌细胞 (Panc-1) 中,在基于细胞的增殖和凋亡检定中,对选定的小分子进行评价。

[0334] NCI/DTP 平铺的化合物组的三维坐标以 MDL SD 格式得到,并通过 DOCK 实用程序

SDF2MOL2 转换成 mol2 格式。采用 SYBDB 计算配体的部分原子电荷、溶剂化能和范德华参数,并添加到平铺的化合物组 mol2 文件中。

[0335] 实施例 3

[0336] 细胞增殖检定:通过直接向培养孔加入少量的单溶液试剂 (One Solution Reagent),培育 1-4 小时,然后用分光光度酶标仪在 490nm 读取吸光度,使用 CellTiter 96 含水单溶液进行细胞增殖检定 (Promega)。通过 490nm 的吸光度量测得的甲瓩产物量与培养基中活细胞的数量直接成正比。

[0337] 实施例 4

[0338] 腺病毒感染:将细胞以 6×10^3 或 2×10^5 的密度铺于培养板上,并使其粘附 24h。然后用腺病毒以每个细胞 50-500 的感染复数或病灶形成单位 (FFU) 的病毒浓度感染细胞 (参见 Golubovskaya, V. 等人, J. Biol. Chem., 277, 2002, 38978-38987)。通过用不同剂量的 Ad-GFP 感染细胞并通过荧光显微镜肉眼观察感染百分比而确定此最佳病毒滴度。用每细胞 100FFU 的 Ad-GFP 处理导致 .95% 的感染率。感染后,细胞耗用 48 或 72h 以进行进一步实验。

[0339] 实施例 5

[0340] siRNA 转染检定:将细胞以 6×10^3 个细胞的密度铺于 60mm 直径的培养板或以 2×10^5 个细胞的密度铺于 100mm 直径的培养板上,并使其粘附 24h。然后根据制造商的方案,采用 Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, California) 用 1-10nM 的 FAK siRNA 或非特异性的 siRNA 转染细胞。利用数种 FAK siRNA 序列来筛选 FAK 敲除株。用于细胞系的 FAK siRNA 的序列为 5' -GAAGUUGGUUGUCUAGAAUU-3' 和 5' -GGUUCAAGCUGGAUUUUUUU-3'。转染后培育细胞 48-72h,然后用于实验。用蛋白质印迹验证 FAK 被 siRNA 抑制。实验重复进行三次。

[0341] 实施例 6

[0342] 免疫沉淀和蛋白质印迹:用冰冷的 $1 \times$ 磷酸缓冲盐水 (PBS) 洗涤细胞两次,并在冰上在含有 20mM Tris, pH 7.4、150mM NaCl、1% NP-40、5mM 乙二胺四乙酸、蛋白酶抑制剂 (Complete™ Protease Inhibitor Cocktail 来自 Roche, Nutley, New Jersey) 和磷酸酶抑制剂 (Phosphatase Inhibitor Cocktail Set I 和 Set II 来自 Calbiochem) 的缓冲液中裂解 30 分钟。在 4°C 下以 10000r. p. m 离心溶菌产物 30 分钟,并对上清进行分析。通过采用 Bio-Rad 蛋白检测确定蛋白质浓度。

[0343] 免疫沉淀:各样品使用 1mg 总细胞提取物。在 4°C 将提取物与 11g 合适的抗体一起培育过夜。加入 25 微升蛋白质 A/G-琼脂糖球珠 (Oncogene Research Products, La Jolla, California),并在 4°C 摇动培育样品 2h。用溶菌缓冲液洗涤沉淀三次,在 40 μ l 的 Laemmli 缓冲液中重悬,并除去 35 μ l 以用于蛋白质印迹。

[0344] 蛋白质印迹:用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳溶解含有 30 μ g 蛋白质的煮沸的样品,随后转移至聚偏二氟乙烯膜 (Bio-Rad, Hercules, California)。根据随各抗体提供的方案进行蛋白质印迹。用 Western Lightning™ Chemiluminescence Reagent Plus (PerkinElmer Life Sciences, Waltham, Massachusetts) 形成免疫印迹。通过图像分析软件程序 (image J) 来测量蛋白质印迹中的条带强度。

[0345] 结果:对用 NSC 344553 处理的细胞溶菌产物的免疫沉淀和蛋白质印迹分析绘于

图 2 和图 3。图 2 显示 NSC 344553 对 FAK-IGF-1R 相互作用的效应,通过对经过不同剂量的 NSC 344553 试验的 C8161 黑素瘤细胞的细胞溶菌产物的免疫沉淀和蛋白质印迹分析而图示。图 3 示出用 75 μ M 的 NSC 344553 处理的 C8161 黑素瘤细胞的效应。用 NSC128687 处理的 MiaPaCa-2 胰腺癌细胞的免疫沉淀和蛋白质印迹分析绘于图 12。

[0346] 对用 IGF-1、NSC 344553、PI3 激酶抑制剂或 NVP-AEW541 (“NVP”) 处理的黑素瘤细胞 (C8161 和 A375) 和胰腺癌细胞 (Panc-1 和 MiaPaca-2) 进行蛋白质印迹分析 (参见图 4、5、7、8、9 和 14)。

[0347] 图 5 描述用 5 μ M 的 NSC 344553 或 PI3 激酶抑制剂处理的 C8161 黑素瘤细胞的效应。图 7 显示在 IGF-1R 野生型和 IGF-1R 缺失型的小鼠胚胎成纤维细胞中,在 24h 处理组和 30 分钟 IGF-1 刺激组中观察到 p-AKT 下降的最显著效应。图 8 显示 FAK 野生型和 FAK 缺失型成纤维细胞的蛋白质印迹分析。在 24h 处理组和 30 分钟 IGF-1 刺激组中看到 p-AKT 下降的最显著效应。图 9 显示 Panc-1 癌细胞经 NSC 344553 处理时的效应。

[0348] 实施例 7

[0349] 细胞存活和脱附检验:细胞经 siRNA 转染处理之后,通过 3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基溴化四唑鎓 (MTT) 检定 (CellTiter 96 $\text{\textcircled{R}}$ Aqueous, Promega, Madison, WI) 测定细胞存活。简单地,向各孔中加入 20 μ l 四唑鎓化合物。然后在 37 $^{\circ}$ C 下培育细胞 1h。用酶标仪在 490nm 处读取平板,以确定存活力。在脱附检定中,在血球计中分别收集脱附和吸附的细胞并计数。将脱附的细胞数除以细胞总数来计算脱附百分比。

[0350] 凋亡检定:处理后,对吸附和脱附的细胞进行收集和计数,并根据制造商的说明书通过使用 APO-BRDU 试剂盒 (BD Pharmingen, San Diego, CA) 制备细胞以进行末端尿苷脱氧核苷酸转移酶 (TUNEL) 检定。用荧光激活细胞分选-Calibur 流式细胞仪 (BD Biosciences) 对染色的细胞进行分析。用 CellQuest 软件 (BD Biosciences) 完成对样品中凋亡细胞的百分比的计算。还通过 Hoechst 染色对凋亡细胞进行分析。向固定的细胞加入 Hoechst 33342 (11g/ml) 并将样品安置在盖玻片上。在 Zeiss 显微镜下观察玻片中凋亡的细胞核。凋亡细胞的百分比计为凋亡细胞与细胞总数的比。

[0351] 结果:对 NSC 344553 的 MTT 检定 (Cell titer 96) 的检定结果绘于图 11,其显示用 NSC 344553 处理 A375 和 C8161 黑素瘤细胞使细胞存活力以剂量依赖性的方式被抑制 (范围 0.05-25 μ M)。图 6 显示 NSC 344553 抑制胰腺癌细胞 (Panc-1 和 MiaPaCa-2) 和黑素瘤细胞 (C8161 和 A375) 的细胞存活力。

[0352] 图 10 显示 0.05 μ M 的 NSC 344553 对 FAK 野生型和裸细胞及 IGF-1R 野生型和裸细胞的 72 小时处理。结果显示,NSC 344553 处理使 FAK+/+ 和 IGF-1R+/+ 成纤维细胞的增殖减少,但对 FAK-/- 和 IGF-1R-/- 细胞没有作用。

[0353] MTT 检定结果显示,用 NSC 344553 处理导致 AKT 磷酸化降低,并使细胞存活力以剂量依赖性的方式被抑制 (范围 0.05-100 μ M),伴随相关的 PARP 裂解。还观察到 0.05 μ M 的 NSC 344553 使 FAK+/+ 和 IGF-1R+/+ 成纤维细胞的增殖减少,但对 FAK-/- 和 IGF-1R-/- 细胞没有作用。更重要地,持续 5 天腹膜内注射 15mg/kg 的 NSC 344553 有效地 ($p < 0.05$) 导致裸鼠中黑色素瘤消退。

[0354] 对 NSC 250435 的 MTT 检定 (Cell titer 96) 的检定结果绘于图 13,其显示 NSC 250435 抑制 A375 和 C8161 黑素瘤细胞的细胞存活力。

[0355] 实施例 8

[0356] 克隆形成 (clonogenic) 检定: 实验中使用胰腺癌细胞系 Panc-1、MiaPaca-2、Panc 2.03 和 Panc 3.27。为了确定细胞存活力, 进行克隆形成检定以评价细胞的再增殖完整性 (参见 Chinnaiyan P. 等人, Clin. Cancer Res. 2008 ;14(17) :5410-5)。克隆形成检定检测所有形式的辐射诱导的细胞死亡, 因此被认为是辐射敏感性分析的“金标准”。使用两种药物浓度, 包括 1) 使 FAK/IGF-1R 通路 (基于蛋白质印迹) 取消所需的最小剂量和 2) 显示次大活性 (细胞存活降低 20% -50%) 的浓度。辐射之前使细胞暴露于 FAK/IGF-1R 抑制剂 24 小时 (基于由蛋白质印迹所确定的抑制 FAK/IGF-1R 激活所需的时间)。辐射后 24 小时用新的培养基 (无药物) 代替含有药物的培养基。在辐射后 10-14 天, 然后对克隆 (由 ≥ 50 个细胞确定) 染色并计数。

[0357] 实施例 9

[0358] 抑制 FAK/IGF-1R 通路对辐射诱导的细胞迁移的作用

[0359] 为了检测细胞移动, 在两室的 Boyden 类型的室中进行跨室迁移检定 (transwell migration assay)。在 5- μ M 孔径 (24 孔) 的 transwell 室的上室中, 将 1×10^5 细胞 / 孔铺于其各自的培养基, 并使其粘附 30 分钟。细胞包括对照细胞和预先暴露于 FAK/IGF-1R 抑制剂 24 小时的细胞。处理条件包括未处理的、仅 RT、仅 FAK/IGF-1R 抑制的、和 RT 与 FAK/IGF-1R 抑制剂组合。将细胞暴露于分级剂量的辐射 (2Gy、4Gy、6Gy 或 8Gy) 并回到培育箱至 24 小时, 漂洗, 固定。用棉签除去残留在聚碳酸酯膜顶部的细胞。用醇类结晶紫对已通过孔迁移至下表面的细胞染色。然后将膜固定到显微镜载片上并对其计数。

[0360] 实施例 10

[0361] 免疫荧光染色和共聚焦显微镜法

[0362] 在 3.7% 仲甲醛的 $1 \times$ PBS 中固定细胞 10 分钟, 并用 0.5% TritonX-100 渗透 5 分钟。然后用 $1 \times$ PBS 洗涤细胞, 用 25% 正常山羊血清的 $1 \times$ PBS 封闭 20 分钟, 并在室温下与初级抗体 (在 25% 山羊血清中 1 : 200 稀释) 一起培育 30 分钟。用 $1 \times$ PBS 洗涤三次后, 室温下将细胞与结合 Texas Red 的二级抗体 (在 25% 山羊血清中 1 : 400 稀释) 在一起培育 30 分钟, 并在显微镜下观察之前, 用 $1 \times$ PBS 再洗涤三次。为了共免疫染色实验, 将细胞与在 25% 的山羊血清中 1 : 100 稀释的另一种初级抗体一起培育 1h。用 $1 \times$ PBS 洗涤三次后, 用与荧光素异硫氰酸酯结合的二级抗体 (1 : 100 稀释) 涂覆盖玻片。用 Leica 共聚焦显微镜和 MRC-1024 共聚焦激光扫描系统评价与 FAK 和 IGF-1R 抗体一起免疫染色的细胞的共定位 (colocalization)。用 FAK 抗体对在有或没有测试化合物的情况下经 FAK-CD 或 FAK siRNA 处理的细胞染色, 并用 Zeiss 显微镜评价 FAK 从黏着斑的移位。

[0363] 结果: 共聚焦显微镜检定显示, 存在 FAK-NT 和 FAK-NT2 构建体与 IGF-1R 的共定位。FAK-NT 和 FAK-NT2 转染的重叠百分比高, 其显示与 IGF-1R 共定位的是 FAK-NT, 更特别是 FAK-NT2。FAK-NT1、FAK-NT3 和 FAK-CD 的共定位低。当在有 NSC 250435 的条件下转染细胞时, FAK-NT, 更具体地, FAK-NT2 与 IGF-1R 之间的相互作用百分比显著降低至约 30%。结果证明, NSC 250435 阻断了 FAK-NT2 和 IGF-1R 之间的相互作用。

[0364] 实施例 11

[0365] 辐射诱导的 FAK/IGF-1R 通路激活

[0366] 暴露至 2Gy 和 10Gy 的辐射之后, 以时程的方式 (time-course manner) 收集细胞。

收集溶菌产物,并对 FAK 和 IGF-1R 二者进行免疫沉淀。为其各自的磷酸化形式,对细胞进行蛋白质印迹(参见 Liu W. 等人, *Carcinogenesis*, 2008 ;29(6) :1096-1107)。用 FAK/IGF-1R 激酶和小分子抑制剂对细胞预处理后,进行类似研究。进行质谱以确定 RT 之后与 FAK/IGF-1R 联合的蛋白。然后用 siRNA 靶向在辐射处理条件下与 FAK-IGF-1R 复合物结合的被鉴定的蛋白,以确定其在 FAK/IGF-1R 激活和下游信号传导中的相关作用。

[0367] 有丝分裂灾难

[0368] 然后通过细胞/细胞核的形态学和被取消的(abrogated)G2/M 检验点激活对有丝分裂灾难进行评价(Xu B. 等人, *Molecular and Cell Biology*, 2002 ;22(4) :1049-59)。使用 Hoechst 染色进行有丝分裂灾难的显微镜确定,并通过多核细胞的百分比量化(Castedo M., 等人, *Oncogene*, 2004 ;23(16) :2825-37)。

[0369] 细胞周期检验点激活

[0370] 采用流式细胞仪对辐射后被暴露至 FAK/IGF-1R 抑制剂的细胞中被取消的 G2/M 期阻滞进行检测。为了将 G2/M 期(4n)的细胞分成单独的 M-期和 G2-期部分,用碘化丙啶和在有丝分裂期特异表达的磷酸化组蛋白 H3 进行双标记。该分析提供对 G2 细胞进入 M 期的进展和 FAK/IGF-1R 通路对 G2 检验点激活的影响的衡量。

[0371] DNA 损伤 / 修复

[0372] 在 DNADSB 和修复的研究中,因其与 DNA 双链断裂的关系,采用组蛋白变种 H2AX 的磷酸化形式(称为 γ H2AX)。具体地,通过免疫荧光在辐射数分钟内可检测到 γ H2AX 焦点,这已经直接联系到双键断裂。之前已显示,辐射后 24 小时检测的 γ H2AX 的残余水平(或相反地,焦点分散)与辐射敏感性相关(Banath JP 等人, *Cancer Res.*, 2004 ;64(19) :7144-9)。FAK/IGF-1R 通路抑制对 DNA DSB 修复的影响通过确定 γ H2AX 焦点动力学而测定(参见 Chinnaiyan P. 等人, *Clin. Cancer Res.* 2008 ;14(17) :5410-5)。

[0373] 实施例 12

[0374] 基于结构的计算机分子模拟和计算机对接

[0375] 之前的研究已经证明,FAK 的氨基端(aa 127-243, FKA-NT2)与 IGF-1R 的胞质内部分的一部分(aa 959-1266)(21)直接结合。采用 DOCK 5.1 程序对来自 NCI 发展治疗计划数据库的化合物进行分析,以鉴定在预测的 FAK-NT2/IGF-1R 界面上推定与 FAK-FERM 结合的那些化合物(图 15A)。对具有高度可能性结合到界面的化合物,筛选其抑制 FAK 和 IGF-1R 的相互作用的能力。随后,INT2-31(NSC 344553)被鉴定为最有效的 FAK/IGF-1R 结合抑制剂。该化合物具有 377.31g/mol 的分子量和 $C_{12}H_{16}N_3O_7PS$ 的分子式。结构示于图 15A。计算结合至 FAK-NT2 的 INT2-31 的所有构象的分子间能量作为静电能和范德华能之和,预测的与 FAK-NT2 相互作用的最低能量包括 -50.12 的预测评分,范德华能量占 -16.28,静电能占 -33.84。

[0376] 实施例 13

[0377] INT2-31 阻断 FAK 和 IGF-1R 的相互作用

[0378] 在沉降检定中采用加标签的纯化的蛋白质构建体对 INT2-31 阻断 FAK 和 IGF-1R 的蛋白-蛋白相互作用的能力进行评价。INT2-31 导致纯化的 GST-FAK-NT2 和 IGF-1R β 间的结合以剂量依赖性的方式下降,平均 IC_{50} 为 3.96 μ M(图 15B)。对两种黑素瘤细胞系进行评价,以表征药物在体外的效力。如采用针对 FAK 的抗体通过免疫沉淀所证实,在 C8161

和 A375 黑素瘤细胞中 INT2-31 在低微摩尔级浓度阻断结合 (平均 IC_{50} 分别为 2.72 和 3.17 μM) (图 15C 和图 15D)。

[0379] 此外,分析 INT2-31 对食道癌、胰腺癌和乳腺癌细胞系的细胞存活力的作用,并确定各细胞系的 IC_{50} 值,如表 1 所示。为得到平均 IC_{50} 值,用增加浓度的化合物对各细胞系处理 72 小时,重复三次,并计算三个独立实验的 IC_{50} 值的平均值。与黑素瘤结果相似,与正常细胞相比,INT2-31 在癌细胞中更加抑制存活力。细胞对 INT2-31 的敏感性不同,并与细胞的 FAK 和 IGF-1R 表达水平直接相关。

[0380] 表 1 INT2-31 对癌细胞系的 IC_{50}

细胞系	[INT2-31] μM
黑素瘤	
黑素细胞	97.3
A375	2.7
C8161	0.5
SK-MEL-28	22.1
食道癌	
TE3	5.6
TE7	3.2
TE9	3.6
KYSE70	4.6
KYSE140	2.5
KYSE180	19.8
胰腺癌	
HPDE	
Panc-1	6.7
Miapaca-2	4.73
AsPC1	16.9
BxPC3	45.6
乳腺癌	
MCF10A	100
MCF7	0.03
BT474	2.39

[0381] 实施例 14

[0382] INT2-31 降低黑素瘤细胞的存活力

[0383] 为检测对黑素瘤细胞存活力的作用,将三种人黑素瘤细胞系暴露于增加剂量的

INT2-31 至 72h, 并将结果与人黑素细胞比较。如图 16A 所示, INT2-31 在癌细胞中比在正常细胞中更抑制存活力。用增加浓度的化合物对各细胞系处理 72h, 重复三次, 并计算三个独立实验的平均 IC_{50} 值。与正常人黑素细胞相比, 三种黑素瘤细胞系均具有上调的 FAK 和 IGF-1R 表达, 以及对 INT2-31 提高的敏感性 (图 16B)。三种细胞系中 INT2-31 的效力不同, 可能与基本的 FAK 和 IGF-1R 激活有关, 最不敏感的细胞系 (SK-MEL-28) 具有最高的 FAK 和 IGF-1R 表达。

[0385] 实施例 15

[0386] INT2-31 抑制黑素瘤细胞增殖, 且依赖于是否存在 FAK 和 IGF-1R 而具有作用

[0387] 为评价 INT2-31 对细胞增殖的作用, 进行 CSFE 细胞分布检定。如图 16C 所示, INT2-31 在 C8161 和 A375 细胞中均抑制细胞增殖, 但在 C8161 细胞中作用更大。评估经 INT2-31 处理的细胞数量显示对 C8161 黑素瘤细胞生长有效的的时间和剂量依赖性的抑制 (图 16D)。这些结果与通过 MTT 检定所见的研究结果相似 (图 16A)。

[0388] 为显示 INT2-31 的作用对表达 FAK 的细胞是特异性的, 用引起 FAK 暂时敲除的 FAK shRNA 构建体转染 C8161 细胞 (图 17A)。因为 FAK shRNA1 比 FAK shRNA2 更高的 FAK 敲除效率, 使用 FAK shRNA1 进行 MTT 检定。表达 FAK shRNA 的 C8161 细胞对 INT2-31 的作用明显比亲本细胞和模拟转染的细胞更不敏感 (图 17B)。利用 FAK 野生型和缺失型的成纤维细胞证实了这些研究结果。FAK 野生型成纤维细胞对 INT2-31 的作用明显比 FAK 缺失型成纤维细胞更敏感 (图 17C)。在处理 IGF-1R 成熟 (proficient) 和 IGF-1R 缺陷的成纤维细胞的过程中, 也显示了对 IGF-1R 的特异性。IGF-1R^{-/-} 成纤维细胞对 INT2-31 的作用明显比 IGF-1R^{+/+} 细胞更不敏感 ($p < 0.05$, 图 17D)。

[0389] 实施例 16

[0390] INT2-31 诱导细胞凋亡

[0391] 测定 INT2-31 对处理过的细胞的脱附的作用。在存在增加浓度的 INT2-31 的条件下测定 C8161 黑素瘤细胞的脱附。如图 18A 所示, 用 $5 \mu M$ 的 INT2-31 处理 72h 后, 仅 7% 的 C8161 细胞从板子脱离。INT2-31 的作用明显低于双重 FAK 和 IGF-1R 激酶抑制剂, TAE 226 (Novartis, Basel)。用 $5 \mu M$ 剂量处理 72h 后, 如通过检测 Hoescht 阳性细胞所示, INT2-31 对细胞凋亡的作用被标为高于 50% 的凋亡诱导 (图 18B)。通过共聚焦显微镜法, $1 \mu M$ 和 $5 \mu M$ 的 INT2-31 处理 72h 后的半胱天冬氨酸酶 3/7 活化分析证实了此结果 (图 18C)。最后, 通过蛋白质印迹评价 INT2-31 的作用。图 18D 描述用 INT2-31 处理 48 小时后的 PARP 和半胱天冬氨酸酶 -9 裂解。INT2-31 对半胱天冬氨酸酶 8 的水平没有明显作用。

[0392] 实施例 17

[0393] INT2-31 降低 Akt 激活而不抑制激酶活性

[0394] 在三种黑素瘤细胞系中, 在不同的浓度和处理时间下分析 INT2-31 对 FAK 和 IGF-1R 通路效应物 (effector) 的作用 (图 19)。INT2-31 处理导致对基本的和 IGF-1 诱导的信号传导至 AKT 的持续抑制。注意, INT2-31 对基本的 FAK 磷酸化或基本的或 IGF-1 诱导的 IGF-1R 磷酸化没有明显的作用。而且, 当对 Akt 有明显作用时, 剂量越大, 对信号传导给 ERK 的作用越小, 所有细胞系中的 p-ERK 略有下降。INT2-31 对 p-Akt 的作用与对细胞生长、存活力和凋亡的作用相关, 用 $0.5-1 \mu M$ 处理, C8161 细胞具有显著的 p-Akt 抑制; 而显著降低 A375 和 SK-MEL-28 细胞中的 p-Akt 需要更高剂量的 INT2-31 (分别为 $1-5 \mu M$ 和

5-10 μ M)。

[0395] 对 Akt 磷酸化的 INT2-31 处理时程的分析在处理 24 小时后显示部分磷酸化,在 72 小时时有持续作用(图 19E)。

[0396] 接着,检测该化合物对 FAK、IGF-1R、胰岛素受体、VEGFR-1、AKT-1、EGFR、VEGFR-2、c-MET、PDGFR α 、p70S6K、Src 和 PI3 激酶的作用(图 19D)。在 1 μ M 剂量下,该化合物不抑制 FAK 或 IGF-1R 的激酶活性,且抑制任意其它蛋白激酶不超过 22%。因此,INT2-31 阻断 FAK 和 IGF-1R 的结合而不抑制其激酶活性,并以剂量和时间依赖性的方式抑制黑素瘤细胞存活力。

[0397] 而且,为证实 INT2-31 特异地结合到 FAK 的 NT2(aa 127-243) 区域,以阻断与 IGF-1R 的相互作用并降低 Akt 的磷酸化,用 FAK 的 N 端的 3 个 GFP 片段(FAK-NT1、FAK-NT2 和 FAK-NT3) 转染 C8161 细胞。如图 19F 和 19G 所示,与 FAK-NT1 和 NT3 过表达的细胞相比,过表达 FAK-NT2 片段使 IGF-1 诱导的 AKT 磷酸化降低。

[0398] 实施例 18

[0399] INT2-31 降低黑素瘤异种移植物中的肿瘤 p-Akt 和生长

[0400] 如图 20A 和 20B 所示,与接受 PBS 对照注射的小鼠相比,每天腹膜内注射 15mg/kg 的 INT2-31 至 21 天导致 C8161 和 A375 皮下的肿瘤生长显著降低 ($p < 0.05$)。在此浓度下,药物不具有严重的毒性作用,因为各组动物之间的体重没有显著差别。为评定 INT2-31 在体内对细胞增殖的作用,用 Ki67 抗体对 C8161 异种移植物染色(图 20C)。相对于用 PBS(对照)处理的那些,在来源于 INT2-31 处理的小鼠的肿瘤中,对 Ki67 反应的细胞百分比和 Ki67 染色的强度显著下降。此外,在用 INT2-31 处理的肿瘤中进行细胞凋亡的细胞百分比相对于对照显著提高(图 20C, $p < 0.05$)。证实了显示 INT2-31 降低癌细胞增殖并增加癌细胞凋亡的体外数据。通过对来源于经过处理和未经处理的肿瘤的 FAK 进行免疫沉淀,分析 INT2-31 对 C8161 肿瘤中 FAK 和 IGF-1R 的体内相互作用的影响。IGF-1R 的蛋白质印迹显示 FAK 和 IGF-1R 共免疫沉淀降低。各肿瘤中 IGF-1R 与 FAK 的比率的密度测定显示,与 PBS 处理的 (0.98 ± 0.11) 肿瘤样本相比,INT2-31 处理的肿瘤样本中平均比率降低 ($0.78 \pm 0.16, p = 0.09$)。最后,进行 AKT 活化的肿瘤分析,并通过蛋白质印迹检测 p-AKT 的水平。分析显示,经 INT2-31 处理的动物中的 AKT 磷酸化相比于 PBS 对照处理的动物降低(图 20D)。因此,我们的先导化合物 INT2-31 使体内的肿瘤生长降低,阻断 FAK 和 IGF-1R 的体内相互作用,并导致 AKT 磷酸化降低。

[0401] 实施例 19

[0402] INT2-31 使癌细胞对化疗敏感

[0403] 为评价 INT2-31 对 Akt 去磷酸化的作用,并将其与细胞对传统化疗的敏感性相关联,分析食道癌和胰腺癌细胞系中联合治疗对细胞存活力和细胞凋亡的作用。KYSE 70 和 140 食道癌细胞均对 INT2-31 和 5-FU 处理敏感,且 0.5 和 1 μ M 的 INT2-31 与 5-FU 具有协同作用(图 21)。在我们的胰腺癌细胞中,尽管 INT2-31 对细胞存活的作用在与吉西他滨结合时仅具有可加性(数据未显示),但 INT2-31 与 5-FU 化疗在 1 μ M 浓度下具有协同作用(图 21 和图 22)。

[0404] 实施例 20

[0405] 使用 INT2-31 处理对食道癌存活和增殖的体外和体内抑制

[0406] 已显示食道癌过表达 FAK 和 IGF-1R。为了理解在直接的患者样本中靶向这些蛋白的相互作用的作用,建立以下系统:在小鼠和组织培养板中生长直接的食道癌样本,以得到新鲜人组织进行实验。已从癌症患者中获得 20 个以上的肿瘤和相应的正常组织样本。对样本的免疫组化和蛋白质印迹分析也显示,肿瘤样本中 FAK 和 IGF-1R 的水平相比于正常组织提高。为评价 INT2-31 对患者样本的体外作用,我们利用在组织培养板中生长的细胞的 MTT 检定,使用最多八次传代 (passages)。食道患者 #5 的 MTT 检定的代表性结果示于图 23A。提高 INT1-31 的浓度有效地降低细胞存活,平均 IC_{50} 值为 $2.18 \mu M$ 。

[0407] 接着,我们对食道患者 #5 样本的体内肿瘤生长的抑制进行评价。如方法部分所述,将来源于新鲜食道的人腺癌肿瘤样本的小片 ($0.3 \times 0.3 \times 0.3 \text{cm}$) 皮下植入到 2 只小鼠中。当一个肿瘤达到 1.5cc^3 时,将其切除并切成 ($0.3 \times 0.3 \times 0.3 \text{cm}$) 的小片,并皮下移植到另 10 只小鼠中。当肿瘤达到 $\sim 100 \text{mm}^3$ 时,将小鼠随机分成两组,每组 5 只小鼠。如图 23B 所示,相比于接受 PBS 对照注射的小鼠,每天腹膜内注射 50mg/kg 的 INT2-31 至 21 天导致新鲜的食道腺癌肿瘤生长显著下降 ($p < 0.05$)。在此浓度下,药物没有严重的毒性作用,因为各组动物的体重之间没有显著差别。为评价 INT2-31 对细胞增殖的体内作用,我们用 Ki67 抗体对食道患者 #5 肿瘤样本的异种移植物染色。如图 23C 所示,肿瘤的免疫组化染色显示,与 PBS 组相比,在来源于用 INT2-31 处理的小鼠的肿瘤中,对 Ki67 反应的细胞百分比显著降低。这证实了我们的体外数据:药物使癌细胞增殖减少;以及黑素瘤模型的体内数据。

[0408] 实施例 21

[0409] 通过 INT2-31 处理抑制原位胰腺异种移植物

[0410] 为进一步验证 INT2-31 的活性和特异性,使用原位小鼠模型。稳定转染胰腺癌细胞系, Mia paca-2 和 Panc-1 细胞,采用荧光素酶-RFP (红色荧光蛋白) 报告基因以对异种移植物体内成像。扩增并分选 RFP 阳性细胞后,细胞在培养基中扩增,并将 5×10^6 个肿瘤细胞移植到 14 只小鼠的胰腺中。如材料和方法部分所述,通过 IVIS lumina 成像仪每周对小鼠成像,并通过生物发光信号评估肿瘤大小。当肿瘤达到 $\sim 100 \text{mm}^3$ 时,将小鼠随机分成以下 2 组,每组 7 只小鼠:对照和 15mg/kg 的 INT2-31。如图 24 所示,每天腹膜内 50mg/kg 处理 Miapaca2 和皮下注射 15mg/kg 的 INT2-31 至 21 天,充分使原位胰腺异种移植物的生长降低,并且如动物体重和外表所检测,没有任何显著的副作用。

[0411] 参考引入

[0412] 本申请通篇引用的所有参考资料 (包括参考文献、已授权专利、公开的专利申请和共同未决的专利申请) 的内容特意整体地引入本文以供参考。

[0413] 实施方式和等效形式

[0414] 对本文的化学基团列表的阐述包括对任意单一基团或列举的基团的组合的限定。对本文的实施方式的阐述包括该实施方式作为任何单一的实施方式或与任意其它实施方式或其部分结合。

[0415] 尽管已经参照具体的实施方式公开本发明,但显而易见,本领域其他技术人员可在不背离本发明的真正精神和范围的条件下,设想到本发明的其它实施方式和变型。意在将权利要求解释为包括这些实施方式和等效的变型。

[0416] 仅使用常规的实验,本领域的技术人员将会认识或者能够确定本文所述的本发明的具体实施方式的许多等效形式。这些等效形式意在包括在所附权利要求中。

[0417] 参考文献

[0418] 1. Hochwald SN, Golubovskaya VM. FAK as a target for cancer therapy. *Gene Therapy and Molecular Biology* 2009 ;13 ;26-35.

[0419] 2. Schlaepfer DD, Mitra SK. Multiple connections link FAK to cell motility and invasion. *Curr Opin Genet Dev* 2004 ;14 :92-101.

[0420] 3. Schaller MD. Biochemical signals and biological responses elicited by the focal adhesion kinase. *Biochim Biophys Acta* 2001 ;1540 :1-21.

[0421] 4. Hanks SK, Polte TR. Signaling through focal adhesion kinase. *Bioessays* 1997 ;19 :137-45.

[0422] 5. Corsi JM, Rouer E, Girault JA, Enslin H. Organization and post-transcriptional processing of focal adhesion kinase gene. *BMC Genomics* 2006 ;7 :198.

[0423] 6. Cance WG, Harris JE, Iacocca MV, Roche E, Yang X, Chang J, Simkins S, Xu L. Immunohistochemical analyses of focal adhesion kinase expression in benign and malignant human breast and colon tissues: correlation with preinvasive and invasive phenotypes. *Clin Cancer Res* 2000 ;6 :2417-23.

[0424] 7. McLean GW, Carragher NO, Avizienyte E, Evans J, Brunton VG, Frame MC. The role of focal adhesion kinase in cancer—a new therapeutic opportunity. *Nat Rev Cancer* 2005 ;5 :505-15.

[0425] 8. Vincent AM, Feldman EL. Control of cell survival by IGF signaling pathways. *Growth Hormone and IGF Research* 2002 ;12 :193-7.

[0426] 9. Dews M, Prisco M, Peruzzi F, Romano G, Morrione A, Baserga B. Domains of the insulin-like growth factor 1 receptor required for the activation of extracellular signal-regulated kinases. *Endocrinology* 2000 ;141 :1289-1300.

[0427] 10. Valentinis B, Morrione A, Peruzzi F, Prisco M, Reiss K, Baserga R. Anti-apoptotic signaling of the IGF-1 receptor in fibroblasts following loss of matrix adhesion. *Oncogene* 1999 ;18 :1827-36.

[0428] 11. Pollak. Insulin and insulin-like growth factor signaling in neoplasia. *Nat Rev Cancer* 2008 ;8 :915-28.

[0429] 12. Eggermont AM, Testori A, Marsden J, 等人. Utility of adjuvant systemic therapy in melanoma. *Ann Oncol* 2009 ;20 :vi30-4.

[0430] 13. Kanter-Lewensohn L, Dricu A, Girnita L, Wejde J, Larsson O. Expression of insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R) and p27Kip1 in melanocyte tumors: a potential regulatory role of IGF-1 pathway in distribution of p27Kip1 between different cyclins. *Growth Factors* 2000 ;17 :193-202.

[0431] 14. Kanter-Lewensohn L, Dricu A, Wang M, Wejde J, Kiessling R, Larsson O. Expression of the insulin-like growth factor-1 receptor and its anti-apoptotic effect in malignant melanoma: a potential therapeutic target. *Melanoma Res* 1998 ;8 :389-97.

- [0432] 15. Kahana Q, Micksche M, Witz IP, Yron I. The focal adhesion kinase (P125FAK) is constitutively active in human malignant melanoma. Oncogene 2002; 21 :3969-77.
- [0433] 16. Jaiswal BS, Janakiraman V, Kljavin NM, 等人. Combined targeting of BRAF and CRAF or BRAF and PI3K effector pathways is required for efficacy in NRAS mutant tumors. PLoS One 2009 ;4 :e5717.
- [0434] 17. Smalley KS, Haass NK, Brafford PA, Lioni M, Flaherty KT, Herlyn M. Multiple signaling pathways must be targeted to overcome drug resistance in cell lines derived from melanoma metastases. Mol Cancer Ther 2006 ;5 :1136-44.
- [0435] 18. Liu W, Bloom DA, Cance WG, Golubovskaya V, Kurenova E, Hochwald SN. FAK and IGF-1R interact to provide survival signals in human pancreatic adenocarcinoma cells. Carcinogenesis 2008 ;29 :1096-107.
- [0436] 19. Hochwald SN, Nyberg C, Zheng M, 等人. A novel small molecule inhibitor of FAK autophosphorylation decreases growth of human pancreatic cancer. Cell Cycle 2009 ;8 :2435-43.
- [0437] 20. Zheng D, Golubovskaya V, Kurenova E, Beierle E, Wood C, Massoll NA, Ostrov D, Cance WG, Hochwald SN. A novel strategy to inhibit FAK and IGF-1R decreases growth of pancreatic cancer xenografts. Molecular Carcinogenesis, in press.
- [0438] 21. Zheng D, Kurenova E, Ucar D, 等人. Targeting of the protein interaction site between FAK and IGF-1R. Biochem Biophys Res Comm 2009 ;388 :301-05.
- [0439] 22. Ceccarelli DF, Song HK, Poy F, Schaller MD, Eck MJ. Crystal structure of the FERM domain of focal adhesion kinase. J Biol Chem 2006 ;281 :252-9.
- [0440] 23. Munshi S, Kornienko M, Hall DL, 等人. Crystal structure of the Apo, unactivated insulin-like growth factor-1 receptor kinase. Implication for inhibitor specificity. J Biol Chem 2002 ;277 :38797-802.
- [0441] 24. Staal SP. Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2 :amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma. Proc Natl Acad Sci 1987 ;84 :5034-7.
- [0442] 25. Ruggeri BA, Huang L, Wood M, Cheng JQ, Testa JR. Amplification and overexpression of the AKT2 oncogene in a subset of human pancreatic ductal adenocarcinomas. Mol Carcinog 1998 ;21 :81-6.
- [0443] 26. Yamamoto D, Sonoda Y, Hasegawa M, Funakoshi-Tago M, Aizu-Yokota E, Kasahara T. FAK overexpression upregulates cyclin D3 and enhances cell proliferation via the PKC and PI3-kinase-Akt pathways. Cellular Signaling 2003 ; 15 :575-83.
- [0444] 27. Arbet-Engels C, Janknecht R, Eckhart W. Role of focal adhesion kinase in MAP kinase activation by insulin-like growth factor-1 or insulin. FEBS Letters 1999 ;454 :252-6.

- [0445] 28. Yujiri T, Nawata R, Takahashi T. MEK kinase 1 interacts with focal adhesion kinase and regulates insulin receptor substrate-1 expression. *J Biol Chem* 2002 ;278 :3846-51.
- [0446] 29. Baron V, Calleja V, Ferrari P, Alengrin F, Van Obberghen E. p125Fak focal adhesion kinase is a substrate for the insulin and insulin-like growth factor-1 tyrosine kinase receptors. *J Biol Chem* 1998 ;273 :7162-8.
- [0447] 30. Lebrun P, Mothe-Satney I, Delahaye L, Van Obberghen E, Baron V. Insulin receptor substrate-1 as a signaling molecule for focal adhesion kinase pp125Fak and pp6src. *J Biol Chem* 1998 ;273 :32244-53.
- [0448] 31. Lebrun P, Baron V, Hauck CR, Schlaepfer DD, Van Obberghen E. Cell adhesion and focal adhesion kinase regulate insulin receptor substrate-1 expression. *J Biol Chem* 2000 ;275 :38371-77.
- [0449] 32. Annabi SE, Gautier N, Baron V. Focal adhesion kinase and src mediate integrin regulation of insulin receptor phosphorylation. *FEBS Letters* 2001 ;507 :247-52.
- [0450] 33. van Nimwegen MJ, van de Water B. Focal adhesion kinase :a potential target in cancer therapy. *Biochem Pharmacol* 2007 ;73 :597-609.
- [0451] 34. Shi Q, Hjelmeland AB, Keir ST, 等人. A novel low-molecular weight inhibitor of focal adhesion kinase, TAE226, inhibits glioma growth. *Mol Carcinog* 2007 ;46 :488-96.
- [0452] 35. Slack-Davis JK, Martin KH, Tilghman RW, 等人. Cellular characterization of a novel focal adhesion kinase inhibitor. *J Biol Chem* 2007 ;282 :14845-52.
- [0453] 36. Roberts WG, Ung E, Whalen P, 等人. Antitumor activity and pharmacology of a selective focal adhesion kinase inhibitor, PF-562,271. *Cancer Res* 2008 ;68 :1935-44.
- [0454] 37. Hewish M, Chau I, Cunningham D. Insulin-like growth factor 1 receptor targeted therapeutics :novel compounds and novel treatment strategies for cancer medicine. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 2009 ;3 :54-72.
- [0455] 38. Liu G, Meng X, Jin Y, 等人. Inhibitory role of focal adhesion kinase on anoikis in the lung cancer cell A549. *Cell Biol Int* 2008 ;32 :663-70.
- [0456] 39. Kurenova EV, Hunt DL, He D, Magis AT, Ostrov DA, Cance WG. Small molecule chloropyramine hydrochloride (C4) targets the binding site of focal adhesion kinase and vascular endothelial growth factor receptor 3 and suppresses breast cancer growth in vivo. *J Med Chem* 2009 ;52 :4716-24.
- [0457] 40. Vassilev LT, Vu BT, Graves B, 等人. In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science* 2004 ;303 :844-8.

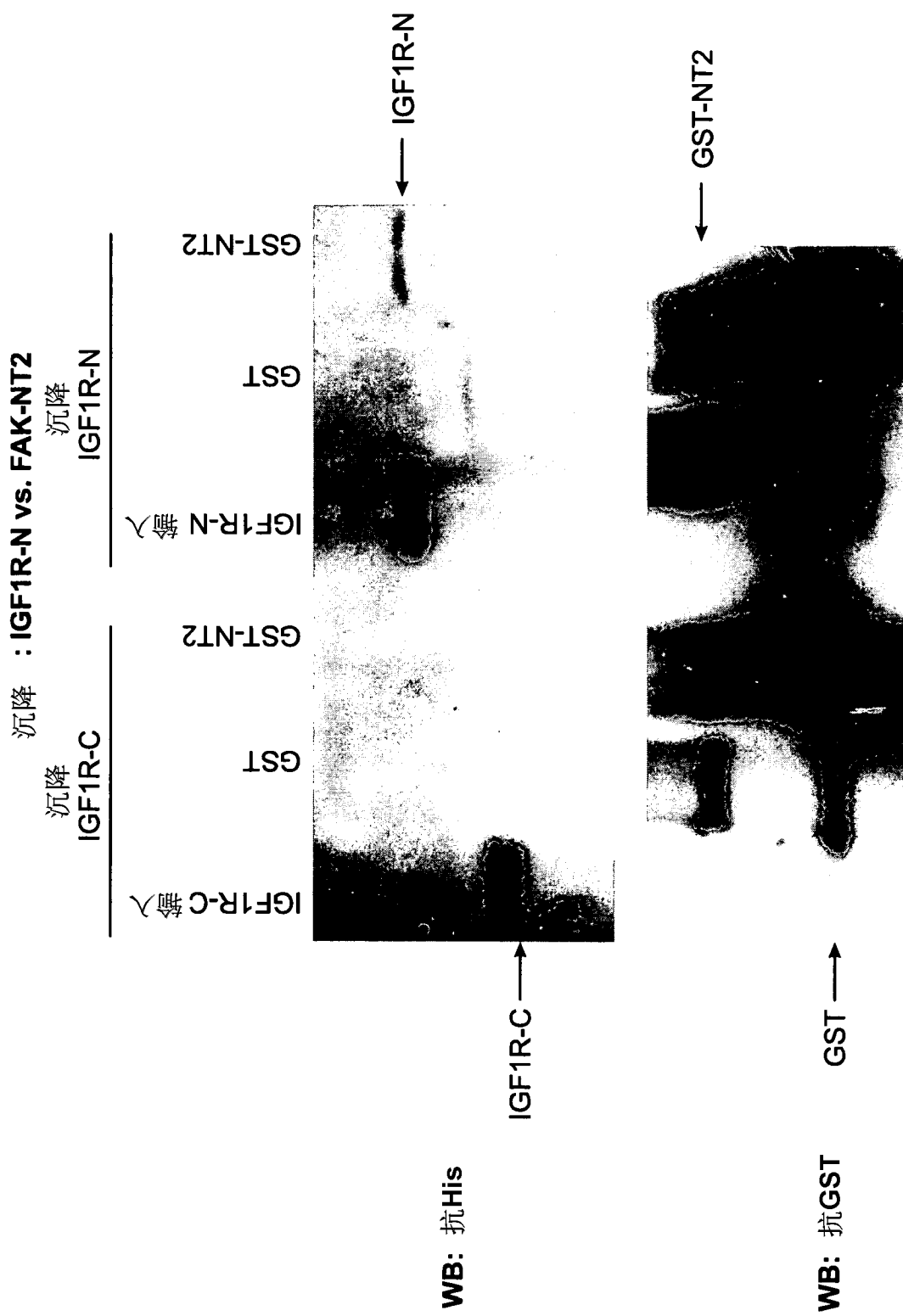


图 1

NSC344553对IGF1R-FAK相互作用的影响
24h剂量的NSC344553测试C8161黑素瘤癌细胞

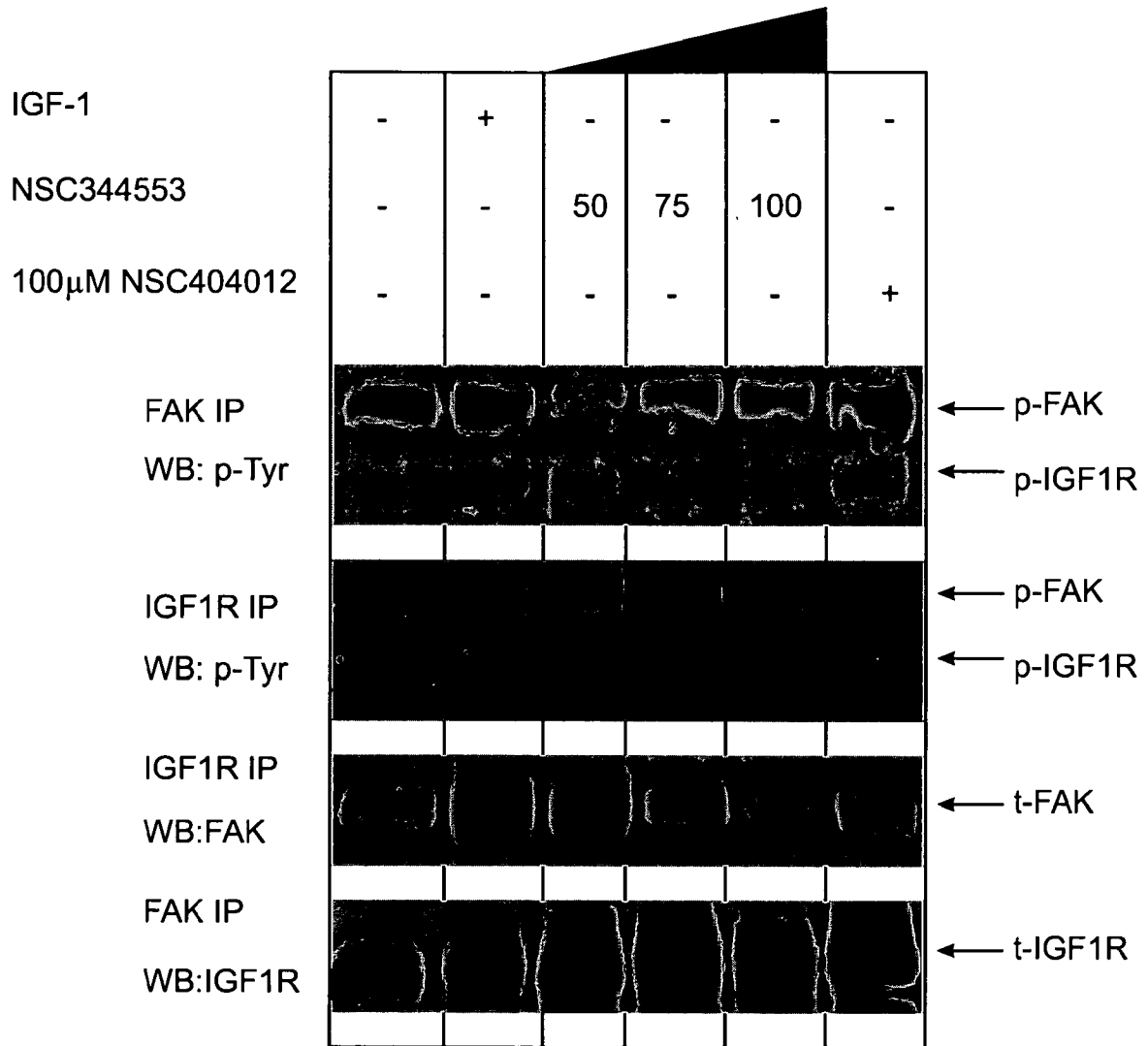


图 2

NSC344553 (“A”) 对IGF1R-FAK相互作用的影响

75 μ M的NSC344553测试C8161黑素瘤癌细胞

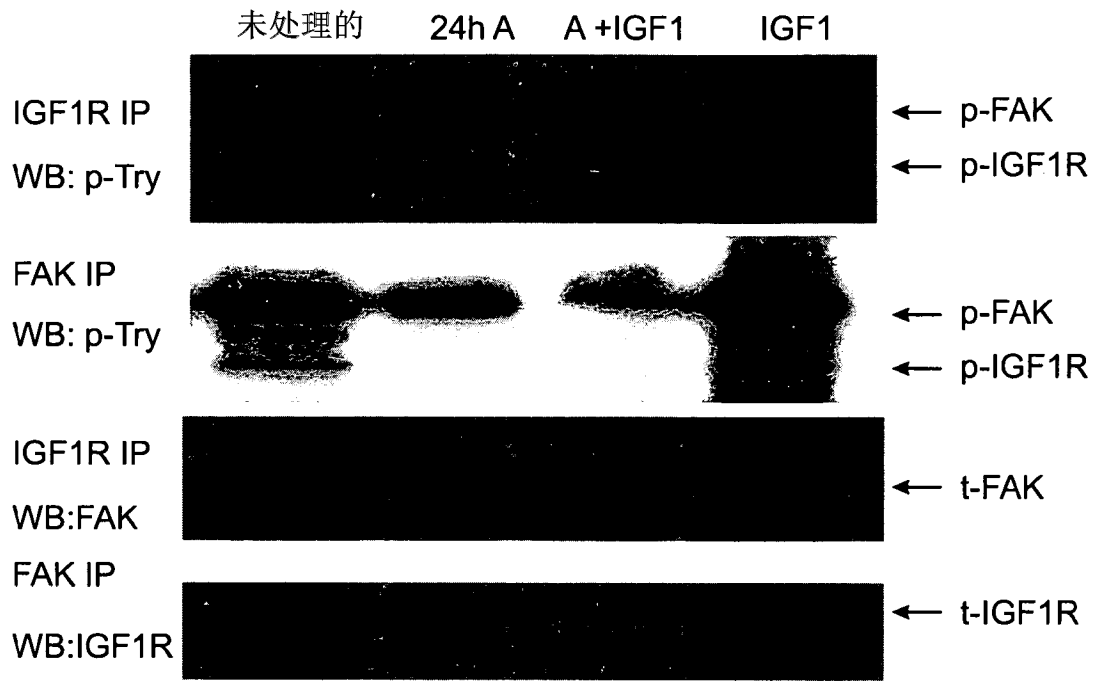


图 3

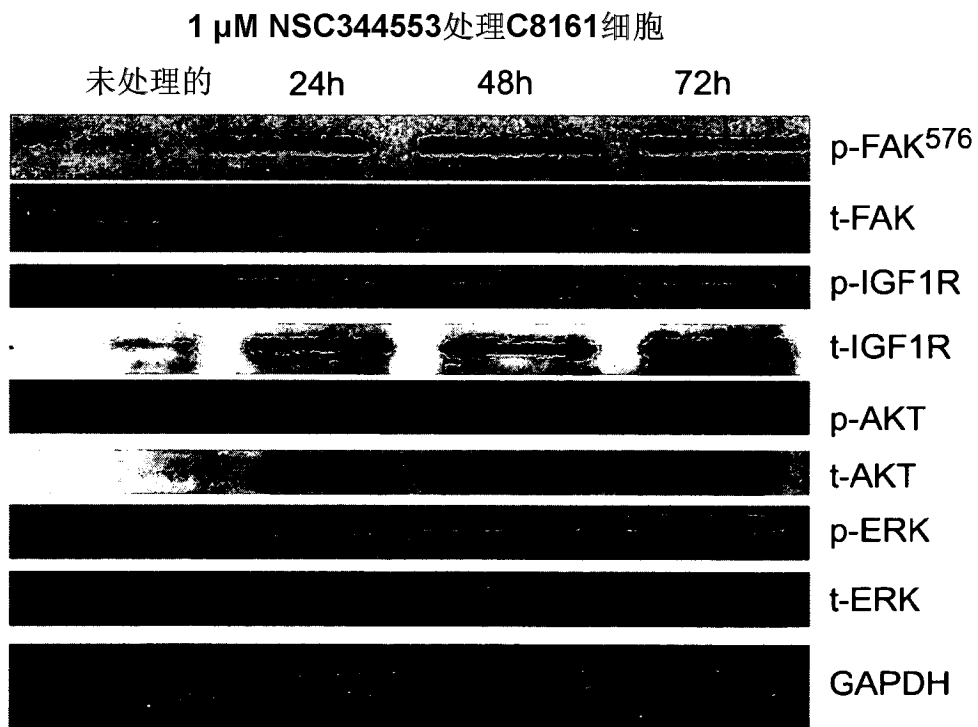


图 4

C8161 24h 5 μ M NSC344553和PI3激酶抑制剂

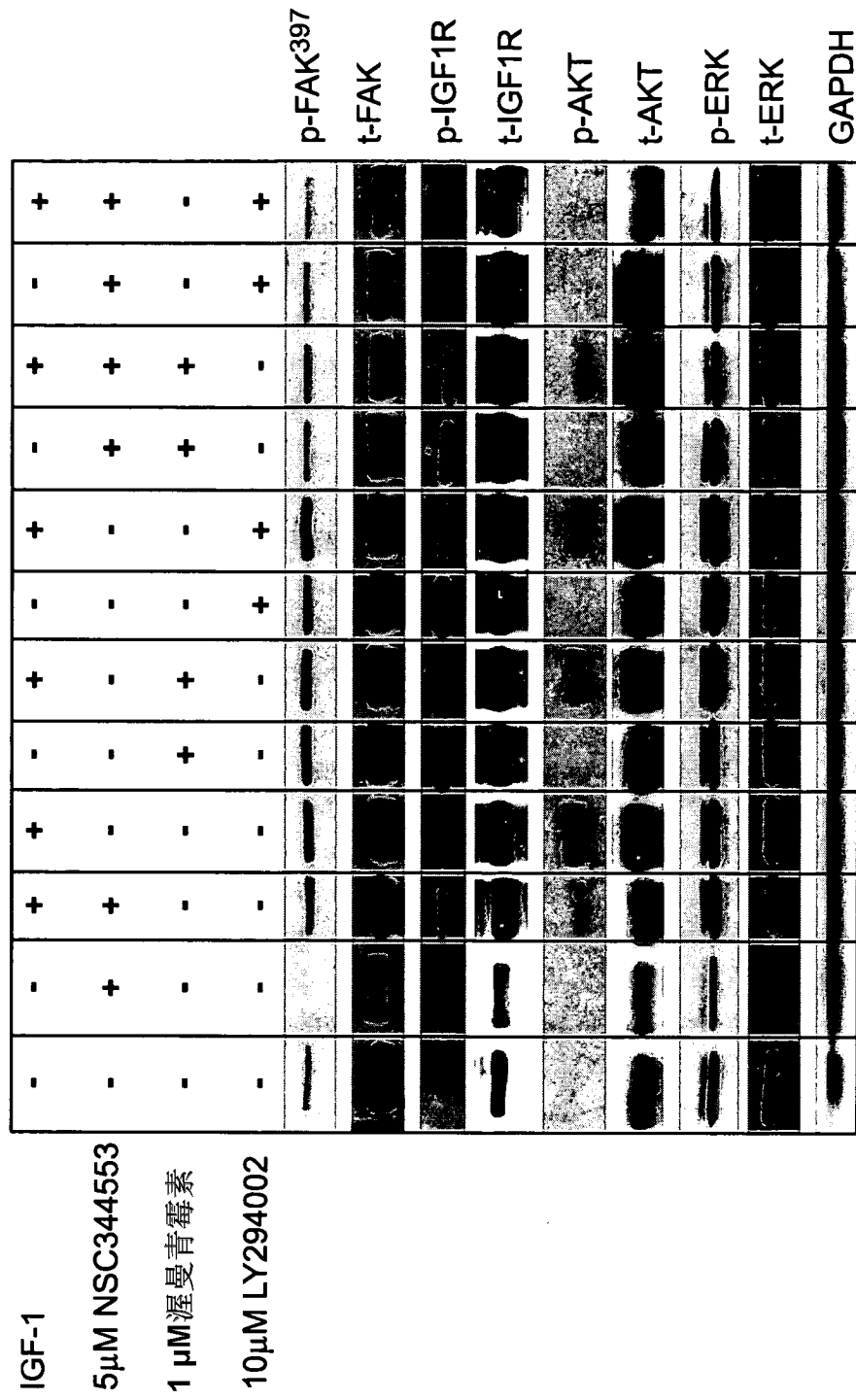


图 5

72h NSC344553 ('A') 处理胰细胞和黑色素瘤细胞

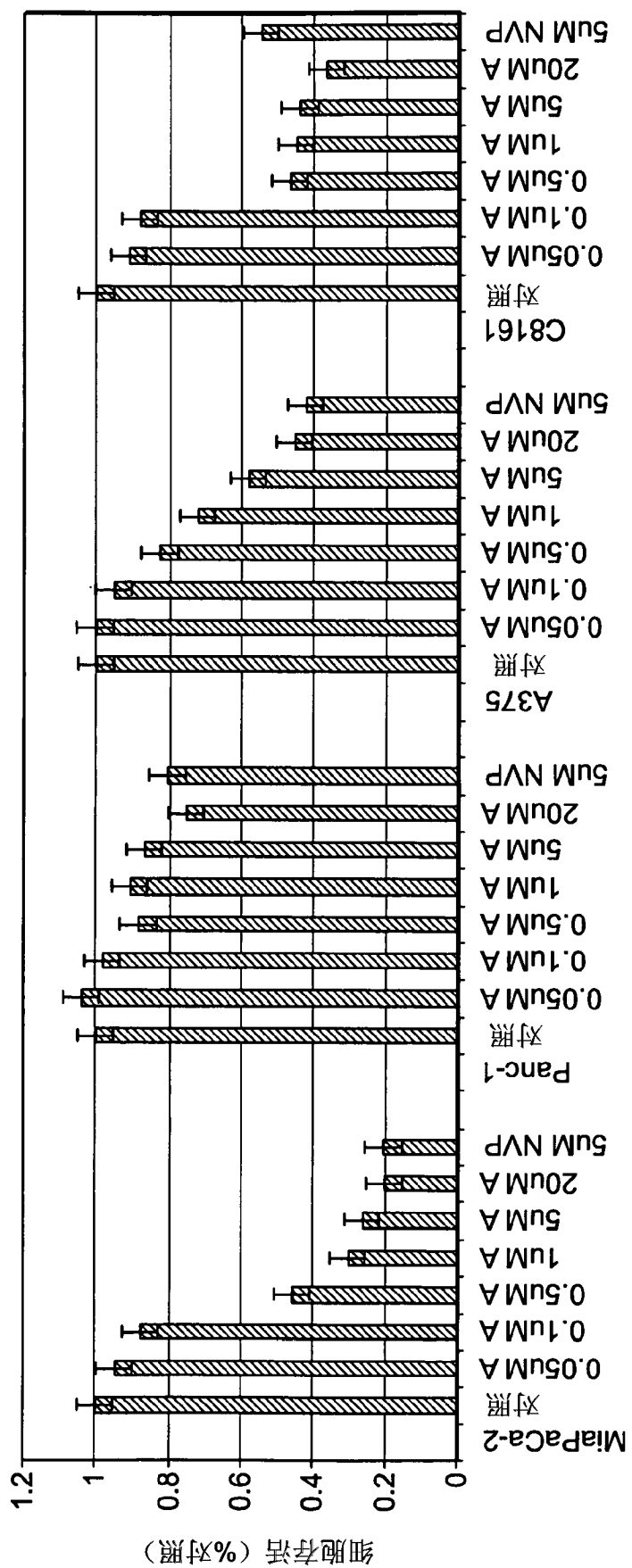


图 6

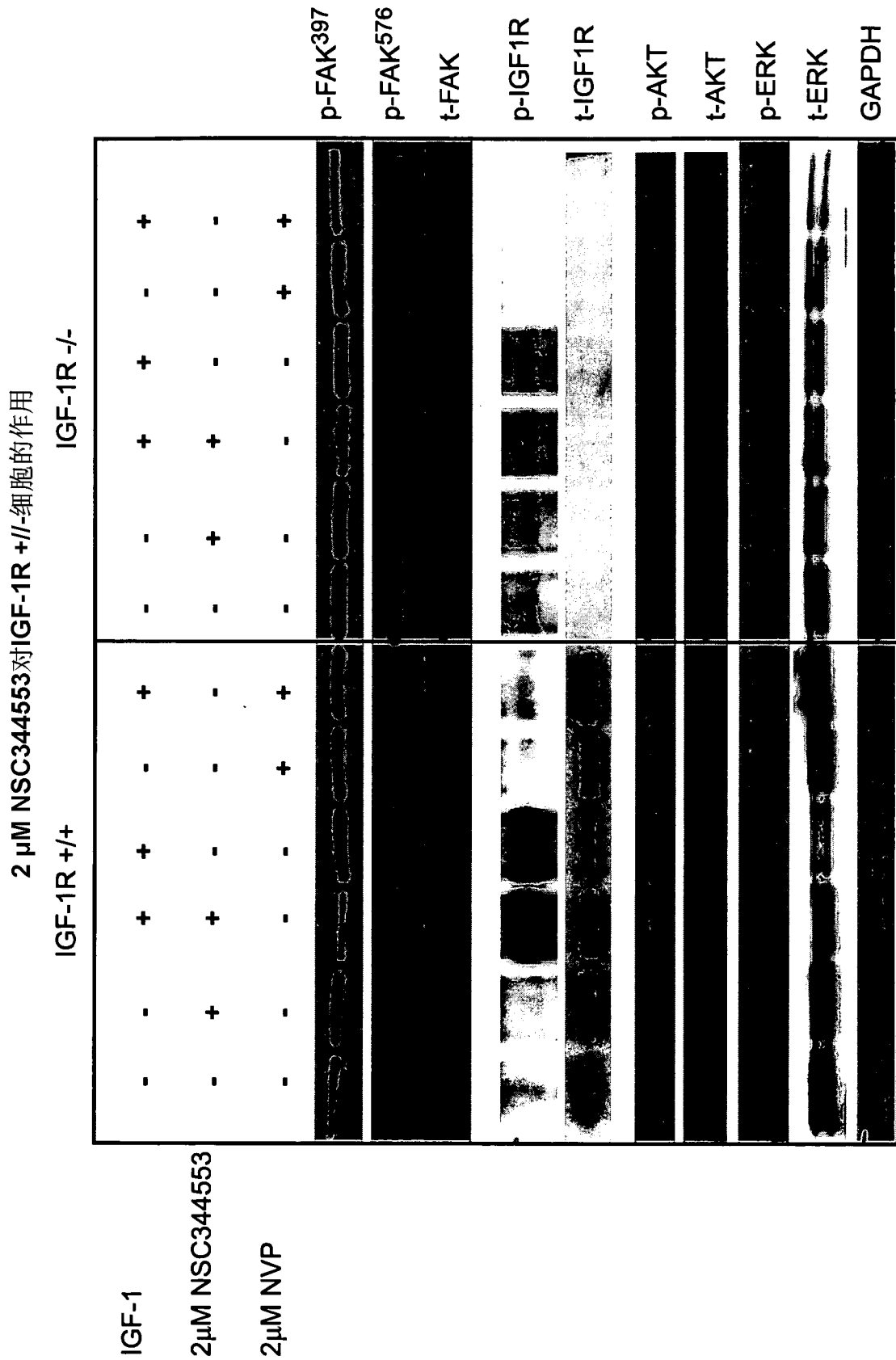


图 7

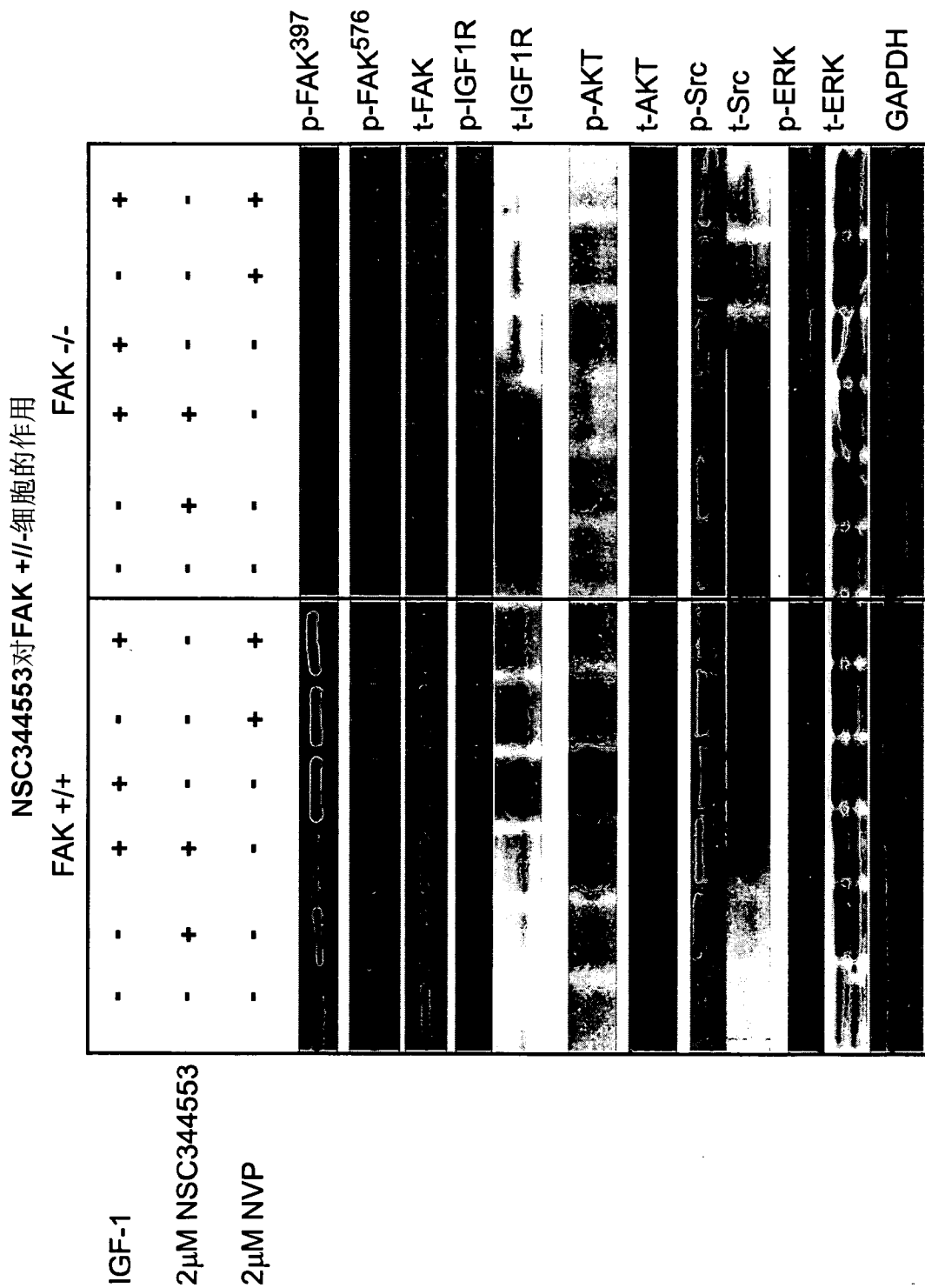


图 8

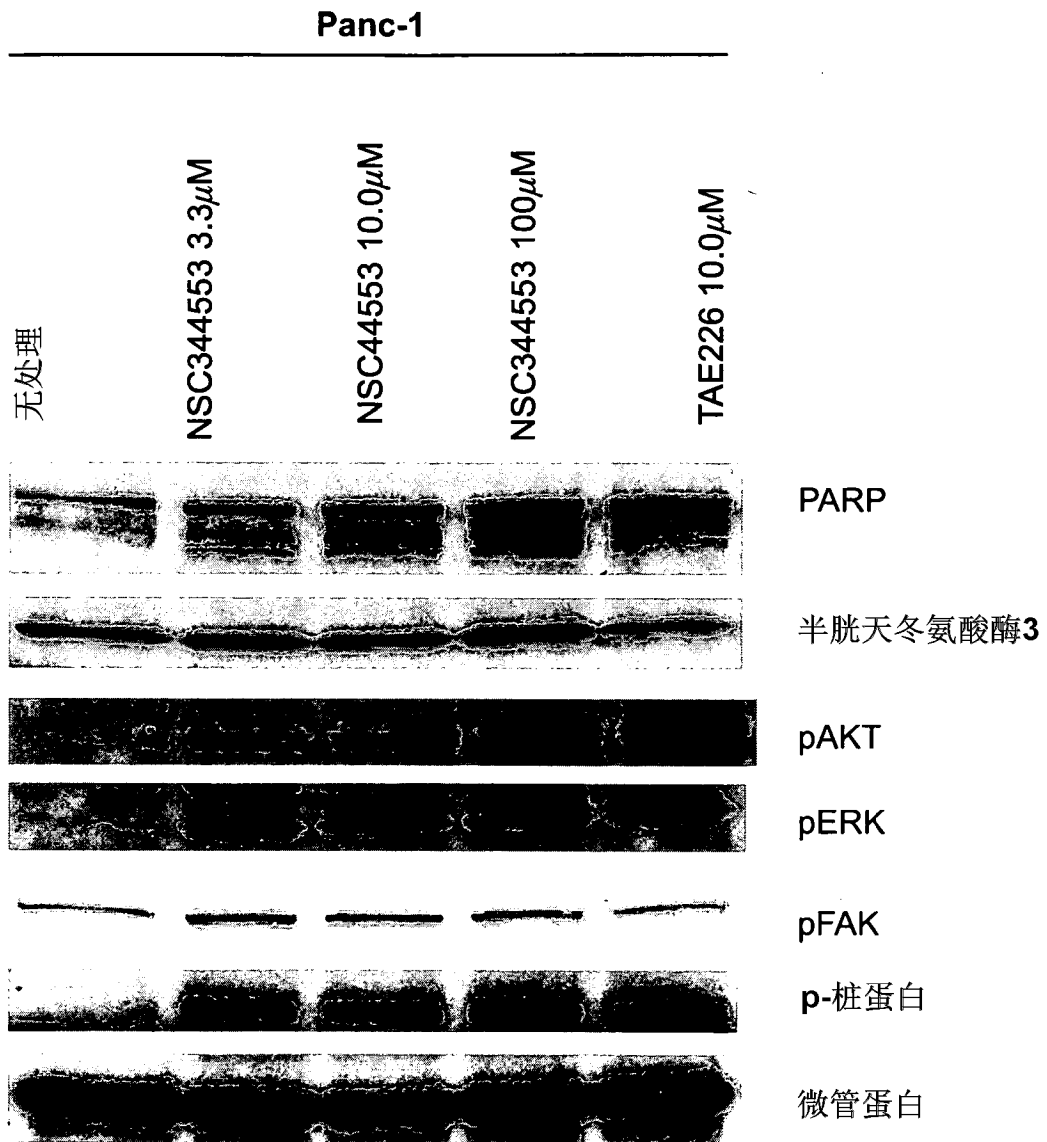


图 9

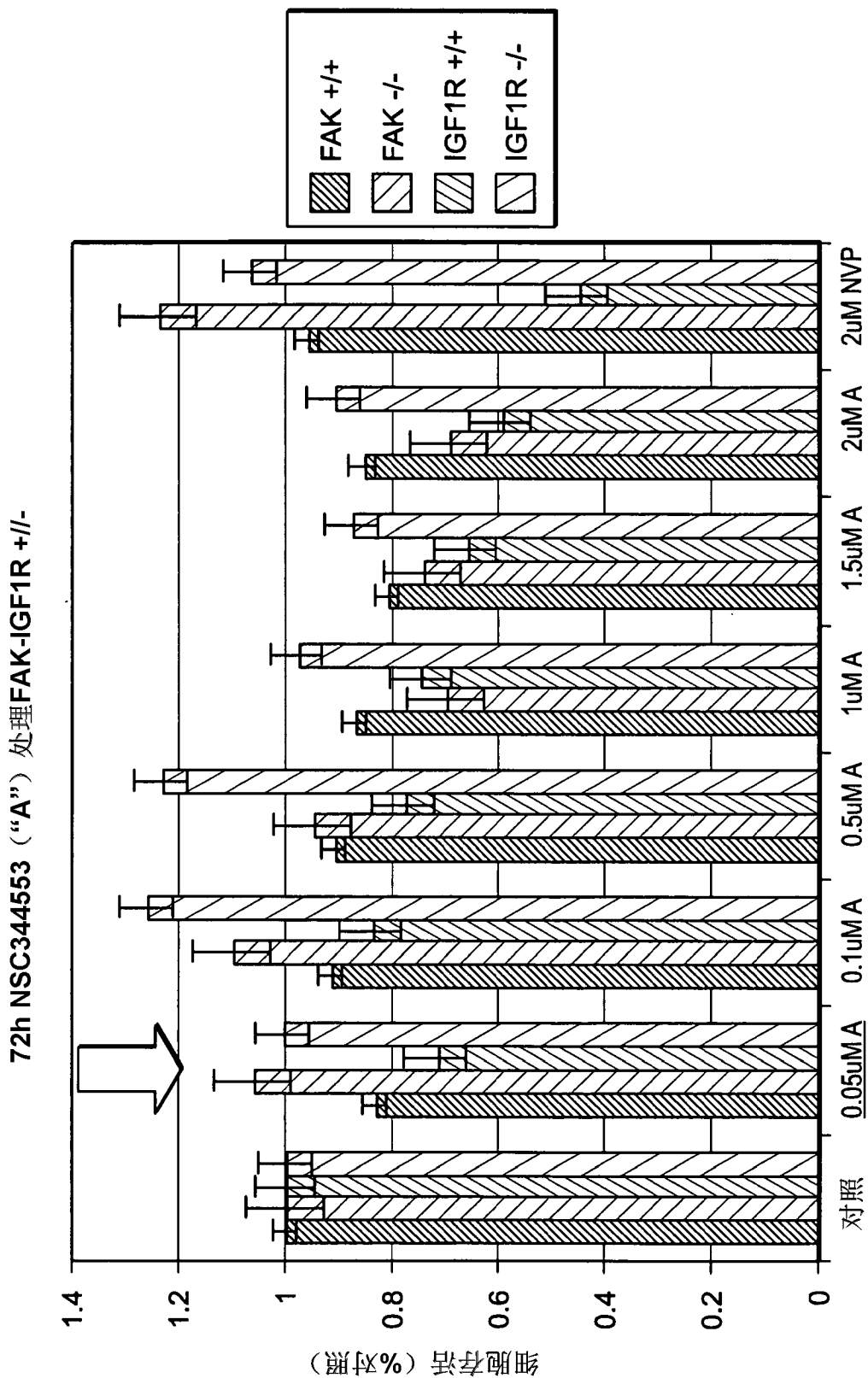


图 10



图 11

用NSC128687 (“B”) 处理24小时的MiaPaCa-2细胞

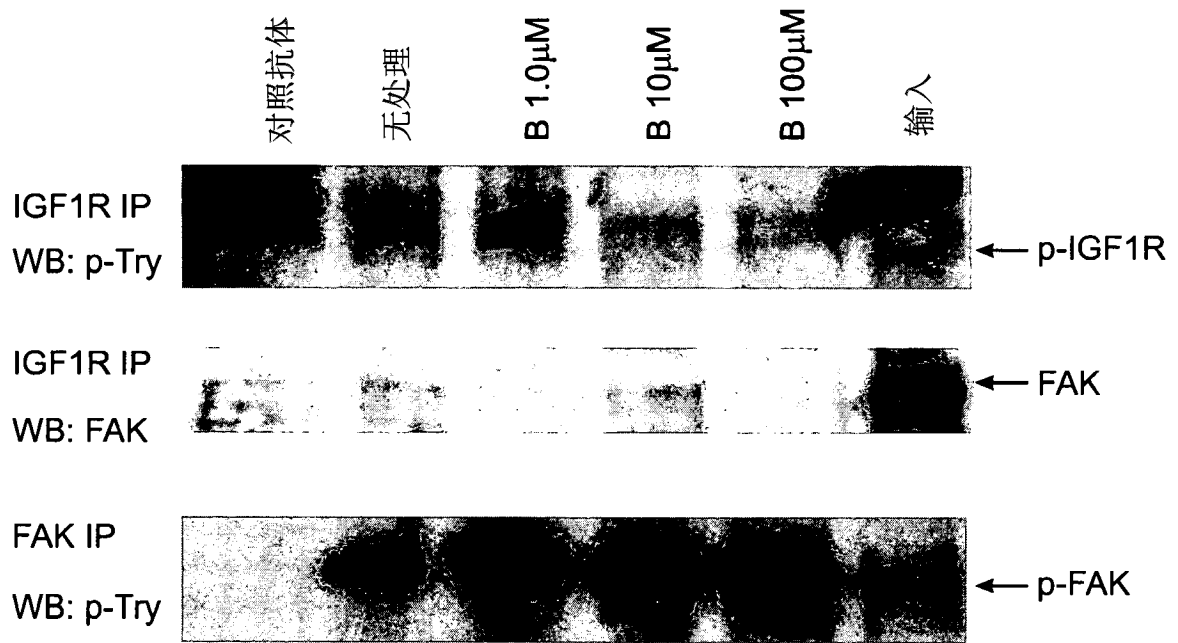


图 12

72小时后MiaPaCa-2细胞对NSC250435的剂量响应曲线

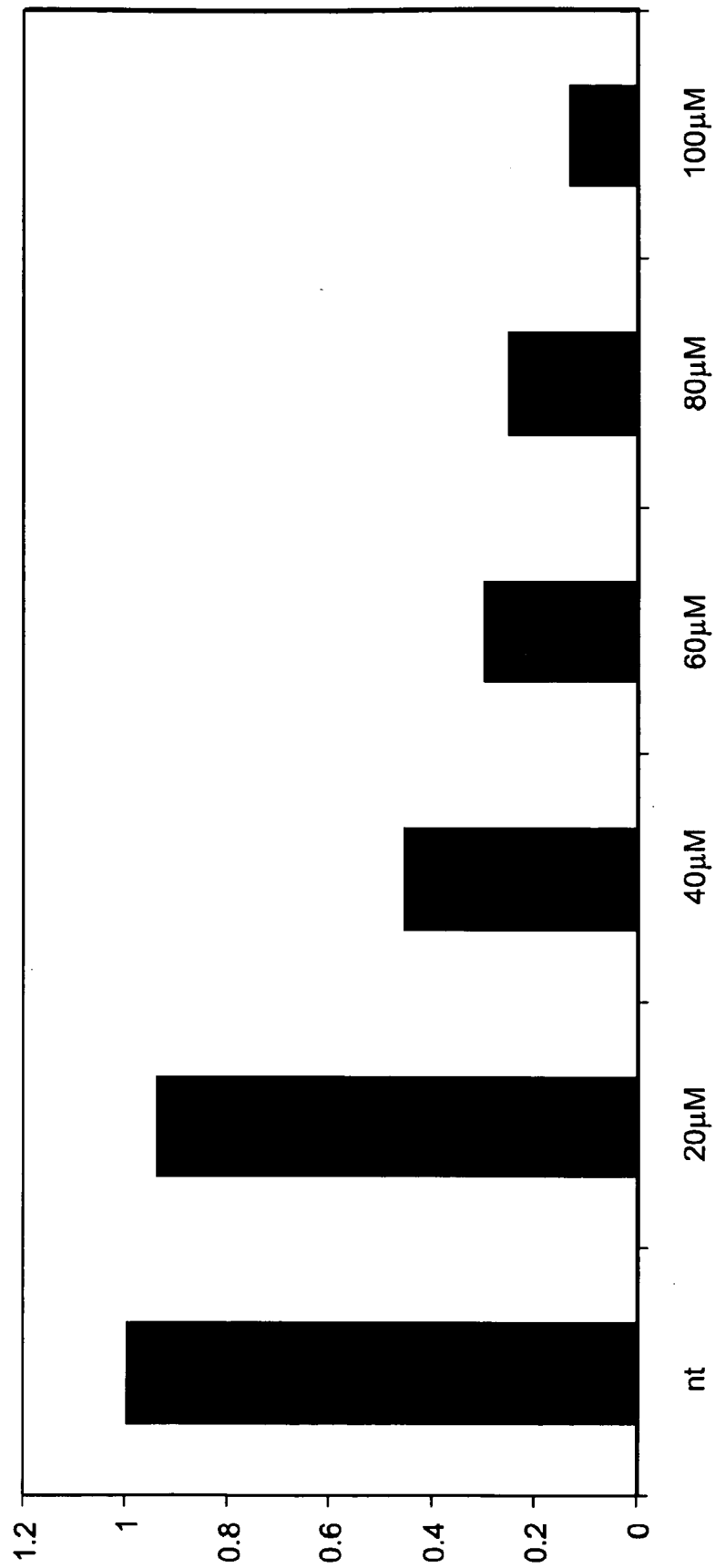


图 13

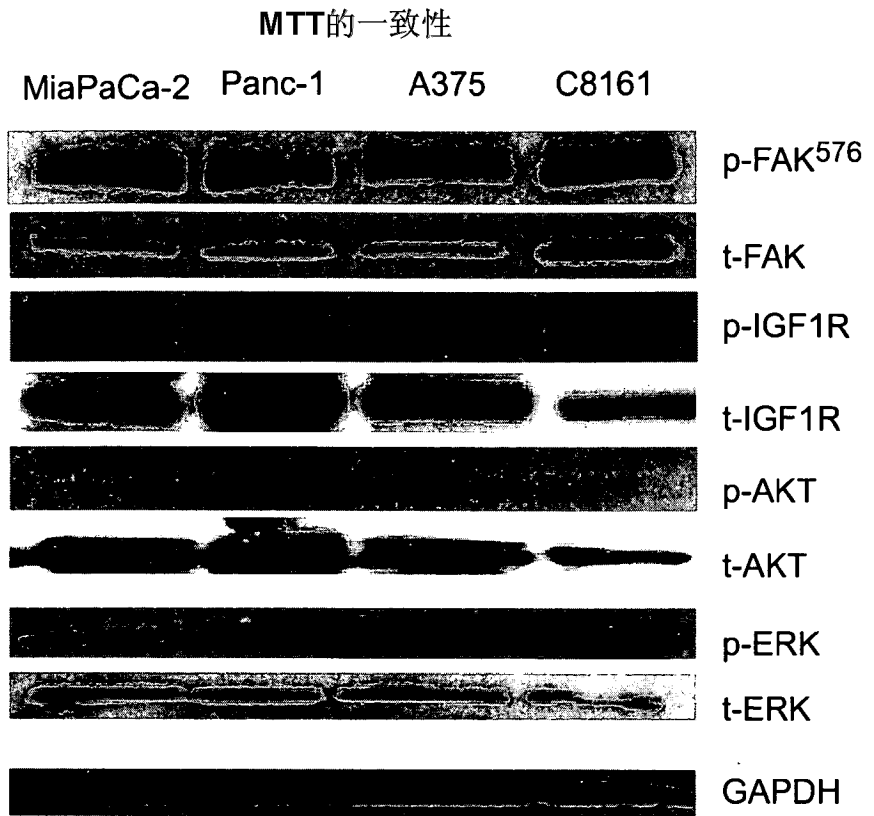


图 14

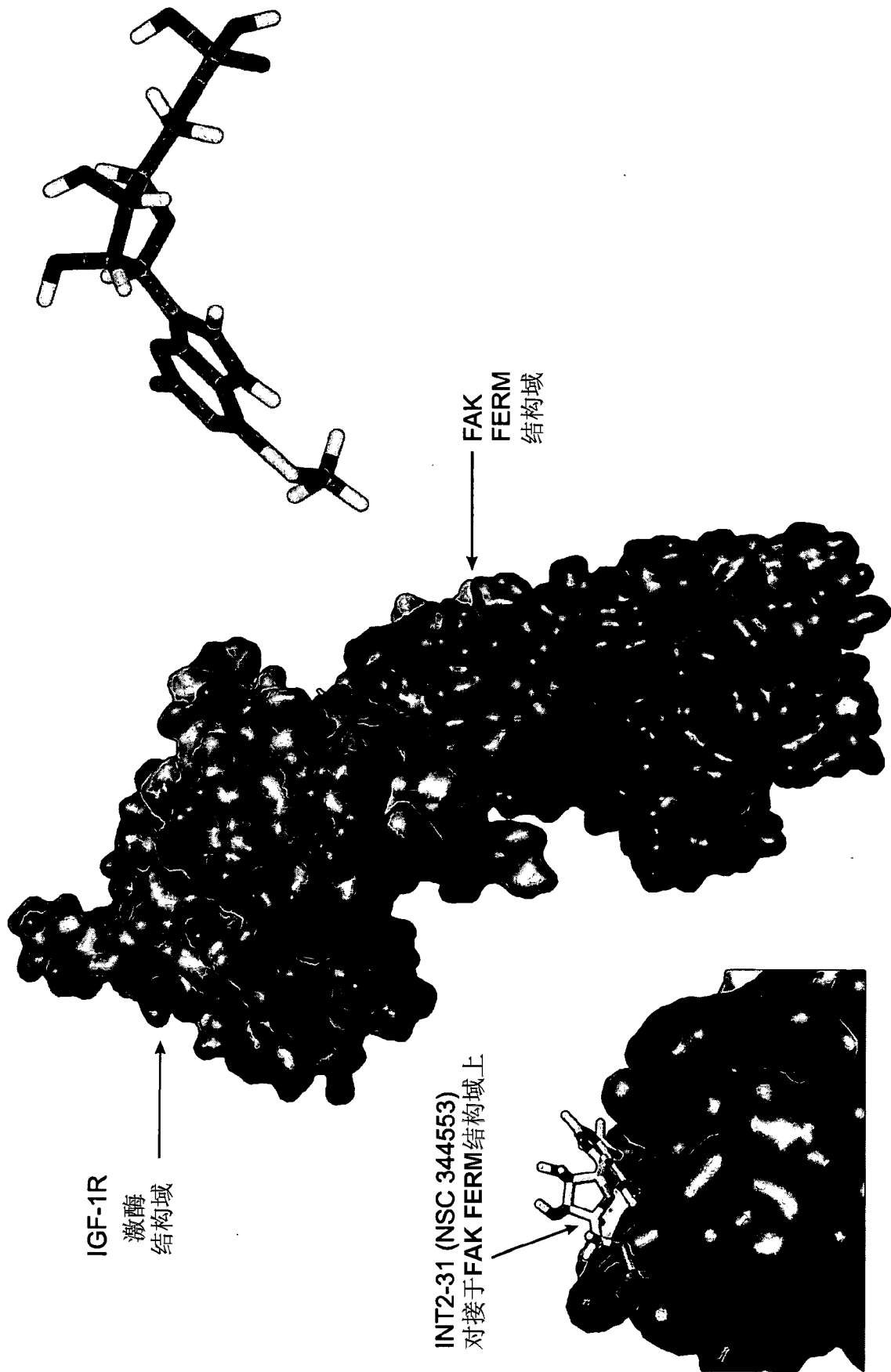
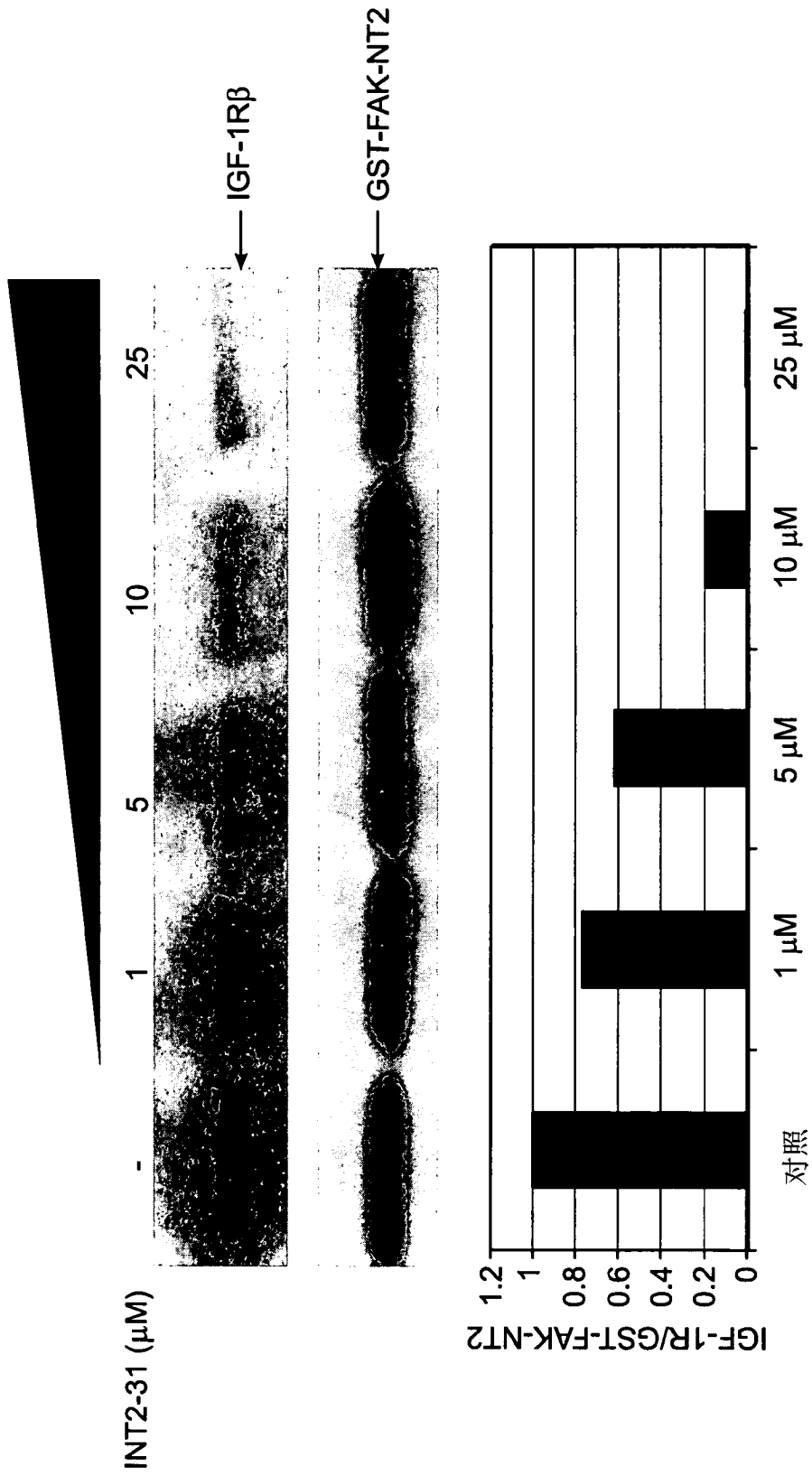
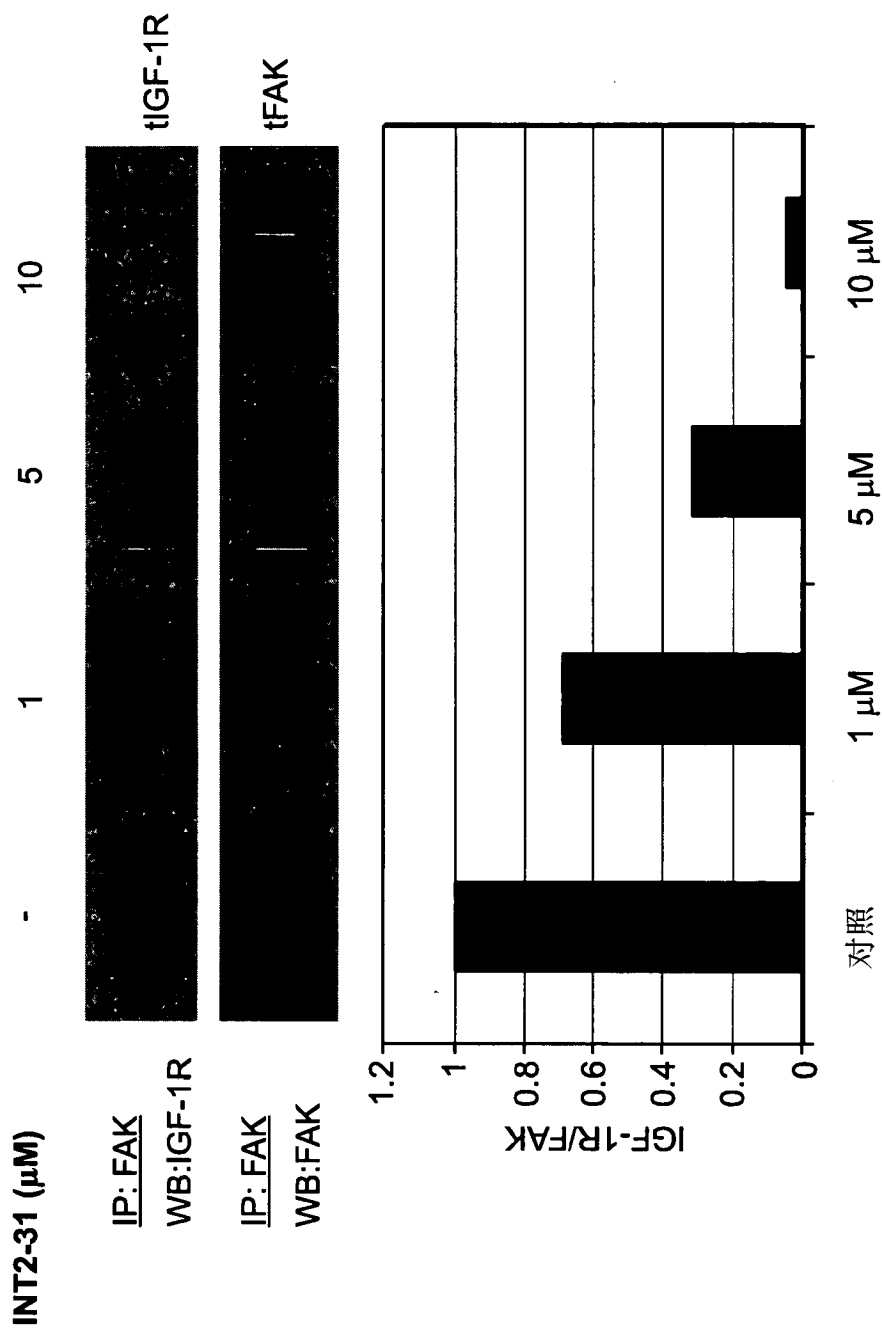


图 15A



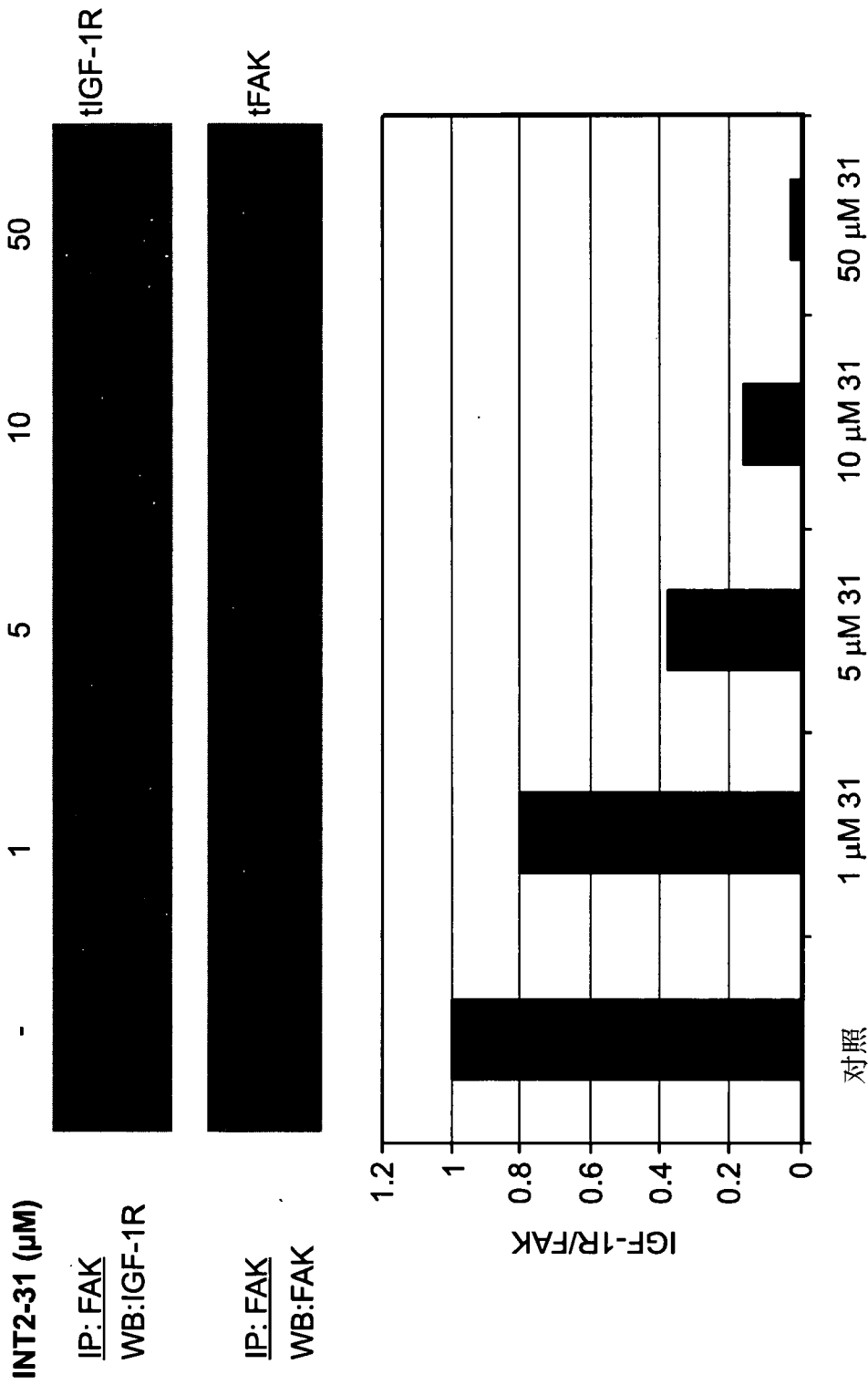
IGF-1Rb的GST-FAK-NT2沉降

图 15B



INT2-31在C8161黑素瘤细胞中对IGF-1R和FAK相互作用的影响

图 15C



INT2-31在A375黑色素瘤细胞中对IGF-1R和FAK相互作用的影响

图 15D

FAK、IGF-1R、Akt和ERK在黑素瘤细胞系和黑素细胞中的表达谱

黑素瘤细胞系蛋白质表达谱

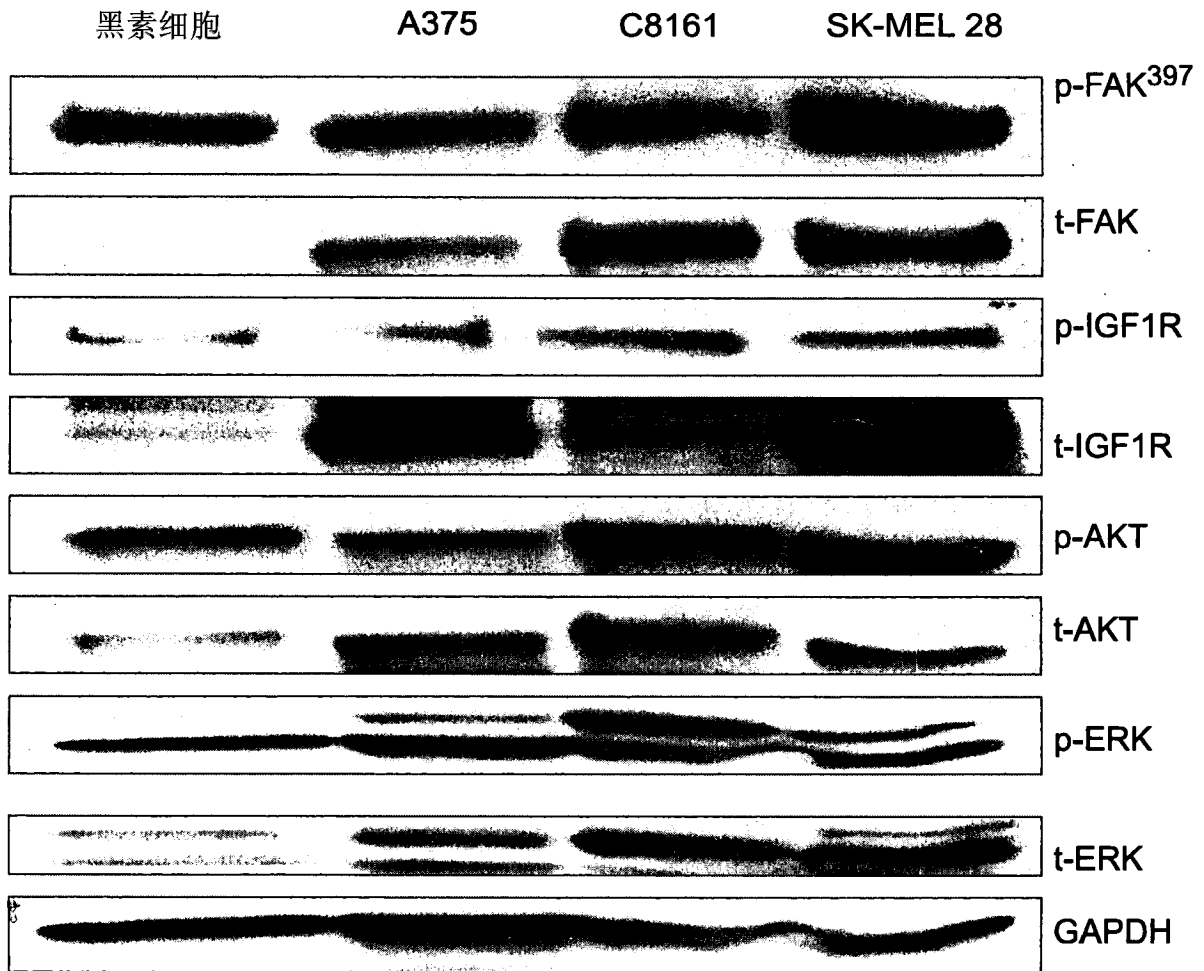


图 16A

NSC344553对细胞存活的作用

黑素瘤细胞系的MTT检定

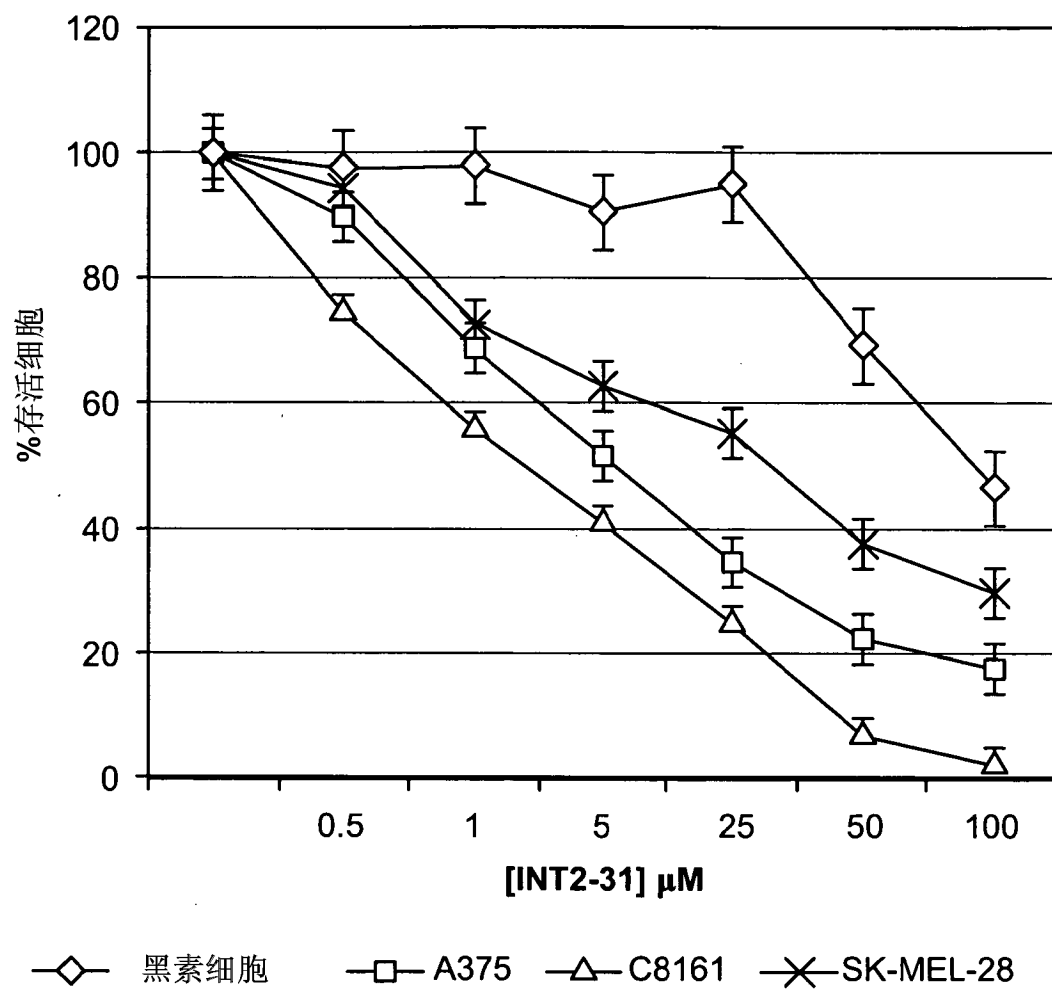
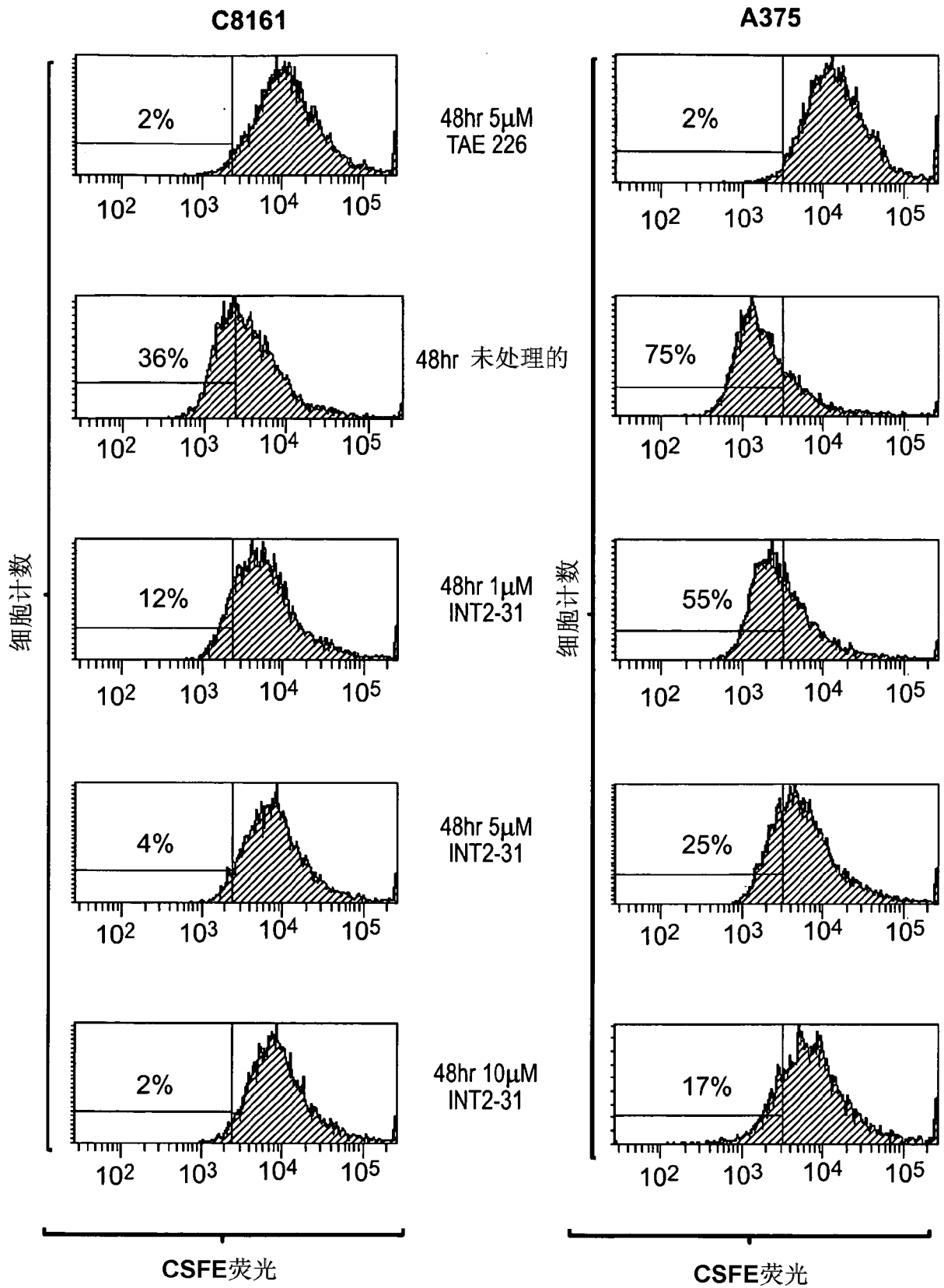
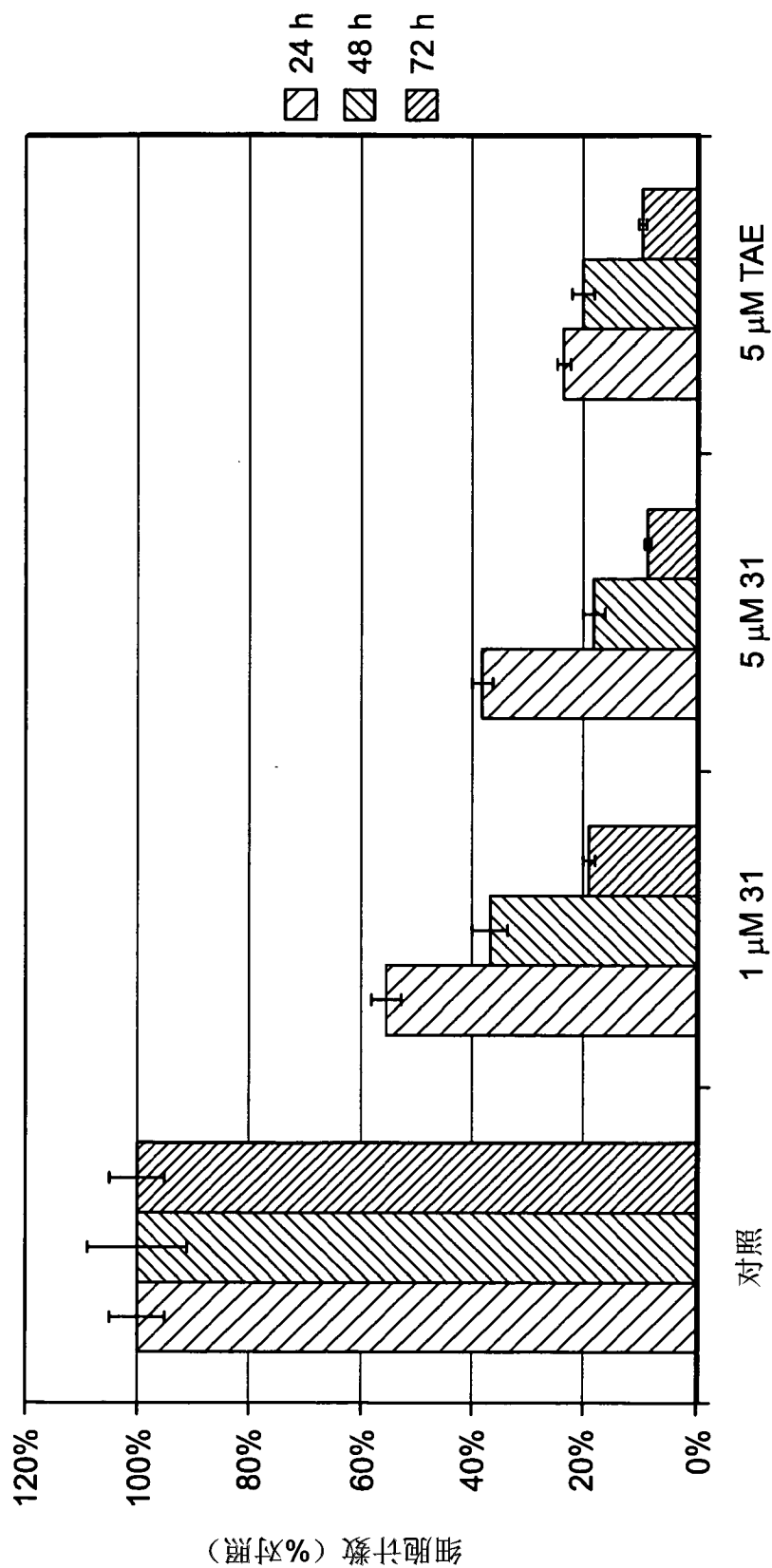


图 16B



INT2-31对CSFE增殖检定的作用

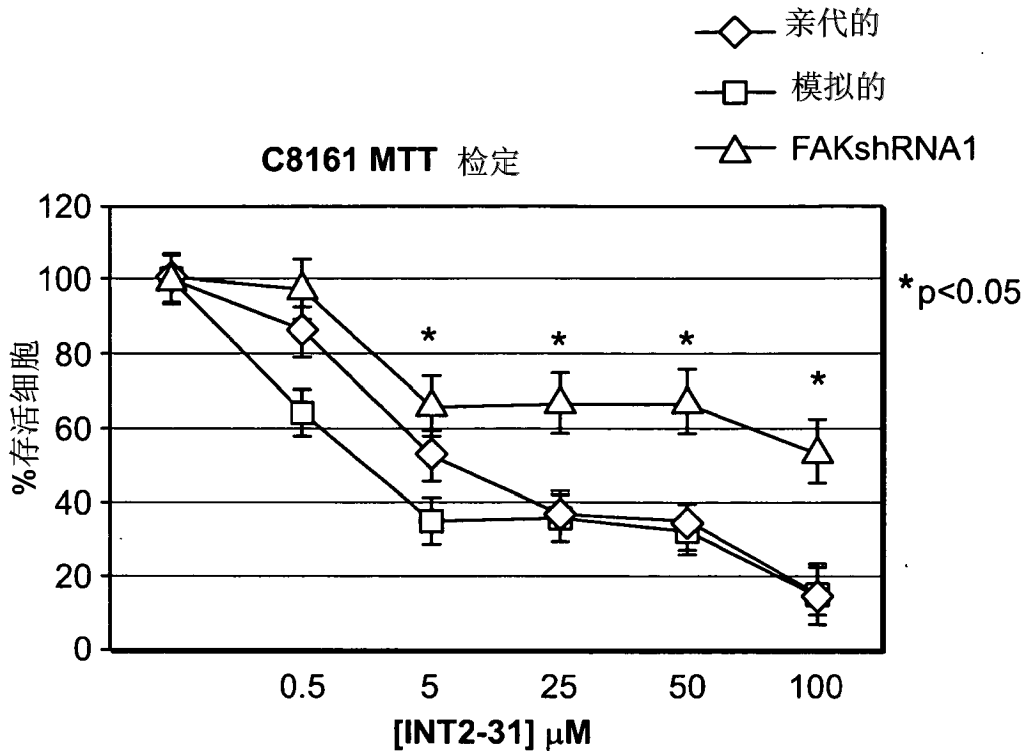
图 16C



INT2-31对C8161细胞的生长速率的作用

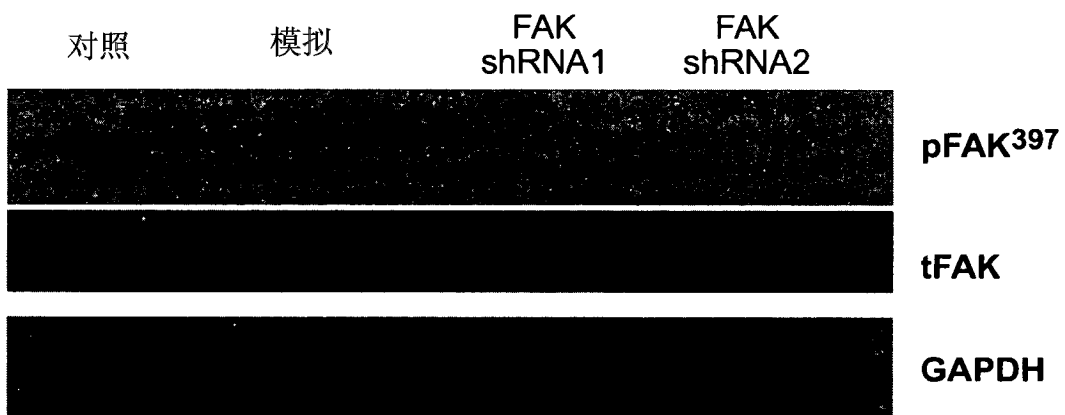
图 16D

FAK shRNA对C8161黑素瘤细胞对于INT2-31的敏感度的作用



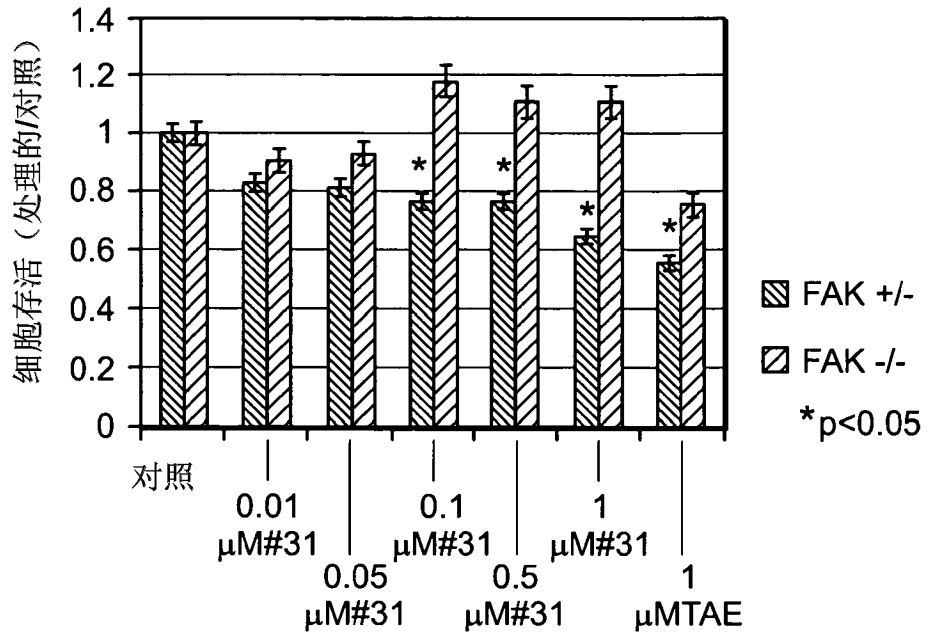
显示相比于亲代的和模拟转染的细胞，在表达FAK shRNA的C8161细胞中的作用的MTT检定

图 17A



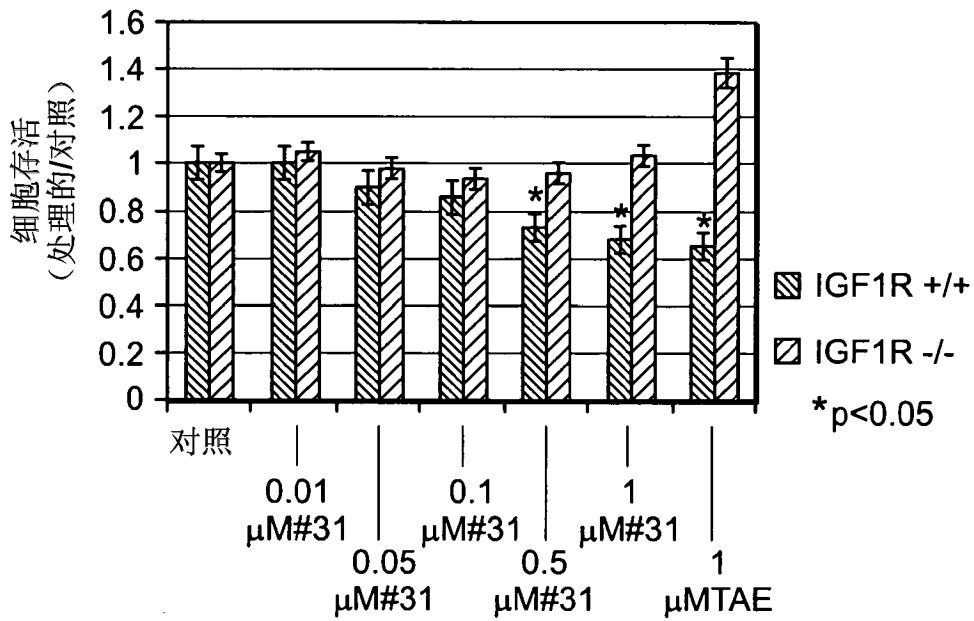
显示通过FAK shRNA敲除FAK的蛋白质印迹

图 17B



显示INT2-31对FAK野生型和缺失型成纤维细胞的作用的MTT检定

图 17C



显示INT2-31对IGF-1R野生型和缺失型成纤维细胞的作用的MTT检定

图 17D

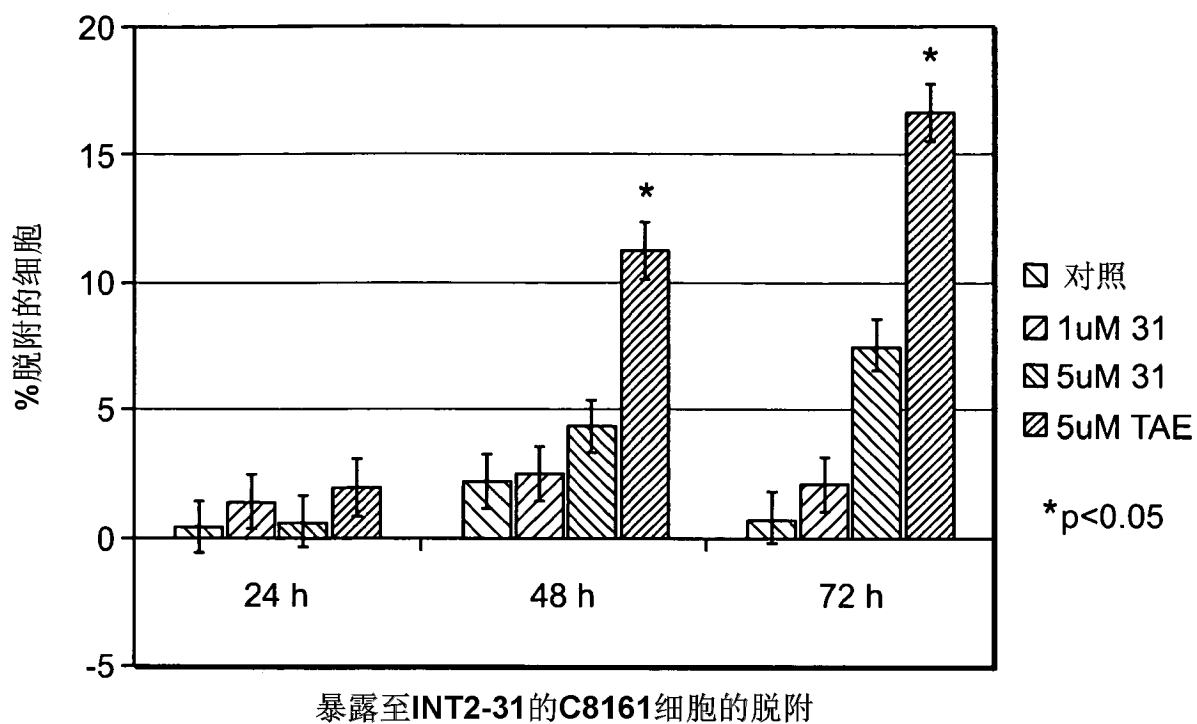


图 18A

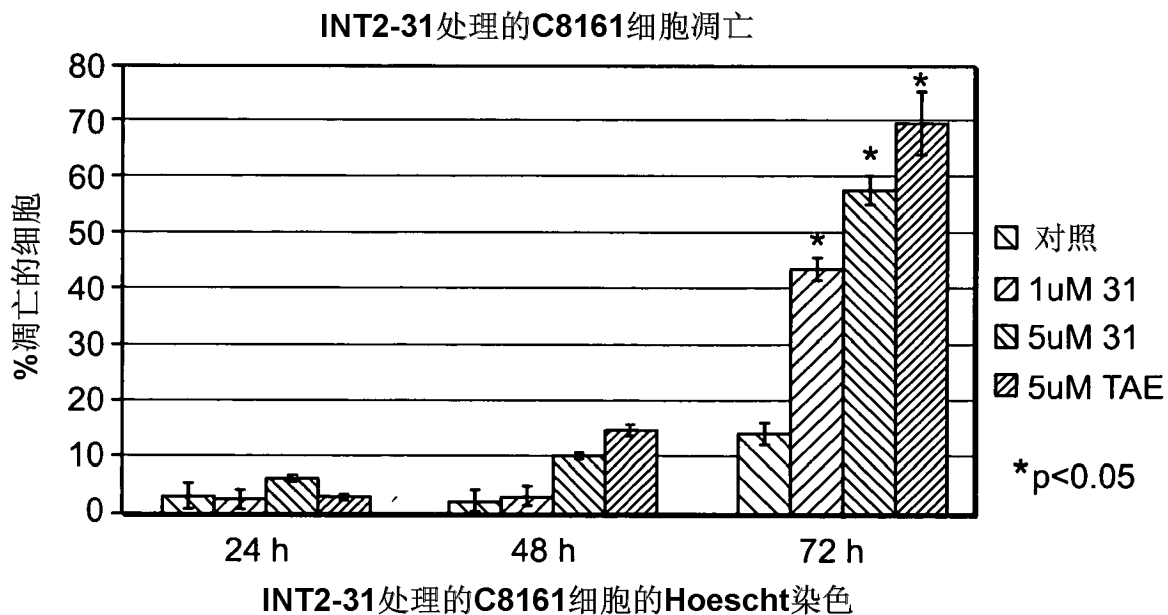
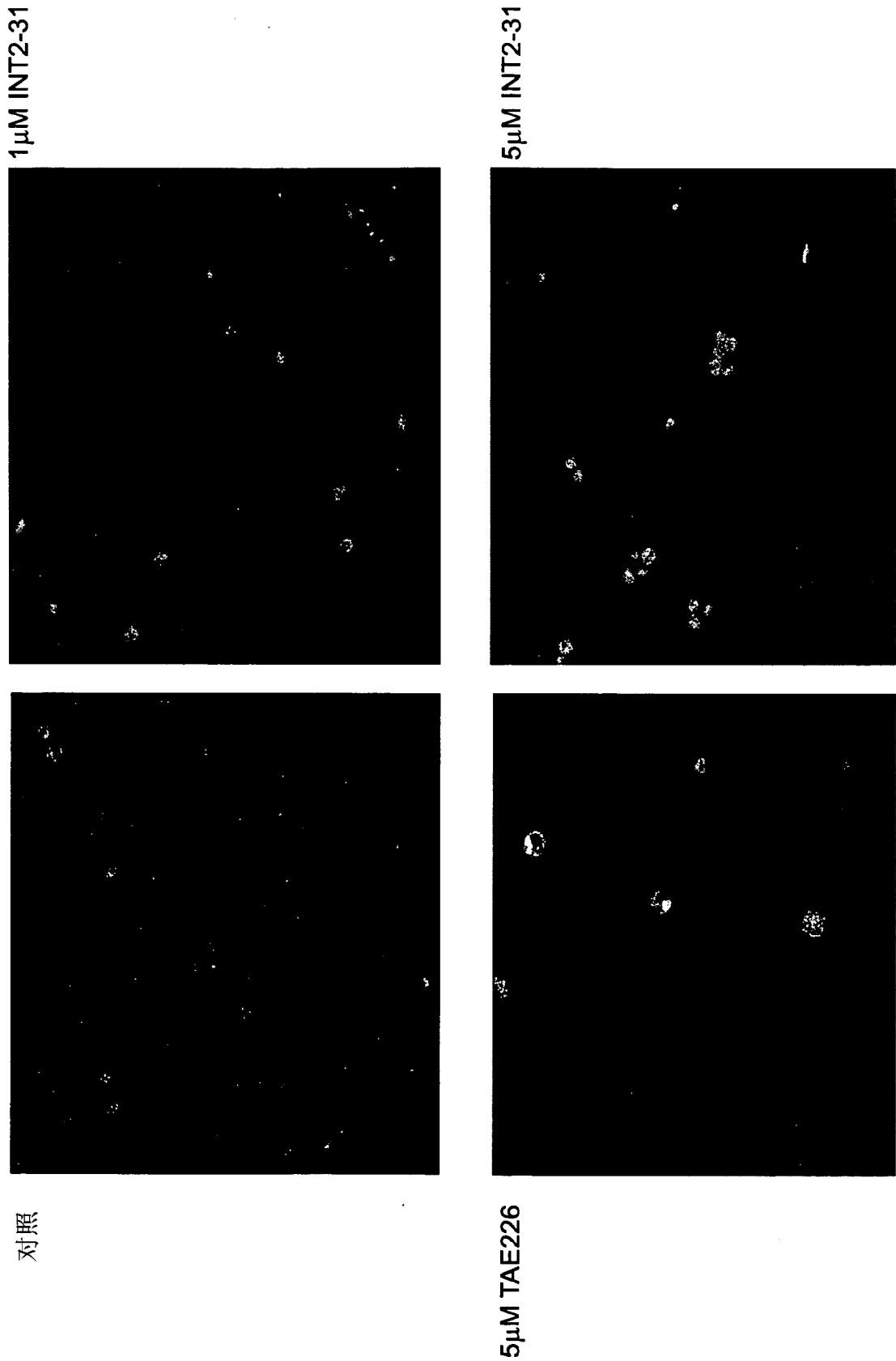
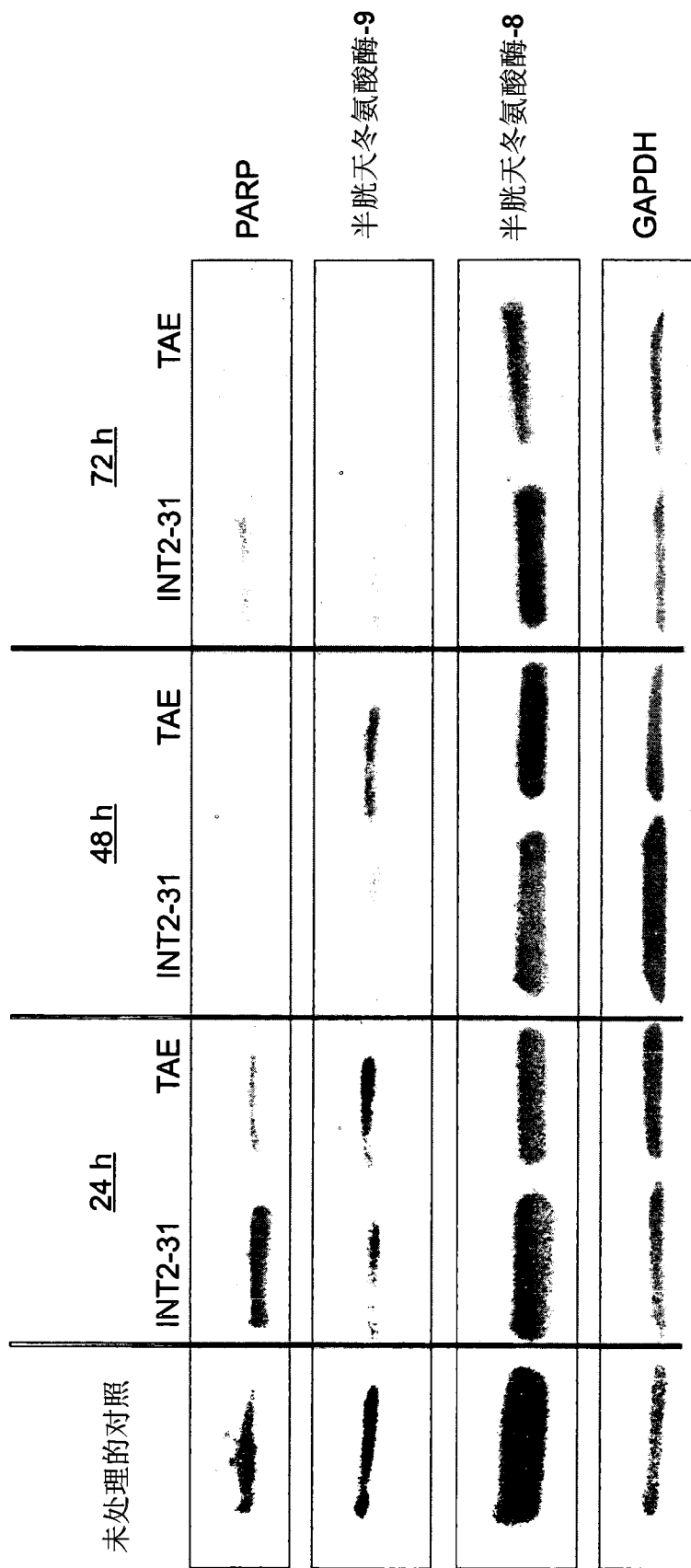


图 18B



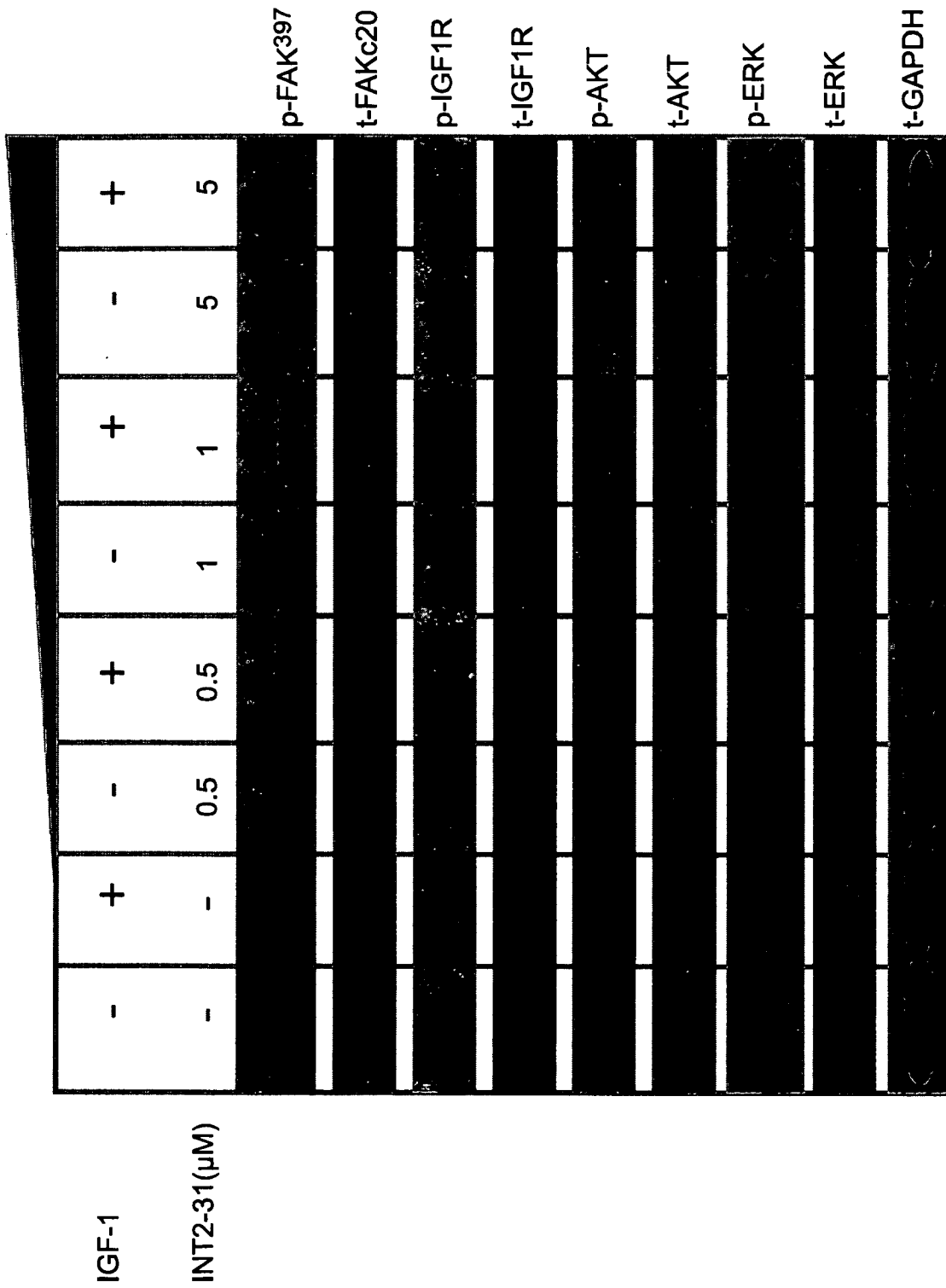
经48h的INT2-31或TAE226处理的C8161细胞中激活的半胱天冬氨酸酶3/7检测

图 18C



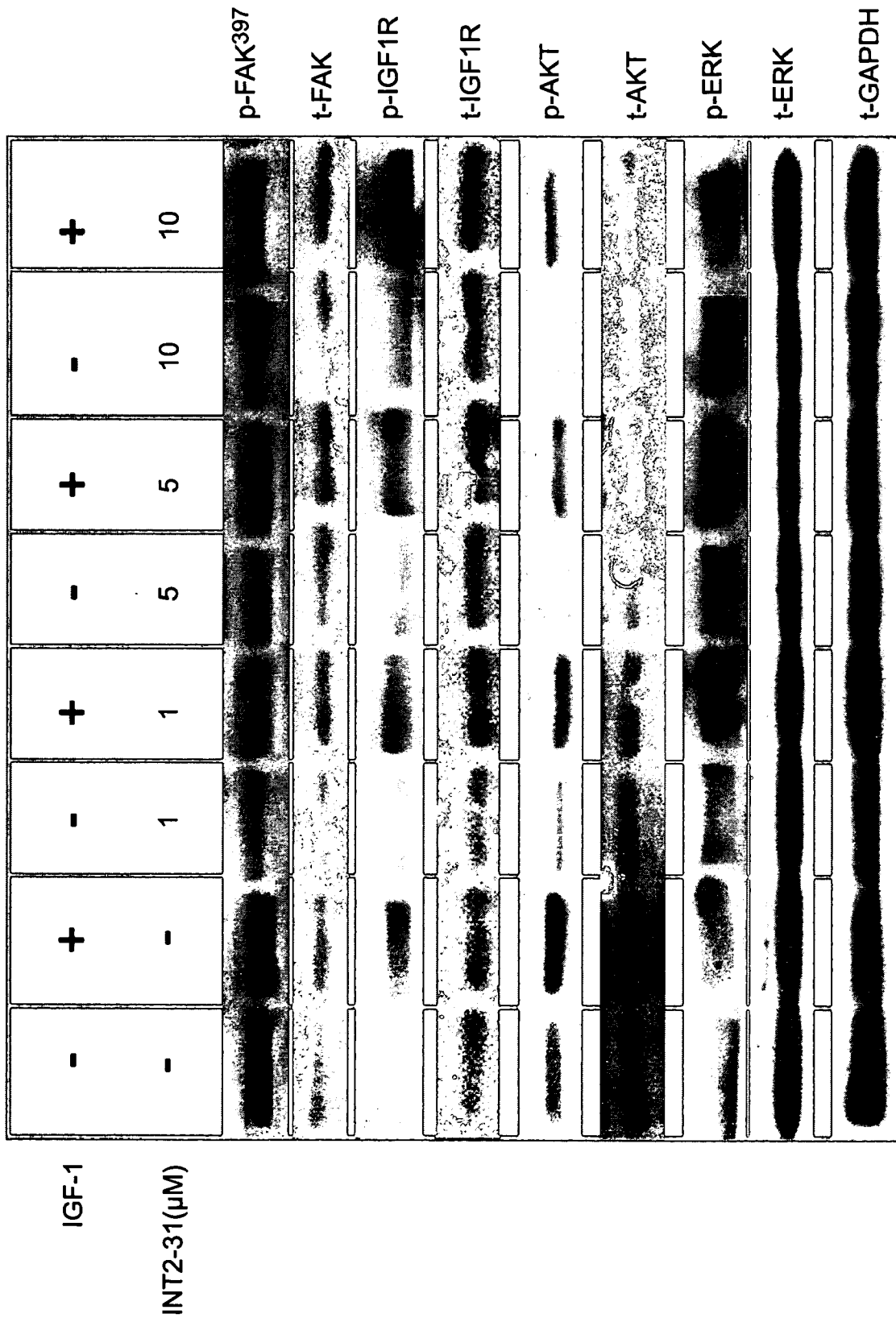
INT2-31对C8161细胞中细胞凋亡的生化标志物的作用

图 18D



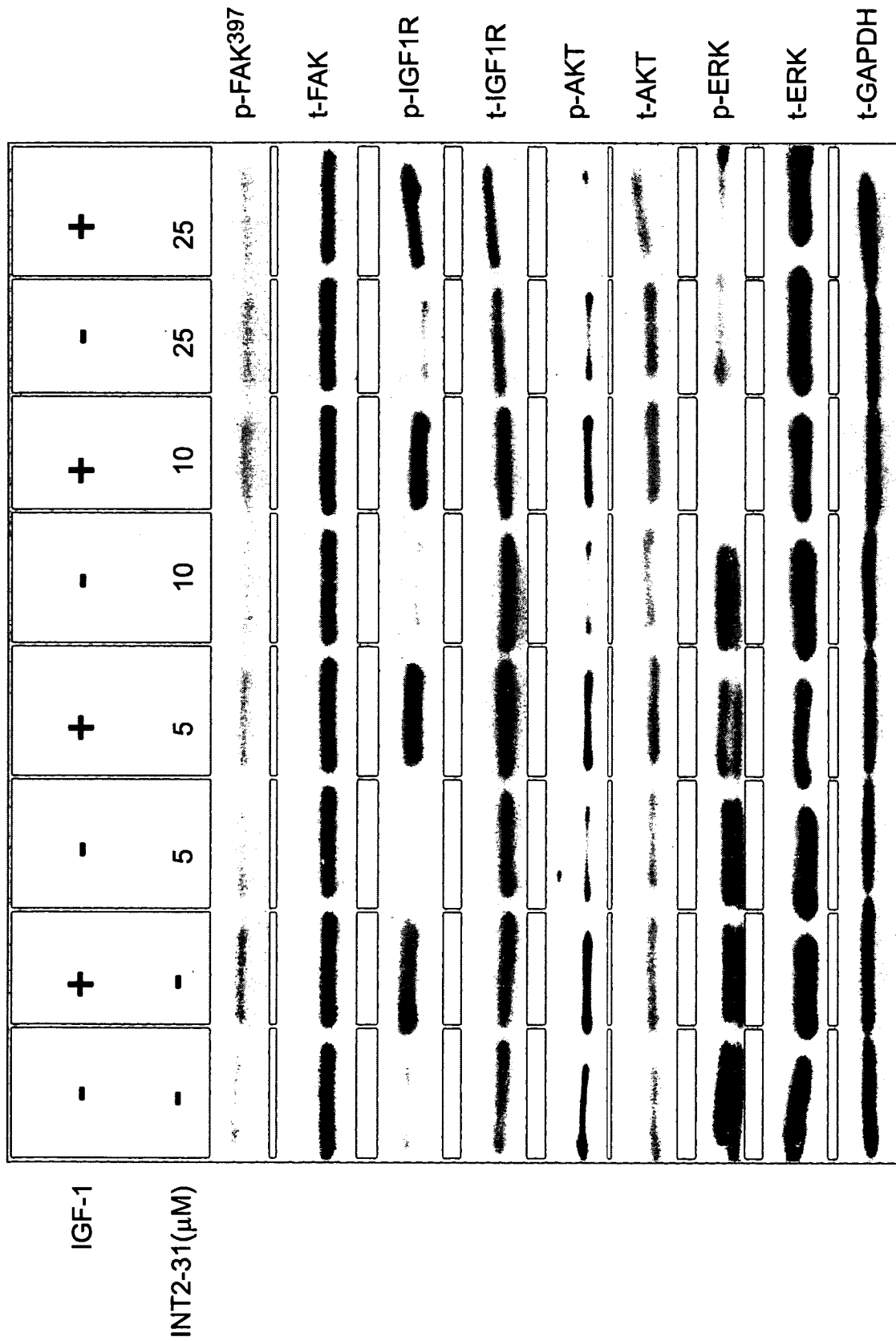
INT2-31对C8161细胞中信号传导的作用

图 19A



INT2-31对A375细胞中信号传导的作用

图 19B



INT2-31对SK-MEL-28细胞中信号传导的作用

图 19C

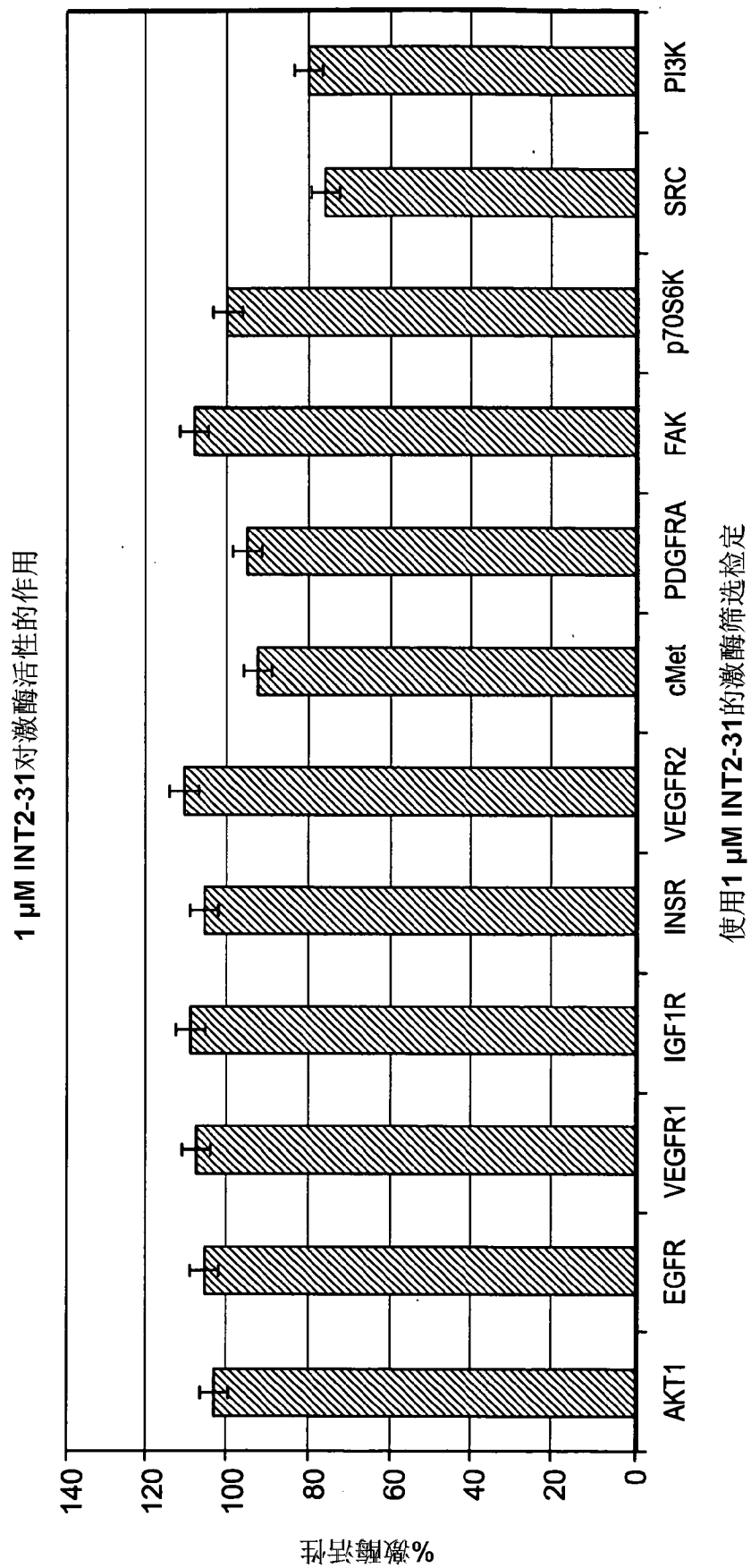


图 19D

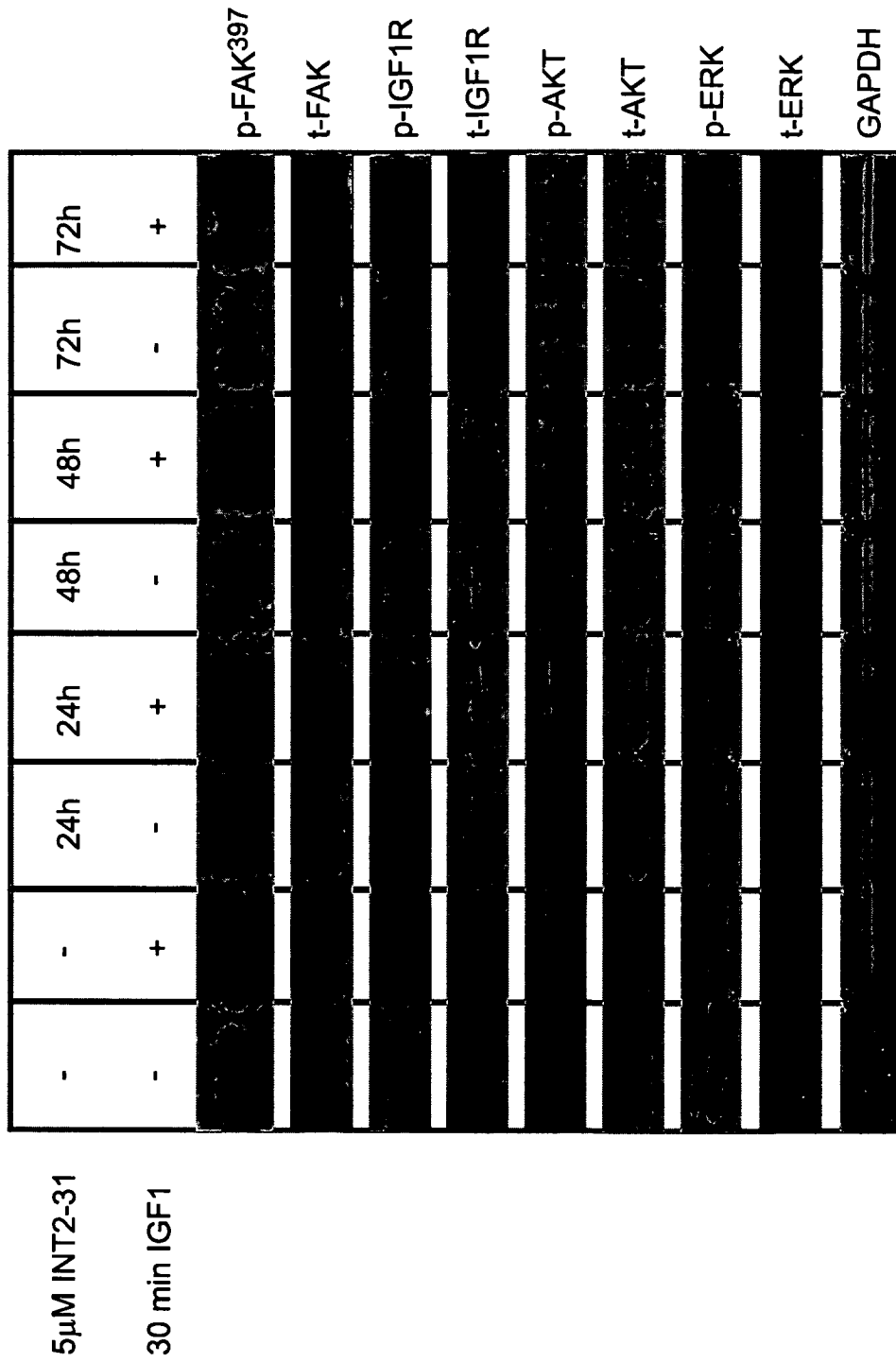


图 19E

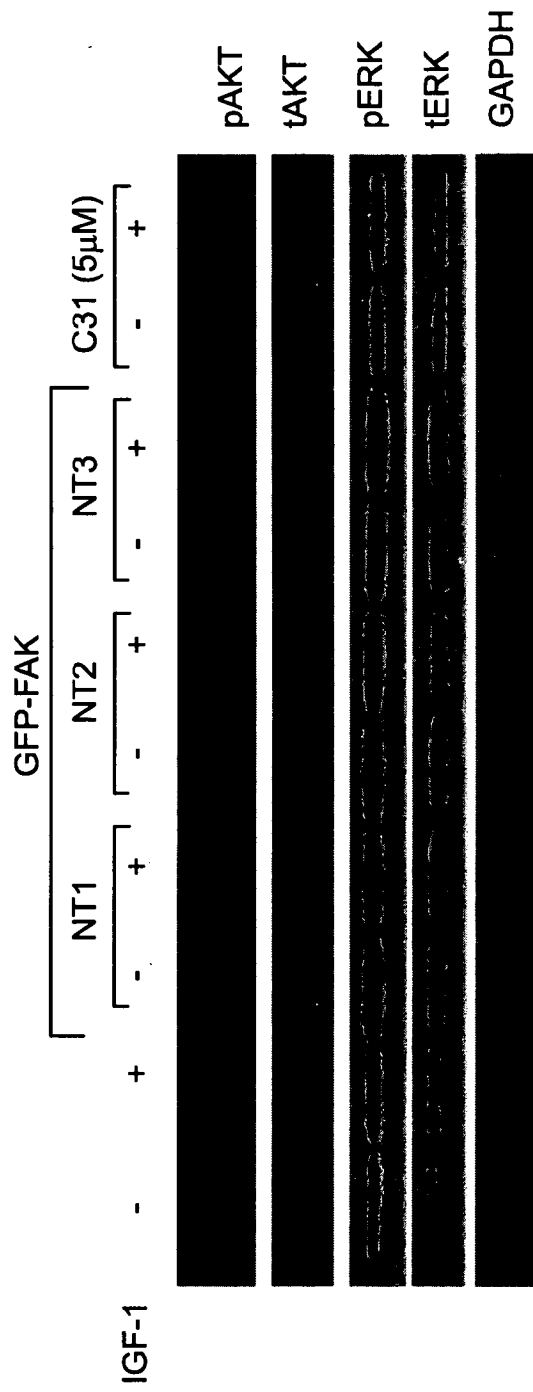


图 19F

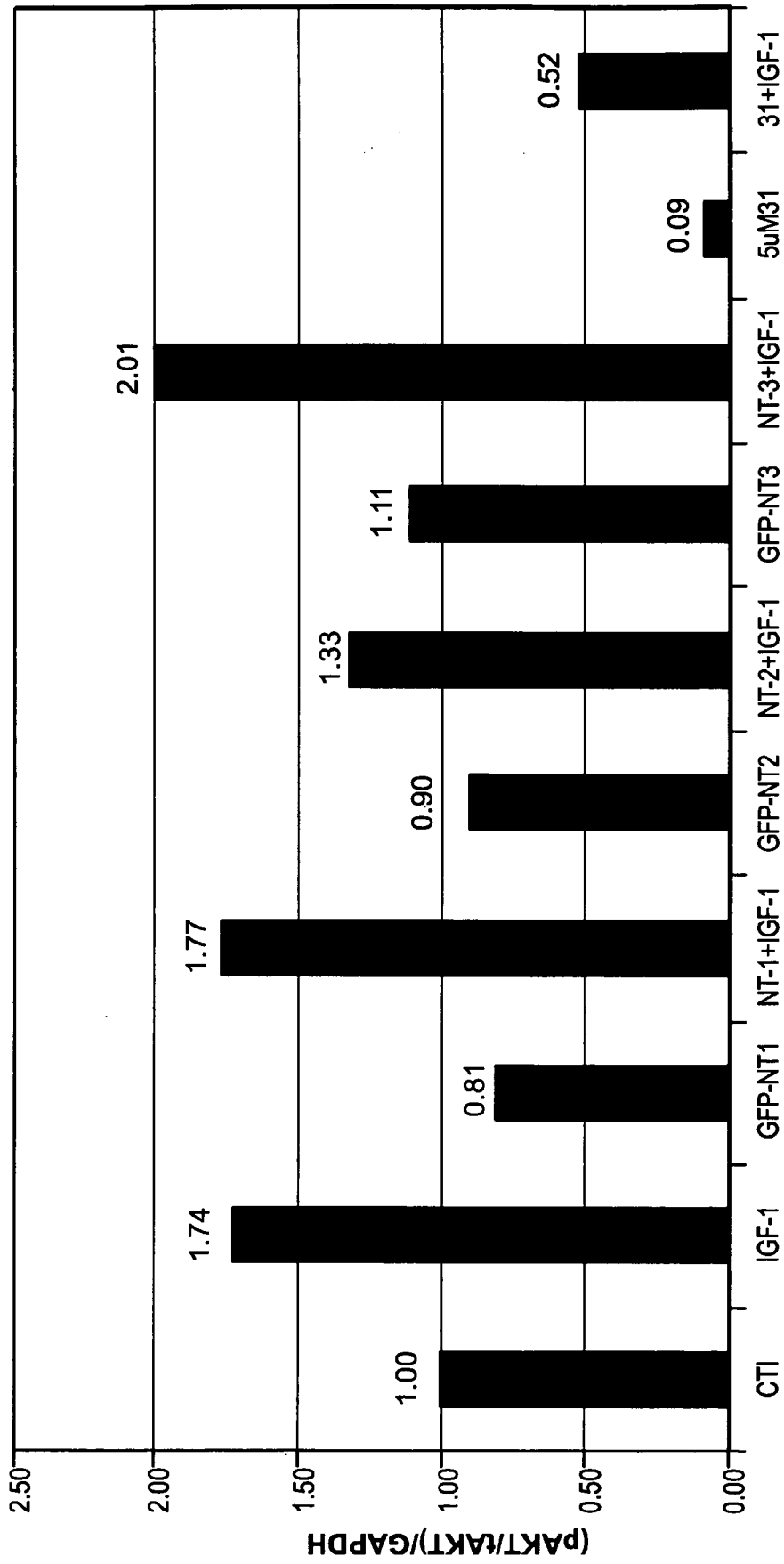


图 19G

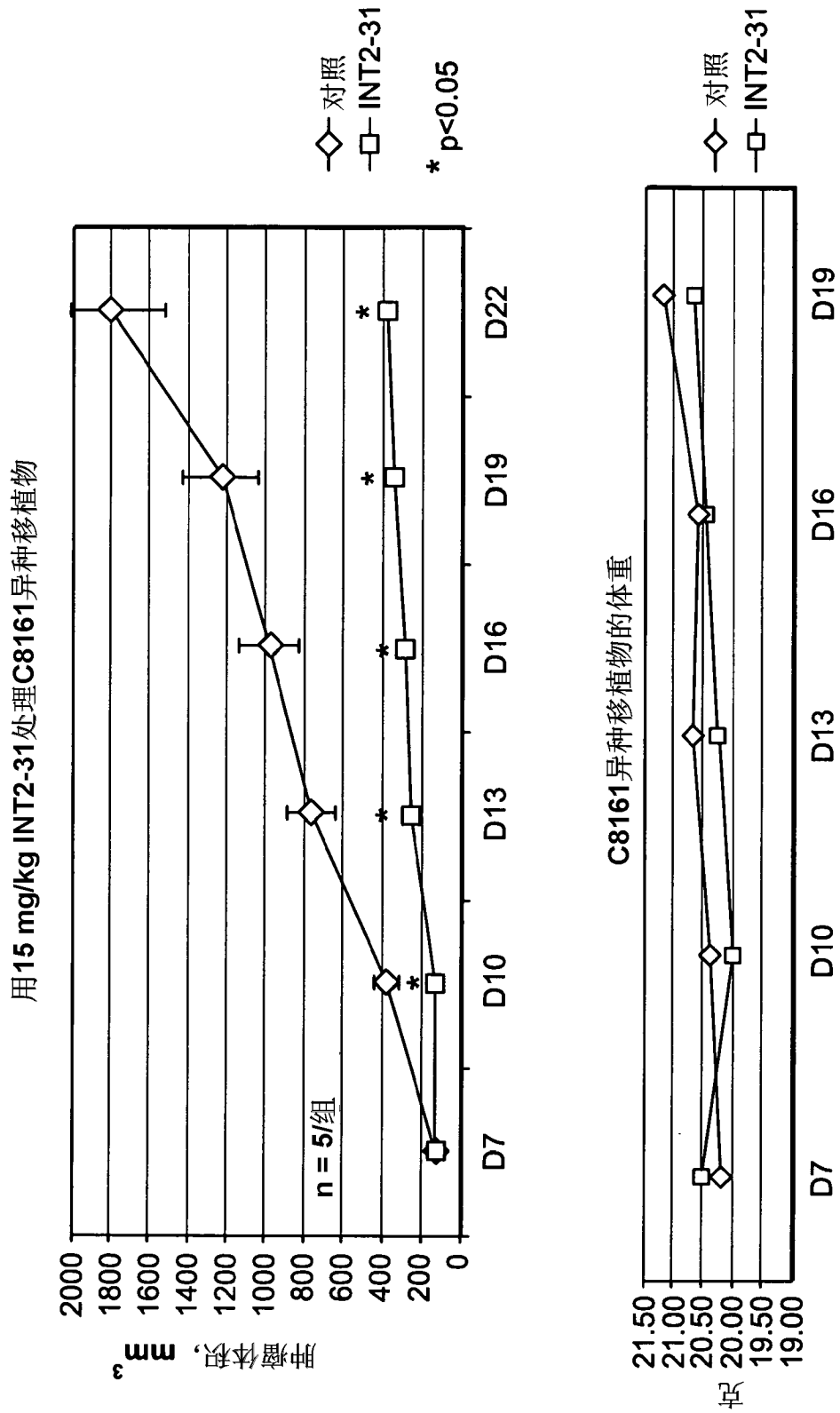


图 20A

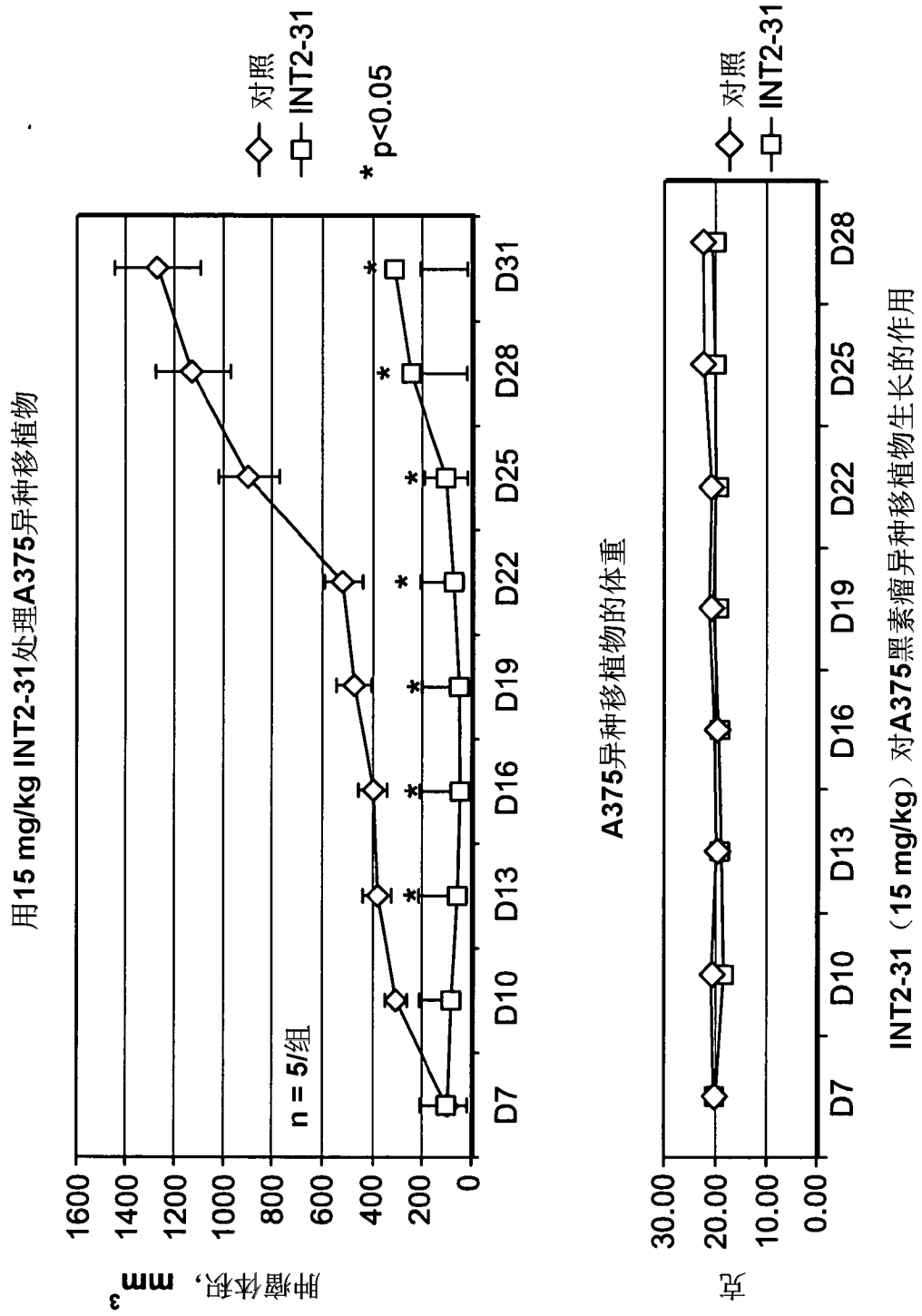
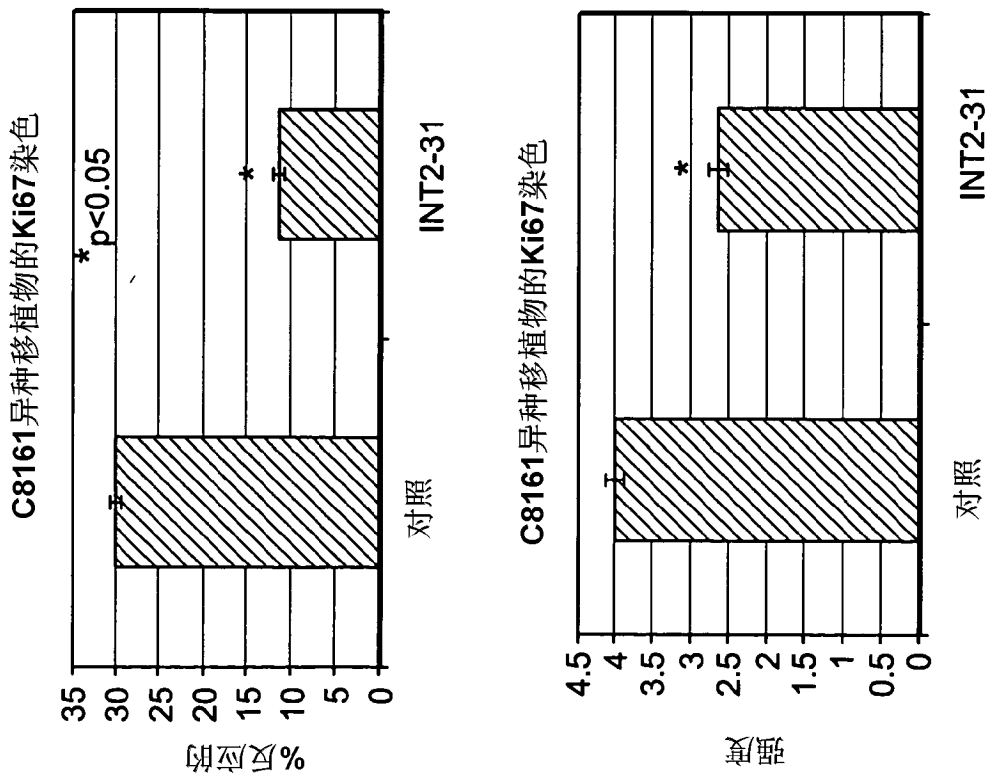


图 20B



用INT2-31 (15 mg/kg) 相对于PBS对照处理的肿瘤的Ki67染色
用PBS相对于INT2-31处理的肿瘤中的TUNEL阳性细胞

图 20C

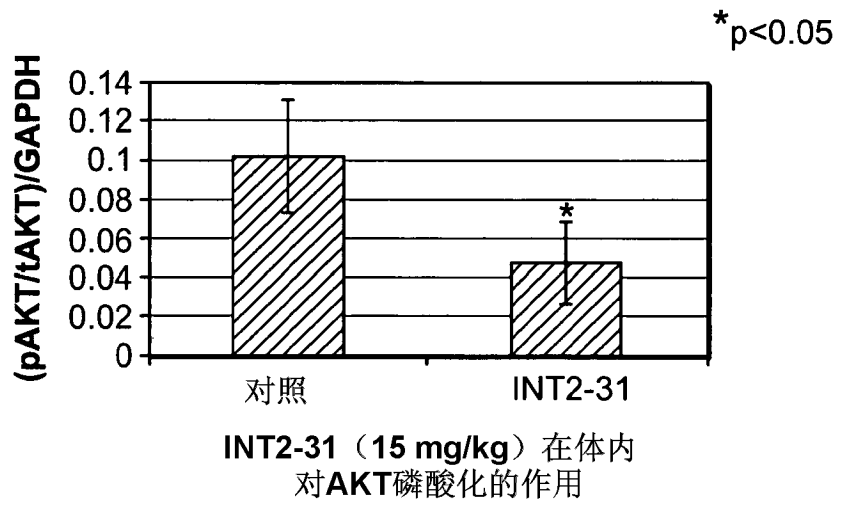
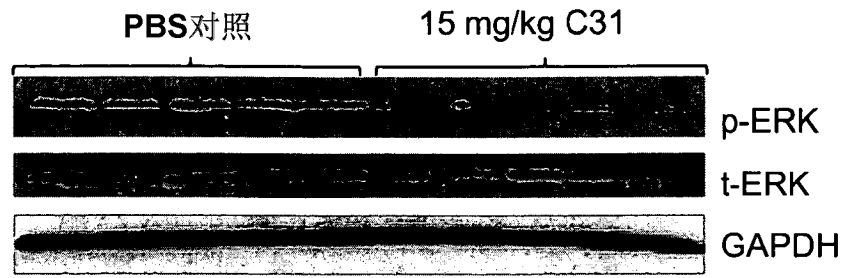


图 20D

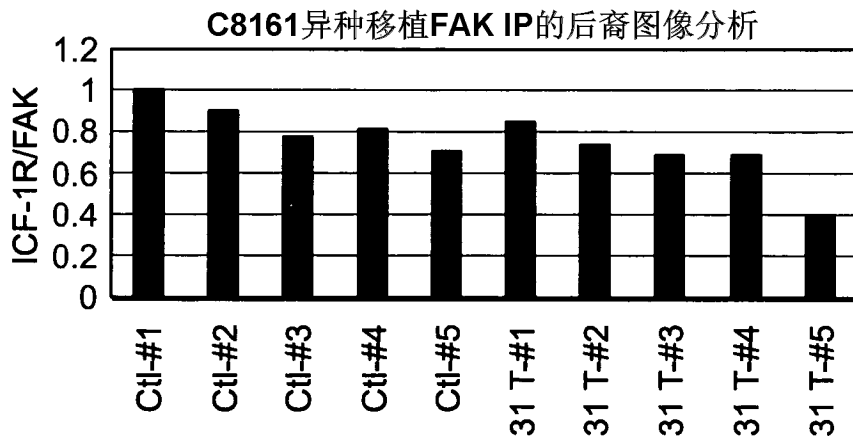
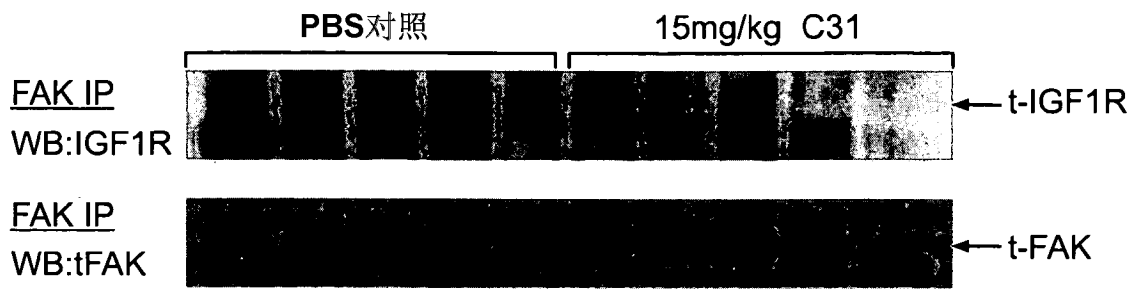


图 20E

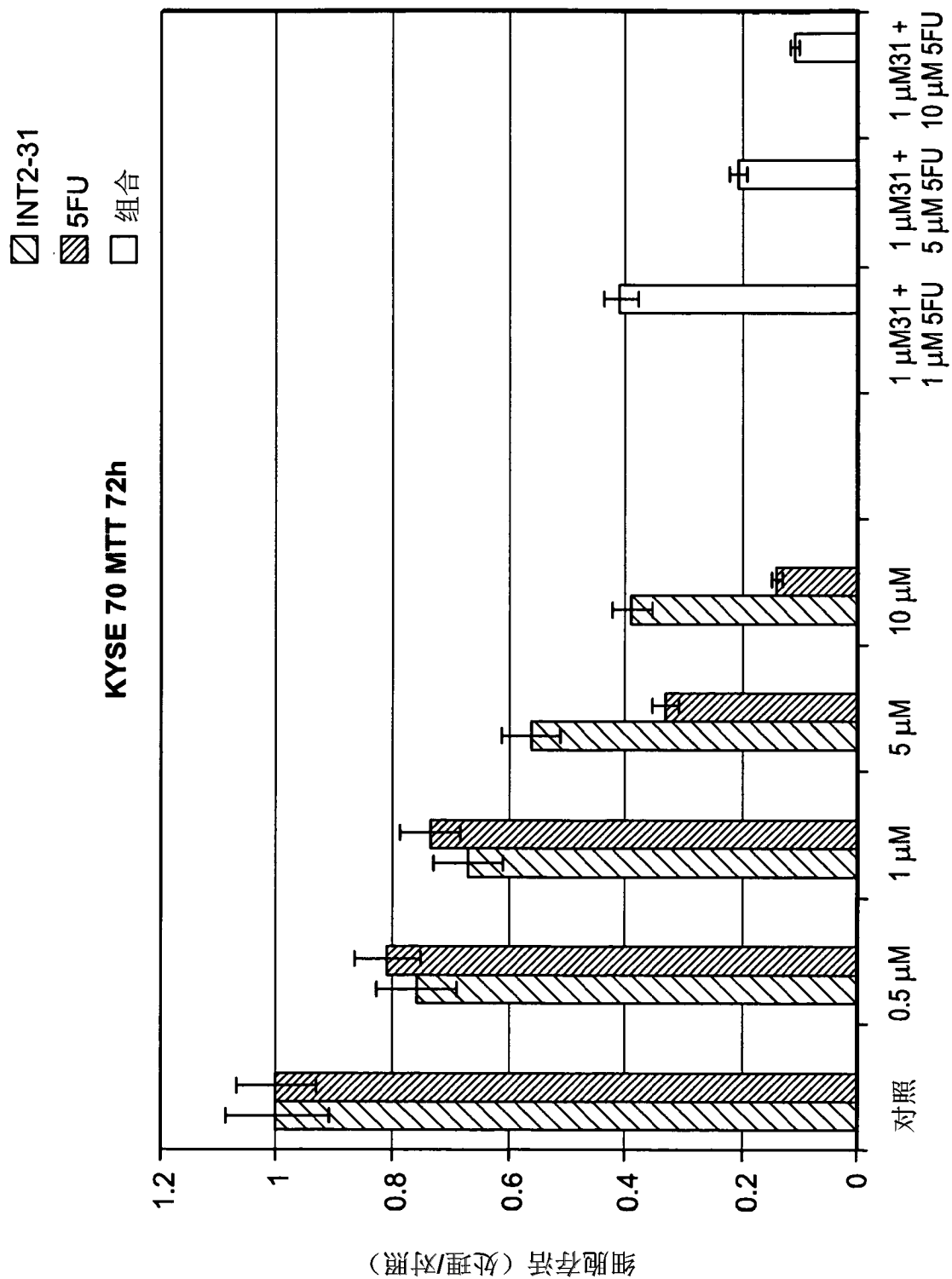


图 21A

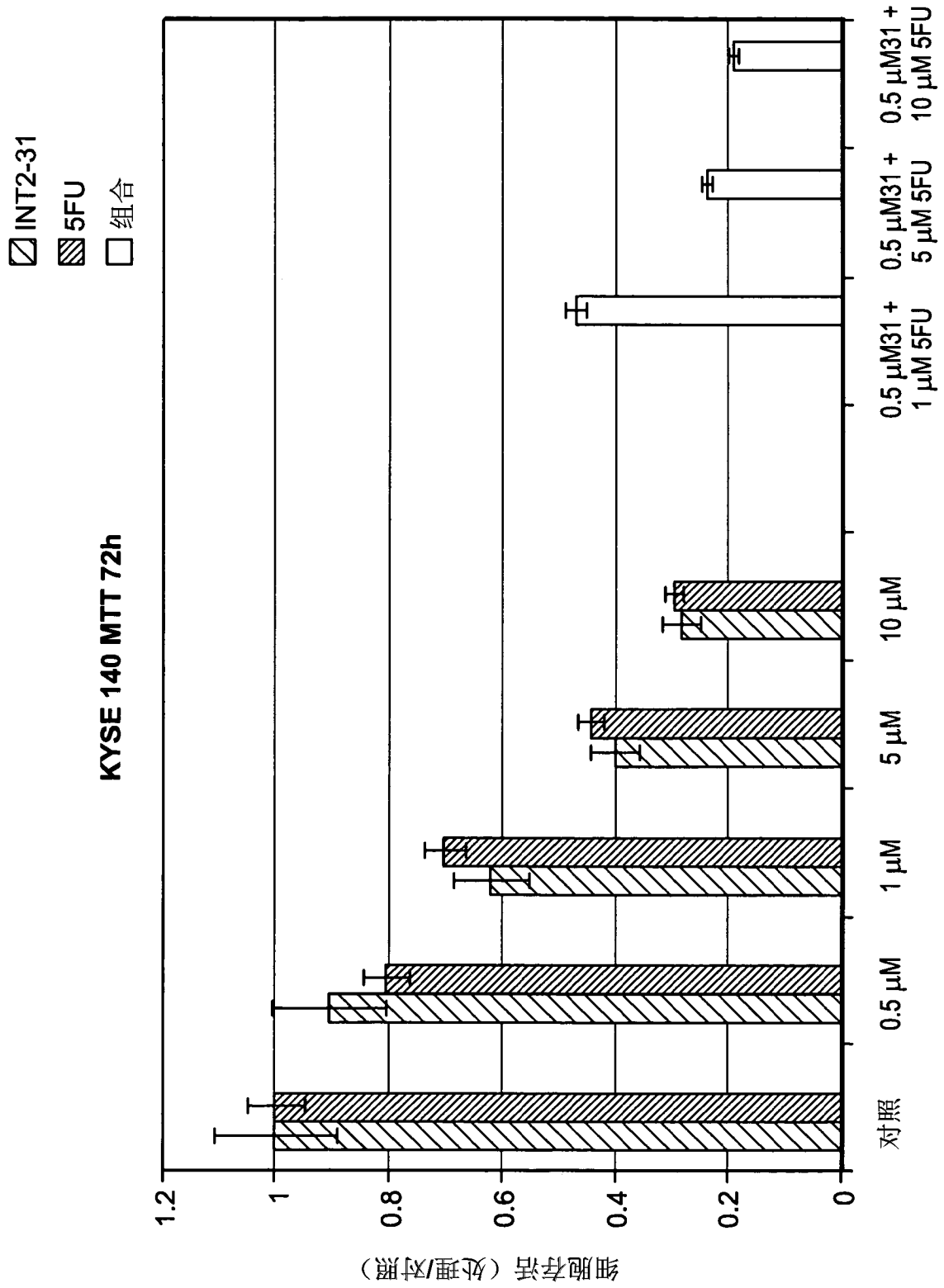
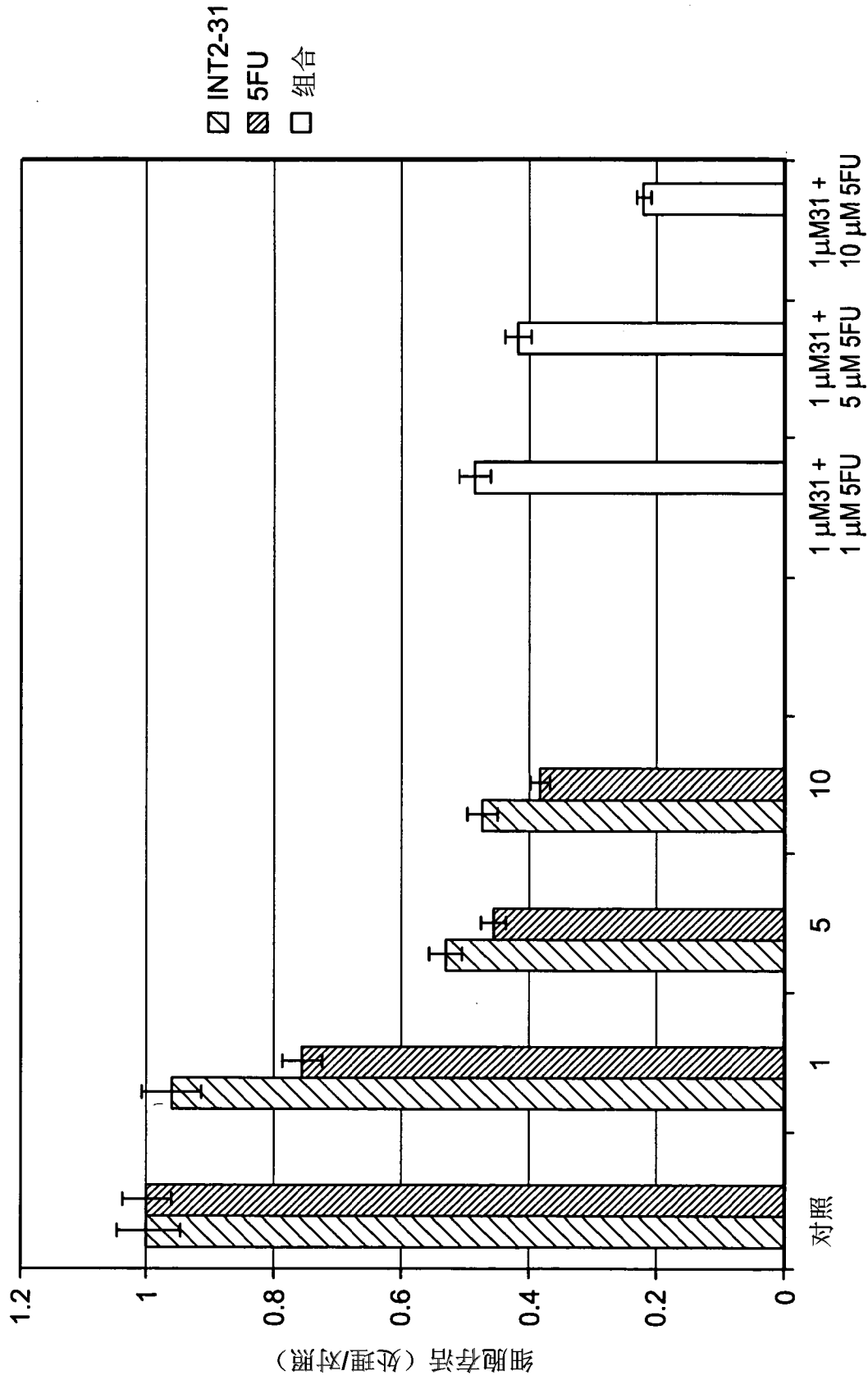


图 21B



INT2-31使胰腺癌细胞对化疗敏感
A) 显示用增加浓度的INT2-31、5-FU或组合处理72小时的Panc-1细胞系的存活的MTT测定

图 22

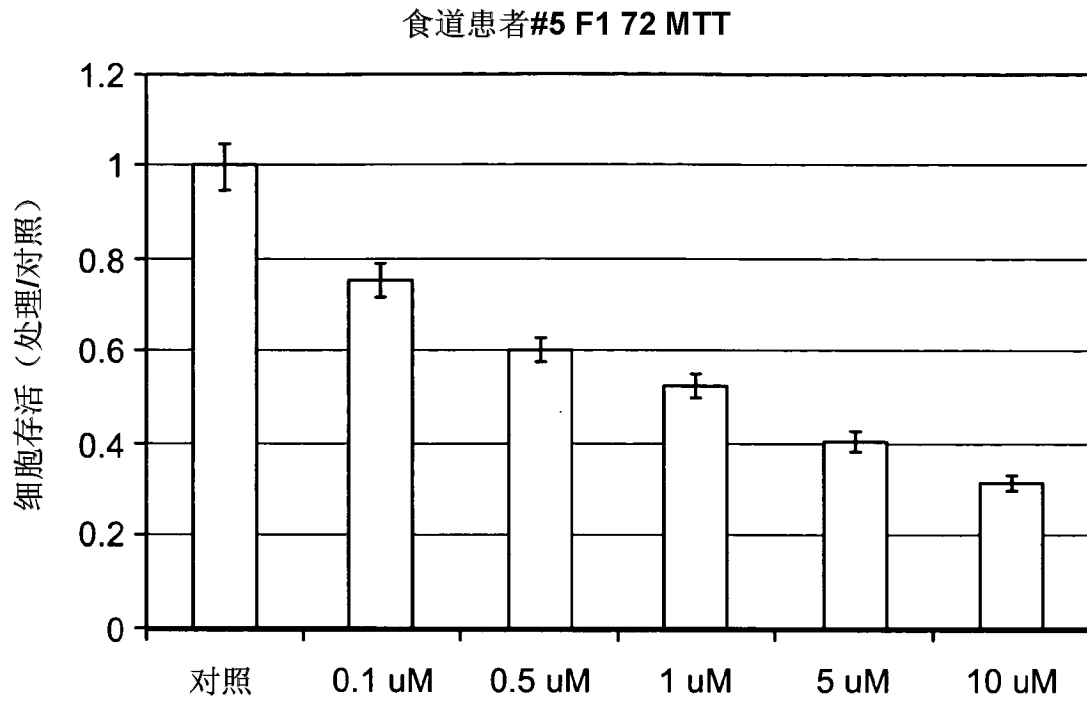


图 23A

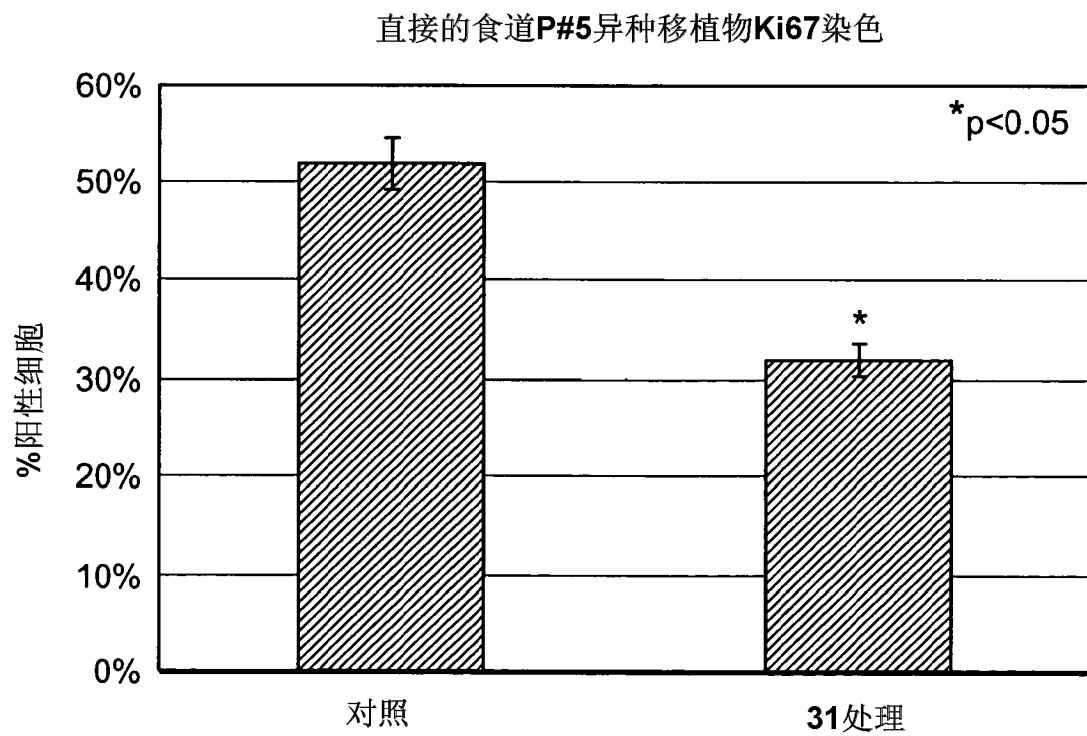


图 23C

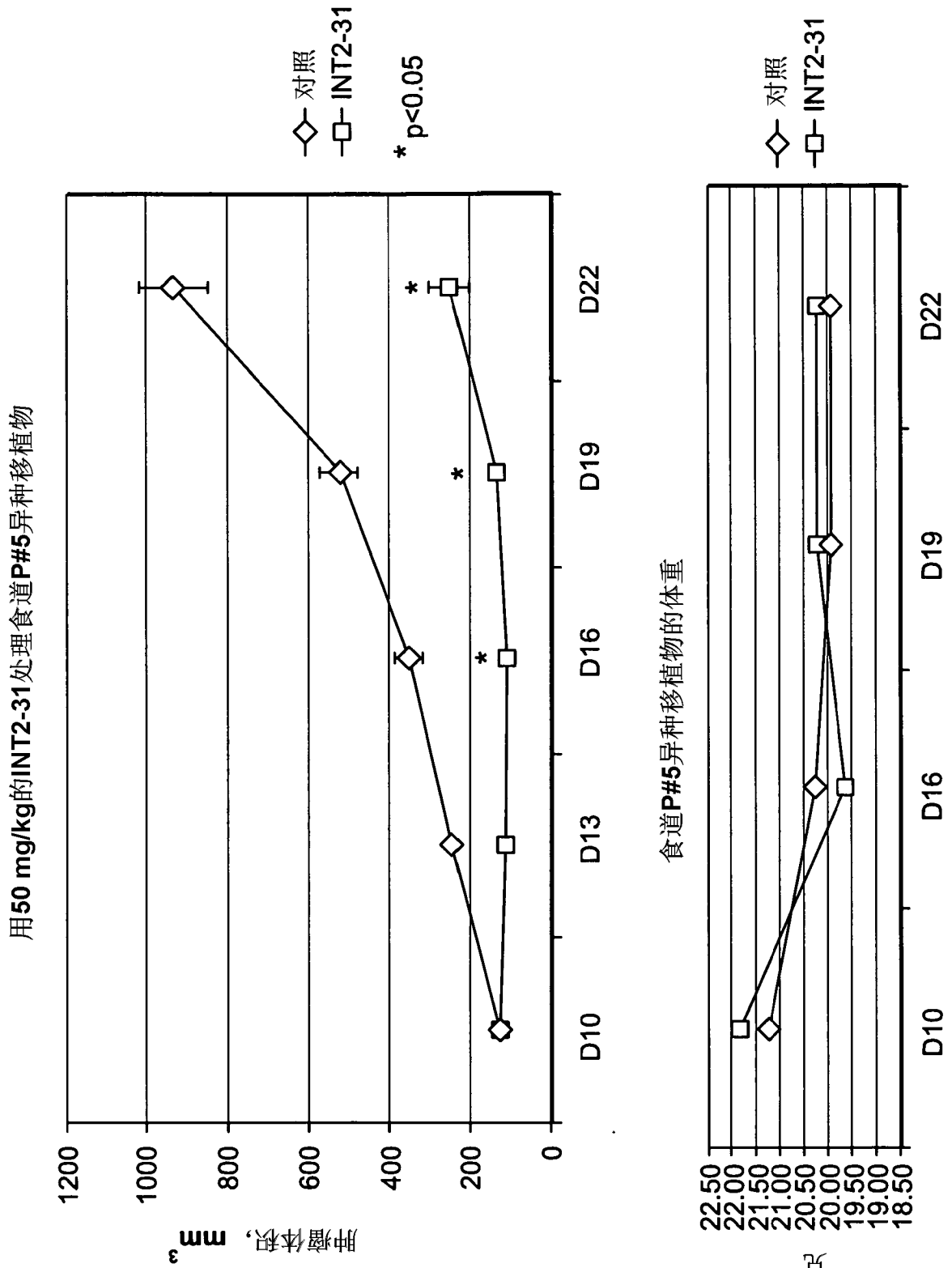


图 23B



图 24A

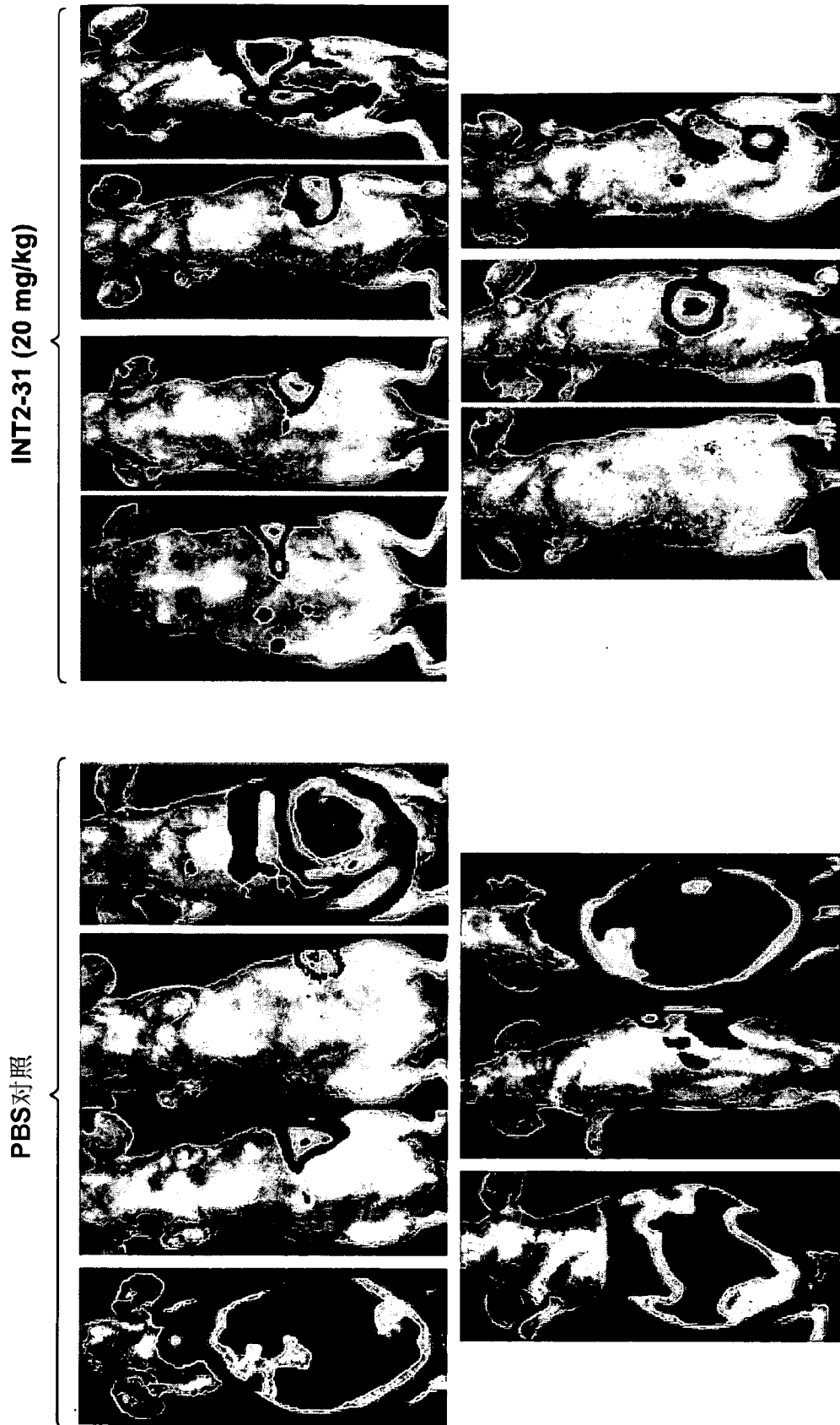


图 24B