

(19) 中华人民共和国国家知识产权局



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105326831 A

(43) 申请公布日 2016. 02. 17

(21) 申请号 201510831539. 6

(22) 申请日 2015. 11. 25

(71) 申请人 中国科学院生物物理研究所  
地址 100101 北京市朝阳区大屯路 15 号  
申请人 中国科学院上海药物研究所

(72) 发明人 陈畅 罗成 蒋华良 李江美  
高振 赵丹 张伦峰 乔新华

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 关畅 白艳

(51) Int. Cl.

*A61K 31/387*(2006. 01)

*A61P 35/00*(2006. 01)

*A61P 33/06*(2006. 01)

*A61P 25/28*(2006. 01)

*A61P 3/10*(2006. 01)

权利要求书1页 说明书13页  
序列表5页 附图6页

(54) 发明名称

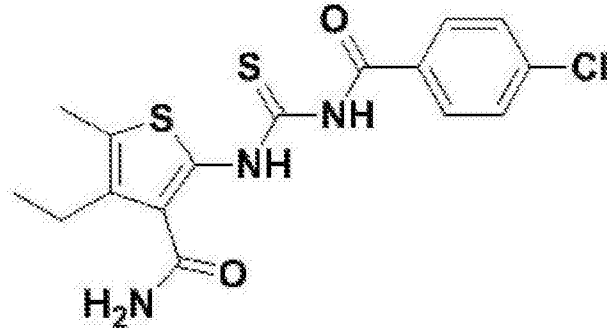
肌醇磷脂 4 位激酶二型  $\alpha$  亚型特异抑制剂  
PI-273 的应用

(57) 摘要

本发明公开了肌醇磷脂 4 位激酶二型  $\alpha$  亚型 (PI4KII  $\alpha$ ) 特异抑制剂 PI-273 的应用。本发明提供了 PI-273 作为 PI4KII  $\alpha$  酶抑制剂中的应用。PI-273 在制备抑制 PI4KII  $\alpha$  酶活性的产品中的应用。本发明的实验证明了, 本发明的实验证明, 本发明首次根据人源 PI4KII  $\alpha$  的晶体结构筛选出其亚型特异的小分子抑制剂。PI-273 显著性的抑制 MCF-7 诱导的肿瘤组织的生长。PI4KII  $\alpha$  亚型特异的抑制剂 PI-273 提供了乳腺癌治疗的新策略。

1. PI-273 作为 PI4KII  $\alpha$  酶抑制剂中的应用；

PI-273 的化学结构式为式 1：



式 1。

2. PI-273 在制备抑制 PI4KII  $\alpha$  酶活性的产品中的应用。

3. PI-273 在制备 PI4KII  $\alpha$  的可逆抑制剂中的应用；

或 PI-273 在制备 PI4KII  $\alpha$  的 PI 竞争性抑制剂中的应用。

4. PI-273 在制备抑制磷脂酰肌醇信号通路的产品中的应用。

5. PI-273 在制备预防和 / 或治疗肿瘤的产品中的应用。

6. PI-273 在制备抑制肿瘤的产品中的应用。

7. 根据权利要求 6 所述的应用,其特征在於：

所述抑制肿瘤体现在如下 1)-4) 中至少一种：

1) 抑制肿瘤细胞增殖；

2) 使肿瘤细胞阻滞在细胞周期的 G2/M 期；

3) 促进肿瘤细胞凋亡；

4) 抑制肿瘤细胞成瘤能力。

8. PI-273 在制备具有如下 1)-4) 中至少一种功能的产品中的应用。

1) 抑制肿瘤细胞增殖；

2) 使肿瘤细胞阻滞在细胞周期的 G2/M 期；

3) 促进肿瘤细胞凋亡；

4) 抑制细胞成瘤能力。

9. 一种如下 1)-8) 中至少一种功能的产品,其活性成分为 PI-273；

1) 预防和 / 或治疗肿瘤；

2) 抑制肿瘤；

3) 抑制肿瘤细胞增殖；

4) 使肿瘤细胞阻滞在细胞周期的 G2/M 期；；

5) 促进肿瘤细胞凋亡；

6) 抑制细胞成瘤能力。

7) 抑制 PI4KII  $\alpha$  酶活性；

8) 抑制磷脂酰肌醇信号通路。

10. 根据权利要求 1-8 中任一所述应用或权利要求 9 所述的产品,其特征在於:所述肿瘤为乳腺癌;所述肿瘤细胞为乳腺癌细胞。

## 肌醇磷脂 4 位激酶二型 $\alpha$ 亚型特异抑制剂 PI-273 的应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,尤其涉及一种肌醇磷脂 4 位激酶二型  $\alpha$  亚型 (PI4KII  $\alpha$ ) 特异抑制剂 PI-273 的应用。

### 背景技术

[0002] 肌醇磷脂 (PI) 信号通路在跨膜信号转导和多种生长因子和激素调节细胞生长的信号通路中起核心作用。肌醇磷脂 4 位激酶 PI4K 是 PI 信号通路中第一个起重要作用的激酶,在肌醇磷脂循环过程中 PI4-K 首先催化肌醇磷脂 (PI) 环上 D4 位磷酸化,产生 4-磷酸磷脂酰肌醇 (4-phosphatidyl-inositide, PIP), 然后由 PIP5-K 激酶进一步催化合成 (4,5-phosphatidyl-inositide diphosphate, PIP2); PIP2 在磷脂酶 C (Phospholipase C, PLC) 的作用下水解为三磷酸肌醇 (1,4,5-trisphosphoinositol, IP3) 和甘油二酯 (Diacylglycerol, DAG), 作为第二信使, 引发胞内钙释放和激活蛋白激酶 C (Protein kinase C, PKC), 启动细胞内的双信使系统。另外, PIP2 也是 PI3-K 的底物, 因而 PI4K 影响 PI3-K 信号通路。近年研究发现 PIP, PIP2 本身也具有重要生物学功能。因此, PI4K 是 PI 信号通路中的关键分子, 关于 PI4K 的功能研究引起了人们越来越多的关注。

[0003] PI4K 激酶与许多人的重要疾病如癌症、疟疾、阿尔兹海默症和糖尿病等相关。其中 PI4KII  $\alpha$  是磷脂酰肌醇信号通路和磷脂酰肌醇代谢中的关键分子, 在 PIP2 生物合成、溶酶体和高尔基体相关膜转运、细胞内信号通路传导、病原体吞噬和神经突触囊泡循环等方面起着重要作用。

[0004] 目前已经报道了增加 PI4KII  $\alpha$  的表达会促进肿瘤的生长以及通过联合抑制 EGFR 和 PI4KII  $\alpha$  的表达来治疗 EGFR 依赖的肿瘤。PI4KII  $\alpha$  在 Wnt 和 Akt 信号通路也有重要作用。然而, 与 PI3K 激酶家族的大量研究相比, 对 PI4K 的基础研究和临床应用却很少, 主要原因之一是缺少 PI4K 激酶家族的特异抑制剂。在已有的 PIK 家族的小分子抑制剂除了 PIK-75 是 PI 底物竞争抑制剂其余绝大部分 ATP 竞争抑制剂。由于 PIK 家族不同亚型的核酸结合口袋有高度保守的氨基酸序列, 小分子抑制剂很难区分抑制不同亚型的激酶。亚型特异的抑制剂通过减少脱靶效应从而减小毒性。因此, 发现 PI 底物竞争的抑制剂可以解决这个问题。另外, 越来越多的证据表明, 除了 PI3K 激酶, 其他的 PIK 激酶和磷酸酶如 PI4KII  $\alpha$ 、PI4KIII  $\beta$ 、PI4KIII  $\alpha$ 、PIP5K1  $\alpha$  和 INPP4B 影响癌症的发生, 所以发现不同 PIK 激酶亚型特异抑制剂会极大的促进肿瘤发生机制的研究及其治疗。

[0005] 最近解析了人源 PI4KII  $\alpha$  结合 ADP 形式的晶体结构, 确认出不同于 PI3K 的核酸结合口袋和 PI 结合口袋。其中棕榈酰化插入片段通过影响 PI 结合口袋影响 PI4KII  $\alpha$  酶活性, 而棕榈酰化插入片段并不存在于其他 PIK 激酶中, 所以棕榈酰化插入片段是特异抑制剂筛选的理想位点。

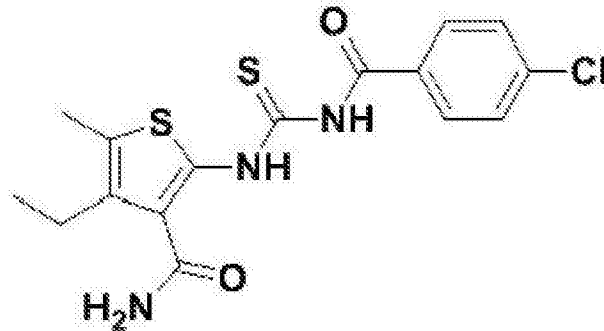
### 发明内容

[0006] 本发明的一个目的是提供 PI-273 的用途。

[0007] 本发明提供了 PI-273 作为 PI4KII  $\alpha$  酶抑制剂中的应用；

[0008] PI-273 的化学结构式为式 1：

[0009]



[0010] 式 1。

[0011] 上述 PI-273 在制备抑制 PI4KII  $\alpha$  酶活性的产品中的应用也是本发明保护的范  
围。

[0012] 上述 PI-273 在制备 PI4KII  $\alpha$  的可逆抑制剂中的应用也是本发明保护的范

[0013] 或上述 PI-273 在制备 PI4KII  $\alpha$  的 PT 竞争性抑制剂中的应用也是本发明保护的  
范围。

[0014] 上述 PI-273 在制备抑制磷脂酰肌醇信号通路的产品中的应用也是本发明保护的  
范围。

[0015] 上述应用中,所述抑制磷脂酰肌醇信号通路通过抑制 PI4KII  $\alpha$  酶活性实现。

[0016] 上述 PI-273 在制备预防和 / 或治疗肿瘤的产品中的应用也是本发明保护的范

[0017] 上述 PI-273 在制备抑制肿瘤的产品中的应用也是本发明保护的范

[0018] 上述应用中,

[0019] 所述抑制肿瘤体现在如下 1)-4) 中至少一种：

[0020] 1) 抑制肿瘤细胞增殖；

[0021] 2) 使肿瘤细胞阻滞在细胞周期的 G2/M 期；

[0022] 3) 促进肿瘤细胞凋亡；

[0023] 4) 抑制肿瘤细胞成瘤能力。

[0024] 上述 PI-273 在制备具有如下 1)-4) 中至少一种功能的产品中的应用也是本发  
明保护的范

[0025] 1) 抑制肿瘤细胞增殖；

[0026] 2) 使肿瘤细胞阻滞在细胞周期的 G2/M 期；；

[0027] 3) 促进肿瘤细胞凋亡；

[0028] 4) 抑制细胞成瘤能力。

[0029] 本发明另一个目的是提供一种如下 1)-8) 中至少一种功能的产品。

[0030] 本发明提供的产品,其活性成分为 PI-273；

[0031] 1) 预防和 / 或治疗肿瘤；

[0032] 2) 抑制肿瘤；

[0033] 3) 抑制肿瘤细胞增殖；

[0034] 4) 使肿瘤细胞阻滞在细胞周期的 G2/M 期；；

- [0035] 5) 促进肿瘤细胞凋亡；  
[0036] 6) 抑制细胞成瘤能力。  
[0037] 7) 抑制 PI4KII  $\alpha$  酶活性；  
[0038] 8) 抑制磷脂酰肌醇信号通路。  
[0039] 上述肿瘤为乳腺癌；上述肿瘤细胞为乳腺癌细胞。  
[0040] 上述动物为小鼠。

[0041] 本发明的实验证明,本发明首次根据人源 PI4KII  $\alpha$  的晶体结构筛选出其亚型特异的小分子抑制剂 PI-273。用酶动力学方法确定 PI-273 是 PI4KII  $\alpha$  底物 PI 的竞争性抑制剂。利用突变分析和抑制剂与 PI4KII  $\alpha$  的对接模型,确定 PI-273 通过与 PI4KII  $\alpha$  蛋白棕榈酰化插入片段 (Pal insertion) 相互作用从而抑制 PI4KII  $\alpha$  的酶活性。体内和体外实验显示 PI-273 亚型特异的抑制 PI4KII  $\alpha$  的酶活性。在细胞水平上 PI-273 通过抑制 PI4KII  $\alpha$  酶活性从而抑制磷脂酰肌醇信号通路。PI-273 可以阻断细胞周期 G2/M 期抑制肿瘤细胞增殖,诱导凋亡及抑制细胞成瘤能力。动物水平上在对实验小鼠没有毒性的情况下,PI-273 显著性的抑制 MCF-7 诱导的肿瘤组织的生长。PI4KII  $\alpha$  亚型特异的抑制剂 PI-273 提供了乳腺癌治疗的新策略。

[0042] 下面通过实施例来更好说明和理解本发明,但本发明的保护范围不限于实施例的范围。

#### 附图说明

- [0043] 图 1 为 PI4KII  $\alpha$  小分子抑制剂的筛选；  
[0044] a. PI-273 和 PI-69 的化学结构式；  
[0045] b. 用 PI4K 激酶活性检测方法检测不同化合物对 PI4KII  $\alpha$  体外酶活抑制效果,化合物对乳腺癌细胞 MCF-7, Hs 578T, T-47D 细胞系处理 3 天后检测对细胞增殖能力的抑制效果；  
[0046] c. 用 1  $\mu$ M 和 3  $\mu$ M PI-273 处理 MCF-7 细胞 2 天后收取细胞检测 PI4P 的含量变化。  
[0047] 图 2 为 PI-273 直接结合 PI4KII  $\alpha$  并可逆的抑制 PI4KII  $\alpha$  酶活性；  
[0048] a. 表面等离子共振实验检测 PI-273 与 PI4KII  $\alpha$  的相互作用,PI-273 从 1.25  $\mu$ M 到 20  $\mu$ M 等梯度稀释；  
[0049] b. 蛋白热稳定性实验检测 PI-273 与 PI4KII  $\alpha$  的相互作用,不同浓度的 PI-273 和 PI-69 与 5  $\mu$ M PI4KII  $\alpha$  蛋白处理后,分析 PI4KII  $\alpha$  蛋白稳定性变化；  
[0050] c. 利用细胞热转移分析实验确定 PI-273 与 PI4KII  $\alpha$  的相互作用,用 1  $\mu$ M PI-273 处理 MCF-7 细胞 96 小时和 20  $\mu$ M PI-273 处理细胞裂解液用 30 分钟；  
[0051] d. 将 PI4KII  $\alpha$  与不同浓度梯度的 PI-273 (0-1  $\mu$ M) 预孵育不同时间 (0-60min)；  
[0052] e. 加入不同浓度的 PI-273 (0-2  $\mu$ M) 测定不同 PI4KII  $\alpha$  酶浓度 (2.5-10ng/ $\mu$ l) 的反应初速率,以初速率对酶浓度作图。  
[0053] 图 3 为 PI-273 是 PI4KII  $\alpha$  底物 PI 的竞争性抑制剂；  
[0054] a. 在不同浓度的底物 ATP 条件下,检测不同浓度的 PI-273 (0-0.8  $\mu$ M) 下 PI4KII  $\alpha$  的酶活性,求算  $V_{max}$  和  $K_m$  值；

- [0055] b. 在不同浓度的底物 PI 条件下,检测不同浓度的 PI-273 (0-0.4  $\mu$ M) 下 PI4KII  $\alpha$  的酶活性, 求算  $V_{max}$  和  $K_m$  值;
- [0056] c. 5  $\mu$ M 各突变蛋白与 50  $\mu$ M PI-273 处理后,用蛋白热稳定性实验检测蛋白溶解温度的变化;
- [0057] d. PI-273 与 PI4KII  $\alpha$  的结合模型。
- [0058] 图 4 为 PI-273 选择性抑制 PI4KII  $\alpha$  酶活性;
- [0059] a. PI-273 和 PI-294 对 32 种不同激酶的选择性作用, 激酶经对照 DMSO, 5  $\mu$ M PI-273 和 5  $\mu$ M PI-294 处理后检测酶活性抑制效果。
- [0060] b. PI-273 和 PI-294 对选择的 7 种激酶的半数抑制浓度。
- [0061] c. PI-273 对过表达和干扰 PI4KII  $\alpha$  蛋白后细胞的增殖抑制效果。
- [0062] d. 在 MCF-7 细胞中 PI-273 特异调节 HER2 和 AKT 信号通路, MCF-7 细胞经 PI-273 处理 3 天, 100ng/ml EGF 或者 Insulin 处理 10 分钟, 免疫印迹法检测 HER-2 和 AKT 的磷酸化蛋白水平。
- [0063] e. f. 1  $\mu$ M PI-273 或 DMSO 处理对照或者干扰 PI4KII  $\alpha$  的细胞 3 天后, 检测 PI4P 含量和 AKT 磷酸化的蛋白水平。
- [0064] 图 5 为 PI-273 对乳腺癌细胞的抑制效果;
- [0065] a. 不同浓度的 PI-273 处理 MCF-7, T-47D, HS578T 细胞 24h, 48h, 72h 和 96h, 用 CFDA SE 实验检测细胞增殖效应;
- [0066] b. 不同浓度的 PI-273 处理 MCF-7, T-47D, HS578T 细胞 48h 后通过 PI 染色和流式细胞仪分析细胞周期变化;
- [0067] c. PI-273 处理细胞 48h, 72h 和 96h 后 TUNEL 检测细胞凋亡过程;
- [0068] d. e. PI-273 处理 MCF-7, T-47D, HS578T 细胞 14 天后, 检测平板成克隆和琼脂糖成克隆的数量。
- [0069] 图 6 为 PI-273 在移植瘤模型中的抗肿瘤作用;
- [0070] a. 肿瘤生长曲线。MCF-7 细胞移植到 BALB/c 裸鼠 4 天后连续 16 天腹腔注射 25mg/kg/day PI-273;
- [0071] b. 肿瘤重量;
- [0072] c. 小鼠体重变化;
- [0073] d. MCF-7 移植瘤的组织切片 TUNEL 染色;
- [0074] e. MCF-7 移植瘤的组织切片 Ki-67 染色;
- [0075] f. PI-273 对 MCF-7 移植瘤磷酸化 AKT 蛋白水平和 PI4P 含量的影响。

### 具体实施方式

- [0076] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明, 均为常规方法。
- [0077] 下述实施例中所用的材料、试剂等, 如无特殊说明, 均可从商业途径得到。
- [0078] 下述实施例细胞在 DMEM 营养混合物 (Kaighn's 改进) 中培养, 该营养混合物含有 10% 胎小牛血清 (Hyclone)、硫酸链霉素 (100ug/ml) 和氨苄青霉素 (100 单位/ml)。按照制造商的使用说明, 通过使用阳离子型脂质如 Lipofectamine 2000 (Invitrogen), 在 6 孔或 6-cm 板中进行转染 (30% -60% 汇合)。转染之后 6 小时细胞换液。

[0079] 下述实施例 PI4KII  $\alpha$  蛋白通过如下方法制备：

[0080] 表达 PI4KII  $\alpha$  和 GST 的重组载体为将序列 2 所示的 PI4KII  $\alpha$  蛋白编码基因插入 pGEX-6P-1 载体的 EcoR I 和 Xho I 酶切位点得到的重组载体；再将表达 PI4KII  $\alpha$  和 GST 的重组载体在 *E. coli* BL21 菌株中表达。菌株在 37℃ 生长到 OD600 达到 1.0 左右后加入 0.3mM IPTG 在 16℃ 诱导表达 18h。收菌后用含 50mM Hepes, 1M NaCl, 2mM DTT, 20mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM PMSF, 1mg/ml 溶菌酶的溶液重悬。用高压破碎仪在 30000psi 破碎细菌。4℃ 转速 12000g 下离心 40min, 取上清用 GST 亲和柱继续纯化。GST 标签用 PreScission 蛋白酶在 4℃ 含 50mM Hepes, 300mM NaCl, 0.1% Triton X-100 和 2mM MgCl<sub>2</sub> 的溶液中酶切过夜, 获得 PI4KII  $\alpha$  蛋白

[0081] 下述实施例 PI4KII  $\alpha$  激酶活性通过 ADP-Glo 激酶试剂盒（出售公司：Promega, 产品目录号：V9102）检测 ADP 的产生, 具体如下：

[0082] 将不同量的 PI4KII  $\alpha$  蛋白溶解在反应溶液中得到 PI4KII  $\alpha$  蛋白溶液, 不同量的底物磷脂酰肌醇（出售公司：Sigma, 产品目录号：P6636）用反应溶液重悬超声 30 分钟, 得到 PI 溶液；再将 1  $\mu$ l PI4KII  $\alpha$  蛋白溶液、7  $\mu$ l 反应溶液和 10  $\mu$ l PI 溶液混合, 加入 2  $\mu$ l ATP（出售公司：Promega, 产品目录号：V9102）在室温下反应 1min；再加入 20  $\mu$ l ADP-Glo 试剂（ADP-Glo 激酶试剂盒中自带）终止反应, 室温孵育 60 分钟；再加入 40  $\mu$ l 激酶检测试剂（ADP-Glo 激酶试剂盒中自带），室温继续孵育 60 分钟后, 用 Promega Glomax 发光检测仪在整合时间 1 秒记录化学发光信号值。

[0083] 反应溶液由 50mM Hepes、300mM NaCl、1mM EDTA、20mM MgCl<sub>2</sub> 和水组成。

[0084] 产物 ADP 的生成量与读取化学发光信号值的函数式： $Y = 0.000000431269X$ , Y 表示产物 ADP 的生成量 (nM), X 表示读取的化学发光信号值。

[0085] 下述实施例 PI4P 含量检测方法如下：

[0086] 用 5  $\mu$ l 的 CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O (1:2:0.8) 混合液重悬样品, 冰水浴超声 5 分钟后将点样到 PI4P 膜上；用含 3% BSA 的 PBS-T 溶液封闭 1 小时后加入 5mL PI4P 检测溶液（出售公司：Echelon Biosciences, 产品目录号：K-4000），室温孵育 1 小时；用 PBS-T 溶液（10mM 磷酸盐, 2.7mM 氯化钾, 137mM 氯化钠, 0.1% Tween-20, pH 7.4）清洗 3 次每次 5 分钟；加入 5mL PI4P 二抗检测溶液（出售公司：Echelon Biosciences, 产品目录号：K-4000），室温孵育 1 小时；用 PBS-T 溶液清洗 3 次每次 5 分钟；检测化学发光信号。

[0087] 上述 CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O (1:2:0.8) 混合液为将 CHCl<sub>3</sub>、MeOH 和 H<sub>2</sub>O 按照体积比为 1:2:0.8 混合, 得到的混合液。

[0088] 下述实施例动物研究的方法如下：

[0089] 按照食品与药物管理局的非临床实验室研究的良好实验室规范 (GLP 条例) 和根据作为立法基础的德国动物保护法进行体内实验。八周大小的雄性 BALB/c 裸鼠在 SPF 条件下保养, 皮下注射 MCF-7 细胞, 接种 4 天后, 按剂量 25mg/kg/day 腹腔注射 PI-27315 天后处死小鼠。期间用游标卡尺每周测三次肿瘤大小并计算肿瘤体积 [(最小直径)<sup>2</sup> × 最大直径]/2。

[0090] 实施例 1、PI4KII  $\alpha$  的小分子抑制剂 PI-273 的筛选

[0091] PI4KII  $\alpha$  的氨基酸序列为序列 1。

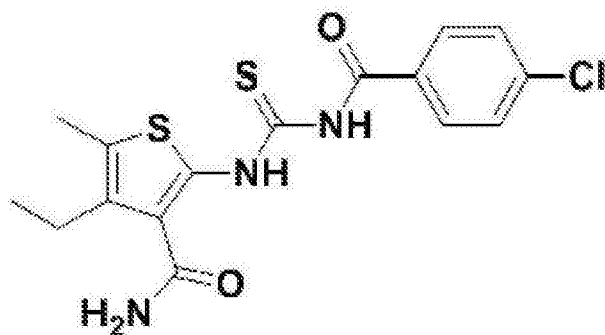
[0092] 基于 PI4KII  $\alpha$  结构从 SPECS 化合物库中虚拟筛选潜在的小分子抑制剂, 最终选

择了 142 个化合物。检测了这些化合物在  $100 \mu\text{M}$  时对 PI4KII  $\alpha$  抑制效果,进一步确定化合物对 PI4KII  $\alpha$  的半数抑制浓度。其中 PI-93 表现最好的抑制效果。根据 PI-93 化学结构选择了 53 个候选化合物,其中 PI-273 在体外酶活实验中  $\text{IC}_{50}$  为  $0.47 \mu\text{M}$ ,显著抑制 3 种乳腺癌 MCF-7, Hs 578T, T-47D 细胞系的生长。PI-273 处理 MCF-7 细胞后,PI4P 含量降低。PI-273 是 PI4KII  $\alpha$  潜在的激酶活性抑制剂。

[0093] PI-273 (结构式为式 1) 的筛选见图 1 所示,其中, a、PI-273 和 PI-69 的化学结构式;b、用 PI4K 激酶活性检测方法检测不同化合物对 PI4KII  $\alpha$  体外酶活抑制效果,化合物对乳腺癌细胞 MCF-7, Hs 578T, T-47D 细胞系处理 3 天后检测对细胞增殖能力的抑制效果;c. 用  $1 \mu\text{M}$  和  $3 \mu\text{M}$  PI-273 处理 MCF-7 细胞 2 天后收取细胞检测 PI4P 的含量变化。

[0094] PI-273 的化学结构式如下式 1 所示:

[0095]



式 1。

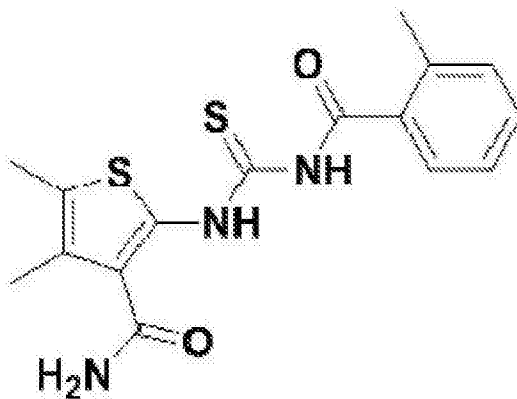
[0096] 实施例 2、PI-273 抑制 PI4KII  $\alpha$  酶活性

[0097] 一、PI-273 直接结合 PI4KII  $\alpha$  并可逆的抑制 PI4KII  $\alpha$

[0098] 检测 PI-273 及其类似物 PI-69、PI-277、PI-282 与 PI4KII  $\alpha$  是否有相互作用,下面的化合物分别为 PI-273、PI-69、PI-277 和 PI-282。具体如下:

[0099] PI-69 结构式为式 2 所示:

[0100]

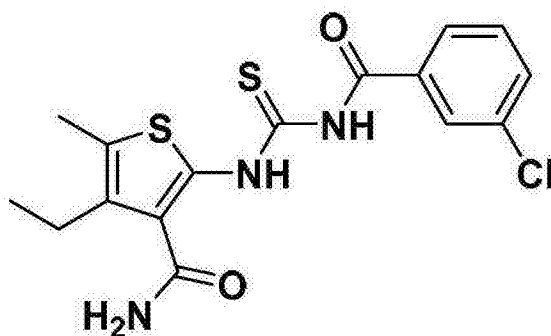


式 2

[0101] PI-277 结构式为式 3 所示:

[0102]

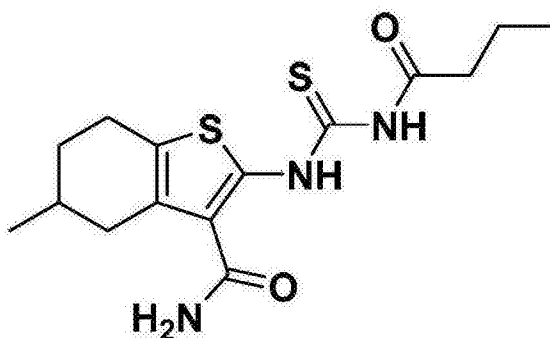




式 3

[0103] PI-282 结构式为式 4 所示：

[0104]



式 4.

[0105] 1) 表面等离子共振实验

[0106] 表面等离子共振实验在 GE 公司的 Biacore T200 进行。PI4KII  $\alpha$  蛋白与 CM5 芯片共价固定, 芯片在含 10mM HEPES (pH 7.4), 150mM NaCl, 3mM EDTA, 0.05% (v/v) 表面活性剂 P20, 0.1% (v/v) DMSO 的 HBS-EP 溶液中平衡；

[0107] PI-273、PI-69、PI-277 和 PI-282 分别等梯度稀释后与芯片结合解离各 120 秒；根据 Biacore T200 分析软件计算检测化合物与蛋白的结合解离常数。

[0108] 测得的 PI-273 结合解离常数为 9.49  $\mu\text{M}$  (图 2a), PI-277 结合解离常数为 9.59  $\mu\text{M}$ , PI-282 结合解离常数为 5.91  $\mu\text{M}$ 。

[0109] 上述结果表明, PI-273、PI-69、PI-277 和 PI-282 均能与 PI4KII  $\alpha$  蛋白相互作用。

[0110] 2) 蛋白热稳定性

[0111] 蛋白热稳定性实验在 ABI 公司的 7500 快速实时荧光定量 PCR 仪中进行。在含有 5  $\mu\text{M}$  PI4KII  $\alpha$  蛋白、5 $\times$ SYPRO orange 试剂 (出售公司: Sigma, 产品目录号: S5692) 和化合物的 20  $\mu\text{l}$  反应溶液从 25 $^{\circ}\text{C}$  加热到 95 $^{\circ}\text{C}$ , 通过蛋白热稳定性软件计算溶解温度值。

[0112] 上述化合物分别为 5  $\mu\text{M}$  PI-273、10  $\mu\text{M}$  PI-273、15  $\mu\text{M}$  PI-273、20  $\mu\text{M}$  PI-273、25  $\mu\text{M}$  PI-273、40  $\mu\text{M}$  PI-273、50  $\mu\text{M}$  PI-273 或 40  $\mu\text{M}$  PI-69。

[0113] 蛋白热稳定性分析结果如图 2b 所示, 表明 PI-273 能剂量依赖的增大 PI4KII  $\alpha$  的溶解温度, 而对 PI4KII  $\alpha$  无抑制效果的 PI-69 却不会增大 PI4KII  $\alpha$  的溶解温度。

[0114] 3) 细胞热转移分析实验

[0115] MCF-7 细胞 (购自 ATCC, ATCC 编号 ATCC® HTB-22™) 在含有  $1 \mu\text{M}$  PI-273 的细胞培养基中培养 96 小时后,收取细胞。液氮反复冻融 3 次,20000g 离心 30 分钟,取上清 50ul 每管分装在不同温度梯度下加热 3 分钟后室温冷却 3 分钟;加热后的裂解液 20000g 离心 30 分钟,取上清,为  $1 \mu\text{M}$  PI-273 处理 MCF-7 细胞产物,上样电泳,免疫印迹分析 PI4KII  $\alpha$  蛋白量。以 DMSO 为对照。

[0116] MCF-7 细胞液氮反复冻融 3 次,20000g 离心 30 分钟,取上清 50ul 每管分装在不同温度梯度下加热 3 分钟后室温冷却 3 分钟;获得 MCF-7 细胞裂解液,向 MCF-7 细胞裂解液中加入终浓度  $20 \mu\text{M}$  PI-273,静置 30 分钟后在不同温度梯度下加热 3 分钟后室温冷却 3 分钟,20000g 离心 30 分钟,取上清,为细胞裂解液用  $20 \mu\text{M}$  PI-273 处理 30 分钟产物,上样电泳,免疫印迹分析 PI4KII  $\alpha$  蛋白量。

[0117] 结果如图 2c 所示,用  $1 \mu\text{M}$  PI-273 处理 MCF-7 细胞 96 小时 (273 体内) 和细胞裂解液用  $20 \mu\text{M}$  PI-273 处理 30 分钟 (273 体外) 都会显著的改变 PI4KII  $\alpha$  的溶解曲线。对照处理中,50% PI4KII  $\alpha$  蛋白降解发生在  $60^\circ\text{C}$ ,而 PI-273 处理后,降解温度增大到  $72^\circ\text{C}$  (细胞) 和  $80^\circ\text{C}$  (细胞裂解液)。

[0118] 4) 反应初速率

[0119] A、PI-273 与 PI4KII  $\alpha$  孵育时间的影响

[0120] 将  $1 \mu\text{g}$  PI4KII  $\alpha$  蛋白溶解在 20ul 反应溶液中得到 PI4KII  $\alpha$  蛋白溶液,向 PI4KII  $\alpha$  蛋白溶液中加入不同量 PI-273,使 PI-273 终浓度分别为  $0.125 \mu\text{M}$ 、 $0.25 \mu\text{M}$ 、 $0.5 \mu\text{M}$ 、 $1 \mu\text{M}$ ;室温分别静置 5 分钟、10 分钟、20 分钟、40 分钟、60 分钟;再加入  $2 \mu\text{l}$  ATP 在室温下反应 1min;再加入  $20 \mu\text{l}$  ADP-Glo 试剂 (ADP-Glo 激酶试剂盒中自带) 终止反应,室温孵育 60 分钟;再加入  $40 \mu\text{l}$  激酶检测试剂 (ADP-Glo 激酶试剂盒中自带),室温继续孵育 60 分钟后,用 Promega Glomax 发光检测仪在整合时间 1 秒记录化学发光信号值。以不加入 PI-273 为正常组。

[0121] 上述反应溶液由 50mM HEPES、300mM NaCl、1mM EDTA、20mM  $\text{MgCl}_2$  和水组成。

[0122] 产物 ADP 的生成量与读取化学发光信号值的函数式:  $Y = 0.000000431269X$ , Y 表示产物 ADP 的生成量 (nM), X 表示读取的化学发光信号值。

[0123] 抑制率 (%) = PI-273 处理组 ADP 生成量 / 正常组 ADP 生成量 \* 100%

[0124] 结果如图 2d 所示,可以看出,PI-273 可抑制 PI4KII  $\alpha$  酶活性,且与蛋白孵育时间不影响 PI4KII  $\alpha$  酶活性。

[0125] B、PI-273 与 PI4KII  $\alpha$  直接可逆结合

[0126] 将不同量的 PI4KII  $\alpha$  蛋白溶解在反应溶液中得到 PI4KII  $\alpha$  蛋白溶液,其中 PI4KII  $\alpha$  的浓度分别为  $2.5 \text{ng}/\mu\text{l}$ 、 $5 \text{ng}/\mu\text{l}$ 、 $7.5 \text{ng}/\mu\text{l}$ 、 $10 \text{ng}/\mu\text{l}$ ;再向 PI4KII  $\alpha$  蛋白溶液中加入不同量 PI-273,使 PI-273 终浓度分别为  $0.5 \mu\text{M}$ 、 $1 \mu\text{M}$ 、 $2 \mu\text{M}$ ;室温静置 5 分钟;再加入  $2 \mu\text{l}$  ATP 在室温下反应 1min;再加入  $20 \mu\text{l}$  ADP-Glo 试剂 (ADP-Glo 激酶试剂盒中自带) 终止反应,室温孵育 60 分钟;再加入  $40 \mu\text{l}$  激酶检测试剂 (ADP-Glo 激酶试剂盒中自带),室温继续孵育 60 分钟后,用 Promega Glomax 发光检测仪在整合时间 1 秒记录化学发光信号值。

[0127] 上述反应溶液由 50mM HEPES、300mM NaCl、1mM EDTA、20mM  $\text{MgCl}_2$  和水组成。

[0128] 产物 ADP 的生成量与读取化学发光信号值的函数式:  $Y = 0.000000431269X$ , Y 表

示产物 ADP 的生成量 (nM), X 表示读取的化学发光信号值。

[0129] 初速率 = 产物 ADP 的浓度 / 时间

[0130] 结果如图 2e 所示, 可以看出, 同时加入抑制剂后测定不同酶浓度的反应初速率, 以初速率对酶浓度作图, 随着 PI-273 浓度增加, 曲线斜率降低。

[0131] 以上实验表明 PI-273 通过与 PI4KII  $\alpha$  直接可逆结合抑制其酶活性, 是 PI4KII  $\alpha$  的可逆抑制剂。

[0132] 二、PI-273 通过竞争 PI 抑制 PI4KII  $\alpha$

[0133] A、在不同浓度的底物 ATP 条件下, 检测不同浓度的 PI-273 (0-0.8  $\mu$ M) 下 PI4KII  $\alpha$  的酶活性, 求算  $V_{max}$  和  $K_m$  值

[0134] 将 1 $\mu$ g PI4KII  $\alpha$  蛋白溶解在 20 $\mu$ l 反应溶液中得到 PI4KII  $\alpha$  蛋白溶液, 向 PI4KII  $\alpha$  蛋白溶液中加入不同量 PI-273, 使 PI-273 终浓度分别为 0.2  $\mu$ M、0.4  $\mu$ M、0.8  $\mu$ M; 室温分别静置 5 分钟; 再加入 2  $\mu$ l 终浓度为 5  $\mu$ M、10  $\mu$ M、25  $\mu$ M、50  $\mu$ M、100  $\mu$ M ATP 在室温下反应 1min; 再加入 20  $\mu$ l ADP-Glo 试剂 (ADP-Glo 激酶试剂盒中自带) 终止反应, 室温孵育 60 分钟; 再加入 40  $\mu$ l 激酶检测试剂 (ADP-Glo 激酶试剂盒中自带), 室温继续孵育 60 分钟后, 用 Promega Glomax 发光检测仪在整合时间 1 秒记录化学发光信号值。

[0135] 上述反应溶液由 50mM Hepes、300mM NaCl、1mM EDTA、20mM MgCl<sub>2</sub> 和水组成。

[0136] 产物 ADP 的生成量与读取化学发光信号值的函数式:  $Y = 0.000000431269X$ , Y 表示产物 ADP 的生成量 (nM), X 表示读取的化学发光信号值。

[0137] 结果如图 3a。

[0138] B、在不同浓度的底物 PI 条件下, 检测不同浓度的 PI-273 (0-0.4  $\mu$ M) 下 PI4KII  $\alpha$  的酶活性, 求算  $V_{max}$  和  $K_m$  值。

[0139] 将 1 $\mu$ g PI4KII  $\alpha$  蛋白溶解在 20 $\mu$ l 反应溶液中得到 PI4KII  $\alpha$  蛋白溶液, 向 PI4KII  $\alpha$  蛋白溶液中加入不同量 PI-273 和 PI 磷脂酰肌醇, 使 PI-273 终浓度分别为 0.1  $\mu$ M、0.2  $\mu$ M、0.4  $\mu$ M, PI 的终浓度分别为 0.2mM、0.25mM、0.33mM、0.5mM、1mM; 室温分别静置 5 分钟; 再加入 2  $\mu$ l 终浓度为 100  $\mu$ M ATP 在室温下反应 1min; 再加入 20  $\mu$ l ADP-Glo 试剂 (ADP-Glo 激酶试剂盒中自带) 终止反应, 室温孵育 60 分钟; 再加入 40  $\mu$ l 激酶检测试剂 (ADP-Glo 激酶试剂盒中自带), 室温继续孵育 60 分钟后, 用 Promega Glomax 发光检测仪在整合时间 1 秒记录化学发光信号值。

[0140] 上述反应溶液由 50mM Hepes、300mM NaCl、1mM EDTA、20mM MgCl<sub>2</sub> 和水组成。

[0141] 产物 ADP 的生成量与读取化学发光信号值的函数式:  $Y = 0.000000431269X$ , Y 表示产物 ADP 的生成量 (nM), X 表示读取的化学发光信号值。

[0142] 结果如图 3b。

[0143] 从图 3a 和 3b 可以看出, 利用酶动力学方法, 在不同浓度 ATP 条件下, 增大 PI-273 浓度会减小最大反应速率 ( $V_{max}$ ), 但米氏常数 ( $K_m$ ) 并无显著变化, 说明 PI-273 是 ATP 的非竞争性抑制剂。在不同浓度 PI 条件下, 增大 PI-273 浓度最大反应速率 ( $V_{max}$ ) 不变, 但米氏常数 ( $K_m$ ) 会增大, 说明 PI-273 是 PI 的竞争性抑制剂。

[0144] C、5  $\mu$ M 各突变蛋白与 50  $\mu$ M PI-273 处理后, 用蛋白热稳定性实验检测蛋白溶解温度的变化

[0145] 野生型 PI4KII  $\alpha$  氨基酸序列为序列 1;

[0146] PI4KII  $\alpha$  突变体 $\Delta$  165-173 的氨基酸序列为将序列 1 的 165 位到 173 位氨基酸去除,其余序列 1 的氨基酸残基组成的蛋白;

[0147] PI4KII  $\alpha$  突变体 K165E/K168E/K172E 的氨基酸序列为将序列 1 的 165 位,168 位,172 位突变为谷氨酸得到的蛋白;

[0148] PI4KII  $\alpha$  突变体 Q171A 的氨基酸序列为将序列 1 的 171 位氨基酸突变为丙氨酸得到的蛋白;

[0149] PI4KII  $\alpha$  突变体 L153A 的氨基酸序列为将序列 1 的 153 位氨基酸突变为丙氨酸得到的蛋白;

[0150] PI4KII  $\alpha$  突变体 K152A 的氨基酸序列为将序列 1 的 152 位氨基酸突变为丙氨酸得到的蛋白;

[0151] PI4KII  $\alpha$  突变体 D346A 的氨基酸序列为将序列 1 的 346 位氨基酸突变为丙氨酸得到的蛋白;

[0152] PI4KII  $\alpha$  突变体 Y159A 的氨基酸序列为将序列 1 的 159 位氨基酸突变为丙氨酸得到的蛋白;

[0153] PI4KII  $\alpha$  突变体 Y159A/L349A 的氨基酸序列为将序列 1 的 159 位和 349 位氨基酸突变为丙氨酸得到的蛋白;

[0154] 按照前面蛋白热稳定性实验检测方法,通过蛋白热稳定性软件计算上述突变体溶解温度值,结果如图 3c,可以看出,野生型 PI4KII  $\alpha$  在与 PI-273 处理后,蛋白溶解温度会增大,但是突变或者截断棕榈酰化插入片段而可以显著减少增加的溶解温度。而突变核酸或者 PI 结合位点都不会有显著变化。提出了 PI4KII  $\alpha$  与 PI-273 结合模型。小分子结合位点在靠近棕榈酰化插入片段的位置。

[0155] D、PI-273 与 PI4KII  $\alpha$  的结合模型

[0156] 根据对接模型如图 3d,PI4KII  $\alpha$  的氨基酸残基 Asp412, Gln415, K418 与 PI-273 杂环形成 3 个氢键, Thr167, Lys168, Leu170, Gln171, Lys172, Phe179 残基与 PI-273R3 基团形成疏水作用。由于结合口袋的限制, R1/R2/R3 基团的大小受到限制。如果 R1 和 R2 是甲基和乙基, R3 可以大如苯类似物。如果 R1 和 R2 是五环或者六环, R3 只能是丙基或者丁基。单点氨基酸突变对于 PI-273 与突变蛋白的结合力没有影响,这可能是由于棕榈酰化插入片段在结构上的柔性。当同时突变三个氨基酸位点 K165E/K168E/K172E 则会减弱 PI-273 与突变蛋白的结合力。

[0157] 上述结果表明, PI-273 是 PI4KII  $\alpha$  底物 PI 的竞争性抑制剂,不是和 ATP 竞争。PI-273 通过竞争 PI 抑制 PI4KII  $\alpha$ 。

[0158] 三、PI-273 特异抑制 PI4KII  $\alpha$  酶活性

[0159] 通过确定激酶抑制剂的选择性避免由于脱靶效应引起的副作用。激酶选择性作用谱实验对于抑制剂的选择性和潜在的副作用的确定是必需的。检测了化合物对 32 种与 PIK 激酶信号通路相关的激酶的抑制效果。

[0160] 1、PI-273 对不同激酶的选择性抑制

[0161] 将图 4a 横坐标中的激酶均分别与 PI-273 和 PI-294 进行反应,检测激酶活性,具体如下:

[0162] 将 1 $\mu$ g 各激酶溶解在 20 $\mu$ l 反应溶液中得到激酶溶液,向激酶溶液中加入 PI-273

或 PI-294, PI-273 终浓度为  $5 \mu\text{M}$ , PI-294 的终浓度为  $5 \mu\text{M}$ ; 室温分别静置 5 分钟; 再加入  $2 \mu\text{l}$  终浓度为  $100 \mu\text{M}$  ATP 在室温下反应 1min; 再加入  $20 \mu\text{l}$  ADP-Glo 试剂 (ADP-Glo 激酶试剂盒中自带) 终止反应, 室温孵育 60 分钟; 再加入  $40 \mu\text{l}$  激酶检测试剂 (ADP-Glo 激酶试剂盒中自带), 室温继续孵育 60 分钟后, 用 Promega Glomax 发光检测仪在整合时间 1 秒记录化学发光信号值。以不加入 PI-294 或 PI-273 为正常组。

[0163] 上述反应在孔板中进行。

[0164] 上述反应溶液由 50mM Hepes、300mM NaCl、1mM EDTA、20mM  $\text{MgCl}_2$  和水组成。

[0165] 产物 ADP 的生成量与读取化学发光信号值的函数式:  $Y = 0.000000431269X$ , Y 表示产物 ADP 的生成量 (nM), X 表示读取的化学发光信号值。

[0166] 抑制率 (%) = PI-273 或 PI-294 处理组 ADP 生成量 / 正常组 ADP 生成量 \* 100%

[0167] 结果如图 4a 和 4b 所示, 可以看出,  $5 \mu\text{M}$  PI-273 和 PI-294 可以至少抑制 PI4KII  $\alpha$  80% 的酶活性, 抑制效果远远强于其余激酶。另外选择 7 种激酶测定 PI-273 和 PI-294 对其的半数抑制浓度。PI-273 和 PI-294 对 PI4KII  $\alpha$  半数抑制浓度分别为  $0.47 \mu\text{M}$  和  $0.41 \mu\text{M}$ 。其余 6 种激酶半数抑制浓度远高于 PI4KII  $\alpha$ 。即使是同源性最高的 PI4KII  $\beta$  亚型, PI-273 的  $\text{IC}_{50}$  值比 PI4KII  $\alpha$  高 30 倍; 结构与 PI3K 激酶相似的 PI4KIII  $\beta$  亚型, PI-273 的  $\text{IC}_{50}$  值达到  $100 \mu\text{M}$ 。这说明 PI-273 对于 PI4KII  $\alpha$  是特异抑制的, PI-273 为 PI4KII  $\alpha$  的抑制剂。

[0168] 2、PI-273 对 PI4KII  $\alpha$  的体内抑制特异性

[0169] pcDNA3.1-PI4KII  $\alpha$  为将 PI4KII  $\alpha$  的编码基因 (序列 2,) 插入 pcDNA3.1 载体 (出售公司: Invitrogen, 产品目录号: V800-20) 的 Xho I 和 EcoR I 酶切位点间得到的载体。

[0170] PI4KII  $\alpha$  siRNA 序列 3, UGAAGCAGAACCUCUCCUCATT;

[0171] Control siRNA 为序列 4, UUCUCCGAACGUGUCACGUTT;

[0172] A、细胞的增殖抑制

[0173] 将 PI4KII  $\alpha$  siRNA、control siRNA、pcDNA3.1-PI4KII  $\alpha$  和 pcDNA3.1 载体分别转染 MCF-7 细胞 48 小时后, 用终浓度  $2 \mu\text{M}$ 、 $4 \mu\text{M}$ 、 $5 \mu\text{M}$  PI-273 培养细胞 48 小时, 用 WST-8 细胞计数盒 (出售公司: Neuronbc, 产品目录号: 2011516888) 检测细胞增殖。

[0174] 结果如图 4c 所示, PI-273 通过特异抑制 PI4KII  $\alpha$  蛋白活性的从而抑制细胞的增殖。

[0175] 用终浓度  $0.1 \mu\text{M}$ 、 $0.5 \mu\text{M}$ 、 $1 \mu\text{M}$ 、 $5 \mu\text{M}$ 、 $10 \mu\text{M}$  PI-273 培养 MCF-7 细胞 3 天,  $100\text{ng}/\text{ml}$  EGF 处理 10 分钟, 免疫印迹法检测 HER-2 和 AKT 的磷酸化蛋白水平。

[0176] 结果如图 4d 所示, PI-273 抑制 MCF-7 细胞中 HER-2 和 AKT 蛋白的磷酸化。

[0177]  $1 \mu\text{M}$  PI-273、DMSO 处理对照和 PI4KII  $\alpha$  siRNA 转染的 MCF-7 细胞 3 天后, 按照前面的方法检测 PI4P 含量, 结果如 4e; 收集细胞免疫印迹法检测 AKT 磷酸化的蛋白水平, 结果如 4f, 可以看出, PI-273 特异的抑制 PI4KII  $\alpha$  蛋白活性进而抑制 AKT 的磷酸化水平。PI-273 抑制磷脂酰肌醇信号通路通过抑制 PI4KII  $\alpha$  酶活性实现。

[0178] 细胞活力实验显示, 在 MCF-7 细胞中过表达 PI4KII  $\alpha$  可以增加 PI-273 对细胞的敏感性, 而干扰 PI4KII  $\alpha$  的表达降低 PI-273 对细胞的敏感性, 结果表明 PI-273 通过 PI4KII  $\alpha$  影响细胞活力。以前的研究表明 PI4KII  $\alpha$  可以调节 HER-2 和 AKT 信号通路。PI-273 剂量和时间依赖的抑制 HER2/AKT 信号通路。然而 PI-273 的类似物 PI-294, PI-250,

PI-295, PI-308 在该信号通路上作用弱很多,这与细胞活力实验数据一致。发现在野生型细胞 PI-273 可以降低 40% PI4P 产生,而在干扰 PI4KII  $\alpha$  表达的细胞中,PI-273 不会显著降低 PI4P 的产生。同时,在野生型细胞 PI-273 可以降低 60% p-AKT 的水平,在干扰 PI4KII  $\alpha$  表达的细胞中则没有影响。

[0179] 上述结果证明,PI-273 是 PI4KII  $\alpha$  的特异性抑制剂。

[0180] 实施例 3、PI-273 抑制肿瘤

[0181] 一、PI-273 抑制肿瘤细胞

[0182] 进一步确定 PI-273 对 PI4KII  $\alpha$  酶活性抑制的生物效应,具体如下:3 种乳腺癌细胞系 MCF-7, T-47D, HS578T (均购自 ATCC, MCF-7 编号 ATCC<sup>®</sup> HTB-22<sup>™</sup>, T-47D 编号 ATCC<sup>®</sup> HTB-133<sup>™</sup>, HS578T 编号 ATCC<sup>®</sup> HTB-126<sup>™</sup>) 在含有 1  $\mu$ M 和 2  $\mu$ M PI-273 的细胞培养基中培养 24h, 48h, 72h 和 96h。

[0183] 用 CFDA SE 实验检测细胞增殖效应,0.5  $\mu$ M CFDA SE 标记细胞,1  $\mu$ M 和 2  $\mu$ M PI-273 处理细胞 24、48、72 和 96 小时后收集细胞,流式细胞仪检测荧光。结果如图 5a, 1  $\mu$ M 和 2  $\mu$ M PI-273 可以抑制 MCF-7 和 T-47D (人乳腺管癌细胞) 的细胞增殖,但是不影响 HS578T 的细胞增殖。说明 MCF-7 和 T-47D 细胞对 PI-273 更敏感。

[0184] 不同浓度的 PI-273 处理 MCF-7, T-47D, HS578T 细胞 48h 后通过 PI 染色和流式细胞仪分析细胞周期变化,结果如图 5b, PI-273 可以显著阻断细胞周期的 G2/M 期,尤其 MCF-7 和 T-47D 细胞对 PI-273 更敏感。

[0185] 不同浓度的 PI-273 处理 MCF-7, T-47D, HS578T 细胞 48h, 72h 和 96h 后 TUNEL 检测细胞凋亡过程,结果如图 5c, PI-273 处理后可以诱导 3 种乳腺癌细胞的凋亡,尤其在 MCF-7 细胞中。

[0186] 不同浓度的 PI-273 处理 MCF-7, T-47D, HS578T 细胞 14 天后,检测平板成克隆和琼脂糖成克隆的数量。结果如图 5d 和 5e,可以看出,在 MCF-7 和 T-47D 细胞中 1  $\mu$ M PI-273 处理可以减少大于 50% 的平板克隆和琼脂糖克隆的生长。在 HS578T 细胞对 PI-273 的敏感性低于另两种细胞。

[0187] 上述结果表明,PI-273 可以抑制肿瘤细胞增殖,使肿瘤细胞在 G2/M 期阻滞、促进肿瘤细胞凋亡和抑制细胞成瘤能力,肿瘤细胞主要为 MCF-7 和 T-47D。

[0188] 二、PI-273 在移植瘤模型中的抗肿瘤作用

[0189] 为了确定 PI-273 在体内是否能抑制乳腺癌,选择对 PI-273 敏感的 MCF-7 细胞系移植到 BALB/c 裸鼠中。细胞注射 4 天后,给小鼠腹腔注射 25mg/kg/day PI-273 和对照 5% DMSO。经 15 次注射后处死小鼠。测量肿瘤生长体积、肿瘤重量和小鼠体重。将 MCF-7 移植瘤的组织切片 TUNEL 染色和 Ki-67 染色。

[0190] 取肿瘤组织裂解提取蛋白样品,蛋白样品电泳后转膜,奶粉封闭 1 小时,AKT 磷酸化抗体孵育 1 小时后清洗,二抗孵育 1 小时后清洗,显色凝胶成像分析 AKT 蛋白的磷酸化水平;取肿瘤组织裂解提取脂质,点样到硝酸纤维膜上,PBST 溶液封闭 1 小时,PI4P 抗体孵育 1 小时后清洗,二抗孵育 1 小时后清洗,显色凝胶成像分析。

[0191] 结果如图 6 所示, a. 肿瘤生长曲线;MCF-7 细胞移植到 BALB/c 裸鼠 4 天后连续 16 天腹腔注射 25mg/kg/day PI-273 ;b. 肿瘤重量 ;c. 小鼠体重变化 ;d. MCF-7 移植瘤的组织切片 TUNEL 染色 ;e. MCF-7 移植瘤的组织切片 Ki-67 染色 ;f. PI-273 对 MCF-7 移植瘤磷

酸化 AKT 蛋白水平和 PI4P 含量的影响 ;可以看出, PI-273 显著抑制 MCF-7 移植瘤的体积和重量 (图 6a 和 6b)。另外一组小鼠腹腔注射 50mg/kg/2day 的 PI-273 和对照,该剂量的 PI-273 也可抑制 MCF-7 移植瘤的生长,但抑制效果较 25mg/kg/dayPI-273 处理组弱。没有发现 PI-273 处理组小鼠有嗜睡,体重减少或者其他的身体不适的现象 (图 6c), PI-273 处理组小鼠各组织器官经 HE 染色后没有发现组织损伤。小鼠的组织切片经 TUNEL 染色后发现 PI-273 处理组的凋亡细胞增加 (图 6d);Ki-67 染色表明 PI-273 处理组细胞增殖减弱 (图 6f)。PI-273 处理组的肿瘤组织 PI4P 含量和 AKT 磷酸化水平较对照组显著降低。

[0192] 上述结果证明 :PI-273 抑制乳腺癌,可抑制 MCF-7 诱导的乳腺癌的增殖、存活和 AKT 信号通路。

[0001]

<110>中国科学院生物物理研究所；中国科学院上海药物研究所

<120>肌醇磷脂 4 位激酶二型  $\alpha$  亚型特异抑制剂 PI-273 的应用

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 479

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 1

Met Asp Glu Thr Ser Pro Leu Val Ser Pro Glu Arg Ala Gln Pro Pro  
1                    5                    10                    15

Asp Tyr Thr Phe Pro Ser Gly Ser Gly Ala His Phe Pro Gln Val Pro  
                  20                    25                    30

Gly Gly Ala Val Arg Val Ala Ala Ala Ala Gly Ser Gly Pro Ser Pro  
                  35                    40                    45

Pro Gly Ser Pro Gly His Asp Arg Glu Arg Gln Pro Leu Leu Asp Arg  
                  50                    55                    60

Ala Arg Gly Ala Ala Ala Gln Gly Gln Thr Gln Thr Val Ala Ala Gln  
65                    70                    75                    80

Ala Gln Ala Leu Ala Ala Gln Ala Ala Ala Ala Ala His Ala Ala Gln  
                  85                    90                    95

[0002]



Ala His Arg Glu Arg Asn Glu Phe Pro Glu Asp Pro Glu Phe Glu Ala  
 100 105 110

Val Val Arg Gln Ala Glu Leu Ala Ile Glu Arg Cys Ile Phe Pro Glu  
 115 120 125

Arg Ile Tyr Gln Gly Ser Ser Gly Ser Tyr Phe Val Lys Asp Pro Gln  
 130 135 140

Gly Arg Ile Ile Ala Val Phe Lys Pro Lys Asn Glu Glu Pro Tyr Gly  
 145 150 155 160

His Leu Asn Pro Lys Trp Thr Lys Trp Leu Gln Lys Leu Cys Cys Pro  
 165 170 175

Cys Cys Phe Gly Arg Asp Cys Leu Val Leu Asn Gln Gly Tyr Leu Ser  
 180 185 190

Glu Ala Gly Ala Ser Leu Val Asp Gln Lys Leu Glu Leu Asn Ile Val  
 195 200 205

Pro Arg Thr Lys Val Val Tyr Leu Ala Ser Glu Thr Phe Asn Tyr Ser  
 210 215 220

Ala Ile Asp Arg Val Lys Ser Arg Gly Lys Arg Leu Ala Leu Glu Lys  
 225 230 235 240

Val Pro Lys Val Gly Gln Arg Phe Asn Arg Ile Gly Leu Pro Pro Lys  
 245 250 255

Val Gly Ser Phe Gln Leu Phe Val Glu Gly Tyr Lys Asp Ala Asp Tyr  
 260 265 270

[0003]

Trp Leu Arg Arg Phe Glu Ala Glu Pro Leu Pro Glu Asn Thr Asn Arg  
 275 280 285

Gln Leu Leu Leu Gln Phe Glu Arg Leu Val Val Leu Asp Tyr Ile Ile  
 290 295 300

Arg Asn Thr Asp Arg Gly Asn Asp Asn Trp Leu Ile Lys Tyr Asp Cys  
 305 310 315 320

Pro Met Asp Ser Ser Ser Ser Arg Asp Thr Asp Trp Val Val Val Lys  
 325 330 335

Glu Pro Val Ile Lys Val Ala Ala Ile Asp Asn Gly Leu Ala Phe Pro  
 340 345 350

Leu Lys His Pro Asp Ser Trp Arg Ala Tyr Pro Phe Tyr Trp Ala Trp  
 355 360 365

Leu Pro Gln Ala Lys Val Pro Phe Ser Gln Glu Ile Lys Asp Leu Ile  
 370 375 380

Leu Pro Lys Ile Ser Asp Pro Asn Phe Val Lys Asp Leu Glu Glu Asp  
 385 390 395 400

Leu Tyr Glu Leu Phe Lys Lys Asp Pro Gly Phe Asp Arg Gly Gln Phe  
 405 410 415

His Lys Gln Ile Ala Val Met Arg Gly Gln Ile Leu Asn Leu Thr Gln  
 420 425 430

Ala Leu Lys Asp Asn Lys Ser Pro Leu His Leu Val Gln Met Pro Pro  
 435 440 445

[0004]

Val Ile Val Glu Thr Ala Arg Ser His Gln Arg Ser Ser Ser Glu Ser  
 450 455 460

Tyr Thr Gln Ser Phe Gln Ser Arg Lys Pro Phe Phe Ser Trp Trp  
 465 470 475

<210> 2

<211> 1440

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 2

```

atggacgaga cgagcccact agtgtccccc gagcggggccc aacccccgga ctacacetic      60
ccgtcgggct cgggcgctca ctttccgcag gtgcccgggg gcgcggtccg agtggeggcg      120
gcggccggct cgggcccctc tccgccgggc tcgccgggccc acgaccgcga ggggcagcca      180
ctgttggate gggeccgggg cgeggeggcc cagggccaga cccaaaccgt ggcggcgcag      240
gcccaggctc tggccgctca ggccgcggcg geageccacg ccgctcagge ccaccgcgag      300
cggaacgagt tcccggagga tcttgagttc gaggcggttg tgcggcaggc cgagctgccc      360
atcgagcget gcatetttcc egagcgcate taccagggct ccagcgggaag ctacttcgctc      420
aaggaccctc aggggaggat cattgctgtc ttcaaacca agaatgaaga gccctatggg      480
catettaate ctaagtggac caagtggetg cagaagctgt getgtccttg ctgctttgce      540
cgtgactgcc ttgtccttaa ccagggctat ctctcagaag caggggccag cctggtggac      600
caaaaactgg aactcaacat tgttccccgt acaaaggtag tatacctgge cagtgcagacc      660
ttcaactata gtgccattga ccgagtgaag tccaggggca agcggcttgc actagagaaa      720
gtgccaaaag ttggacagcg gtttaaccgc ategggctac caccaaaggt tggttcattc      780
cagctctttg ttgaaggcta caaagatgca gactattgce tgcggcgttt tgaagcagaa      840
cctcttcttg agaacaacta ccggcaacta ctgctccagt ttgagcggtt ggtggtgctg      900
gattacatca tccgcaaac acgatcagggc aatgacaact ggetgattaa atatgactgt      960
ccaatggata gttctagctc tcgggacaca gactgggttg tggtaagga gcctgttate      1020
aaggtggetg ccatagacaa tgggctggcc tteccactga agcatcctga ctctggagg      1080
gcatatcctt tttactgggc ctggttgccc caggcgaaag tccattttc tcaggagate      1140
aaagatctga tcttccaaa gatateggac cctaacttcg tcaaggactt ggaagaggac      1200

```

[0005]

ctatatgaac ttttcaagaa agatcctggt ttcgacaggg gccagttcca taagcagatt	1260
gctgicatgc ggggccagat cttaaattctg acccaggect tgaagacaa caagagtccc	1320
ctgcacctcg tccagatgcc acctgtgatt gtcgagacgg cccgttccca ccagcggctt	1380
tctagegagt cctacacaca gagcttctag agccggaage ccttcttttc atggtggtaa	1440

<210> 3

<211> 23

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 3

ugaagcagaa ccucuuccuc att	23
---------------------------	----

<210> 4

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 4

uucuccgaac gugucacguf t	21
-------------------------	----

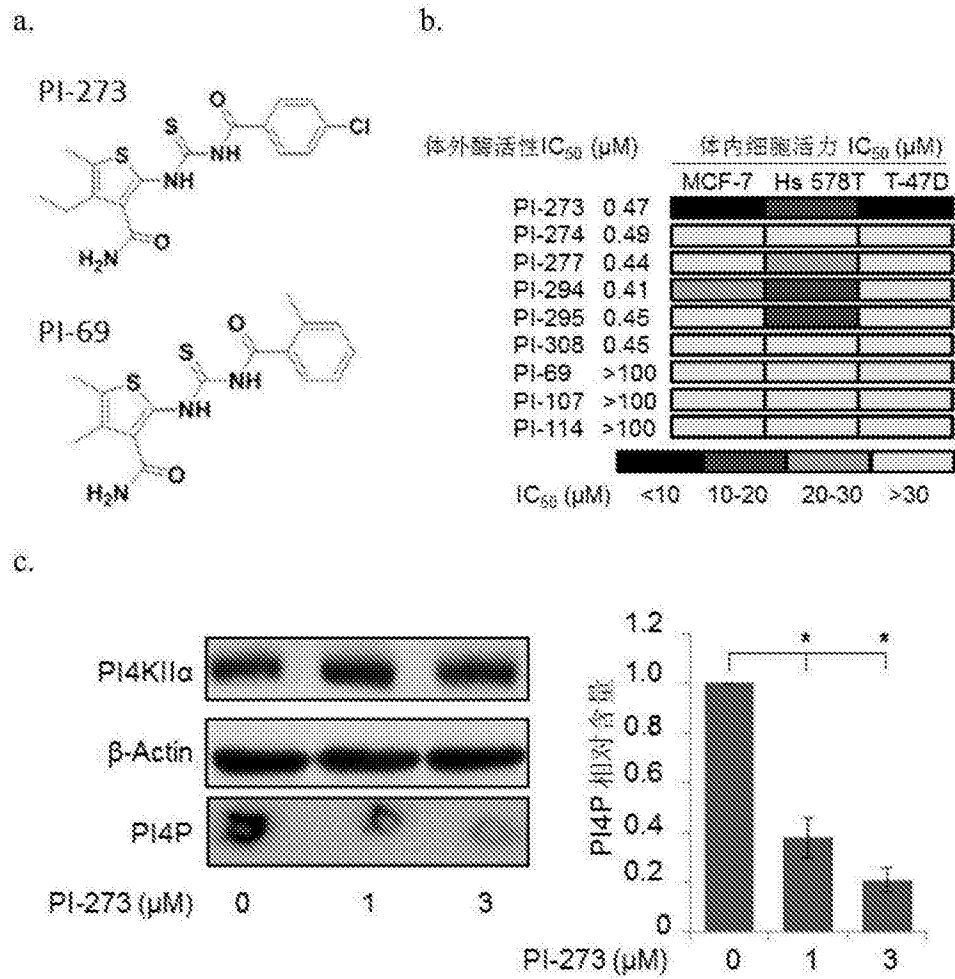


图 1

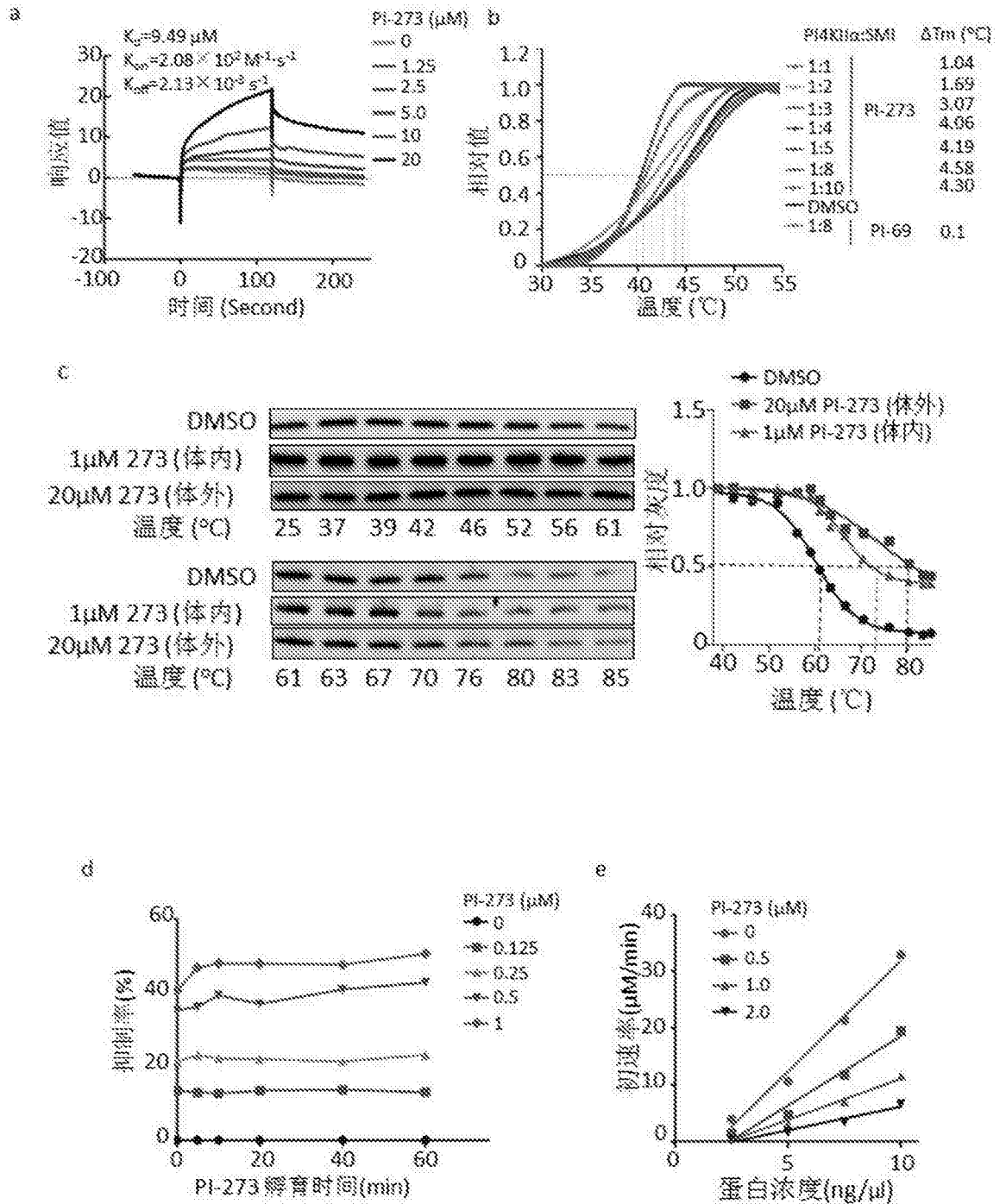


图 2

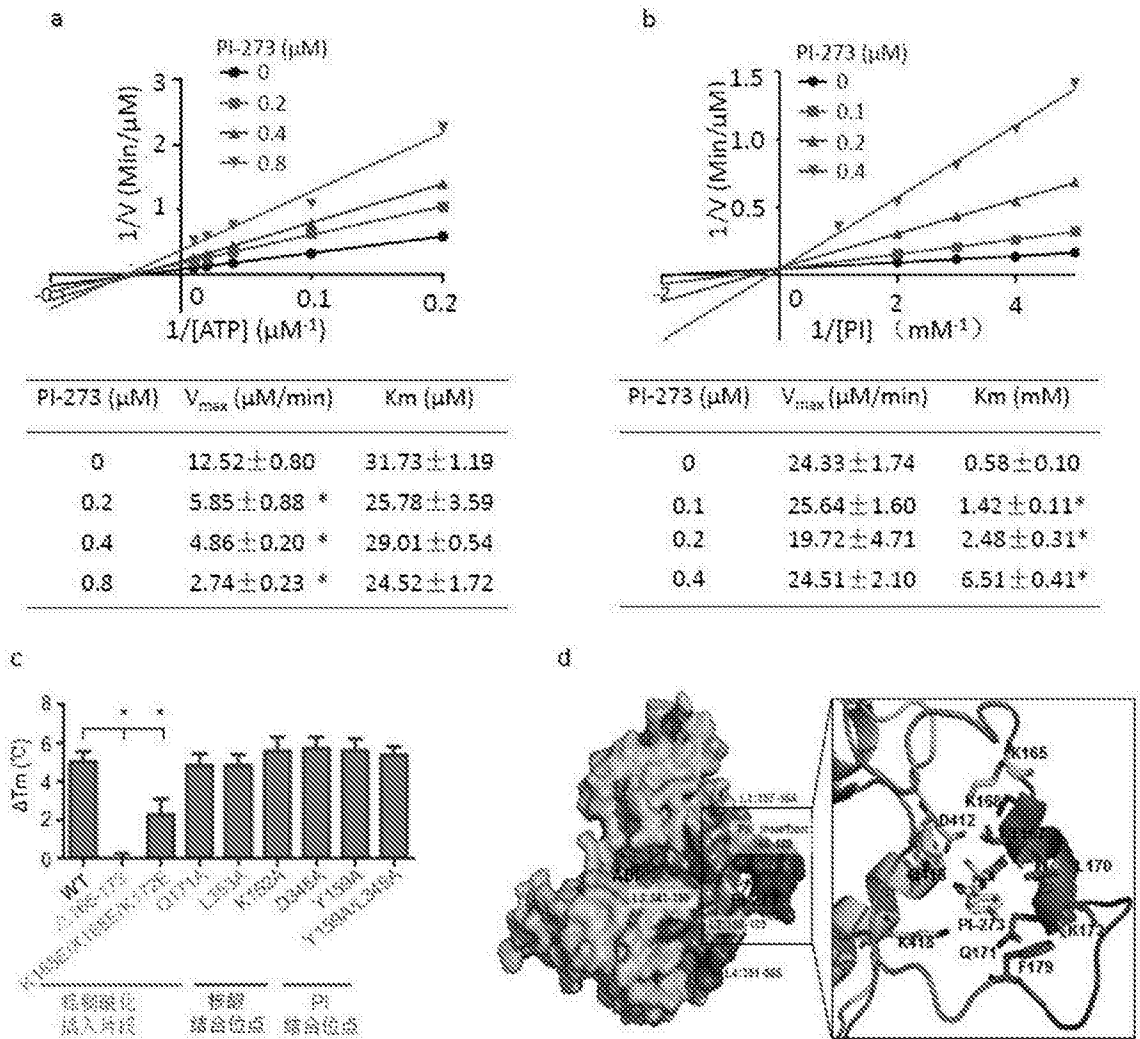
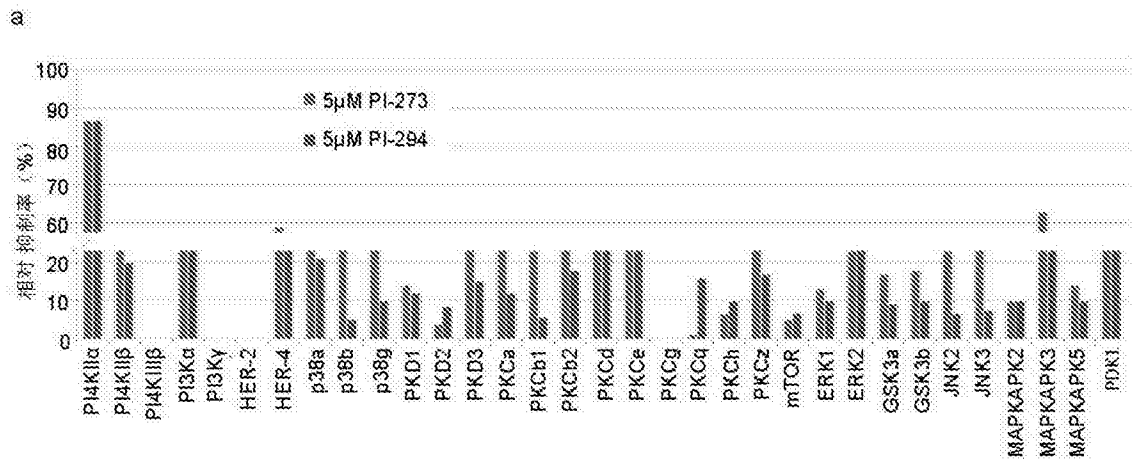


图 3



b

激酶	IC <sub>50</sub> (µM)	PI-273	PI-294
PI4KIIα		0.47	0.41
PI4KIIβ		14.4	33.9
PI4KIIIβ		100	>100
GSK3b		49.6	53.6
ERK1		70.1	>100
MAPKAPK3		9.6	29.9
PKD1		59.7	>100

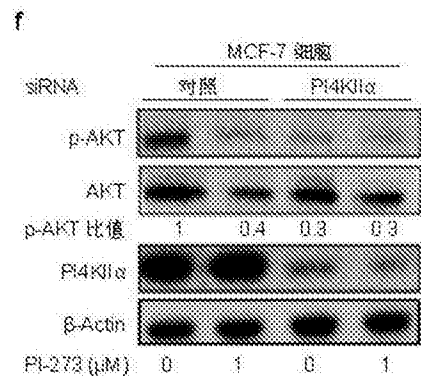
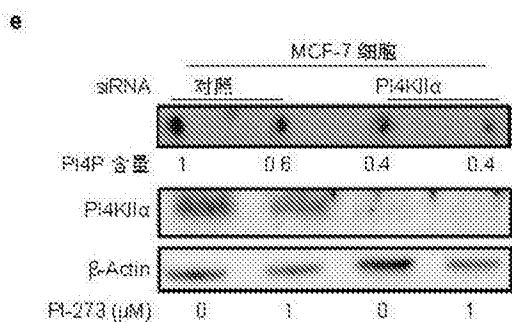
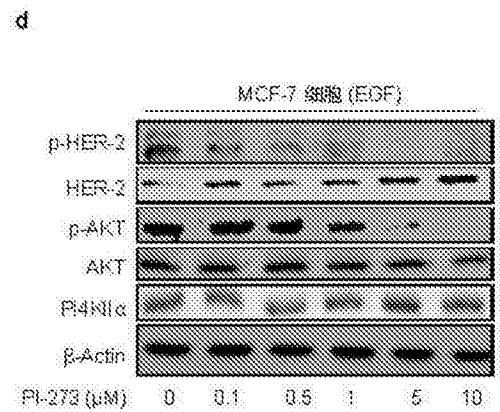
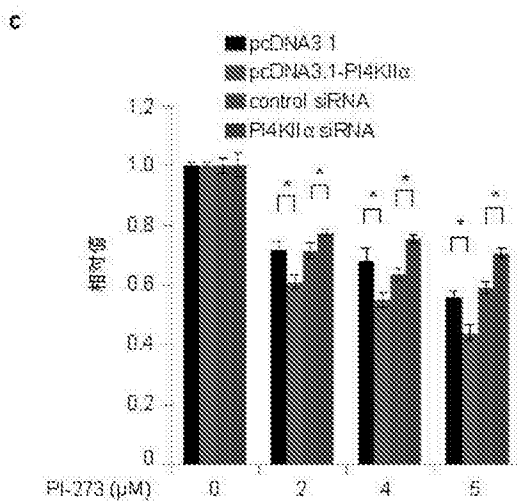


图 4



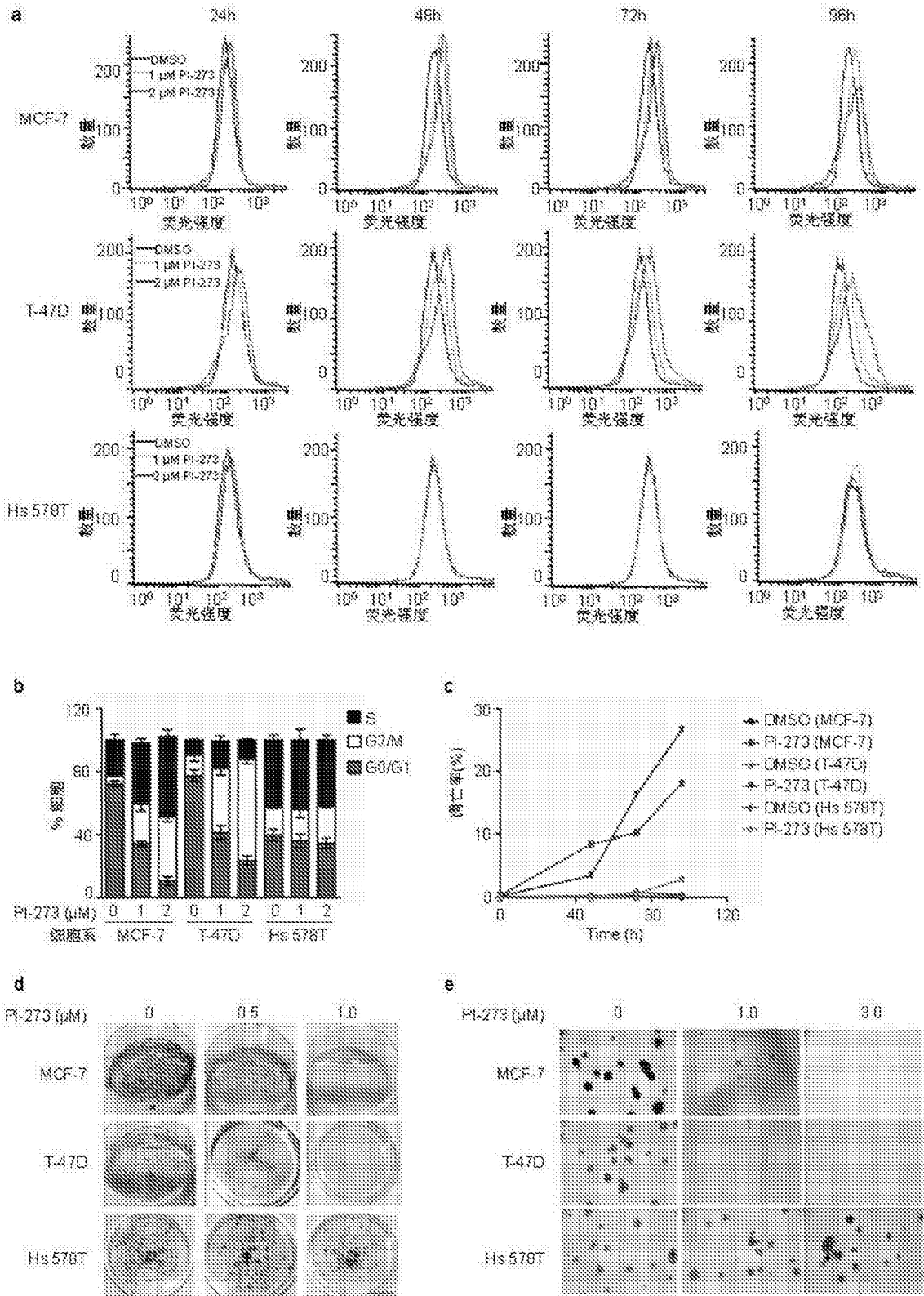


图 5

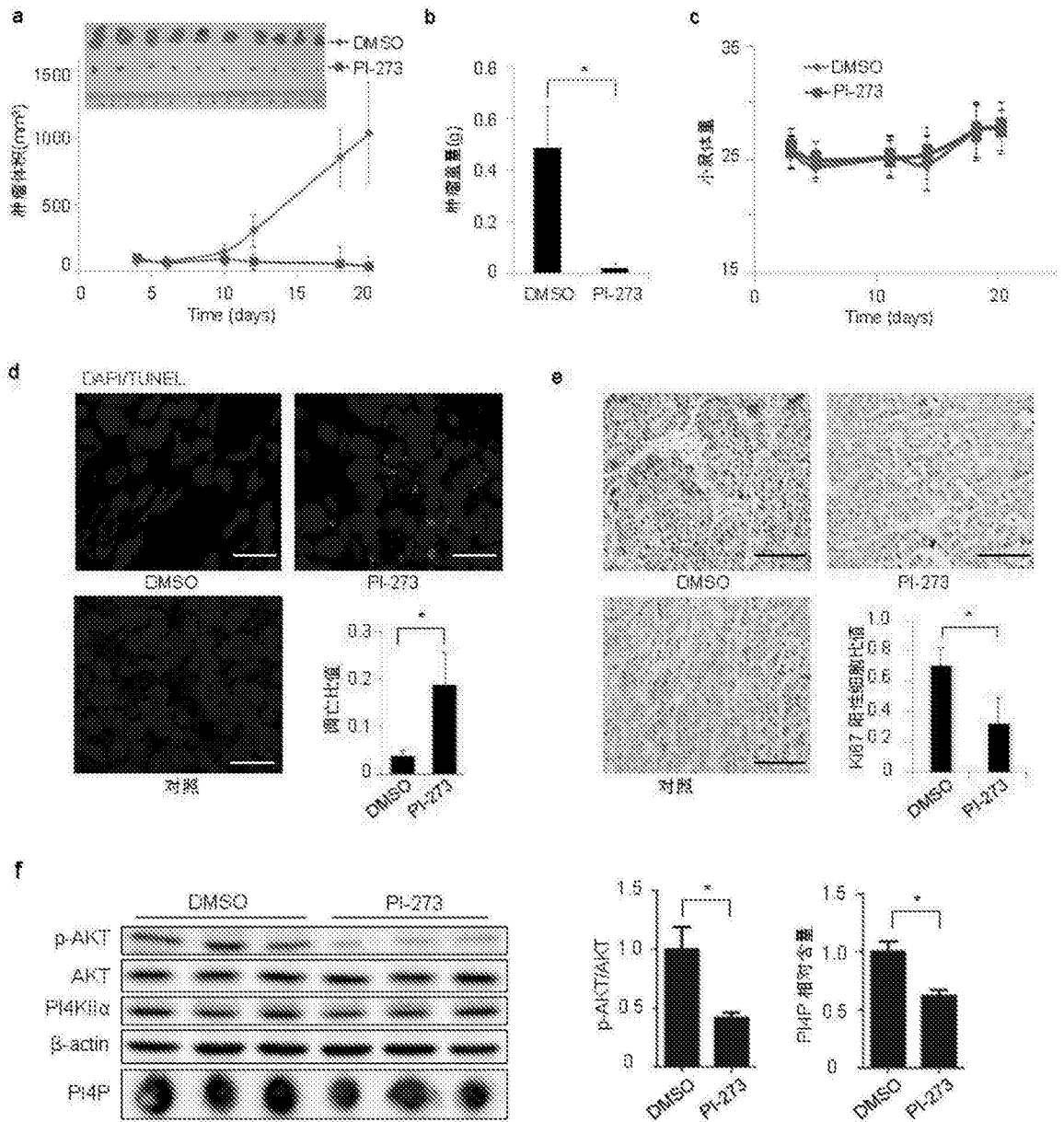


图 6