

國立臺灣大學醫學院藥理學研究所

碩士論文

Graduate Institute of Pharmacology

College of Medicine

National Taiwan University

Master Thesis

探討新合成 HSP90 抑制劑 MPT0G256 誘導細胞凋亡與
合併 gemcitabine 呈現協同作用於人類非小細胞肺癌之
體外及體內作用機轉

MPT0G256, a novel synthetic HSP90 inhibitor, induces
cell apoptosis and displays synergistic anti-cancer activity
with gemcitabine in human lung adenocarcinoma *in vitro*
and *in vivo*.

陳俊瑋

Chun-Wei Chen

指導教授：鄧哲明 博士，潘秀玲 博士

Advisor: Che-Ming Teng, Ph.D., Shiow-Lin Pan, Ph.D.

中華民國 104 年 6 月

June, 2015



目 錄



口試委員審定書.....	I
致謝.....	II
縮寫表.....	IV
中文摘要.....	1
英文摘要.....	2
第一章 研究動機與目的.....	4
第二章 文獻回顧.....	5
第三章 實驗材料與方法.....	46
第一節 實驗材料.....	46
第二節 實驗方法.....	48
第四章 實驗結果.....	54
第五章 討論.....	63
第六章 結論與展望.....	69
參考文獻.....	96

國立臺灣大學碩士學位論文

口試委員會審定書

探討新合成 HSP90 抑制劑 MPT0G256 誘導細胞凋亡
與合併 gemcitabine 呈現協同作用於人類非小細胞
肺癌之體外及體內作用機轉

MPT0G256, a novel synthetic HSP90 inhibitor, induces
cell apoptosis and displays synergistic anti-cancer activity
with gemcitabine in human lung adenocarcinoma
in vitro and *in vivo*.

本論文係陳俊瑋君 (R02443007) 在國立臺灣大學藥理
學研究所完成之碩士學位論文，於民國 104 年 6 月 17 日承
下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員： 鄧哲明 (指導教授)
陳育玲 (指導教授)

顏茂雄
楊春茂
黃德高

所長： 林琨瑛

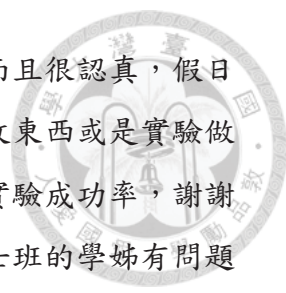
致 謝



大學畢業那年推甄進入鄧老師實驗室，老師一直是笑容滿面，一開始只是感覺老師好像很忙，開會或是審查案子成了日常的行程，由後續的血栓論著選讀、專題報告、中午和老師吃飯，才發現老師的真材實料，對於新藥研發的流程、審查有許多想法，非常務實，同時非常的通人情，制式化的體制總要給人們緩衝的空間，除了知識的增長，特別記得一次與老師的午餐，老師說：人際關係也是非常重要。老師也非常的會鼓勵同學，不論是自己的學生或是其他報告的學生，令人充滿正向的能量，今天我要畢業了，我將帶著老師、學長姐、父母與同學賦予我的這些能量，踏出台大的校園，有些迷惘，但是經由老師的耳濡目染、外賓演講、藥廠參觀，我相信我能成功，為了自己也為了父母，謝謝老師這兩年的教誨。潘老師，北醫計劃王，總是很風趣，做事總給人優雅的感覺，卻不失效率，跟您討論進度總能解決很多問題，謝謝您在實驗與日常生活的幫忙。同時也謝謝口試委員楊春茂、顏茂雄、黃德富老師，謝謝你們於口試提供的寶貴意見與想法，讓我受益良多。

那一年踏入台大藥理，由於大學時代大多是紙上談兵課程，那時的我對於「做研究」並沒有太多的想法，甚麼都不懂，彷彿剛學步的孩童。一年級時坐進 1151 實驗室，那時 1151 非常熱鬧，美全學姊，一直記得學姊跟業務的介紹：我是美全，美麗的美，完全的全。雖然不常問妳問題，不過學姊的直率跟適時罵髒話，讓我覺得學姊很親民。琪琪是大家的心靈導師，談話尺度很寬，懂滿多生活冷知識的，感謝妳替實驗室肅殺的氣氛帶來幽默。怡琳自從不把爛掉的花倒掉，放學時伸懶腰爛花水灑滿頭髮，從此被稱為臭頭怡琳，還是生活中的衰神，時不時電腦當機、一出門就下雨，我真的是不知道怎麼說妳，只能帶妳去行天宮拜拜，看能不能改運一下，謝謝妳跟家銘在動物實驗上的幫忙。思穎學姊，同為雙子座，總能聽懂我的話中話，跟妳聊天很輕鬆，沒有太多代溝或是上對下的感覺，相信學姊去美國一定也會有自己的一片天。

也謝謝 1143 的學長姐的幫忙。雅玲學姊，學姊總是幫大家買實驗器材、整理照片，非常得老師重用，雖然常常因為浪費實驗耗材被學姊念，不過就是因為有學姊這個生活班長的存在，實驗室生活才能如此井然有序，謝謝妳的付出。耙子



學姊，雖然接觸只有一年，學姊的思考很快，實驗也很俐落，而且很認真，假日作息都跟平日做實驗一樣，雖然我一年級時滿雷的，很常忘記收東西或是實驗做不好，常惹妳翻白眼，不過妳還是會跟我說該怎麼修正與增加實驗成功率，謝謝妳的幫忙。敏吾學姊，就好像大家的祿姆，我跟子涵，或是博士班的學姊有問題都會找妳討論，在妳身上我看見了「博學」兩個字，也謝謝妳在百忙之中抽空幫我看進度，解決實驗上的問題，如同阿潘學姐說的，這屆碩士班似乎有高人指點，妳就是那位我實驗室生涯的高人，非常感謝。瀚立學姊，跟我姊一樣是標準的雙魚座，實驗很認真，活動也很主動幫忙，除了幫忙其他實驗室的同學，也時常幫我跟子涵解決實驗上的問題，特別謝謝妳抽空幫我看論文及聽我模擬口試。之雅學姊，做事非常的謹慎，雖然有一段時間有一些誤會跟我有點處不好，幾經檢討發現是自己做事不夠周全，也於之後主動釋出善意，跟學姊變成了好朋友，才發現學姊不論是在實驗還是籌備活動上都是非常全面周全的，令人欽佩。小白學姊，一提到妳就會想到妳驚訝到下巴掉下來的表情，真是非常有記憶點，學姊也很熱心，活動都幫忙集思廣益，希望妳出去工作後，工作及家庭都順利。

和穎，從大學就是好麻吉，從近來口試時就提醒我許多技巧，進來後剛開始實驗不懂的地方不敢問學姊，就先問你，雖然生活中你很搞笑，但實驗上並不會拖泥帶水，也謝謝你在我被學姊念的時候給我加油打氣，平時放假我們也會約吃飯，希望這段友誼能繼續保持下去，我們都是台北人，一定還有許多機會一起出去玩。珏衡，謝謝妳在入學時借我自傳參考，也跟妳實驗上許多問題，妳總是能提供自己綜合所有要素認為最好的解決方式，非常感謝。子涵，剛進來時妳還有些台大氣場，早上精神不好會有點小脾氣，但經過兩年的光陰，妳已變得平易近人，也交到了男朋友，實驗上非常的認真，也很熱心幫忙解決許多活動的問題，感覺有點被我影響變得說話很直接，不過也是滿令人回味的，那一年，我們一起噴學弟妹不打招呼，謝謝妳在實驗及生活上的幫忙，友誼長存。

最後謝謝我的父親陳泰宏、母親簡淑純的養育之恩，沒有你們生活的支持，我不會有今日的成就。謝謝姊姊陳韻如在我出門在外實驗到很晚時，陪媽媽聊天、出去玩。謝謝大舅簡錦祥對於阿嬤的照顧，讓我能專心於學業上。謝謝表妹簡千枝、簡佑家在生活上的幫忙，跟妳們聚餐很開心。

僅此，對於所有幫助過我的人們，致上最高的謝意。

縮寫表



17-AAG	17-Allylamino-17-demethoxy geldanamycin
17-DMAG	17-Dimethylamino ethylamino-17-demethoxygeldanamycin
ALK	Anaplastic lymphoma kinase
Apaf-1	Apoptotic protease activating factor 1
BAD	BCL-2-associated agonist of cell death
BAX	BCL-2-associated X protein
BCL-2	B-cell lymphoma 2
BIM	BCL-2-interacting mediator of cell death
Cdk	Cyclin-dependent kinase
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
EGFR	Epithelial growth factor receptor
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EML4	Echinoderm microtubule-associated protein-like 4
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FAK	Focal adhesion kinase
FBS	Fetal bovine serum
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FoxO	Forkhead box O transcription factors
GAP	GTPase-activating protein
GEF	Guanine nucleotide exchange factor
GI ₅₀	Median growth inhibition

GIST	Gastrointestinal stromal tumors
GSK3 α /3 β	Glycogen synthase kinase 3 α /3 β
GRB2	Growth factor receptor-bound-2
HDAC	Histone deacetylase
HIF1 α	Hypoxia-inducible factor 1 α
HSF	Heat shock transcription factor
HSP	Heat shock protein
IC ₅₀	Median inhibition concentration
IPI-504	17-Allylamino-17-demethoxygeldanamycin hydroquinone hydrochloride
K-Ras	Kirsten rat sarcoma 2 viral oncogene homolog
MMP-2	Metalloproteinase-2
MTT	3- (4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
NSCLC	Non-small cell lung cancer
PARP	Poly (ADP-ribose) polymerase
PI3K	Phosphoinositide-dependent kinase 1
PI	Propidium iodide
SOS	Son of sevenless
SRB	Sulforodamine B
TKI	Tyrosine kinase inhibitor
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor



中文摘要



肺癌不論在全球或是台灣，都位居癌症致死率之首。由於病灶早期不易察覺，確診時常為病灶晚期或已有轉移情形，需要依靠全身性化療藥物或標靶藥物治療。目前的標靶藥物雖然有效提升病患的存活率，但部分病患使用單一機轉標靶藥物後會有抗藥性的產生，使得新機轉藥物的研發是急迫且必須的。

Heat shock protein 90 (HSP90) 是一個 molecular chaperone，藉由幫助其受質蛋白 (client proteins) 正確的折疊與增強蛋白質間作用力，使其正常的運作。非小細胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 中許多的致癌性蛋白是 HSP90 的受質蛋白，也因此，針對肺癌發展 HSP90 的抑制劑被認為是有潛力的發展方向。

MPT0G256 是一個全合成的 HSP90 抑制劑，對於肺腺癌 (adenocarcinoma) 在體外與體內都展現出有效抑制癌細胞生長的作用。首先藉由 SRB assay 與 MTT assay 測定 MPT0G256 於體外抑制多種人類癌症細胞株的能力，發現 MPT0G256 對於人類非小細胞肺癌 A549 細胞有最強力的抑制細胞增生與毒殺細胞的作用；藉由 HSP90 α activity assay kit 也發現 MPT0G256 能有效抑制 HSP90 α 的活性。此外，藉由抑制 HSP90 α 活性，MPT0G256 能有效降低致癌性受質蛋白，如 EGFR、Akt、MEK 及 Cdk1 的表現，抑制多條細胞存活相關的訊息路徑，如 PI3K/Akt/mTOR pathway、MAPK kinase pathway。MPT0G256 也會導致 A549 細胞週期停滯於 G₂/M 期與細胞凋亡，同時伴隨著有 Heat shock protein 70 (HSP70) 代償性上升的現象。

接著我們探討併用 MPT0G256 與傳統化療藥 gemcitabine 或 HSP70 抑制劑 Ver155008 於 A549 與 NCI-H1975 細胞體外的作用。發現 MPT0G256 併用兩者都能協同性地抑制細胞生長，且增強 HSP90 受質蛋白降解與細胞凋亡情形，同時也測得併用藥物會造成細胞週期的影響。

藉由 tissue microarrays，發現 HSP90 在肺腺癌組織有較正常組織高度表現的情形，故我們接著探討 MPT0G256 併用 gemcitabine 於 A549 xenograft 的作用。發現單獨使用 MPT0G256 或 gemcitabine 都能有效抑制 A549 腫瘤生長，併用後呈現出更佳的抑制作用，且能有效降解體內腫瘤組織 HSP90 受質蛋白表現。

綜合以上結果，我們認為新合成的 HSP90 抑制劑 MPT0G256 具備新藥研發的潛力，且合併 gemcitabine 治療策略於 NSCLC 治療是一個有潛力的發展方向。

Abstract



Lung cancer is the leading cause of cancer death worldwide. Although targeted therapies have led to remarkable improvements in response and survival, some patients will develop acquired drug resistance resulting in disease relapse. Therefore, new drugs with novel mechanisms of anti-cancer therapies are urgently needed to be discovered.

Heat shock protein 90 (HSP90) is involved in protein folding and functions as a chaperone for numerous client proteins, many of which are important in non-small cell lung cancer (NSCLC) pathogenesis. MPT0G256 is a novel, fully synthesized HSP90 inhibitor with potent *in vitro* and *in vivo* anticancer activity against lung adenocarcinoma.

We first assessed *in vitro* effects of MPT0G256 on cell proliferation and cell viability in different human cancer cell lines. MPT0G256 had shown the best antiproliferative activity and cytotoxicity against human lung adenocarcinoma A549 cells, and it also showed prominent inhibitory effect on HSP90 α activity. Moreover, MPT0G256 induced degradation of HSP90 client proteins including EGFR, Akt, MEK and Cdk1, and thus blocked several cancer survival pathways, such as PI3K/Akt/mTOR signaling, MAPK kinase signaling. In addition, MPT0G256 induced G₂/M cell cycle arrest and apoptosis in A549 cells, and a compensatory upregulation of heat shock protein 70

(HSP70).

We next combined MPT0G256 with gemcitabine and HSP70 inhibitor Ver155008 in A549 and NCI-H1975 cells, and evaluated the drug combinational effect *in vitro*. Combination of MPT0G256 with both drugs resulted in synergistic growth inhibition, further enhancement of HSP90 client proteins degradation and cell apoptosis over either of the monotherapies in both cell lines. Cell cycle analysis after the combined treatment was also performed.

As we found HSP90 was highly expressed in lung cancer by tissue microarrays, we evaluated the drug combinational effect *in vivo*. The combined treatment of MPT0G256 and gemcitabine resulted in more effective tumor growth delay and degradation of HSP90 client proteins than either of monotherapies in A549 xenograft models.

Together, our results showed that MPT0G256, a novel HSP90 inhibitor, has great potential as a new drug candidate for targeted therapy or a new strategy in combination with gemcitabine for non-small cell lung cancer treatment.

第一章 研究動機與目的



肺癌不論在全球或台灣，都位居癌症致死率之首，發生率也高居全球第二名。肺癌病灶早期由於症狀不明明顯，且缺乏早期診斷工具，確診時通常是病灶晚期或已有轉移現象，且即便以手術切除病灶，仍有 65 % 的病患在兩年內復發 (Collins *et al.*, 2007)。目前針對非小細胞肺癌的藥物治療，除了傳統的化學治療，也有許多針對肺癌病患特定基因突變作為標的的標靶治療藥物，如針對人類表皮生長因子受體 (epithelial growth factor receptor, EGFR) 做抑制的酪胺酸激酶抑制劑 (tyrosine kinase inhibitor, TKIs)，雖然病患有不錯的反應且提高了生存率，但標靶藥物針對癌細胞單一訊息傳遞路徑做抑制，癌細胞容易經由繞道 (bypass) 或代償性活化其他訊息傳遞路徑幫助細胞存活導致抗藥性，如使用 EGFR TKIs 病患平均使用 10 個月後會產生後天抗藥性，使得標靶藥物長期使用效果不彰；因此，尋求同時抑制多種致癌訊息傳遞路徑或是併用不同機轉藥物，是近年來的發展趨勢。

Heat shock protein 90 (HSP90) 是一個 molecular chaperone，藉由幫助其「受質蛋白 (clients)」正確的折疊與增強蛋白間的作用力，使其能正常的運作，維持細胞中蛋白質的恆定。由於許多致癌性蛋白、生長因子受器、激酶、轉錄因子皆為 HSP90 的受質蛋白，抑制 HSP90 能同時達到抑制多條癌症生存與抗凋亡相關的訊息傳遞路徑，因此，HSP90 抑制劑被認為是具有相較於傳統化療與標靶藥物抑制單一路徑，更能有效抑制癌細胞的存活的潛力。雖然目前尚未有 HSP90 抑制劑被美國 FDA 核准，但已有許多的 HSP90 抑制劑針對血液性腫瘤與固態腫瘤的進行臨床試驗。

本篇論文針對一新合成的 HSP90 抑制劑 MPT0G256 (由台北醫學大學劉景平教授提供)，探討其在人類非小細胞肺癌細胞株 A549 細胞的作用機轉。並進一步合併使用傳統化療藥物 gemcitabine 與 HSP70 抑制劑 Ver155008，以期能減少彼此藥物劑量、副作用與抗藥性，並協同性增強藥物抗癌的效果。接著探討併用藥物於不同基因型非小細胞肺癌 NCI-H1975 細胞的藥效與機轉。最後於 A549 腫瘤移植動物觀察合併藥物抑制腫瘤生長的效果。期望透過本篇研究，能夠讓我們更了解 HSP90 抑制劑於人類非小細胞肺癌的抗癌機轉與作用，並期許 MPT0G256 能夠發展成為肺癌治療藥物的候選藥物。

第二章 文獻回顧



一、肺癌 (lung cancer)

(一) 流行病學與分類

台灣衛生福利部國民健康署統計資料顯示，惡性腫瘤已蟬聯 32 年台灣十大死因之首，其中肺癌發生率已躍升為癌症的第四位，死亡率為癌症之首（附表 1）；而根據美國 2014 年癌症資料統計，肺癌為全球癌症發生率的第二名，死亡率則為癌症之首（附圖 1）(Basto *et al.*, 2007; Siegel *et al.*, 2014)。肺癌晚期 (Stage III、IV) 平均五年生存率 (average five-year survival) 約為 15% (Collins *et al.*, 2007)。

肺癌根據分化程度和形態特徵，可分為兩大類，即小細胞肺癌 (small cell lung cancer, SCLC) 和非小細胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC)，其中又以後者占了大多數，根據美國癌症協會 (American Cancer Society) 統計指出，非小細胞肺癌約占總肺癌病人數的 85% 以上。進一步用組織病理學做區分，非小細胞肺癌可分為三大類：鱗狀上皮細胞癌 (squamous cell carcinoma) (佔總肺癌病患 25%)、腺癌 (adenocarcinoma) (佔總肺癌病患 40%)、大細胞肺癌 (large cell carcinoma) (佔總肺癌病患 10%)，由於它們的治療與預後相似，故臨床上通常仍以非小細胞肺癌作為治療的大方向 (W D. Travis, 1999)。

(二) 危險因子

根據美國疾病管制局 (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) 指出，吸菸是導致肺癌最主要的危險因子，約有 90 % 的肺癌病患吸菸的情形，且相較於未吸菸者而言，菸癮者會有 15 到 30 倍的可能得到肺癌或死亡。

氡氣 (Radon) 是導致肺癌的危險因子第二名，它是一種自然存在的放射性惰性氣體，產自於鐳的放射性衰變，是土壤中常見的微量元素，埋藏於大理石或花崗岩等建材，或經由地板裂縫進入屋內導致屋內氡氣累積而致癌，亦是礦工導致肺癌的原因之一 (Lubin *et al.*, 1995)。

其他危險因子尚有吸二手菸、暴露於石棉、柴油氣、二氧化矽、鉻等化學物質、接受放射線治療以及家族遺傳。



(三) 症狀

雖然肺癌初期只有約 10 % 的病患是沒有症狀的，大多數的病患還是有症狀，但由於症狀的特異性不高，病患就醫時通常已是病灶晚期或是已有轉移的情形。而非特異性的系統性症狀包括疲倦、厭食、體重減輕，以及病灶部位直接造成的一些症狀 (Collins *et al.*, 2007)。

若病灶部位是原發性肺癌，可能會有咳嗽、呼吸困難、胸悶、咳血的情形。75 % 的病患咳嗽原因是因為腫瘤組織造成支氣管阻塞導致肺炎造成，而有 60 % 的病患會因為肺癌組織直接佔據呼吸道而導致呼吸困難，50 % 的病患會有間歇性的胸痛，35 % 的原位癌病患會有咳血的情形 (Collins *et al.*, 2007)。

約有 40 % 的病患診斷時已有胸內擴散 (intrathoracic spread) 的情形，可能會有聲音嘶啞、呼吸困難、末梢神經疼痛、濁音、吞嚥困難、上腔靜脈阻塞的情形。嘶啞 (2~18%) 的原因主要是由於喉部神經癱瘓所造成，若病灶部位比較靠近橫膈或是胸膜積水，則會出現呼吸困難的不適感，而當腫瘤組織直接侵犯胸腔壁，則會有持續性的疼痛感 (Collins *et al.*, 2007)。

約有 1/3 的肺癌病患診斷時已有肺外擴散 (extrathoracic spread) 的情形，而肺癌常見的轉移部位有骨骼、肝臟、腎上腺、淋巴結、腦、脊髓。這類病患除了會有一般非特異性的疲倦、體重減輕的症狀，若是骨骼轉移，可能會有疼痛、骨折、血液中鹼性磷酸酶 (alkaline phosphatase) 上升的情形；若有淋巴結轉移的情形則會有明顯的淋巴結腫大；10 % 的病患會有腦轉移的情形，會伴隨著有頭痛、噁心、嘔吐、神經功能缺損、癲癇、困惑、人格改變等症狀。

約有 10 % 的病患會有腫瘤伴生徵候群 (paraneoplastic syndromes)，是由於腫瘤分泌異常的生物活性物質而引起病人出現了全身性臨床表現，如高鈣血症、抗利尿賀爾蒙不正常分泌、庫欣氏症候群、杵狀指、肺性骨關節病等 (Collins *et al.*, 2007)。

(四) 診斷

當病患的肺癌型態與分期並未清楚時，用來確診的診斷方式包括胸部 X 光檢查 (chest X-ray)、痰液檢查 (sputum cytology)、纖維支氣管鏡檢查 (flexible bronchoscopy)、經皮肺穿刺細胞針吸術 (transthoracic needle aspiration)。

痰液檢測可測出可測出 71 % 的肺門腫瘤 (central tumor)，但測出肺周邊腫瘤 (peripheral tumor) 準確度小於 50 %，故若測出為陰性需進一步做檢測。纖維支氣管鏡檢查可以檢測出 88 % 的肺門腫瘤，但對於肺周邊腫瘤敏感度小於 70 % 且難以偵測半徑小於 2 公分的腫瘤組織，故通常會搭配螢光檢測 (fluoroscopic)、電腦斷層掃描 (computed tomography) 或經支氣管細針抽吸診斷 (transbronchial needle aspiration) 來提高敏感度。經皮肺穿刺細胞針吸術 (transthoracic needle aspiration) 相較於支氣管鏡檢，對於確診肺周邊腫瘤有較高的敏感度 (90 %)，且由於是非侵入性檢查，故可用於不適合作支氣管鏡檢或是無法手術之病患，不過有 25~30 % 的病患產生氣胸的併發症。

當已知是非小細胞肺癌早期的病患，則建議做開胸手術 (thoracotomy) 來做確診；而對於疑似小細胞肺癌或是轉移性非小細胞肺癌病患，除了上述的纖維支氣管鏡檢查及經皮肺穿刺細胞針吸術，亦可考慮做胸腔穿刺 (thoracentesis) 或是肺部病理切片檢查來做確診 (Collins *et al.*, 2007)。

(五) 分期與治療

非小細胞肺癌的主要是以 TNM (tumor-nodes-metastasis) 分期系統，依照腫瘤的大小 (T)，淋巴結情況 (N)，遠端轉移與否 (M) 來做分期 (Collins *et al.*, 2007)，根據美國癌症協會 (American Cancer Society) 2015 年治療指引指出，對於第 0 期病患，通常可藉由手術的方式治癒，若病患無法接受手術，則以光動力療法 (photodynamic therapy, PDT)、雷射療法、或近接治療 (brachytherapy) 作為替代選擇。對於第 I、II 期肺癌病患，主要以手術，如肺葉切除術 (lobectomy)、袖形切除術 (sleeve resection)、肺楔形切除術 (wedge resection)、肺段切除術 (segmentectomy) 切除病灶為主，對於高復發危險或是腫瘤大小大於 4 公分的病患則建議輔以輔助性化學治療 (adjuvant chemotherapy)，無法手術病患則以軀體立體定位放射治療 (stereotactic body radiation therapy, SBRT)、傳統放射治療、射頻腫瘤燒灼 (radio-frequency ablation, RFA) 為治療選擇，第 II 期的病患可開始考慮使用化學治療 (chemotherapy) 於手術前縮小腫瘤或是於手術後 (常搭配放射療法) 做進一步的根除癌細胞。第 III 期肺癌病患的治療選擇包括放射治療、傳統化學治療、手術，IIIA 期病患如果可以耐受化療，治療會先從傳統化療開始，等到醫師評估腫瘤有

機會被根除才會進行手術，術後輔以化療或放射治療；IIIB 期病患通常無法藉由手術完全根除癌細胞，通常給予傳統化療、放射治療或兩者同時給予的合併治療 (combination therapy) 為主。第 IV 期的病患，通常腫瘤已有遠端轉移的情形，難以治癒，治療目標為延長病患壽命，可以選擇的治療方式有手術、傳統化學治療、標靶治療(targeted therapy)、放射治療，並可輔以光動力療法、雷射治療或內鏡支架放置術 (endoscopic stent placement) 做症狀緩解。

小細胞肺癌依據可耐受放射治療的範圍分為局限期與擴散期，局限期病患病灶侷限在單側胸廓內，是胸部放射線治療的適應症，擴散期病患則是指病灶擴散到其它肺葉、對側淋巴結或是遠端器官稱之，此類病患以化學治療為主 (Collins *et al.*, 2007)。

(六) 藥物治療

1. 傳統化學治療 (conventional chemotherapy)

傳統化學治療是將抗癌藥物經由靜脈注射或口服藥物，藉由血液將藥物帶至全身，使其有效到達目標器官作用於腫瘤組織，使用的時機有以下三種：手術前幫助縮小腫瘤組織 (neoadjuvant therapy)、術後幫助完全根除癌細胞 (adjuvant therapy)以及作為無法手術或虛弱病患的主要治療。

非小細胞肺癌的傳統化療主要以 platinum doublet therapy 為主，鉑金類藥物如 cisplatin 或 carboplatin 加上另一種化療藥物如 paclitaxel、docetaxel、gemcitabine、vinorelbine、irinotecan、etoposide、vinblastine、pemetrexed 合併使用於第 II、III、VI 的非小細胞肺癌病患，特別是 IIIB、IV 期的病患，相較於使用單一毒殺性化療藥，platinum doublet therapy 能有效提升病患對於藥物的反應 (Zarogoulidis *et al.*, 2013)。通常是以兩種化療藥物合併使用，加入第三種藥物並沒有臨床益處，且會增加副作用風險 (Shukuya *et al.*, 2009)。由於使用的藥物主要是作用於快速分裂的細胞，正常快速分裂的細胞亦可能受到影響，而產生脫髮、嗜中性白血球低下 (neutropenia)、骨髓抑制 (myelosuppression)、口腔潰瘍等副作用，並伴隨有噁心、嘔吐、食慾不振、疲倦等常見副作用。

小細胞肺癌的化療藥物大多著重在去氧核糖核酸拓撲異構酶 (DNA topoisomerase) 的抑制與複合物的穩定，進而抑制 DNA 與 RNA 的複製，降低癌細胞的

分裂。近年來小細胞肺癌化療主要 platinum doublet therapy 為主，即鉑金類藥物如 cisplatin 或 carboplatin 加上另一種拓撲異構酶抑制劑如 irinotecan、belotecan、etoposide、amrubicin 共同使用，約有 50 %到 85 %的小細胞肺癌病患對於這幾種合併治療有反應，中位存活時間為 9 到 12 個月。由於使用的藥物主要是作用於快速分裂的細胞，正常快速分裂的細胞亦可能受到影響，而產生脫髮、嗜中性白血球低下 (neutropenia)、骨髓抑制 (myelosuppression)、口腔潰瘍等副作用；第二線用藥則有 topotecan、amrubicin、picoplatin、belotecan、bendamustine、cyclophosphamide/doxorubicin/vincristine (CAV) 等 (Chan *et al.*, 2013)。

2. 標靶治療 (targeted therapy)

近年來人類基因的定序，使得人們對於癌症的表觀突變 (epigenetic mutations)、抑癌基因不活化 (tumor-suppressor-gene inactivation)及致癌基因導致的突變 (oncogene driver mutations) 能有進一步了解，並針對這些特殊的突變發展出一系列的標靶治療藥物。標靶藥物主要作用於癌細胞中突變的訊息傳遞路徑，具有較佳選擇性，對於正常細胞的損害較低 (Chan *et al.*, 2014)。至今大多數的小細胞肺癌標靶藥物臨床試驗，無論單用或是併用傳統化療藥組套，相較於傳統的 platinum-based doublets 治療，皆呈現較差或是沒有更好的臨床效果(Rossi *et al.*, 2008)，故以下針對非小細胞肺癌常見之突變基因及標靶藥物作介紹，非小細胞肺癌訊息傳遞途徑及可能成為標靶之目標如圖所示 (附圖 2)(Alamgeer *et al.*, 2013)。

① EGFR (epithelial growth factor receptor, EGFR)

造成表面生長因子受體 (EGFR) 過度活化的原因有三：腫瘤細胞表面 EGFR 表現量增加、腫瘤細胞增加 EGFR 受體 (ligand) 的製造、EGFR 突變導致其不用受體結合即可自發性活化 (Rossi *et al.*, 2008)。

非小細胞肺癌約有 40~80 %的病患有 EGFR 過度表現的情形，對於這類病患則給予 EGFR 酪胺酸激酶抑制劑 (EGFR tyrosine kinase inhibitors, EGFR TKIs) 如 gefitinib、erlotinib 等可逆性 TKIs 作為一線治療用藥，相較於 platinum doublet therapy 傳統化療組套，病患有較長的無惡化存活期 (progression-free survival, PFS) 且生活品質較佳 (Mok *et al.*, 2009)。

許多病患在使用 EGFR TKIs 7 到 12 個月後產生後天抗藥性 (acquired resistance)，而導致抗藥性的機轉最常見的是 EGFR exon 20 的 T790M 突變 (codon 790 位置的 threonine 突變為 methionine)(~50 %)，此種突變會降低 EGFR 對於第一代可逆性 TKIs 的親和力，而對於這些抗藥性病患則可以考慮使用二代不可逆性 ErbB-family TKIs 如 afatinib (Miller *et al.*, 2012)，或是合併使用 EGFR 單株抗體 cetuximab 作為治療 (Janjigian *et al.*, 2011)，而約有 15~20 % 的病患同時具有 MET (a hepatocyte growth factor receptor) 過度表現情形 (Sequist *et al.*, 2011)，目前已有合併使用 MET/ALK inhibitor (crizotinib) 及 pan-HER inhibitor (dacomitinib) 的臨床試驗再進行 (ClinicalTrials.gov identifier: NCT01121575)。而對於 EGFR 狀態未知或是 wild-type EGFR，erlotinib 會是 platinum-based doublets 後的第二、三線用藥選擇 (Chan *et al.*, 2014)。

② ALK rearrangements

ALK 基因會和 Echinoderm microtubule-associated protein-like 4 (EML4) 形成 EML4-ALK fusion gene，幫助腫瘤組織惡化與癌細胞增生。約有 3~7 % 的非小細胞肺癌病患具有 EML4-ALK fused oncogene (Chan *et al.*, 2014)，對於此種病人可使用 crizotinib (ALK/MET/ROS tyrosine kinase inhibitor) 這個於 2011 年 FDA 通過的藥物做治療 (Kwak *et al.*, 2010)，且已證實對於已使用過 platinum doublet 治療的病患，crizotinib 相較於其他二線化療藥有較長的無惡化存活期 (PFS)，且副作用少，如視覺障礙、腸胃道副作用。

跟 EGFR TKIs 一樣，具有 ALK rearrangements 的非小細胞肺癌病患亦可能經由多種機轉，如 ALK amplification、EGFR/HER1、HER2、HER3 upregulation、cKIT amplification、或是 ALK 具有 L1196M 突變，而對 crizotinib 產生抗藥性，已有二代 ALK inhibitor 如 ceritinib、alectinib 對於 crizotinib 無效病患進行臨床試驗 (Chan *et al.*, 2014)。

③ K-Ras

K-Ras (kirsten rat sarcoma 2 viral oncogene homolog) 屬於 GTPases 家族，負責傳遞來自上游酪胺酸激酶，如 EGFR、MET 的生長訊息。約有 30 % 的肺腺癌

(adenocarcinoma) 病患以及 4% 的肺鱗狀上皮細胞癌 (squamous cell carcinoma) 具有 K-Ras 的突變，導致生長訊息持續傳遞。K-Ras 突變並不會和 EGFR 或 ALK 突變同時存在 (mutually exclusive)(Gainor *et al.*, 2013)，且具有 K-Ras 突變的病患通常預後不好且對傳統化療或 EGFR TKIs 具有抗藥性 (Chan *et al.*, 2014)。

雖然 K-Ras 是很早就被發現的致癌因子，使用 selirasib (RAS inhibitor) 並無法有效阻止癌細胞的生長 (Riely *et al.*, 2011)，近年來大多朝 RAS/RAF/MEK/ERK pathway 下游分子或是 PI3K/AKT/mTOR pathway 發展 (Suda *et al.*, 2010)。研究顯示 K-Ras 突變細胞 heat shock protein 90 (HSP90) 會有高度表現的情形，故也有針對 HSP90 發展相關藥物 (Suda *et al.*, 2010)。Selumetinib (MEK1/MEK2 inhibitor)，針對 K-Ras 下游的 MEK 做抑制，合併使用 docetaxel 於臨床試驗第二期結果顯示，病患有較長的無惡化存活期 (PFS)(Janne *et al.*, 2013)，且已有合併使用 AKT inhibitor 於臨床試驗第三期 (Meng *et al.*, 2010)。

二、Heat shock protein 90 (HSP90) 及其抑制劑

(一) 熱休克反應 (heat shock response)

熱休克反應是一個轉錄性反應 (transcriptional response)，使細胞內分子伴護蛋白 (molecular chaperone) 快速上升，幫助細胞維持蛋白質恆定 (proteostasis)，來適應外在環境的壓力 (Takeuchi *et al.*, 2015)。

當細胞暴露於多種環境或代謝性壓力 (metabolic stress)，如缺氧、缺血、高氧、暴露於紫外線或化學物質、尼古丁、手術壓力、營養不良 (如葡萄糖缺乏)、機械性壓力、自由基 (radicals) 或致癌物質 (carcinogens) 時，會快速活化熱休克轉錄因子 (heat shock transcriptional factors, HSFs)，轉錄出一系列的分子伴護蛋白 (molecular chaperone)，包括熱休克蛋白 (heat shock proteins, HSPs)，去幫助未成熟或結構不穩定的受體蛋白 (client proteins)，正確的折疊與防止它們聚合 (aggregation)，而維持細胞的生存與胞內的蛋白質恆定 (Takeuchi *et al.*, 2015)。

(二) 熱休克蛋白 (heat shock proteins, HSPs)

細胞受到外界壓力後，會產生許多細胞活性與生理的改變，而這之中變化最

顯著的，便是一系列具有物種間高保留性(highly conserved) 蛋白，稱之為熱休克蛋白 (heat shock protein) 或熱壓力蛋白 (heat stress protein)。它們最先是被發現細胞在高溫環境下會有高度表現的情形而命名之，之後也發現說細胞在其他前述的環境或代謝性壓力下也會產生相同的反應，維持細胞蛋白質恆定 (proteostasis)，進而幫助細胞生存或適應外在環境改變 (Khalil *et al.*, 2011)。

哺乳類的熱休克蛋白，依照分子量可分為六大類：HSP100、HSP90、HSP70、HSP60、HSP40、及 small HSPs (分子量 15~30 kDa)(附表 3)，高分子量的熱休克蛋白需要 ATP 來驅動 (ATP-dependent)，而低分子量的則不用(ATP-independent)(Didelot *et al.*, 2007)，每種 HSP 皆包含有持續表現型 (constitutive) 與壓力誘導型 (regulated inductively) 兩種 subtype 存在，如 HSP90 family 中，HSP90 β ，在一般未受壓力的細胞中約佔細胞總蛋白質的 1%，維持正常細胞中蛋白質的正確折疊，HSP90 α 則是在受到外界壓力時高度表現(Kuhn *et al.*, 2006)；HSP70 family 中，HSP70 屬於壓力誘導型，而 HSC70、HSP75 和 GRP78 則是持續表現型 (Khalil *et al.*, 2011)。

(三) 熱休克蛋白 90 (heat shock protein 90, HSP90)

HSP90 是 small superfamily of functionally unrelated proteins (包括 DNA gyrase、histidine kinase 及 DNA mismatch repair protein MutL 等)的一員，具有和一般 protein kinase 不同的 ATP-binding pocket (Pearl *et al.*, 2006)，結構的部分主要分成三個 domains：an amino terminal (N) domain 主要是 ATP-binding domain，具有 ATPase 的功能，也是許多藥物及 co-chaperone 結合的 domain；middle (M) domain 是其和受質蛋白 (client protein) 結合的地方，也是部分 co-chaperone 的結合位；carboxy-terminal (C) domain 是 dimerization domain，也是部分 co-chaperone 及藥物的結合位 (附圖 3)(Whitesell *et al.*, 2005)，HSP90 經由 C domain 的結合形成 dimer，始具有生理活性 (Wayne *et al.*, 2007)。

HSP90 它是一個 molecular chaperone，主要生理功能是幫助其受質蛋白的正確折疊與增強蛋白質間的作用力 (protein-protein interaction) 來穩定受質蛋白的三級結構。許多的致癌蛋白都是 HSP90 的受質蛋白，也因此癌細胞被認為對 HSP90 具有高度的依賴性 (addiction) (Trepel *et al.*, 2010)。而 HSP90 即是靠著 N 端與 ATP 的結合，造成構型改變，使兩個 HSP90 扭轉在一起，幫助其受質蛋白摺疊，接著

ATP 水解，再次改變構型使其N端分離，如此循環而保持 chaperone 的活性 (附圖 4)(Ali *et al.*, 2006)。雖然 HSP90 主要是存在細胞質為主，但它也牽涉許多的核內反應，如基因的轉錄、染色體重建，修復 DNA 所害造成的突變，且在細胞表面也可發現 HSP90 (Trepel *et al.*, 2010)。

(四) HSP90 於癌症之角色

雖然 HSP90 在正常的細胞與癌細胞都會有表現的情形 (如 HSP90 β)，但由於癌細胞處於營養不良、蛋白質毒性 (proteotoxic)、缺氧、染色體不穩定等高度壓力的環境，需要 HSP90 來緩衝這些外在的壓力，且許多的致癌蛋白 (oncoprotein)、激酶 (kinase)及轉錄因子 (transcription factors)需要 HSP90 的幫忙才能突變、轉移、放大表現 (amplification)及過度表現 (overexpression)，故癌細胞相較於正常組織細胞，時常伴隨著有 HSP90 更高度表現的情形，如壓力誘導型 HSP90 α 的活化 (Neckers *et al.*, 2012)。

H90 在癌症中的過度表現或是活化的 multichaperone complex，可以幫助癌細胞躲避免疫系統攻擊、使細胞不受限制的複製生長、促進血管新生、幫助腫瘤組織的侵犯與轉移、對於抗細胞生長訊息敏感性下降、躲避細胞凋亡、自我活化生長訊息，改變能量代謝型態等 (附圖 5)(Neckers *et al.*, 2012)，預後不好，與腫瘤組織的惡性轉變與癌症的進程有關 (Workman *et al.*, 2007a)。

(五) HSP90 受質蛋白 (HSP90 client proteins)

HSP90 常在癌細胞中有過度表現 (over-expressed) 的情形，藉由調控許多致癌性的受質蛋白 (client proteins)，活化多種致癌訊息傳遞。

與癌症進程相關的 HSP90 受質蛋白，如細胞存活與生長途徑相關的 c-KIT、EGFR、IGFR、HER2、BCR-ABL、BRAF、Raf、MEK、STAT3、STAT5、IL6R、I κ B kinase 等；血管新生途徑相關的 VEGFR、HIF1 α 、NOS 等，抗凋亡途徑相關的 AKT、survivin 等，癌細胞轉移途徑相關的 MMP-2、Src、FAK 等，細胞凋亡途徑相關的 Apaf-1 等，調控細胞週期相關途徑的 Rb、Cdk1、Cdk4、Cdk6 等 (附圖 6)((Hong *et al.*, 2013a)。HSP90 藉由幫助這些這些致癌性受質蛋白正確的折疊或穩

定三級結構，在許多的癌症中都扮演重要的角色。



(六) HSP90 抑制劑的發展

在 2000 年，Hanahan 和 Weinberg 提出了一個假設，認為在癌細胞的進程，癌細胞可以藉由以下六種途徑維持其 phenotype：躲避細胞凋亡、維持血管新生、無限制複製潛力、組織侵犯與轉移、自我提供養分、對於抑制生長訊息不敏感 (Hanahan *et al.*, 2000)。

雖然近年來已有許多化療藥物針對多條上述癌症生存路徑做抑制，並沒有化療藥物是可以同時抑制六條途徑，但由於這六條癌症生存途徑中許多的致癌蛋白同時也是 HSP90 的受質蛋白，因此抑制 HSP90 被認為具有同時抑制這些途徑的可能 (Sidera *et al.*, 2014)。而近年來發展的標靶藥物主要是針對單一訊息傳遞做抑制，癌細胞可能經由突變或是繞過 (bypass) 該被抑制途徑，活化其他路徑繼續存活 (Burdach, 2014)，所以許多標靶藥物雖然能有效抑制腫瘤組織生長，效果卻不是持久的 (Vanneman *et al.*, 2012)，因此發展同時抑制多種致癌蛋白與路徑的藥物，如發展 HSP90 抑制劑 (附圖 7)(Trepel *et al.*, 2010)，近年來被大家所重視。

① N-terminal ATP binding site 抑制劑

A. 天然化合物 (Nature product) 及其衍生物

天然化合物如 geldanamycin (GA) 和 radicicol (RD)，具有 ATP 類似的空間結構，可結合到 HSP90 N 端的 nucleotide-binding pocket，競爭型抑制 ATP 的結合與水解，導致致癌性 HSP90 受體蛋白無法與 HSP90 結合；雖然說 geldanamycin 和 radicicol 在臨床上因為毒性與安定性 (溶解度) 問題無法被應用，但它們開啟了 HSP90 抑制劑的發展新紀元 (Roe *et al.*, 1999)。

A1. Geldanamycin 及其衍生物

Geldanamycin (GA) 在 1970 年代在 *Streptomyces hygroscopicus* 被發現，具有 benzoquinone 的結構，可有效競爭型抑制 HSP90 的 ATP-binding site 導致其 client protein 受到 ubiquitin-mediated proteosomal degradation，但 GA 在動物實驗中，水中溶解度不好，且會產生肝毒性，無法應用於臨床。之後研發出 GA 的衍生物 17-AAG，相較於 GA 在 *in vivo* 中有更好溶解度及較低毒性，進行到臨床試驗 II/III

期由終止試驗，與劑型及毒性無法解決有關 (Sidera *et al.*, 2014)；而同為 GA 衍生物的 17-DMAG 也是做到臨床試驗 I 期終止發展 (Ronnen *et al.*, 2006)。IPI-504 是 17-AAG 的還原態，是目前這類 GA-derived-HSP90 抑制劑中唯一還在進行臨床試驗的藥物，進行到臨床試驗 II/III 期 (Sidera *et al.*, 2014)。後續研究也發現說這類衍生物的肝毒性，可能與其 benzoquinone/hydroquinone 結構有關，故也有迴避掉此結構的藥物發展 (Janin, 2010)。

A2. Radicicol 及其衍生物

Radicicol (RD) 最先是從真菌 *Monocillium nordinni* 及 *Monosporium bonorden* 分離出來的巨環內酯類 (macrocyclic lactone) 類抗生素，在 *in vitro* 和 GA 一樣具有競爭型抑制 HSP90 N 端 ATP-binding site 的作用，但由於其化學結構及代謝不穩定，抗癌作用並沒有辦法應用到 *in vivo* (Soga *et al.*, 2003)；隨後發展出 RD 的 oxime 類衍生物如 KF55823、KF25706，*in vitro* 具有更好的抑制癌細胞增生效力，在乳癌及大腸癌 *in vivo* 實驗，也在病患能忍受劑量（無明顯肝毒性）下也呈現出良好抑制腫瘤生長作用，但這兩個藥物並沒有進入臨床試驗 (Agatsuma *et al.*, 2002)；Radester 是結合 radicicol (radicinol 部分) 與 geldanamycin (benzoquinone 部分) 的化合物，在乳癌細胞 MCF7 有不錯的抑制細胞生長效果，可有效降低 HER-2 及 c-Raf 的表現 (Shen *et al.*, 2005)。此類衍生物目前並沒有藥物進行臨床試驗 (Sidera *et al.*, 2014)。

B. 合成小分子抑制劑與胜肽 (peptide) 類衍生物

由於天然化合物及其衍生物的諸多臨床應用限制，促使科學家致力於二代合成型小分子 HSP90 抑制劑的發展，希望藉由全合成或半合成方式，加強藥物的藥效與穩定性，減少可能的毒性，如肝毒性（可能因為 quinone 結構代謝造成）(Samuni *et al.*, 2010)。

B1. 嘌呤類 (purine scaffold) 衍生物

科學家首先利用 GA 與 RD 於結合 HSP90 時所形成的 C 形空間結構，合成出嘌呤類抑制劑 PU3，經由一連串的修飾，研發出第一個進入臨床試驗的嘌呤類

HSP90 抑制劑 CNF2024/BIIB021 (臨床試驗 I/II 期)(Zhang *et al.*, 2010)，該公司也發展一系列的嘧啶 (pyrimidine) 類衍生物，其中以 EC144 在老鼠中呈現最好的藥效及藥動學特性 (Shi *et al.*, 2012)；MPC-3100 在 2011 年進入臨床試驗 I 期，其 prodrug MPC-0767 於 2012 年申請 IND (Sidera *et al.*, 2014)；Debio 0932 於 2011 年進入臨床試驗一期 (適應症 solid tumor 及 lymphoma)，並於 2012 年進入臨床試驗 I/II 期 (advanced NSCLC)(Stenderup *et al.*, 2014)；PU-H71 則是針對 advanced malignancies 於 2011 年進入臨床試驗 I 期 (Sidera *et al.*, 2014)。

B2. Resorcylic pyrazole/isoxazole 類衍生物

Pyrazole 類藥物發展，保留了天然化合物 radicol 的 resorcinol，如 CCT018159 是此類結構最先被發展出的藥物 (Cheung *et al.*, 2005)，而經由一連串的修飾研發出藥效更強的 VER-49009 及 NYP-AUY922/VER52296 (Gaspar *et al.*, 2010)，NYP-AUY922 是目前被認為最強效的小分子 HSP90 抑制劑，於 2007 年進入臨床試驗 I/II 期 (適應症 relapsed and refractory multiple myeloma 和 HER2+及 ER+ metastatic breast cancer)，並於 2012 年進入臨床 II 期 (適應症 ALK+ and EGFR-mutated NSCLC) (Sidera *et al.*, 2014)，而其衍生物 NYP-HSP990 則是在 2012 年終止於臨床試驗 I 期 (Lamottke *et al.*, 2012)；STA-9090 為 triazole 類衍生物，目前做到臨床試驗 II 期 (適應症 metastatic breast cancer)；KW-2478 則是有合併使用 bortezomib 於 2010 年進入臨床 I/IIa (適應症 relapsed multiple myeloma)；AT13387 則是進行到臨床試驗 II 期 (適應症 GIST)(Sidera *et al.*, 2014)。

B3. Benzamide 類衍生物

SNX-5422 為 SNX2122 的 pro-drug，於 2007 年終止於臨床試驗 I 期 (可能造成不可逆的視網膜傷害)，並於 2012 年重新進入臨床試驗 I 期 (適應症 advanced cancer)，且也陸續發展出 imidazole 類及 pyrazole carboxamide 類衍生物，能有效作用於 leukaemia 及 solid tumor (Sidera *et al.*, 2014)。

② C-terminal ATP binding site 抑制劑

Novobiocin 為一具有 aminocoumarin 結構的抗生素，具有抑制 gyrase 的作用，

最先被發現對於 HSP90 之 N 端 ATP-binding site 具有弱親和力，無法競爭 geldanamycin 與 radicicol 的結合，之後的發現其主要是結合到 HSP90 的 C 端 second ATP-binding site，造成 chaperone complex 的不穩定（如 co-chaperone p23、HSP70 及受質蛋白釋出），而造成 HSP90 受質蛋白的降解（Marcu *et al.*, 2000）；2005 年發展出 novobiocin 衍生物 A4，在 *in vitro* 具有較 novobiocin 強約 70 倍抑制 HSP90 的活性（Yu *et al.*, 2005）；也有結合到 C 端的天然化合物衍生物 DHN1 與 DHN2 被發現（Burlison *et al.*, 2008），HSP90 C 端抑制劑目前並沒有 *in vivo* 的報告（Sidera *et al.*, 2014）。

(七) HSP90 抑制劑與藥物合併的治療策略

目前 HSP90 抑制劑的發展，由於溶解度/劑型及毒性（如 benzoquinone 類經由單電子還原酶如 NADPH cytochrome P450 reductase 和 NADH cytochrome b5 reductase 代謝產生自由基，造成肝毒性；AUY922 造成的視覺障礙（77 %））（Piper *et al.*, 2011）等因素，單一使用效果不佳，且 HSP90 抑制劑已被證實能克服多種傳統化療藥物長期使用產生的抗藥性（如 trastuzumab、arsenic trioxide 等）（Jhaveri *et al.*, 2012），合併不同機轉的藥物使用（附表 4）（Hong *et al.*, 2013b），是目前的治療趨勢；另一方面，癌細胞的 HSP90 受到抑制，亦有可能產生熱休克反應，誘導代償性的熱休克蛋白如 HSP70、HSP27 的上升，故臨床上也朝合併使用 HSP90 抑制劑與 HSP70 抑制劑（Evans *et al.*, 2010）或 HSP27 antisense 抑制劑的方向作發展（Hadchity *et al.*, 2009）。以下列舉幾種 HSP90 抑制劑合併其他藥物治療的臨床試驗：

1. HSP90 抑制劑併用 anti-HER2 單株抗體於 HER2-positive 轉移性乳癌

Trastuzumab 為一 anti-HER2 的單株抗體，於臨床上合併使用第一線化療藥物，對於 HER2-amplified 的乳癌病患有效，但使用一段時間會有乳癌復發或進程的情形。HER2 它是對於 HSP90 最敏感的受質蛋白之一，併用 trastuzumab（17-AAG, HSP90 inhibitor）與 Tanespimycin 於臨床試驗中有效增加 59 % 病患的臨床益處（Modi *et al.*, 2011），目前進行到臨床試驗 II 期（Hong *et al.*, 2013a）。

2. HSP90 抑制劑併用 HSP70 抑制劑於大腸癌及多發性骨髓癌 (multiple myeloma)

研究顯示使用 HSP90 抑制劑如 geldanamycin、radicicol 即衍生物 17-AAG 會誘導其他熱休克蛋白代償性上升，特別是 HSP70 (Khalil *et al.*, 2011)，且過度表現 HSP70 也已證實與藥物抗藥性有關 (Pocaly *et al.*, 2007)。目前已有臨床前數據顯示併用 tanespimycin (17-AAG, HSP90 inhibitor) 與 Ver155008 (HSP70 inhibitor) 對於大腸癌 (Massey *et al.*, 2010) 與多發性骨髓癌 (Zhang *et al.*, 2013) 是有效的，但目前仍未有併用 HSP90 抑制劑與 HSP70 抑制劑治療方式進入臨床試驗。

3. HSP90 抑制劑併用 proteasome 抑制劑於多發性骨髓癌 (multiple myeloma)

多發性骨髓癌具有 HSP90 過度表現的情形，且眾多致癌蛋白如 receptor tyrosine kinases、telomerase、Akt、HIF-1 α 及 MMP2 等是 HSP90 的受質蛋白；bortezomib 是 26S proteasome 抑制劑，可有效抑制 proteasome 降解不正常蛋白質的機轉，造成細胞內蛋白平衡被打破，進而毒殺癌細胞。臨床研究顯示併用 tanespimycin 與 bortezomib 時 tanespimycin 會增強 bortezomib 的毒殺細胞作用，且降低 bortezomib 的抗藥性，目前臨床試驗進行到 I/II 期 (Richardson *et al.*, 2011)。

4. HSP90 抑制劑併用 DNA 損害藥物於轉移性胰臟癌 (metastatic pancreatic cancer)

胰臟癌是具有高致死率且藥物難以到達的癌症，有許多的 DNA 損害藥物對於胰臟癌具有中等的效果，如 gemcitabine，但使用 gemcitabine 這些 DNA 損害藥物時常會誘導 Chk1 的表現，幫助細胞染色體重建、DNA 的複製與修復，而 Chk1 同時是 HSP90 的受質蛋白，因此有併用 tanespimycin (17-AAG, HSP90 inhibitor) 與 gemcitabine 於 stage IV 胰臟癌病患，雖然由於 tanespimycin 劑量未掌控好而導致過大的副作用試驗終止，不過也證實 HSP90 抑制劑可以增強癌細胞對於 gemcitabine 的感受性 (Pedersen *et al.*, 2015)。Gemcitabine 機轉如附圖 13 (Ueno *et al.*, 2007)。



(八) HSP90 抑制劑可能產生之抗藥性

雖然 HSP90 抑制劑相較於傳統藥物有諸多的優點，但並不是所有的癌症對於此類機轉藥物都有反應的。癌細胞可能藉由內生性或後天性機轉，對 HSP90 抑制劑產生抗藥性 (Piper *et al.*, 2011)。由於目前並沒有 HSP90 的 C 端抑制劑再進行臨床試驗，抗藥性機轉主要是針對 N 端抑制劑作研究：

1. 內生性抗藥性 (inherent resistance)

① HSP90 產生突變或轉譯後修飾 (post-translational modification)

天然化合物 geldanamycin 即其衍生物 17-AAG 最早被拿來研究 HSP90 抑制劑的抗藥性，發現在 *S. hygroscopicus* 中，該細菌的 HSP90 的一側 ATP-binding pocket 的帶電胺基酸側鍊有遺失情形，進一步在真核細胞 model yeast *Saccharomyces cerevisiae* 發現若 HSP90 同時具有 E88G 與 N92L 的突變，會導致 geldanamycin 藥效下降 10 倍，且在 *in vivo* 部分，具有突變的 HSP90 則會導致 IC₅₀ 上升至 2.5 倍 (Millson *et al.*, 2011)，不過此種抗藥性機轉在臨床尚未有研究結果 (Piper *et al.*, 2011)。

② NAD(P)H/quinone oxidoreductase 1 (NQO1) 低度表現

具有 benzoquinone 的 HSP90 N 端抑制劑，在低度表現 NAD(P)H/quinone oxidoreductase 1 (NQO1) 的細胞會有抗藥性。NQO1 是一個會催化 benzoquinone 的 HSP90 N 端抑制劑 (如 17-AAG) 還原成 dihydroquinone 的結構的酵素，使得此類抑制劑與 HSP90 的結合更為緊密而有更佳的藥效 (Guo *et al.*, 2006)。此類抗藥性機轉已在低度表現 NQO1 酵素的 glioblastoma *in vitro* 被證實，且通常會伴隨著 NQO1 mRNA 表現的下降，且再加入 NQO1 抑制劑 ES936 後能有效克服此抗藥性，且此抗藥性機轉僅對有 quinone 結構的 HSP90 N 端抑制劑有選擇性，並不會出現在 non-quinone 結構 (如 purine-或 pyrazole-based) 的 N 段抑制劑 (Piper *et al.*, 2011)。

2. 後天性抗藥性 (acquired resistance)：

① Drug efflux pump 的過度表現

具有 benzoquinone 的 HSP90 N 端抑制劑，首先在過度表現 P-glycoprotein (P-gp)

及具有 multidrug resistance (MDR) phenotype，如 MRP-1 efflux pump 過度表現的人類乳癌細胞中發現藥物會被打出細胞造成抗藥性的情形，且有 drug efflux pump 過度表現情形的細胞對於 purine-或 pyrazole-based HSP90 抑制劑仍保有敏感性，因為這些藥物並不是 P-gp 的受質(Taldone *et al.*, 2008)，如過度表現 P-gp 的 adrenocortical carcinoma 對於 17-AAG (benzoquinone 類) 有抗藥性，對於 BIIB021 (purine 類)則有敏感性 (Zhang *et al.*, 2010)。

② 引起熱休克反應 (heat shock response)

Heat shock transcription factor 1 (HSF-1) 是 HSP27、HSP40/70、HSP90 的 transtription factor，負責調控細胞內熱休克蛋白的表現還維持細胞蛋白質平衡，而許多 HSP90 N 端抑制劑 (如 geldanamycin) 即其他如 protein synthesis 抑制劑 puromycin、amino acid analogue (azetidine、canavanine)、proteosome 抑制劑 (MG132、lactacystin) 等已被證實具有誘導 HSF-1 的特性 (Akerfelt *et al.*, 2010)，使得病患接受 HSP90 抑制劑的同時會有 HSF1-dependent HSP27 和 HSP70 誘導上升情形，將 HSP90 抑制作用，誘導其他的熱休克反應來因應 (Erllichman, 2009)，而 silence 掉 HSP70 或 HSP27 也已被證實可以增加癌細胞對於 geldanamycin 的敏感性 (Powers *et al.*, 2008)。故臨床上也朝合併使用 HSP90 抑制劑與 HSP70 抑制劑 (Evans *et al.*, 2010) 或 HSP27 antisense 抑制劑的方向作發展 (Hadchity *et al.*, 2009)。

三、細胞存活與增生之路徑

(一) PI3K-Akt-mTOR 訊息傳遞路徑

當細胞表面的酪胺酸激酶接受器 (如 ERBB2、EGFR) 接受到生長因子活化，會活化下游的 PI3K。PI3K 本身是由 p85、p110 組成的異質雙聚體 (heterodimer)，當上游 PTKRs 被活化時，會招募 (recruit) 下游的 adaptor protein (如 ERBB3、GRB2-associated binding protein 1)，進而招募 p85-p100 雙聚體到細胞膜表面，將其受質 PIP2 磷酸化成第二信使 PIP3，並且使 p100 subunit 與 p85 分離；細胞膜表面累積的 PIP3 會招募下游訊息傳遞蛋白 (如 Akt、PDK1) 到細胞表面，並使這些

訊息傳遞蛋白被磷酸化，活化下游的訊息傳遞路徑。如 Akt 在 serine 473 及 threonine 308 被磷酸化後活化，而活化的 Akt 會藉由磷酸化下游蛋白，如 GSK3 α 、GSK3 β 、FoxO、MDM2、BIM、BAD 等，調控細胞週期與幫助細胞生存，或是藉由抑制 TSC2，使得下游的 mTOR 活化，幫助細胞蛋白質的合成 (附圖 8)(Hollander *et al.*, 2011)。

(二) MAPK 訊息傳遞路徑

RAS 在細胞中主要負責細胞的基因表現、增生、生存、分化，調控細胞週期與細胞骨架，而在許多癌細胞中也發現有 RAS 訊息途徑高度活化，幫助癌細胞進程的情形。未活化的 GDP-bound RAS 會藉由 GEF 的活化，釋放出 GDP 使得 GTP 可接上 RAS，進而招募下游的 effector protein，而當 GTP-bound RAS 與 GAP 結合後，RAS 本身的 GTPase 會上升 105 倍，使得 GTP 被水解，回到未活化的 GDP-binding 型態 (附圖 9a)。RAS-Raf1-MEK-ERK pathway 是癌症中最常見的 RAS 調控相關路徑，經由上游的生長因子酪胺酸激酶受器活化，招募下游的 adaptor protein 如 GRB2、SOS，進而招募 RAS 到細胞膜表現，磷酸化並活化之，使其可活化下游的蛋白，如 Raf1、MEK、ERK 等，幫助細胞的增生與轉錄 (Ahearn *et al.*, 2012)。

(三) 細胞存活與增生訊息傳遞路徑共同調節

在許多癌症中常有 PI3K-Akt pathway 與 MAPK pathway 藉由生長因子或突變活化的情形，生長因子酪胺酸激酶受器，如 EGFR、ERBB2、ERBB3、FGFR1、FGFR3 等，經由與受質結合、過度表現或突變方式，活化下游的 RAS。RAS-Raf1-MEK-ERK pathway 經由磷酸化許多的受質蛋白，引起細胞中的多種反應，如幫助細胞增生與生長；而活化的 RTK 同時也會藉由與 p85 subunit 結合，招募 p85-p100 異質雙聚體 (PI3K)，進而磷酸化下游的 PIP2 成 PIP3，促進 AKT 的磷酸化與活化，引發多種細胞生存的訊息途徑。而這兩條途徑的交集是 TSC1/TSC2 複合物，AKT 與 MEK 可藉由磷酸化 TSC2，使得抑制型 TSC1/TSC2 複合物不活化，間接促進 RHEB 的活化，最終導致下游 mTOR 活化 (附圖 10)(Knowles *et al.*, 2015)。mTOR 的活化會磷酸化 p70S6 kinase 及 4EBP1，使抑制型 4EBP1 與 eIF4E 分離，而促進癌細胞內蛋白質的合成 (附圖 8)(Knowles *et al.*, 2015)，已有文獻顯示必須同時抑制 PI3K-Akt pathway 和 MAPK pathway 才能有效抑制 mTORC1 訊息與

提升 pro-apoptotic protein BH3 family 的作用 (Engelman, 2009)。



四、細胞凋亡

(一) 計畫性細胞死亡 (Programmed cell death)

細胞凋亡 (apoptosis) 又稱為計畫性細胞死亡 (programmed cell death)，是多細胞中常見的自我調控機制，當正常細胞過度生長，接受到內生性或外生性的凋亡訊號時，便會啟動細胞凋亡使細胞安靜的死亡，且不會釋出細胞內物質而引起發炎反應，以控制組織的細胞數目或除去損傷的細胞。首先，凋亡的細胞會因為細胞骨架的崩解而皺縮 (shrink)、固縮 (pyknosis)；細胞核中的染色體凝集，形成凋亡小體 (apoptotic bodies) 並且結構被分解出現斷裂點，最終凋亡的細胞會形成可被巨噬細胞吞噬的球體 (Elmore, 2007)。

(二) 細胞凋亡之途徑

執行細胞凋亡的最常見蛋白質為 caspase，可分為啟動 caspase (initiator caspase: caspase-8、caspase-9) 及執行 caspase (effector caspase: caspase-3、caspase-6、caspase-7)，effector caspase 會進一步切割許多凋亡受質而造成細胞凋亡。活化啟動 caspase 的路徑大致可分為兩類：內生性路徑 (intrinsic pathway) 和外生性路徑 (extrinsic pathway)，外生性路徑是由細胞上的死亡受器 (death receptor) 和受質結合後活化，進而和 procaspase-8 形成活化的 death-inducing signaling complex (DISC)，進而將 procaspase-8 活化成 caspase-8；內生性路徑路徑則是細胞在藥物、放射線、UV、DNA 損害刺激下，引起粒線體膜電位失衡，降解抗凋亡蛋白 Mcl-1，使 pro-apoptotic Bcl-2 family 蛋白如 Bid、Bad、Bim 活化，進而使 Bax、Bak 活化並在粒線體上穿孔，釋放 cytochrome *c* 到細胞質，並和 Apaf-1、procaspase-9 形成凋亡複合體 (apoptosome)，最終導致 caspase-9 被活化。當啟動 caspase 被活化後，會將未活化態的執行 caspase 水解成活化態的執行 caspase，而執行 caspase 活化後會切割活化一些水解酵素，如 PARP，只知執行細胞凋亡的功能 (附圖 11)(Elmore, 2007)。

(三) 熱休克蛋白與細胞凋亡之關係

在細胞凋亡途徑中，熱休克蛋白如 HSP27、HSP70、HSP90 抑制許多相關的受質蛋白，進而抑制 caspase-dependent 與 caspase-independent 的細胞凋亡途徑。HSP27 可藉由抑制 caspase-3、p53、cytochrome c 的活化來抑制細胞凋亡；HSP70 可藉由抑制 proapoptotic protein BAX、JNK、caspase-3 的活化來抑制細胞凋亡；HSP90 可藉由活化 AKT，使下游的 proapoptotic protein BAD、Bax 被磷酸化失去活性，或是藉由 AKT 活化下游的 NF- κ B pathway 幫助細胞存活，而 HSP70 和 HSP90 可以藉由抑制 Apaf-1 和 caspase-9 形成 apoptosome，來抑制下游凋亡途徑的活化。(附圖 12)(Ischia *et al.*, 2013)

五、細胞週期

細胞週期是指真核細胞經由一連串精確且有規律的步驟，使一個母體細胞經由細胞增殖 (production) 與分裂 (division)，產生兩個具有相同遺傳物質的子代細胞。細胞週期可分為四個時期：Gap 1 (G_1)-phase、Synthesis (S)-phase、Gap 2 (G_2)-phase、Mitotic (M)-phase，此外，未進入細胞週期的靜止細胞稱之為 G_0 -phase。 G_1 -phase 細胞會開始生長，並準備 DNA 合成所需要的酵素，當細胞通過 G_1 checkpoint，才會進行下一階段的染色體複製工作；S-phase 細胞的 DNA 會進行複製，將單套染色體複製為雙套染色體； G_2 -phase 時期細胞已具有雙套染色體，並開始合成有絲分裂所需要的酵素，當細胞通過 G_2 checkpoint，才會開始進行有絲分裂；M-phase 細胞進行細胞核分裂 (nuclear division) 與細胞質分裂 (cytokinesis)，染色體、細胞質與胞器平均分配到兩個子細胞。細胞須通過 spindle assembly checkpoint，確保染色體正確附著在紡錘體上，及細胞週期蛋白正確的調控，才會進行有絲分裂 (Pines, 2011)。

(一) 細胞週期蛋白

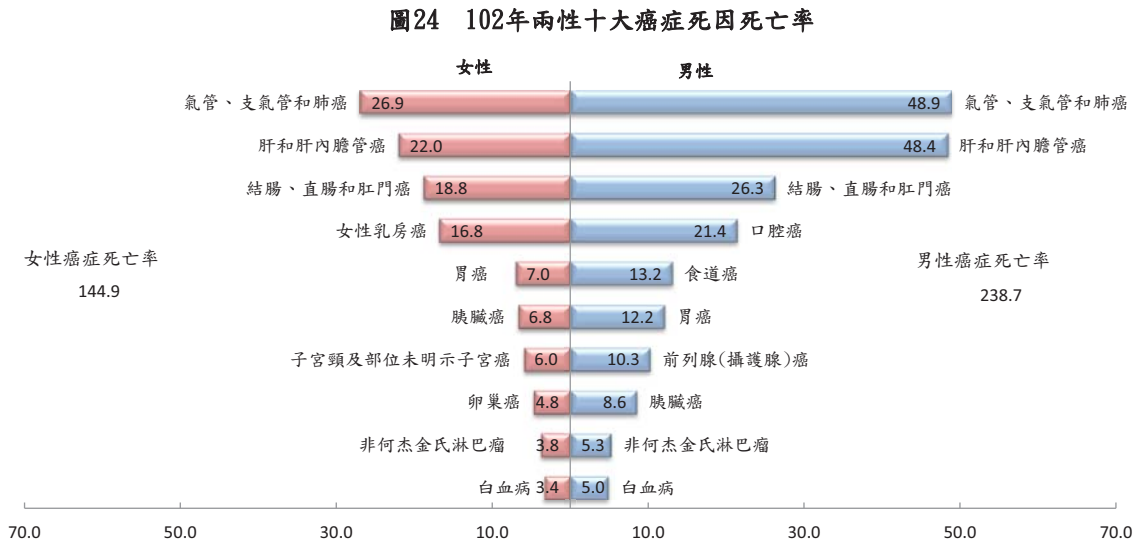
細胞週期的正常運作，主要是透過 cyclin 與 cyclin-dependent kinase (Cdk) 結合形成蛋白複合物來調控。活化態的 Cdk1/cyclin B 複合物動細胞從 G_2 進入 M 期；當細胞進入細胞 M 期的 anaphase，Cdk1/cyclin B 複合物會分離而失去活性，使細

胞週期得以繼續進行。Cdk1/cyclin B 複合物主要受到不同位置的磷酸化與去磷酸所調控。Myt1 會藉由將 Cdk1 的 Tyr14 與 Tyr15 位置磷酸化，Wee1 kinase 會將 Cdk1 的 Tyr15 位置磷酸化，抑制其活性；反之，Cdc25C 會將 Cdk1 的 Tyr14 與 Tyr15 位置去磷酸化，CAK 會將 Thr161 鄰酸化，使其活化。PLK1 會幫助 Cdc25C 活化，幫助 Cdk1/cyclin B 複合物的活化。(附圖 14)(Castedo *et al.*, 2002)。

(二) HSP90 與細胞週期的調控

許多細胞週期調控相關的蛋白同時也受 HSP90 的調控，因此在 HSP90 受到抑制的情形，常導致細胞的週期有停滯的情形。細胞週期調控相關蛋白如 Cdk1、Cdk2、Cdk4、Cdk6、Cyclin B1、Cyclin C、Cyclin E、Myt-1、Wee-1、PLK1、Aurora B、Survivin 等都會受到 HSP90 直接或 HSP90 受質蛋白間接調控，使得 HSP90 抑制劑導致癌細胞有 G₁/S 或 G₂/M 停滯的情形。如 HSP90 可藉由調控 Rb pathway 或 Cyclin D/cdk4/cdk6 的活性導致細胞有 G₁ arrest 情形；或是藉由調控 Cyclin B/cdk1、WEE1、Myt-1、PLK1、Aurora B 導致細胞有 G₂/M arrest 情形。由於每種 HSP90 細胞週期受質蛋白對於 HSP90 的抑制感受性不一樣，使用 HSP90 抑制劑導致細胞週期停滯情形，在每種癌細胞並不具有一致性，且在同一種癌細胞不同藥物濃度作用下也可能產生不一樣的細胞週期停滯情形，如 BT272 乳癌細胞，在 50 nM 的 17-AAG (HSP90 抑制劑) 作用下，會先導致細胞 G₂/M arrest，隨後 G₁/S arrest，接著細胞凋亡；但若給予 500 nM 的 17-AAG 則會導致細胞直接 G₂/M arrest，隨後細胞凋亡，且在 50 nM 的濃度時，BT474 乳癌細胞的 HSP90 受質蛋白 HER-2 蛋白會受到 HSP90 抑制影響，而 BCR-Abl 蛋白則不會 (Burrows *et al.*, 2004)。先前的研究顯示，藥物在越晚的時期造成細胞週期停滯，是有助於導致細胞凋亡的，如 gefitinib 抑制 HER2 family kinase 導致細胞 G₁ arrest，但不足以導致細胞凋亡 (Campiglio *et al.*, 2004)；VX680 抑制 Aurora kinase，造成細胞 G₂/M arrest 的同濃度下，能造成細胞凋亡 (Harrington *et al.*, 2004)。且由於 HSP90 致癌性受質蛋白 (如 HER-2、EGFR) 在許多癌症相較於正常組織有高度表現的情形，HSP90 抑制劑與受質蛋白結合使的藥物在癌症組織停留時間相較於正常時間還長，更容易導致癌細胞有細胞週期停滯的情形，相對的正常組織可能在藥物短暫作用後恢復正常細胞週期運作 (Burrows *et al.*, 2004)。

表 1. 民國 102 年台灣兩性十大癌症死因死亡率



資料來源：衛生福利部統計處，更新日期：民國 103 年 9 月 4 日。

附表 2. Staging classifications for lung cancer.

Stage	Description
Non-small cell carcinoma (TNM staging system)	
Local	
IA (T1N0M0)	T1: 3 cm or less in diameter; surrounded by lung or pleura; does not invade main bronchus
IB (T2N0M0)	T2: more than 3 cm in diameter; may invade pleura; may extend into main bronchus but remains 2 cm or more distal to carina; may cause segmental atelectasis or pneumonitis
IIA (T1N1M0)	N1: involvement of ipsilateral peribronchial or hilar nodes and intrapulmonary nodes
Locally advanced	
IIB (T2N1M0 and T3N0M0)	T3: invasion of chest wall, diaphragm, pleura, or pericardium; main bronchus less than 2 cm distal to carina; atelectasis of entire lung
IIIA (T1N2M0, T2N2M0, T3N1M0, and T3N2M0)	N2: involvement of ipsilateral mediastinal or subcarinal nodes
IIIB (T1-4N3M0)	N3: involvement of contralateral nodes or any supraclavicular nodes
Advanced	
IIIB (T4N1-3M0)	T4: invasion of mediastinum, heart, great vessels, trachea, esophagus, vertebral body, or carina; separate tumor nodules; malignant pleural effusion
IV (T1-4N1-3M1)	Distant metastasis
Small cell carcinoma	
Limited	Disease confined to the ipsilateral hemithorax
Extensive	Disease with metastasis beyond the ipsilateral hemithorax

TNM = tumor-nodes-metastasis.

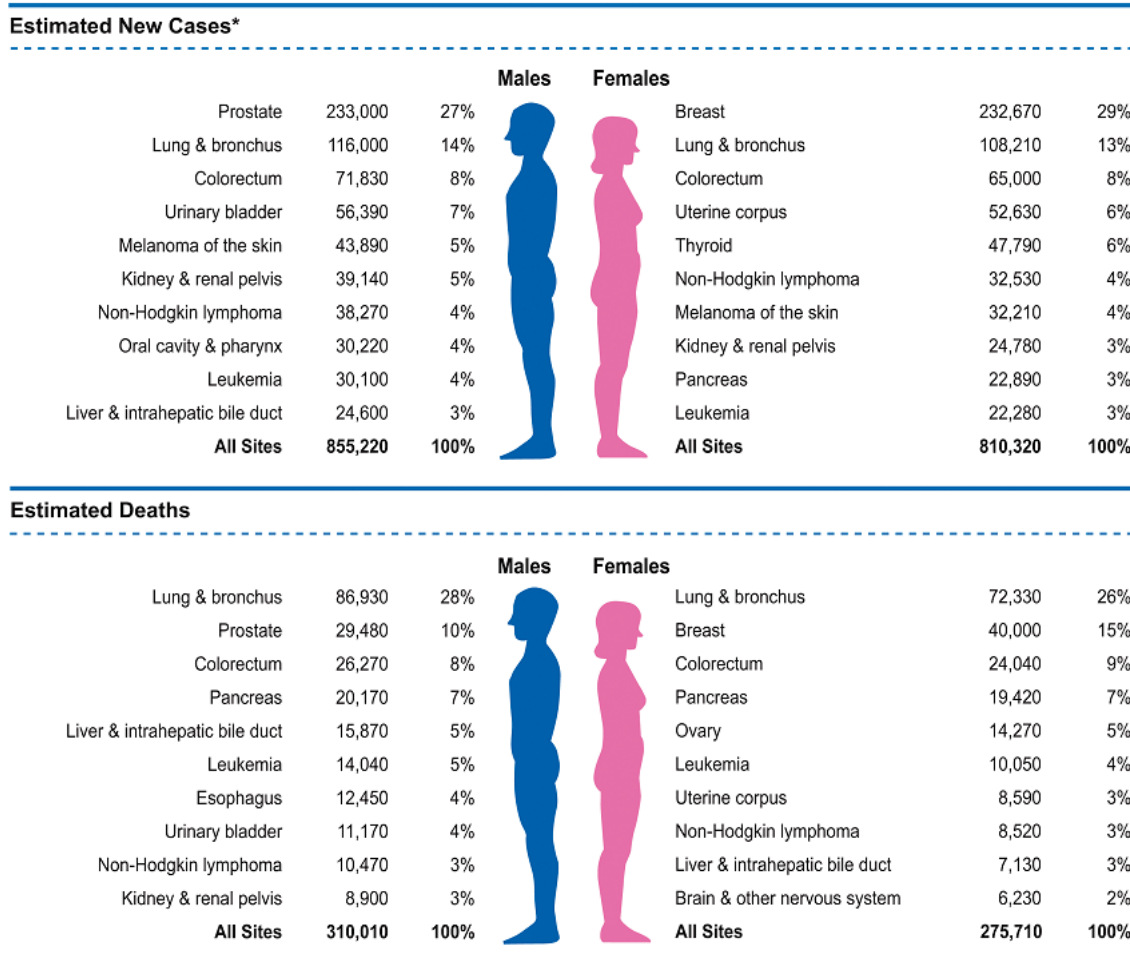
Collins LG *et al.* (2007) American Family Physician 75.

附表 3. Human HSPs according to their molecular weight, location and function.

Family	Members	Molecular weight (kDa)/ sequence length (a.a.)	Intracellular location	Biological function
Small HSPs	HSP10 HSP27	10/102 22/205	Mitochondria Cytosol Nucleus	-Co-factor for HSP60 -Microfilament stabilization -Antiapoptotic
HSP40/DNAJ family	HSP40 DNAJA1	38/340 44/397	Cytosol Nucleus Cytosol	-Accelerate nuclear protein aggregation -Co-chaperone for HSP70 -Co-chaperone of Hsp70 -Contributes to the resistance of tumor to radiotherapy -Promotes reactions in protein metabolism that occur on the ER membrane surface
	DNAJA3	Isoform 1: 52/480 Isoform 2: 49/453	Cytosol Mitochondria	-Tumor suppressor; negative regulator of breast cancer metastasis
	DNAJB4	37/337	Cytosol	-Tumor suppressor in NSCLC; suppresses invasion by upregulating E cadherin
	DNAJB6	Isoform 1: 36/326 Isoform 2: 26/241 Isoform 3: 35/325	Nucleus Cytosol	-Transcriptional repression via NFAT; reduces tumorigenicity and metastasis
	DNAJB9	25/223	Endoplasmic reticulum	-Assists in stabilizing GRP78/BiP binding to unfolded substrate proteins in a J domain-dependent manner -Prevents the accumulation of unfolded proteins in the ER, consequently protecting cells from ER stress -Not investigated
	DNAJC9 DNAJC12	29/260 Isoform 1: 23/198 Isoform 2: 12/107	Nucleus Not reported	-Have an estrogen response elements in its promoter region -An estrogen target gene and that its expression might be used as a marker of the ER transactivation activity
	DNAJC15	16/150	Cytosol	-Transmembrane cochaperone -Expressed in drug sensitive breast cancer cells
	CYP40	40/370	Cytosol	-Accelerates the folding of proteins; catalyzes the cis-trans isomerization of proline imidic peptide bonds in oligopeptides -Modulates apoptosis and mitosis in peroxisome proliferator dependent hepatocellular neoplasms -Refolds proteins and prevents aggregation of denatured proteins -Proapoptotic
HSP60	HSP60	61/573	Mitochondria	-Signaling molecule in the innate immune system -Molecular chaperone; assists the folding of proteins upon ATP hydrolysis
	CCT1 CCT2 CCT3 CCT4 CCT5 CCT6A CCT6B	60/556 57/535 60/545 57/539 59/541 58/531 57/530	Cytosol cytoskeleton Nucleus Cytosol Cytosol cytoskeleton Cytosol cytoskeleton Cytosol Cytosol	-Molecular chaperone -Testis specific expression -Chaperone
HSP70	CCT7 HSP70	59/543 70/641	Cytosol Cytosol	-Assists folding of some newly translated proteins -Guides translocating proteins across organellar membranes through action at both the <i>cis</i> and <i>trans</i> sides -Disassembling oligomeric protein structures -Facilitates proteolytic degradation of unstable proteins -In some cases, controls the biological activity of folded regulatory proteins, including transcription factors
	HSP70-2	70/641	Cell surface	-Constitutively expressed at high levels in brain and testis -Molecular chaperone
	HSP72	70/639	Cytosol	-Stress inducible -Stimulates dephosphorylation (inactivation) of stress kinase JNK in heat-shocked cells and protects them from apoptosis
	HSP73 (HSC70)	70/646	Cytosol	-Constitutively expressed in most tissues -Promotes stabilization of newly synthesized cyclin D1 -Promotes "productive" assembly of the D/CDK4 quaternary holoenzyme complex
	Grp75/Mortalin	73/679	Mitochondria	-Constitutively expressed -Cooperates with Hsp60 to fold preproteins following transit across mitochondrial membrane
	Grp78	72/654	Endoplasmic reticulum	-Antiapoptotic -Regulation of protein folding in endoplasmic reticulum -Anti-inflammatory -Immunomodulator
HSP90	HSP90A	86/732	Cytosol	-Inducible in stress conditions -ATPase activity -Protein translocation -Growth promotion -Cell cycle regulation -Stress-induced cytoprotection
	HSP90B	84/724	Cytosol	-Constitutively expressed -ATPase activity -Early embryonic development -Germ cell maturation -Cytoskeletal stabilization -Cellular transformation -Signal transduction -Long-term cell adaptation
	Grp 94	92/803	Cytosol Endoplasmic reticulum	-Antiapoptotic -Chaperone
	TRAP1	75/704	Mitochondria	-Has ATPase activity -Phosphorylation by PINK1 prevents oxidative-stress-induced apoptosis -Cell cycle regulation

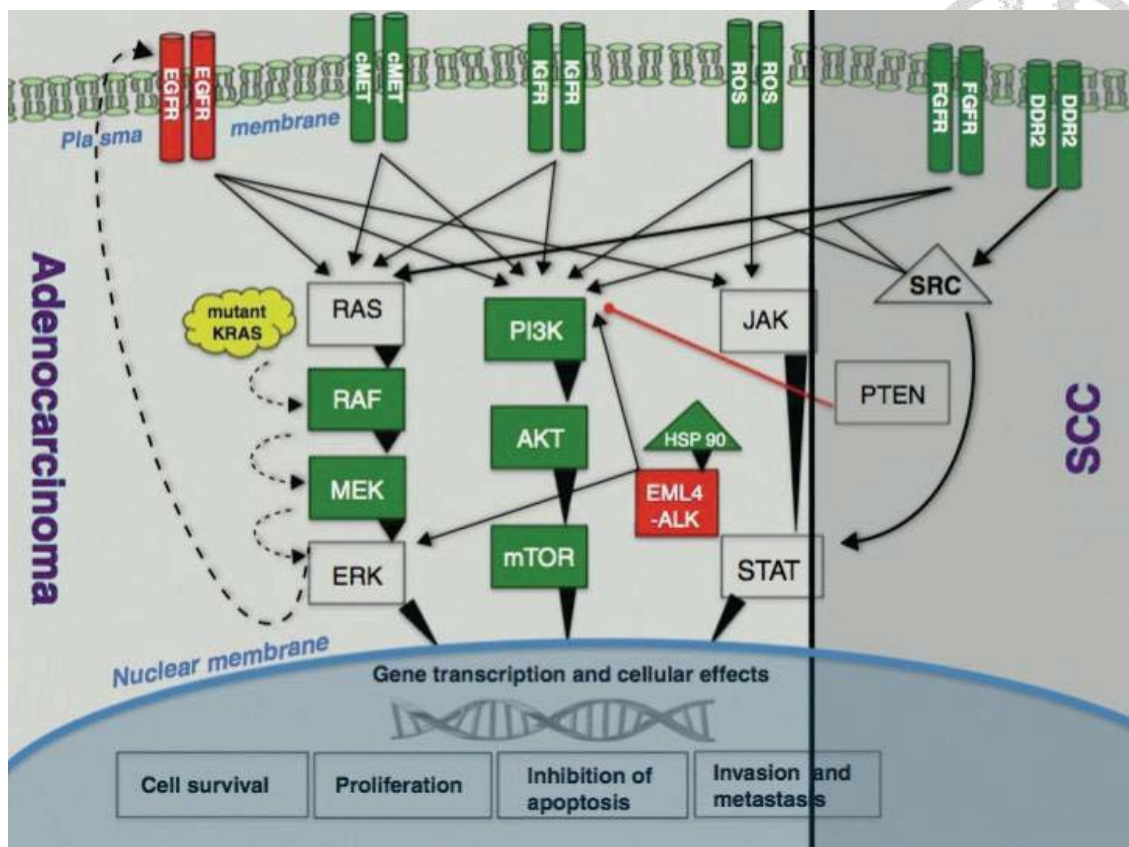
附表 4. Summary of antitumor activity of selected HSP90 inhibitors by tumor type in humans.

Tumor type	Drug	Phase of studies	Response (tumor and markers)	Change in Hsp90 biomarkers pharmacodynamics (PD)	Citations
Breast cancer	Tanespimycin + trastuzumab	II	PR in 1/29 in HER2+ breast cancer pts (24%); SD > 4 weeks in 5/29 HER2+ pts (24%)		Modi et al. ⁷⁶
	Tanespimycin + trastuzumab	II	PR in 6/27 and SD in 10/27 evaluable HER2+ breast cancer patients who had previously progressed on treatment with trastuzumab, providing a clinical benefit rate (CR + PR + SD) of 59%		Modi et al. ⁶
	Alvespimycin + trastuzumab	I	1 confirmed PR in a HER2+ breast cancer pt, 5/25 breast cancer pts with SD > 6 months	Dose-dependent increase in HSP70 seen in PBMCs	Jhaveri et al. ²³
	AUY922	II	PR in 1/10 pts, partial metabolic responses by FDG-PET seen in 2 HER2+ pts who remained on study for >5 cycles	Soluble HER2 levels decreased in 2 HER2+ patients who remained on study for >5 cycles	Schroder et al. ³⁴
	IPI-504 + trastuzumab	II	PR in 1/20 pt. and SD in 14/20 pts	None reported	Modi et al. ⁷⁷
Gastrointestinal Stromal Tumors (GIST)	IPI-504	I	PET PR in 8/54 pts (22%)		Wagner et al. ²⁹
	STA-9090	II (randomized to placebo vs IPI-504)	Trial terminated early due to 3 of 4 on-treatment deaths on the IPI-504 arm		Demetri et al. ⁴⁹
Melanoma	Tanespimycin	II	12/23 evaluable pts had SD (4 SD > 16 weeks, 8 SD > 8 weeks)	Analysis of tumor biopsies from 4 pts did not show sustained inhibition of activated KIT or its downstream pathways	Demetri et al. ⁷⁸
	Alvespimycin	I	15 pts enrolled, 9 pts with available tissue, were BRAF V600E mutant; no responses	13 paired tumor biopsies were conducted showing ↑ HSP70, and ↓ cyclin D1, but no ↓ Raf-1 or ERK levels	Solit et al. ⁵⁶
	STA-9090	I (weekly, biweekly)	Tumor samples confirmed HSP90 inhibition 24 h after 17-DMAG in 2/4 and 2/8 pts given 106 and 80 mg/m ² , respectively		Pacey et al. ²²
Multiple Myeloma	Tanespimycin + bortezomib	I/II	1 PR in melanoma		Cleary et al. ³⁷
Non-small cell carcinoma (NSCLC)	IPI-504	I/II	Response: bortezomib-naïve (41%) bortezomib-pre-treated (20%) bortezomib-refractory (14%)		Richardson et al. ²⁰
		II	PR in 2/11 pts: wild-type (wt) - EGFR (18%), 0 pts with PR with mutant EGFR		Sequist et al. ²⁵
		II	SD > 12 weeks in 7/11 pts: wt-EGFR (64%) SD > 12 weeks in 1/8 pts: mutant-EGFR (13%)		Sequist et al. ²⁶
	Ganetespib (STA-9090)	II	2/3 pts with rALK + NSCLC with PR 5 of 76 (7%) pts enrolled showed a PR, and 18 of 76 (24%) pts had SD for at least 3 months. Of the 68 pts for whom EGFR mutational status was known, 4 of 40 (10%) had wt-EGFR, and 1 of 28 (4%) had activating EGFR mutations. Also, of 3 pts known to have ALK rearrangements, 2 had PRs and 1 had durable SD for 7.2 months		Sequist et al. ²⁶
Ovarian	Tanespimycin + gemcitabine + cisplatin	I	1 pt with PR and 7 pts with prolonged SD		Wong et al. ⁷⁹
	17-DMAG (KOS-1022) + trastuzumab	I	2 PRs in ovarian	↑ HSP70 at 6&25 h, and ↓ ILK at 6 h in PBMCs	Haluska et al. ⁸⁰
Prostate	Alvespimycin	I	1 near complete resolution of ascites and pleural effusion in ovarian cancer pt	Dose-dependent increase in HSP70 seen in PBMCs	Jhaveri et al. ²³
	Tanespimycin	II	PR in 2/25 pts (8%) (prostate, melanoma)	Tumor samples confirmed HSP90 inhibition 24 h after 17-DMAG in pts given 106 and 80 mg/m ² , respectively	Pacey et al. ²²
	IPI-504	II	No objective or confirmed PSA response		Heath et al. ⁸¹
Renal Cell (papillary and clear cell)	Tanespimycin	II	No objective or confirmed PSA response, but one pt with PSA decline and on for 9 cycles		Oh et al. ⁸²
	Tanespimycin	II	No objective responses (6 pts dose reduced)		Ronnen et al. ⁸³
Solid tumors	Ganetespib (STA-9090)	I	1 PR and 2 SD in 49 pts	None reported	Cho et al. ⁶⁰



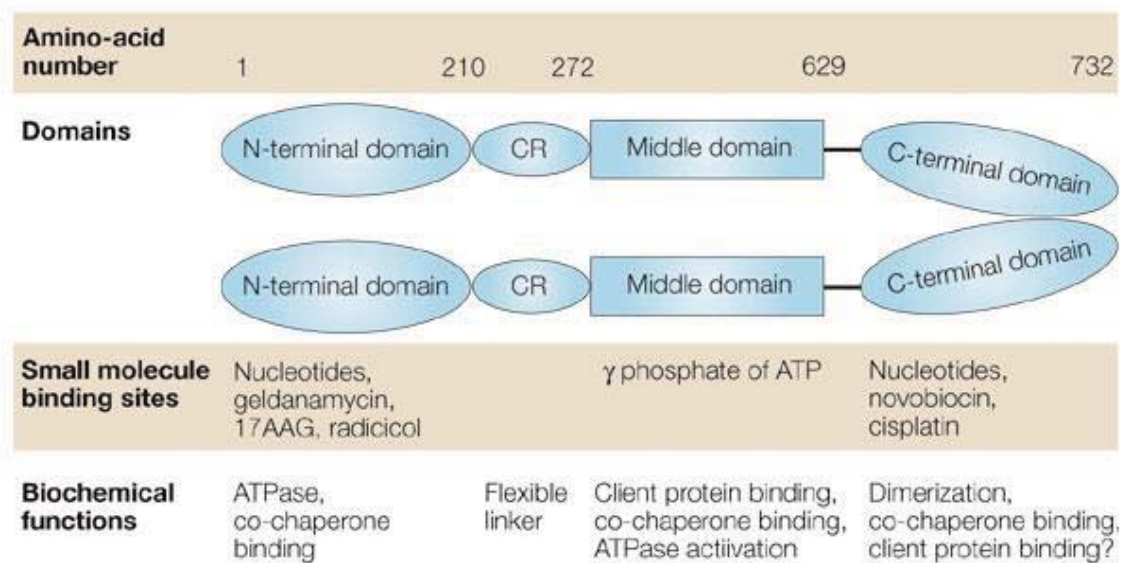
附圖 1. Ten Leading Cancer Types for the Estimated New Cancer Cases and Deaths by Sex, United States, 2014.

Siegel *et al.* (2014) CA Cancer J Clin 2014; 64:9-29.



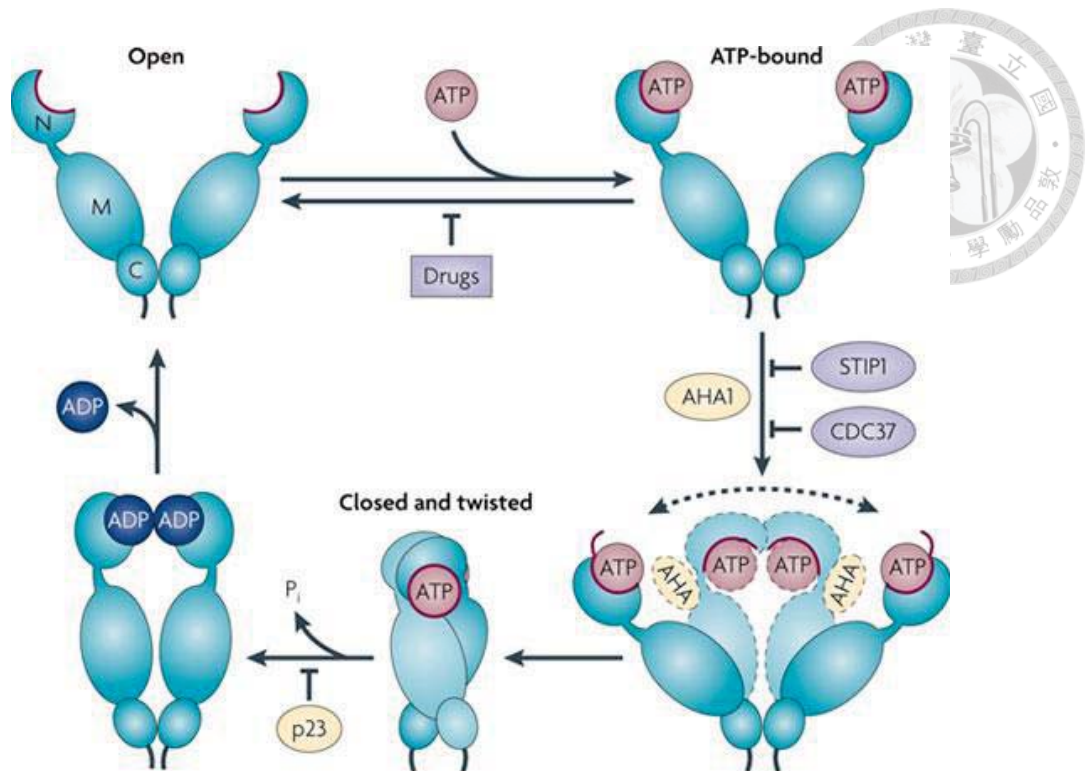
附圖 2. Overview of molecular pathways and potential targets in non-small cell lung cancer (NSCLC). Genetic targets with approved therapeutic agents are shown in red. Targets with agents under development are shown in green while targets with no currently available inhibitors are shown in yellow. Black arrows represent the downstream activation with red line representing the inhibitory action. Dashed arrows represent the proposed auto-activatory mechanism of mutant K-Ras involved to EGFR TKI resistance.

Alamgeer *et al.* (2013) Curr Opin Pharmacol 2013;13:394-401.



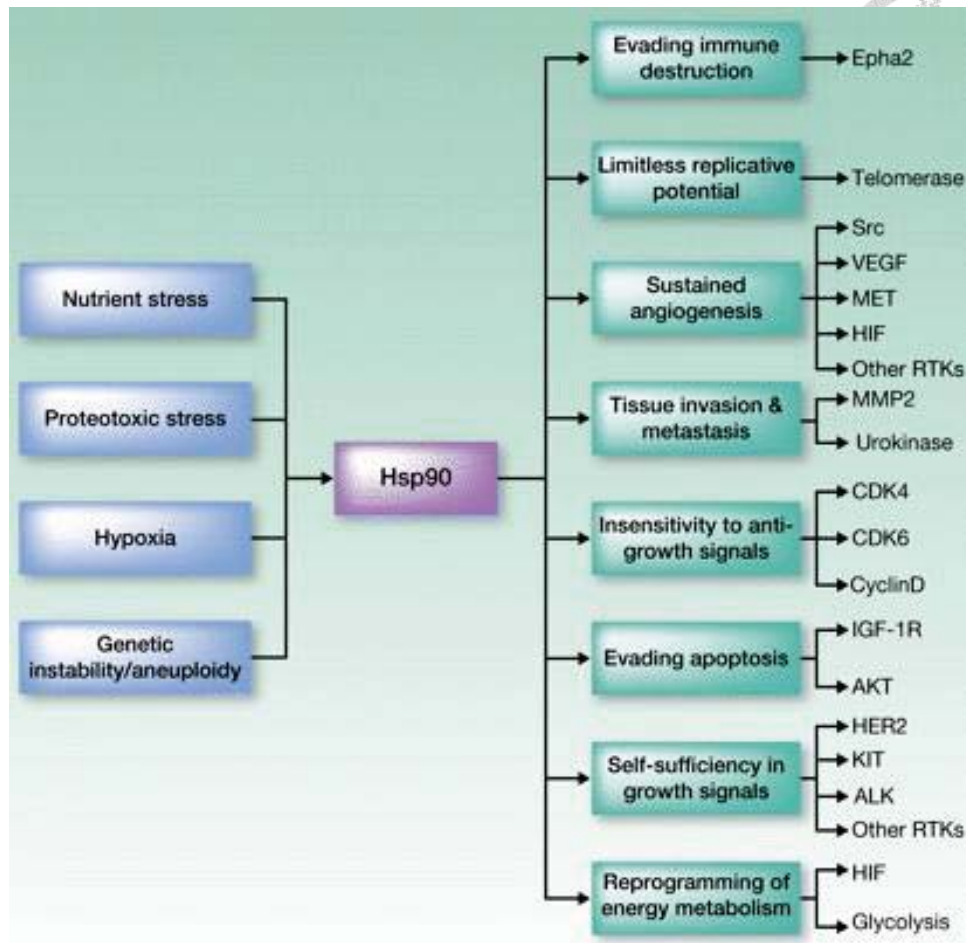
附圖 3. Structure of the HSP90 dimer. The numbering 1–732 indicates the approximate positions in the amino acid sequence of the human protein that define its functional domains. 'CR' refers to a charged region which serves as a flexible linker between the N-terminal and middle domains. The locations where various small molecules bind HSP9 and modulate its function are indicated. The biochemical functions of each domain are also shown. 17AAG, 17-allylaminogeldanamycin; GA, geldanamycin.

Whitesell L *et al.* (2005). *Nat Rev Cancer* 5(10): 761-772.



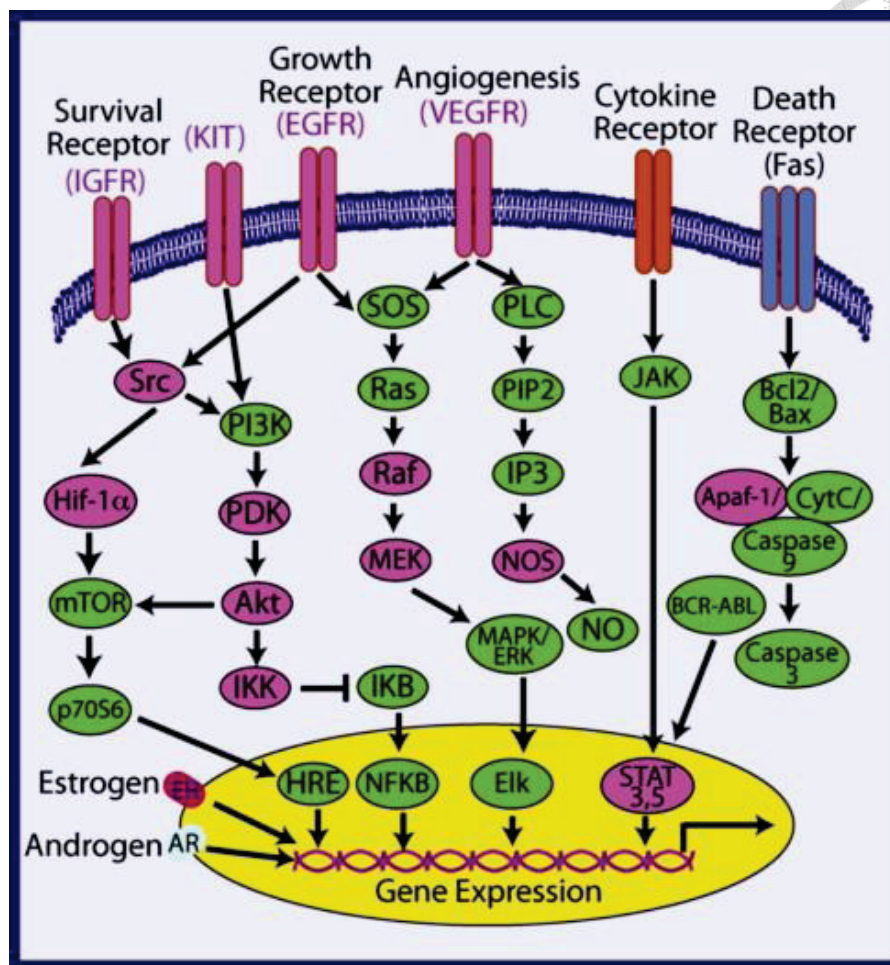
附圖 4. The HSP90 chaperone cycle. Although molecular chaperone heat shock protein 90 (HSP90) samples multiple conformations in the absence of ATP or other factors, current models propose that ATP binding and hydrolysis, as well as a precisely sequenced interaction with an array of co-chaperones, subtly shift the conformational equilibrium, presumably by lowering the energy barrier between certain conformations, thus providing directionality to the HSP90 cycle^{23, 26, 27}. ATP binding to the undimerized (open) amino terminal (N) domain of HSP90 promotes repositioning of a 'lid' segment (red) that leads to transient dimerization of the N domains. Subsequent structural rearrangements result in the 'closed and twisted' conformation of HSP90 that is committed to ATP hydrolysis. Binding of the co-chaperone activator of HSP90 ATPase 1 (AHA1) enhances the rate of ATP hydrolysis-dependent HSP90 cycling by increasing the rate of the conformational alterations that result in the acquisition of ATPase competence. The dashed arrow reflects the difficulty of HSP90 in achieving the ATPase-competent conformation in the absence of AHA1. The co-chaperones STIP1 (also known as p60HOP) and cell division cycle 37 homologue (CDC37), and N domain-binding HSP90 inhibitors, exert an opposite effect to that of AHA1 by preventing the initial structural changes necessary for N domain dimerization. Prostaglandin E synthase 3 (PTGES3; also known as p23) slows the ATPase cycle by stabilizing the closed conformation that is committed to ATP hydrolysis.

Trepel J et al. (2010) Nat Rev Cancer 10(8): 537-549.



附圖 5. HSP90 serves as a buffer against the many environmental stresses that cancer cells must endure and overcome. To accomplish this, the molecular chaperone regulates numerous signaling proteins and pathways (shown on the right).

Neckers L *et al.* (2012). Clin Cancer Res January 1, 2012 18; 64



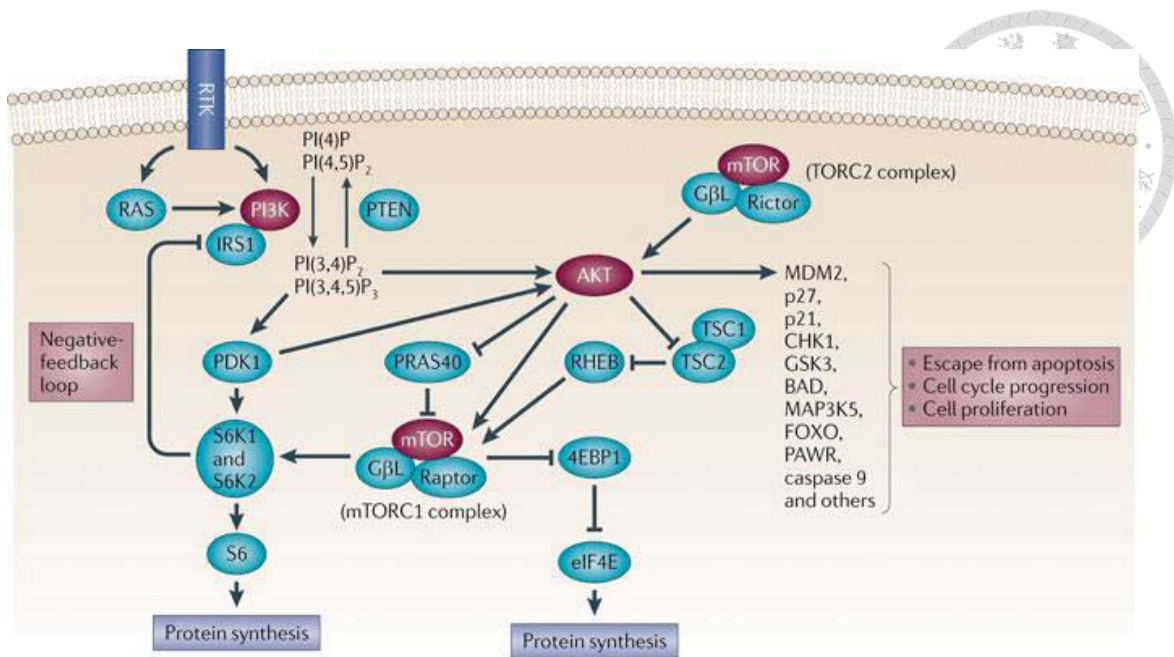
附圖 6. HSP90 client protein pathways involved in survival and anti-apoptosis of tumor cells. JAK – Janus family of tyrosine kinases; STAT – Signal transducers and activators of transcription; MAPK/ERK – Mitogen activated protein kinase, Extracellular signal-regulated kinase; PDK – Phosphoinositide-dependent kinase.

Hong DS et al. (2013) Cancer Treatment Reviews **39**(4): 375-387.

Structure	Inhibitor	Phase	Route	Source
	Tanespimycin (17-AAG)	II/III	Intravenous	BMS
	Retaspimycin hydrochloride (IPI-504)	II	Intravenous	Infinity
	BIIB021 (CNF2024)	II	Oral	Biogen Idec
	AU922	I/II	Intravenous	Novartis
Resorcinol derivative*	STA-9090	I/II	Intravenous	Synta
	IPI-493	I	Oral	Infinity
	SNX-5422 mesylate	I	Oral	Pfizer, Inc.
Small molecule*	BIIB028	I	Intravenous	Biogen Idec
Small molecule*	KW-2478	I	Intravenous	Kyowa Hakko Kirin
Small molecule*	AT13387	I	Oral or intravenous	Astex Therapeutics
Small molecule*	XL888	I	Oral	Exelixis
Small molecule*	HSP990	I	Oral	Novartis
Small molecule*	MPC-3100	I	Oral	Myriad Pharmaceuticals
Nanoparticle albumin-bound 17-AAG	ABI-010	I	Intravenous	Abraxis Bioscience

附圖 7. HSP90 inhibitors in clinical trials

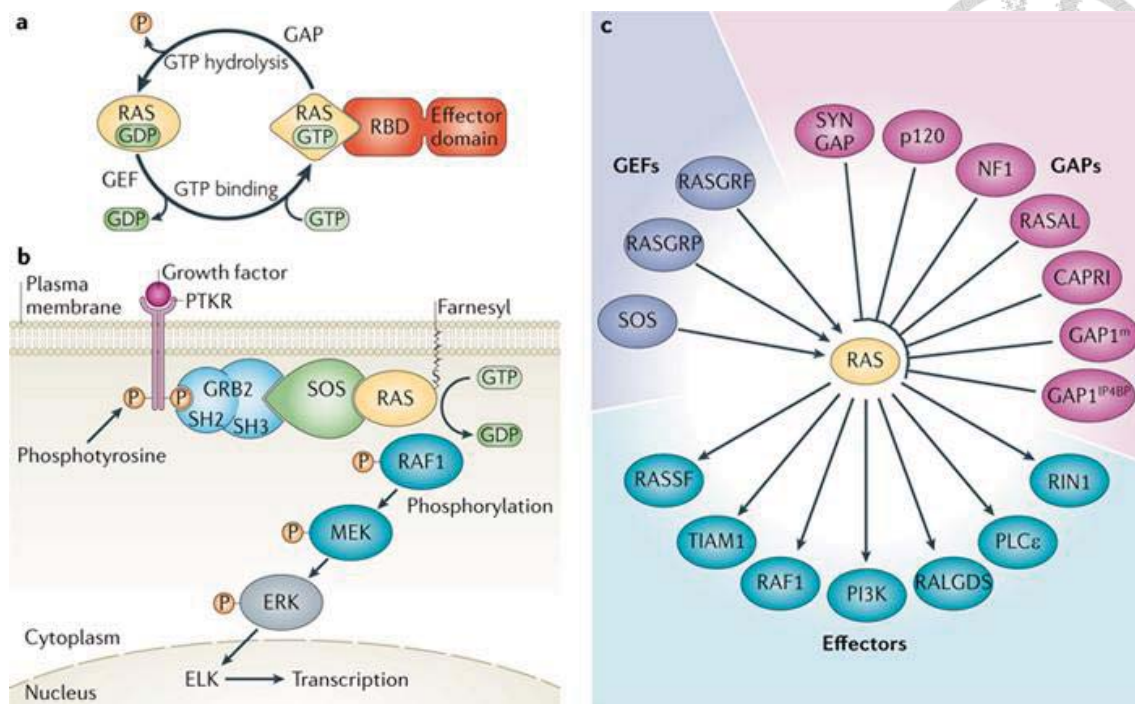
Trepel *et al.* (2010). Nat Rev Cancer. 2010;10(8):537-549.



附圖 8. Canonical PI3K–AKT–mTOR pathway.

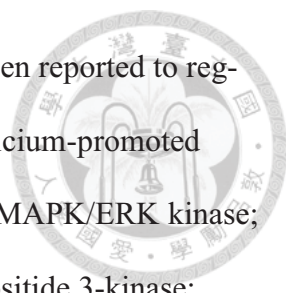
PTEN opposes PI3K function, leading to inactivation of AKT, a crucial downstream target. When PTEN activity is decreased or absent, products of PI3K activate AKT through the activation of its upstream kinase phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK1; encoded by PDPK1). Other upstream regulators of the pathway include receptor tyrosine kinases (RTKs) such as ERBB2 and epidermal growth factor receptor (EGFR) that are important in breast and lung cancer, respectively important downstream targets of AKT (such as p27, p21, FOXO and PAWR (also known as PAR4)) are involved in multiple functions that are crucial for tumour cell growth and survival. mTOR activity is also increased when PTEN activity is lost, and mTOR itself has important targets, including AKT, as well as proteins required for protein translation such as ribosomal protein S6 kinase (S6K; encoded by RPS6KB1 and TPS6KB2) and eukaryotic initiation factor 4E binding protein (4EBP1; encoded by EIF4EBP1). mTOR exists in two different protein complexes, TORC1 and TORC2. Inhibitors of TORC1 by drugs such as rapamycin can activate AKT by deactivating a negative-feedback loop mediated by S6K and insulin receptor substrate 1 (IRS1). Proteins that can be targeted by drugs are indicated in red. BAD, BCL-2-associated agonist of cell death; GSK3, glycogen synthase kinase 3; MAP3K5, apoptosis signal regulator kinase 1.

M. Christine Hollander *et al.* (2015). *Nature Reviews Cancer* 15, 7–24



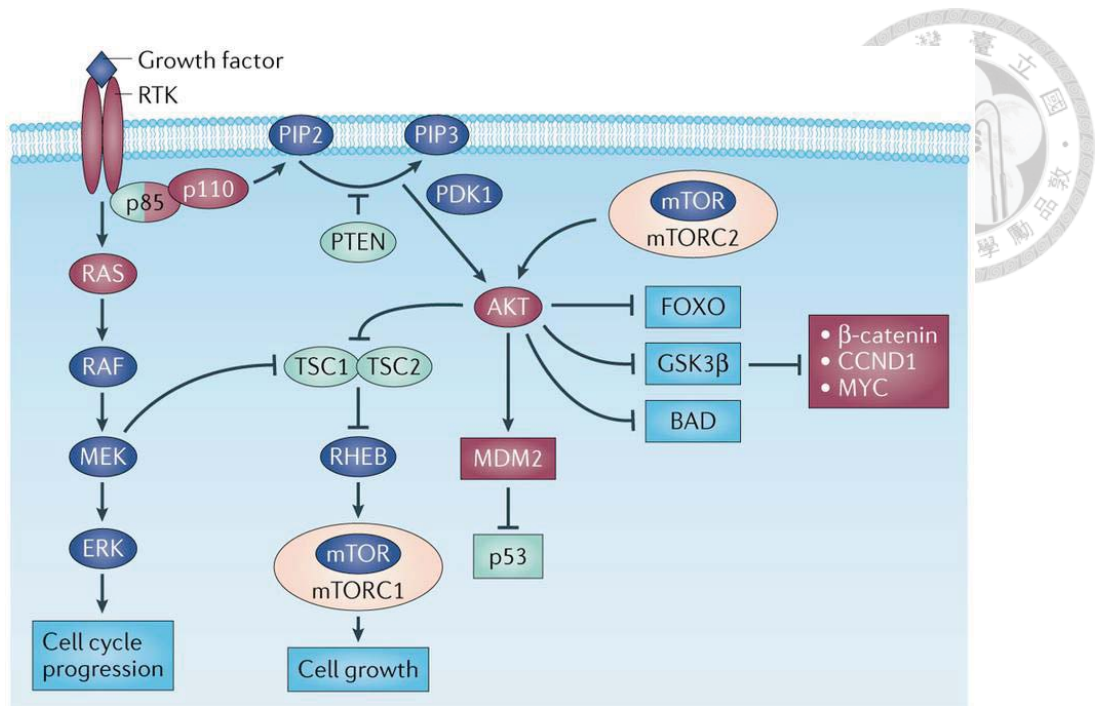
附圖 9. RAS signalling pathway.

a | The GDP–GTP cycle of RAS is shown. Inactive, GDP-bound RAS is activated by a guanine nucleotide exchange factor (GEF), which induces the release of GDP and thereby permits GTP to bind. GTP loading induces a marked conformational change in RAS that allows it to bind effectors via their RAS-binding domains (RBDs). The 'on' state of RAS is limited by its slow intrinsic GTPase activity, which is accelerated up to 105-fold by the binding of a GTPase-activating protein (GAP), allowing RAS to return to its inactive, GDP-bound state. b | The RAS–RAF1–extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway. This pathway is engaged by protein Tyr kinase receptors (PTKRs), which are activated by growth factor binding. The adaptor protein growth factor receptor-bound 2 (GRB2) binds to activated (that is, phosphorylated) RTKs. GRB2 also binds the GEF Son of sevenless (SOS) and brings it to the membrane, where it can activate RAS. RAS initiates downstream signalling by bringing RAF1 to the membrane and activating its kinase activity. This is the best-characterized RAS-regulated pathway and it is frequently dysregulated in cancer. c | Multiplex regulation of, and signalling from,



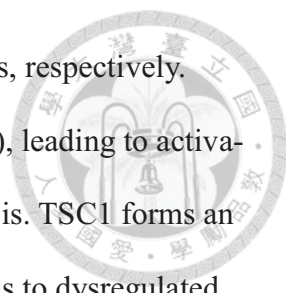
RAS. The various families of GEFs, GAPs and effectors that have been reported to regulate RAS or transmit signals from RAS·GTP are shown. CAPRI, calcium-promoted RAS inactivator; GAP1IP4BP, GAP1 InsP4-binding protein; MEK, MAPK/ERK kinase; NF1, neurofibromin 1; PLC ϵ , phospholipase C ϵ ; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; RALGDS, RAL guanine nucleotide dissociation stimulator; RASAL, RASGAP-activating-like; RASGRF, RAS-specific guanyl-nucleotide-releasing factor; RASGRP, RAS-specific guanine-nucleotide-releasing protein; RASSF, RAS association domain-containing family; RIN1, RAS and RAB interactor 1; SYNGAP, synaptic RASGAP; TIAM1, T lymphoma invasion and metastasis-inducing 1.

Ian M. Ahearn *et al.* (2012). Nature Reviews Molecular Cell Biology 13, 39-51



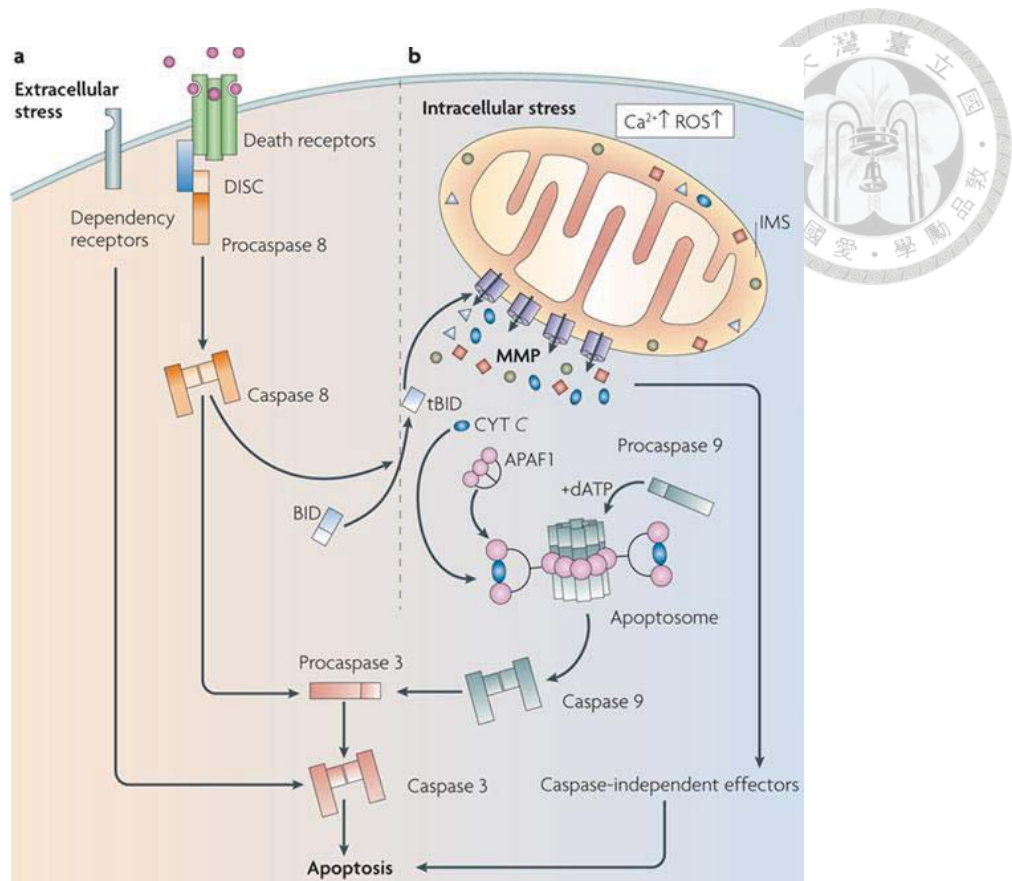
附圖 10. The PI3K and MAPK pathways in cancers.

Growth factor-mediated signalling or mutational activation of both PI3K and MAPK pathways is common in multiple cancers. Receptor tyrosine kinases (RTKs), epidermal growth factor receptor (EGFR), ERBB2, ERBB3, fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1) and FGFR3 may be activated by ligand, overexpression and/or mutation in cancers. Through adaptor proteins, these RTKs activate RAS. Signalling via the RAS–RAF–MEK–ERK cascade leads to phosphorylation of many substrates that can have multiple cellular effects depending on the intensity and duration of signalling. In many situations proliferation is induced. Activated RTKs bind to p85 (the regulatory subunit of PI3K) and recruit the enzyme to the membrane, where it phosphorylates phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂) to generate PIP₃. Activated RAS can also directly activate PI3K. PIP₃ recruits 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1; also known as PDPK1) and AKT, resulting in activation of AKT by phosphorylation, which leads to both positive and negative regulation of a wide range of target proteins (not all shown). Cyclin D1 (CCND1) and MDM2 are upregulated directly or



indirectly, resulting in a positive stimulus via the RB or p53 pathways, respectively. AKT also phosphorylates and inactivates tuberous sclerosis 2 (TSC2), leading to activation of mTOR complex 1 (mTORC1), which controls protein synthesis. TSC1 forms an active complex with TSC2, and loss of function of either protein leads to dysregulated mTOR signalling. AKT phosphorylates and inactivates glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β), relieving its suppression of β -catenin, which is freed to enter the nucleus and activate gene expression. MYC expression is induced as a consequence of both ERK and AKT signalling. Key genes that are activated in bladder cancer are shown in dark red and those that are inactivated in green. BAD, BCL-2-associated agonist of cell death; FOXO, forkhead box O; RHEB, Ras homologue enriched in brain.

Margaret A. Knowles *et al.* (2015). Nature Reviews Cancer 15, 25–41

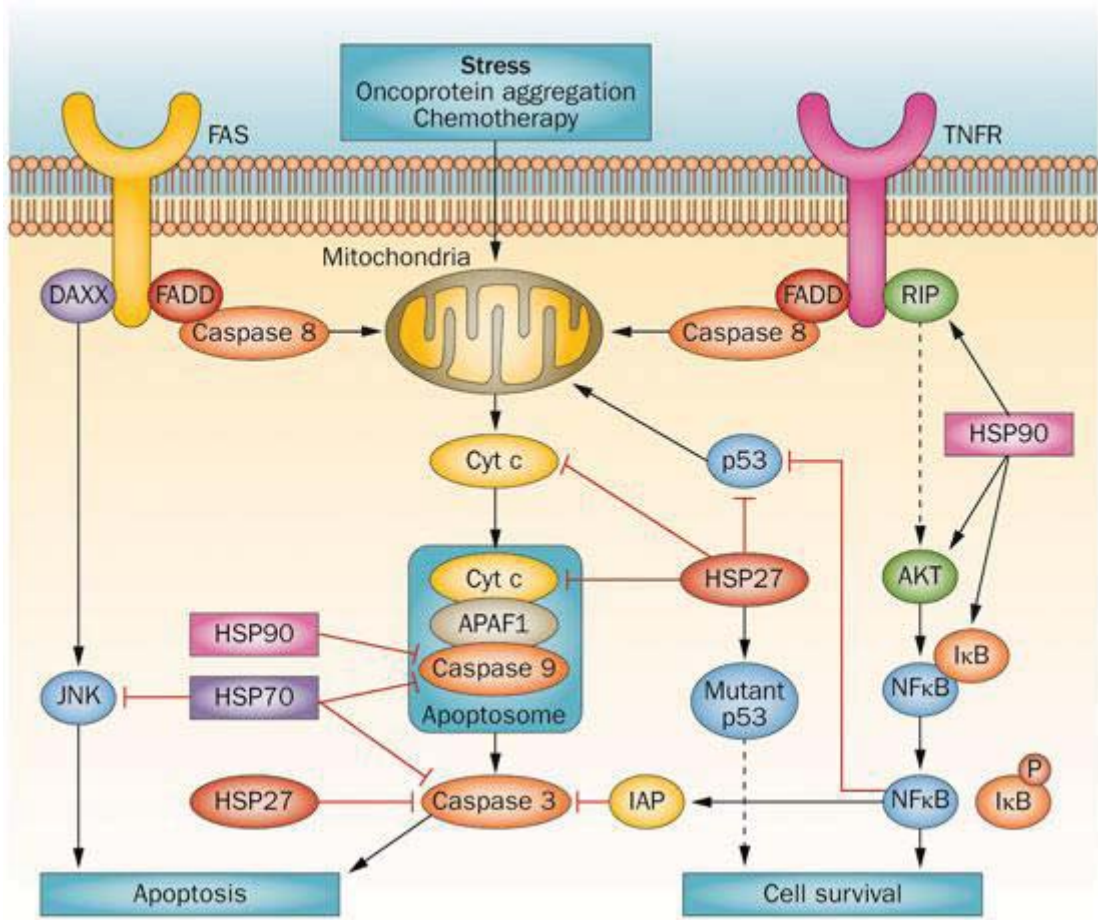


附圖 11. The extrinsic and intrinsic pathways of apoptosis.

Apoptosis can result from the activation of two biochemical cascades, which are known as the extrinsic (part a) and the intrinsic (or mitochondrial, part b) pathways. The extracellular apoptotic pathway is initiated at the plasma membrane by specific transmembrane receptors, whereas mitochondrial apoptosis is triggered by intracellular stimuli such as Ca^{2+} overload and overgeneration of reactive oxygen species (ROS). In both pathways, initiator caspases (caspase 8 and 9, respectively) are activated within specific supramolecular platforms and so can catalyse the proteolytic maturation of executioner caspases, such as caspase 3, which mediate (at least part of) the catabolic processes that characterize end-stage apoptosis. Mitochondrial membrane permeabilization (MMP) marks a point of no return in the mitochondrial pathway (see also Figs 2, 3), by activating both caspase-dependent and caspase-independent mechanisms that eventually execute cell death. For example, following MMP the mitochondrial intermembrane

space (IMS) protein cytochrome c (CYT C) is released into the cytosol and interacts with the adaptor protein apoptotic peptidase activating factor 1 (APAF1) as well as with procaspase 9 to form the apoptosome. This results in the sequential activation of caspase 9 and executioner caspases, such as caspase 3, a process that is known as the caspase cascade. One of the major links between extrinsic and mitochondrial apoptosis is provided by the BCL-2 homology domain 3 (BH3)-only protein BID, which can promote MMP following caspase-8-mediated cleavage. dATP, deoxyadenosine triphosphate; DISC, death-inducing signalling complex; tBID, truncated BID.

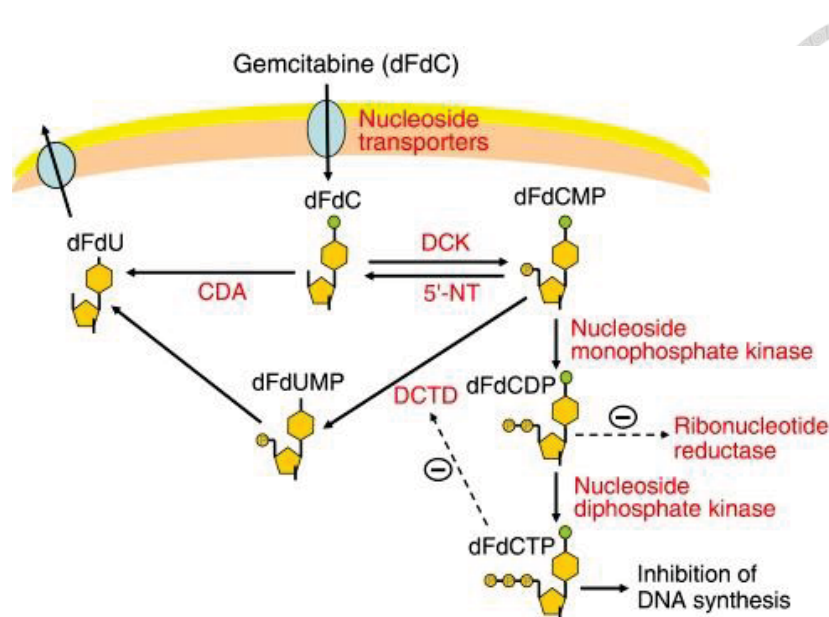
Lorenzo Galluzzi *et al.* (2007). *Nature Reviews Neuroscience* 10, 481-494



附圖 12. Regulation of cell death pathways by HSPs, which are upregulated by cellular stressors such as hyperthermia or local hypoxia and acidosis.

HSP27, HSP70, and HSP90 inhibit multiple steps in both caspase-dependent and caspase-independent apoptotic pathways, providing protection from apoptosis-inducing treatments such as radiotherapy or cytotoxic agents. Stimulation of the tumour necrosis factor receptor (TNFR) leads to protein-kinase-dependent phosphorylation of the IκB complex, which is responsible for holding NFκB stable in the cytoplasm. Upon release from the IκB complex, NFκB translocates to the nucleus and activates transcription of its target genes. HSP90 chaperones multiple proteins in the TNFR-stimulated pathway. Mutant p53 is stabilized and protected from degradation by HSP27, enabling it to exert procancerous effects (possibly via the dominant-negative inhibition of wild-type p53).

Joseph Ischia *et al.* (2013). *Nature Reviews Urology* 10, 386-395

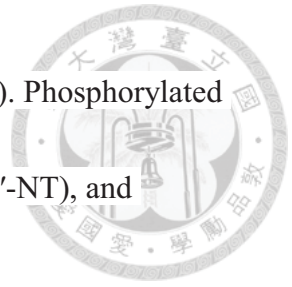


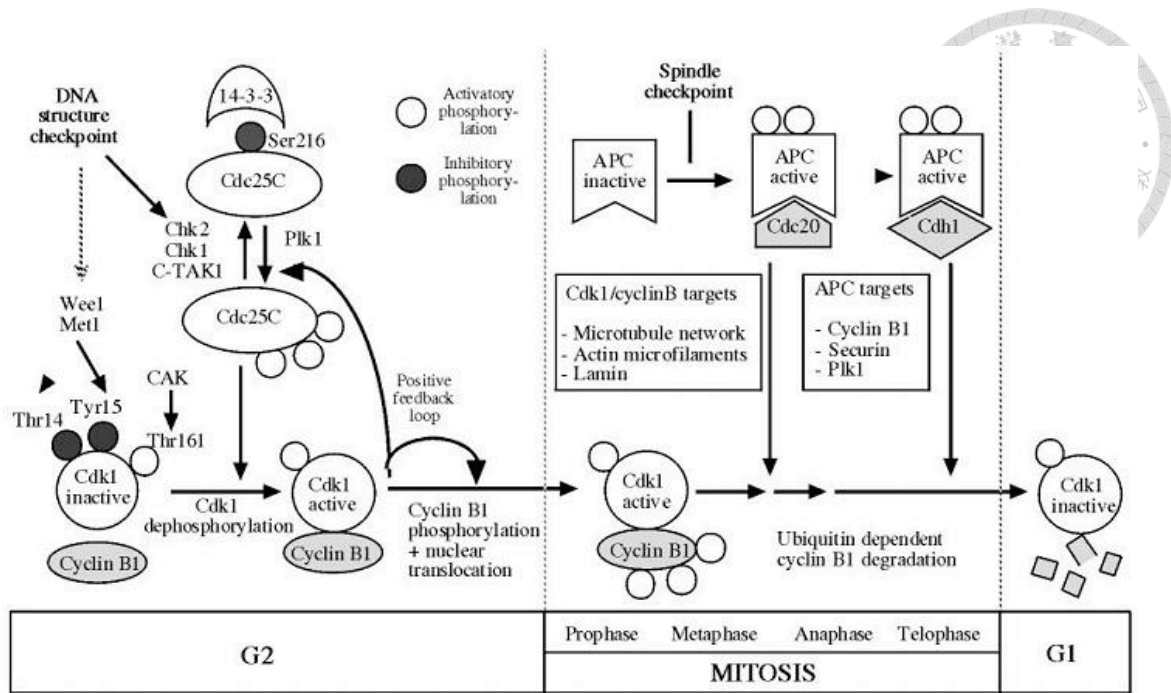
附圖 13. Cellular metabolism and mechanism of gemcitabine

Once administered, gemcitabine is transported into cells by nucleoside transporters.

Gemcitabine is then phosphorylated into gemcitabine monophosphate (dFdCMP) by deoxycytidine kinase (DCK), and dFdCMP is subsequently phosphorylated to gemcitabine diphosphate (dFdCDP) and gemcitabine triphosphate (dFdCTP) by nucleoside monophosphate (UMP/CMP) and diphosphate kinase. Gemcitabine exerts its cytotoxic effect mainly through inhibition of DNA synthesis by being incorporated into the DNA strand as the active dFdCTP. It is known that gemcitabine has a unique mechanism of action known as 'self-potential'. For example, dFdCDP potently inhibits ribonucleotide reductase, resulting in a decrease of competing deoxyribonucleotide pools necessary for DNA synthesis. Again, dFdCTP suppresses inactivation of dFdCMP by inhibiting deoxycytidine monophosphate deaminase (DCTD). On the other hand, more than 90% of administered gemcitabine is converted, and thus inactivated, by

cytidine deaminase (CDA) into 2'-deoxy-2',2'-difluorouridine (dFdU). Phosphorylated metabolites of gemcitabine are reduced by cellular 5'-nucleotidase (5'-NT), and dFdCMP is also converted, and inactivated, by DCTD into 2'-deoxy-2',2'-difluorouridine monophosphate (dFdUMP).
H Ueno *et al.* (2007). Br J Cancer. ; 97(2): 145–151.





附圖 14. Regulation of Cdk1 during normal mitosis.

To allow cells to progress from the G2 to the M phase, Cdk1 has to be active, meaning that it has to bear an activating phosphorylation on Thr161 by CAK, that the inhibitory phosphorylation (on Thr14 and Tyr15) has been removed by active Cdc25C phosphatase, and that Cdk1 associates with cyclin B and translocates to the nucleus. In the nucleus, the active Cdk1/Cyclin B complex then phosphorylates mitotic substrate proteins. During the anaphase the APC becomes activated and targets Cdk1 for degradation. Note that two cell cycle checkpoints indirectly affect the activity of Cdk1. The DNA structure checkpoint activates checkpoint kinases (such as Chk1 and Chk2), which phosphorylate Cdc25C on Ser216, thereby causing it inactivation (and failure to activate Cdk1). Activation of the spindle checkpoint delays maturation of the APC (and thus prevents cyclin B degradation)

M Castedo. (2002). Cell Death and Differentiation 9, 1287 ± 1293

第三章 實驗材料與方法

第一節 實驗材料



一、藥物

MPT0G256 為一 quinolinyllamides 結構衍生物，此系列化合物與正對照組 BIIB021 由台北醫學大學劉景平教授所提供；VER155008 購自 Tocris Bioscience (Bristol, UK)；gemcitabine hydrochloride 購自 Sigma-Aldrich Co. LLC. (Spruce St. St. Louis, MO, USA)。於本實驗中，quinolinyllamides 系列結構衍生物、VER155008、gemcitabine 粉末皆溶於 dimethyl sulfoxide (DMSO)，並置於-20℃冷凍保存。

二、細胞株與細胞培養液

人類非小細胞肺癌細胞株 A549、NCI-H1975、PC9、人類大腸癌細胞株 HCT116、人類肝癌細胞株 Hep3B 購自財團法人食品工業發展研究所 (BCRC) 之生物資源保存及研究中心。培養細胞所用之 RPMI-1640、fetal bovine serum (FBS)、trypsin-EDTA 購自 Gibco® Life Technologies (Grand Island, NY, USA)；加於細胞培養液之抗生素 penicillin-streptomycin-amphotericin B Solution 購自 Biological Industries Ltd. (Kibbutz Beit Haemek, Isarel)；用於細胞培養液酸鹼值調整之 NaHCO_3 購自和光純藥工業株式會社。

三、實驗試劑

Sulforodamine B (SRB)、3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) 購自 Sigma Chemical CO (St. Louis, MO, USA)。HSP90 α activity assay kit 購自 BPS Bioscience (San Diego, CA, USA)。於西方墨點法所使用之一級抗體 HSP90、p-EGFR、EGFR、p-Src、Src、p-FAK、FAK、p-Rb、PTEN、p-Akt (Ser473)、Akt、p-mTOR、mTOR、p-4EBP1、4EBP1、eIF4E、p70S6K、p-MEK1/2、MEK1/2、p-ERK1/2、ERK1/2、p-cdc2 (Tyr15)、p-cdc2 (T161)、Cdc2、p-MPM2、Aurora A、Aurora B、PLK1、ac- α -tubulin、caspase-9、caspase-3 購自 Cell Signaling Technologies

(Beverly, MA, USA); Cyclin B1、PARP 購自 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA); HSP70、Rb、caspase-6、caspase-7 購自 BD Bioscience (San Diego, CA, USA); p53 購自 Epitomics (Burlingame, CA, USA); actine 購自 Merck Millipore (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)。西方墨點法所使用之二級抗體 horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-mouse 及 anti-rabbit IgGs 購自 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)。LipofectamineTM 購自 Invitrogen (Mannheim, Germany)。

四、實驗動物

腫瘤異體移植實驗使用之四週歲雌性 BALB/c 裸鼠購自國家實驗動物中心，並飼養於國立台灣大學醫學院實驗動物中心 (Laboratory Animal Center, College of Medicine, National Taiwan University)。

第二節 實驗方法



一、細胞培養與計數

將 A549、NCI-H1975 細胞培養於含有 10 %FBS 及抗生素之 RPMI-1640 培養液，置於 37°C 與 5 % CO₂ 之恆溫生長箱生長，約三天進行繼代培養。步驟：將 flask 的細胞以 PBS 清洗一次，加入 0.05 % trypsin 並放置於培養箱約 2~3 分鐘，接著使用 10 % 的 FBS 培養液停止 trypsin 的反應，並將細胞切起放置於 15 ml 離心管，以轉速 1,200 rpm 離心三分鐘，離心完吸除上清液，加入培養液沖散細胞的 pallet，並以約 1:8~10 之比例稀釋細胞，然後加入含有新培養液之 flask 中培養。若需進行細胞計數，則於離心並以細胞液依比例稀釋之步驟後，取 50 µl 之細胞液，並加入 50 µl 之 0.4 % trypan blue 均勻混合，取適量至細胞計數器，計算四格之細胞數。

二、測定藥物抑制細胞的生長

以 5000 顆/well 的細胞密度，將 A549、NCI-1975 細胞種於 96-well 的細胞培養盤，靜置一天待細胞貼附於 well 後，吸掉細胞液，加入不同濃度藥物各 100 µl (藥物事先以千倍稀釋，即 2 µl 藥物加入 2 ml 的 10 % FBS RPMI 培養液)，並以 10% TCA 固定一排細胞當作 Tz (加藥當時的細胞數)。待藥物作用 48 小時，以 10 % TCA 固定加藥細胞 10 分鐘，並以自來水清洗，放置化學抽風櫃風乾。乾燥後加入 SRB 並至於室溫 10~15 分鐘染色，並以 1 % 醋酸清洗三次，去除殘留之 SRB，然後至於化學抽風櫃風乾。完全乾燥後，即加入 100 µl 10 mM 的 Trizma base 以溶解 SRB，於 ELISA reader 波長 515 nm 測定吸光值。將吸光值帶入公式： $(Tx - Tz) / (C - Tz) * 100\%$ 即為加藥組 (Tx) 相對於控制組 (C) 的細胞生長率，以內差法求取 GI₅₀，即藥物抑制 50 % 細胞生長所需要的濃度。

三、測定藥物抑制細胞的存活率

以 5000 顆/well 的細胞密度，將 A549、NCI-H1975 細胞種於 96-well 的細胞培養盤，靜置一天待細胞貼附於 well 後，吸掉細胞液，加入不同濃度藥物各 100 µl (藥物事先以千倍稀釋，即 1 µl 藥物加入 1 ml 的 10 %FBS RPMI 培養液)。待藥物

作用 48 小時，將細胞液吸除，並加入 100 μ l 含有 0.5 mg/ml MTT 的 10 % FBS 培養液，放入 37°C 與 5 % CO₂ 之恆溫生長箱作用一小時，使活細胞粒線體將 MTT 的 tetrazolium 結構還原成紫色的 formazan 結晶。於一小時後，吸除含有 MTT 之培養液，加入 100 μ l 的 DMSO 溶解紫色結晶，於 ELISA reader 波長 550 nm 測定吸光值，帶入公式： $(Tx/C)*100\%$ 即為細胞存活率，再利用內差法求取 IC₅₀，即藥物毒殺 50 % 細胞所需要的濃度。

四、測定藥物抑制 HSP90 α 的能力

本實驗利用 HSP90 α assay kit 快速篩選藥物於體外抑制 HSP90 α 的能力。其原理為藉由藥物與 FITC-labeled geldanamycin 競爭 HSP90 α enzyme 的能力，來測定藥物的 IC₅₀，若藥物與 HSP90 α 的結合力強，則會使 FITC-labeled geldanamycin 結合到 HSP90 α enzyme substrate 相對減少，而使螢光表現量降低 (IC₅₀ 數值較低)。依照操作說明書依序加入所需試劑及待測藥物，於室溫避光搖晃反應 1 至 2 小時，接著以螢光光譜儀 (激發光：475~495 nm；放射光 518~538 nm) 進行分析，而抑制 50 % FITC-labeled geldanamycin 與 HSP90 α enzyme substrate 所需藥物濃度即為 IC₅₀。

五、流式細胞儀分析 (Flow cytometric analysis)

利用流式細胞儀觀察細胞週期與細胞凋亡的情形。細胞經藥物處理特定時間後，用 PBS 潤洗，並用 0.05 % trypsin 將細胞收集至離心管，以 1,800 rpm 離心三分鐘，而後吸除上清液，並以 1 ml 75 % (v/v) ethanol (平常置於 -20°C) 使細胞再懸浮，然後將之置於 -20°C overnight 以固定細胞。上機前，以 1,800 rpm 離心三分鐘，吸除上清液，與 100 μ l DNA 萃取液 (內含 0.2 M NaHPO₄ 和 0.1 M citric acid buffer (pH 7.8)) 避光作用 30 分鐘，以 1,800 rpm 離心三分鐘，然後吸除上清液，再加入 500 μ l propidium iodide (PI) staining buffer (內含 80 μ l/ml PI、100 μ l/ml RNase A 和 0.1 % Triton X-100 in PBS) 避光作用 30 分鐘，使 PI 和 DNA 結合。最後以流式細胞儀 CellQuest software 分析樣本的細胞週期，並透過細胞週期中 sub-G1 期 (DNA 含量少於 G₀/G₁ phase 的區域) 的比例還觀察細胞凋亡情形。



六、西方墨點法測定蛋白質的表現

西方墨點法可分為四個步驟：蛋白質萃取、蛋白質定量、SDS-PAGE、蛋白質轉印與偵測蛋白。

(一) 蛋白質萃取

將藥物處理過的細胞收集至 eppendorf 內，製備 lysis buffer mix：950 μ l lysis buffer (內含 20 mM Tris-HCl buffer + 150 mM NaCl + 1 mM EDTA + 1 % Triton X-100 + 2.5 mM sodium pyrophosphate) + 10 μ l 10 mM leupeptin + 10 μ l 5 mM NaF + 10 μ l 1 mM Na_3VO_4 + 10 μ l 1 mM PMSF)，加入適當 lysis buffer mix (依照收集蛋白質多寡給予 60~200 μ l)，至於冰上 lysis 30 分鐘，再將 eppendorf 於 4°C 1,3000 rpm 離心 30 分鐘，取上清液進行蛋白質定量。

(二) 蛋白質定量

利用 BCATM protein assay kit (A : B = 50 : 1) 與全細胞蛋白質萃取液作用後，再以波長 562 nm 測定吸光值，將待測物吸光值帶入 BSA 做出檢量線，即可算出蛋白質濃度，再加入 lysis buffer 將同一批樣品濃度調整成 2.5 μ g/ μ l 並加入 1/4 總體積的 5 倍 sample buffer (0.156 M Tris、1 % SDS、25 % glycerol、12.5 % β -mercaptoethanol、0.2 % bromophenol blue)，以 105°C 煮 10 分鐘，最終蛋白質濃度為 2.0 μ g/ μ l，置於-20°C 冰箱保存。

(三) 製備 SDS-PAGE

首先配置下層膠 (running gel)，可以根據分析的蛋白質分子量配置 8~13 % 下層膠，越低%的膠可以觀察分子量較大的蛋白質，loading 完下層膠以 isopropanol 壓平上端界線，靜置 15 分鐘，接著配置上層膠，接著插上齒梳 (comb)，做出樣品槽，一樣靜置 15 分鐘待電泳膠片凝固，將其架設於電泳槽內，並於內外槽加入 running buffer (1X)(3 g Tris-Base、1 g SDS、14.4 g glycine、1L ddH₂O)，接著將 sample 和 protein marker 分別注入樣品槽。接著以電壓 90 福特 (V) 待樣品從 stacking gel 跑到 running gel，再以高電壓 140 福特待樣品跑到膠片底部即可進行蛋白質轉印。

(四) 蛋白質轉印與偵測蛋白

將 PVDF (polyvinylidene difluoride) 浸泡於甲醇中，在於轉印夾內依序放上海綿、濾紙、PVDF、電泳膠片、濾紙、海綿，小心將空氣排出轉印夾扣上，整個過程需要再 transfer buffer 中完成，最後將轉印夾放入裝滿 transfer buffer 的轉印槽，以固定電流 400 mA 在 4°C 下進行蛋白質轉印 150 分鐘。

待轉印完成後，將 PVDF 取出，浸泡於 5 % 脫脂奶粉中 (5 g 脫脂奶粉 + 100 ml PBS)，於室溫搖晃一小時，目的是減少非專一性結合，接著用 TBST (TBS + 0.1 % (v/v) Tween 20)，清洗 PVDF 數次，最後浸泡在稀釋過的一級抗體，於 4°C 搖晃 overnight，隔天將一級抗體回收，並以 TBST 清洗數次，接著加入相對應的二級抗體，於室溫搖晃兩小時，再將二級抗體回收，以 TBST 清洗數次，最後加入 ECL (enhanced chemiluminescence) 試劑中，即可去暗房壓片顯影。

七、細胞轉染實驗

細胞轉染是以 Lipofetamine™ 2000 執行，首先將 45 萬顆 A549 細胞種入 6 cm dish，靜置於培養箱一天待細胞貼附，隔天配置 plasmid DNA (2 µg) 和 Lipofetamine™ 2000 (4 µl) 各自溶於 opti-MEM (150 µl)，靜置 15 分鐘，再將兩溶液混合再一起靜置 20 分鐘。將 6 cm dish 取出將細胞液吸除，各別加入 1 ml opti-MEM 與 plasmid/Lipofetamine™ 2000 混和液 300 µl，並靜置於細胞培養箱 6~8 小時，之後進行 re-serum (將培養液換成 10 % FBS RPMI-1640)。隔天再將細胞進行藥物處理，最後依實驗設計的時間點以 0.05 % trypsin 收集細胞。

八、基因微陣列晶片

將組織浸於室溫甲醛溶液 12~24 小時，用二次水清洗，接著將切片依序浸於不同濃度的酒精中進行組織脫水 (70 % → 90 % → 95 % → 99 % → 100 % 的酒精，每小時一次共三次)，將組織浸於 xylene 清洗一小時，共清洗三次，將組織浸泡於 60°C paraffin 一小時，共更換四次 paraffin，於室溫保存。將組織切成 4 µM 厚度切片，統一放置於 positive charge slide 上。進行免疫組織染色之前，將切片浸於 xylene 中以脫蠟，接著將切片依序浸於不同濃度的酒精中進行組織脫水 (100 %

→ 95 % → 75 % → 50 % 的酒精)，然後將切片依序浸於一次水和 PBS 中，接著切片浸於 3 % (v/v) H₂O₂ 的甲醇溶液中，以去活化組織內之內生性過氧化酶，進一步將切片浸於 100°C 的 10 mM Tris/1 mM EDTA buffer (pH9.0) 中 40 分鐘，並以 PBST 清洗切片，組織與 3 % BSA 或一級抗體 HSP90 於室溫下反應 1 小時，以 PBST 清洗切片，然後注入一滴 HRP polymer conjugate reagent A 於組織上，室溫作用 10 分鐘，組織再與 DAB chromogen reagent B1、B2 和 B3 作用 5 分鐘，將切片浸水清洗，最後以 Mayer's Hematoxylin solution 進行背景染色，將切片浸水清洗並風乾，於顯微性觀察，陽性染色處呈現棕色。

九、小鼠異體移植實驗

將 1×10^7 人類非小細胞肺癌細胞 A549 細胞皮下注射於 4 週大 Balb/c 雌性裸鼠，當腫瘤組織生長至 100 mm³，分別給予口服 5 % 葡萄糖液 (D5W) 作為 vehicle control、每天口服 MPT0G256 50 mg/kg、兩週一次腹腔注射 gemcitabine 100 mg/kg 及併用口服 MPT0G256 50 mg/kg 和腹腔注射 gemcitabine 100 mg/kg，當腫瘤體積達到 1,200 mm³ 結束試驗，將小鼠犧牲並取下腫瘤保存於甲醛或置於冷凍小管 -80 °C 保存。腫瘤生長天數延遲 (tumor growth inhibition, %TGI) 之計算方式為 $[(T-C)/C] \times 100\%$ ，即加藥組和控制組腫瘤體積到達 1,200 mm³ 的體積差，除以控制組體積再乘 100%。給藥兩週後犧牲小鼠，並取下腫瘤組織保存。

十、免疫組織化學染色 (Immunohistochemistry, IHC)

從裸鼠取出 A549 異種移植腫瘤，並將其浸於 4 % (v/v) 甲醇 (溶於 PBS) 以固定組織，之後進行石蠟包埋及切片。進行免疫組織染色之前，將切片浸於 xylene 中以脫蠟，接著將切片依序浸於不同濃度的酒精中進行組織脫水 (100 % → 95 % → 75 % → 50 % 的酒精)，然後將切片依序浸於一次水和 PBS 中，接著切片浸於 3 % (v/v) H₂O₂ 的甲醇溶液中，以去活化組織內之內生性過氧化酶，進一步將切片浸於 100°C 的 10 mM Tris/1 mM EDTA buffer (pH9.0) 中 40 分鐘，並以 PBST 清洗切片，組織與 3 % BSA 或一級抗體 EGFR 或 cleaved-caspase 3 於室溫下反應 1 小時，以 PBST 清洗切片，然後注入一滴 HRP polymer conjugate reagent A 於組織上，室溫作用 10 分鐘，組織再與 DAB chromogen reagent B1、B2 和 B3 作用 5 分鐘，

將切片浸水清洗，最後以 Mayer's Hematoxylin solution 進行背景染色，將切片浸水清洗並風乾，利用正立顯微鏡放大 200 倍觀察，陽性染色處呈現棕色。



十一、統計分析

本實驗之結果是以獨立至少三次實驗之平均值 $\pm$ 標準誤差 (mean $\pm$ SEM)，並利用 Sigma plot 軟體中的 paired *t*-test 以及 *t*-test (視不同實驗需求)，測定是否具有統計上的差異，或 $P < 0.05$ 則具有統計上的意義。Compusyn®軟體則用以計算藥物合併所產生的作用 (combination index, CI)，若 $CI < 1$ ，則為協同作用 (synergism)； $CI = 1$ 為加成作用 (addition)； $CI > 1$ 則為結抗作用 (antagonism)。

第四章 實驗結果



一、新合成 HSP90 抑制劑對於不同細胞株之生長抑制作用與對於 HSP90 α 活性之抑制作用

首先利用 SRB assay 篩選一系列 quinolinyllamides 衍生物對於多株人類癌症細胞株 (包括人類非小細胞肺癌細胞株 A549、人類大腸癌細胞株 HCT-116、人類肝癌細胞株 Hep3B) 的生長抑制作用。由 Table 1 結果顯示，MPT0G256 能在 A549 細胞株呈現最佳生長抑制作用 ($GI_{50} = 0.18 \pm 0.02 \mu M$)，且相較於 positive control 的 BIIB021 ($GI_{50} = 0.33 \pm 0.02 \mu M$) 也呈現出更好的生長抑制效果。由於 MPT0G256 這一系列 quinolinyllamides 衍生物是由 HSP90 抑制劑 AUY922 為原型進行修飾合成，所以我們使用 HSP90 α assay kit 測定這些衍生物及 BIIB021 於體外 (*in vitro*) 抑制 HSP90 α 的活性，發現 MPT0G256 在這些化合物中具有最強抑制體外 HSP90 α 的能力 ($IC_{50} = 149.06 \pm 0.63 \text{ nM}$) 與 BIIB021 ($IC_{50} = 132.75 \pm 14.75 \text{ nM}$) 相當。本研究也發現 MPT0G256 在具有 EGFR 突變的 NCI-H1975 (T790M 和 L858R 點突變) ($IC_{50} = 0.65 \pm 0.02 \mu M$) 與 PC-9 (exon 19 deletion) ($IC_{50} = 0.92 \pm 0.02 \mu M$) 非小細胞肺癌細胞株中，MPT0G256 相較於 BIIB021 也能呈現出不錯的毒殺細胞能力，但效果並沒有 wild type EGFR 非小細胞肺癌細胞 A549 ($IC_{50} = 0.43 \pm 0.025 \mu M$) 來的好 (Table 2)。綜合以上因素，考量 MPT0G256 在此系列衍生物中，具有最佳抑制腫瘤細胞效果與抑制 HSP90 α 的能力，且 HSP90 α 已被證實在 A549 細胞中有較高表現 (Khalil *et al.*, 2011)；再者，非小細胞肺癌對於 HSP90 抑制劑的感受性佳 (Shimamura *et al.*, 2012)，故本實驗選定 MPT0G256 於 A549 細胞株進行後續抗癌機轉探討。BIIB021 為一全合成 HSP90 抑制劑，本實驗用來當作正對照組化合物。

二、MPT0G256 抑制人類非小細胞肺癌生長與存活

首先使用 SRB assay，測試 MPT0G256 在不同濃度 ($0.03 \sim 1 \mu M$) 下於 48 小時抑制 A549 細胞生長的效果，發現其可以濃度依賴性的方式抑制 A549 細胞的生長， GI_{50} 為 $0.18 \pm 0.02 \mu M$ ，相較於 BIIB021 ($GI_{50} = 0.33 \pm 0.02 \mu M$) 有較好的生長抑制作用 (Figure 1A)。接著經 MTT 測定法測定不同濃度 ($0.03 \sim 3 \mu M$) 下於 48 小時毒殺 A549 細胞的效果，亦能觀察到 MPT0G256 能以濃度依賴性的方式毒殺

A549 細胞， IC_{50} 為 $0.45 \pm 0.01 \mu M$ ，相較於 BIIB021 ($IC_{50} = 2.19 \pm 0.18 \mu M$) 也是有較佳的毒殺細胞作用 (Figure 1B)。BIIB021 為一可口服且不具有 benzoquinone 結構的 HSP90 抑制劑，目前最快的臨床試驗進行到 II 期 (適應症 GIST)，且其不具有 benzoquinone 結構，臨床上並不會造成明顯肝毒性 (Dickson *et al.*, 2013)；MPT0G256 也同時具有可口服、不具有 benzoquinone 結構與容易合成等特性，且較 BIIB021 於 A549 細胞有較佳的抑制細胞生長與毒殺細胞的能力，使其保有發展新穎性。

三、MPT0G256 使 A549 細胞週期停滯於 G_2/M 而後進行細胞凋亡

為了解 MPT0G256 是否會造成細胞週期改變與細胞凋亡，於是藉由流式細胞儀分析不同濃度 ($0.03 \sim 3 \mu M$) 的 MPT0G256 對於 A549 細胞的影響。實驗結果顯示，24 小時的藥物處理可濃度依賴性的使細胞週期停滯於 G_2/M 期 (Figure 2A)；48 小時的藥物處理則明顯地觀察到 sub-G1 期的細胞 (凋亡的細胞) 增多 (Figure 2B)。且不同濃度 ($0.1 \sim 3 \mu M$) 的正對照組 BIIB021 給藥 24 小時 (Figure 2C) 與 48 小時 (Figure 2D) 也可得到類似的情形。HSP90 抑制劑可藉由調控多種細胞週期相關的受質蛋白 (如 Cdk1) 使肺癌細胞停滯於 G_2/M 期 (Senju *et al.*, 2006)。

四、MPT0G256 干擾 A549 細胞週期蛋白表現並抑制 G_2/M 的過渡

由於許多的細胞週期 G_2/M 調控相關蛋白是 HSP90 的受質蛋白 (如 Cdk1)，HSP90 的抑制時常造成肺癌細胞週期 G_2/M arrest，抑制細胞的生長 (Senju *et al.*, 2006)，且藉由流式細胞儀發現 MPT0G256 會於 24 小時造成 A549 細胞 G_2/M arrest，故接著探討藥物對於 G_2/M 調控相關蛋白表現的影響 (Figure 2A、2B)。在 A549 細胞以不同濃度 MPT0G256 ($0.03 \sim 3 \mu M$) 及 BIIB021 ($1 \mu M$) 處理 24 小時後，藉由西方墨點法觀察蛋白質表現變化，可發現 MPT0G256 能以濃度依賴性 ($0.03 \sim 3 \mu M$) (Figure 3A)，增加促進細胞進入細胞週期 M 期的 cyclin B1、p-MPM2、Aurora A、Aurora B、PLK1 的表現，且 Cdk1 (cdc2) 總蛋白下降，抑制進入 M 期磷酸位 p-cdc2 (Tyr15) 下降，雖然促進進入 M 期的磷酸位 p-cdc2 (T161) 也有下降的情形，可能的原因是 cdc2 本身是 HSP90 受質蛋白，HSP90 受到抑制導致 cdc2 總蛋白降解，造成活化態蛋白表現跟著下降。而在時程實驗 (time-course) (Figure 3B) 則是

在 12、24 小時發現有最明顯的 G₂/M arrest 情形，G₂/M 調控相關蛋白表現變化與劑量實驗結果一致。BIIB021 於本實驗用來當作正對照組化合物。



五、MPT0G256 誘導 A549 的細胞凋亡反應

由流式細胞儀結果發現 MPT0G256 於 A549 細胞在 48 小時會造成細胞凋亡情形上升 (Figure 2B)，且文獻指出 HSP90 會藉由活上游的 Akt 與抑制下游 Apaf-1 與 caspase 9 形成 apoptosome 來抑制細胞的凋亡 (Workman *et al.*, 2007b)，於是接著探討 MPT0G256 對於細胞凋亡的影響。在 A549 細胞以不同濃度 MPT0G256 (0.03~3 μ M) 及 BIIB021 (1 μ M) 處理 48 小時後，藉由西方墨點法觀察細胞凋亡蛋白質表現變化，可發現 MPT0G256 能以濃度依賴性 (0.03~3 μ M)(Figure 4A) 方式活化內生性細胞凋亡蛋白水解酶 caspase-9 的 cleavage，且造成下游 caspase-6，caspase-7，caspase-3 的活化 pro-form 下降，而 caspase 的活化造成下游受質 PARP 被切割，而使得 PARP 的 cleavage 增加。在時程實驗 (time-course)(Figure 4B) 則是在 24 小時開始有 caspase 活化及 PARP cleavage 上升情形，而在 48 小時有最明顯的細胞凋亡現象。BIIB021 於本實驗用來當作正對照組化合物。

六、MPT0G256 造成 A549 致癌性受質蛋白降解

為了解 MPT0G256 對於 HSP90 致癌性受質蛋白的作用，利用西方墨點法，在 A549 細胞以不同濃度 MPT0G256 (0.03~3 μ M) 及 BIIB021 (1 μ M) 處理 24 小時後 (Figure 5A)，發現 MPT0G256 與其設計原型藥 AUY922 (HSP90 N 端 ATP-binding pocket 抑制劑) 一樣，並不會抑制 HSP90 的蛋白質表現，而是抑制其活性，且展現典型 HSP90 抑制劑的特性，抑制 HSP90 的同時誘導 co-chaperone HSP70 的代償性上升 (Trepel *et al.*, 2010)。接著探討 MPT0G256 對於 HSP90 致癌性受質蛋白的作用，發現 MPT0G256 能以濃度依賴性 (0.03~3 μ M)(Figure 5A) 與時間依賴性 (6/12/24/48 小時)(Figure 5B) 方式，降低已知的 HSP90 致癌性受質蛋白 (Sidera *et al.*, 2014)，如 EGFR、Src、FAK、Rb 總蛋白質與活化態的表現。BIIB021 於本實驗用來當作正對照組化合物。

七、MPT0G256 抑制 A549 的 PI3K-Akt-mTOR 路徑活化

文獻指出 PI3K-Akt-mTOR pathway 在許多癌細胞中都有大量活化的情形，藉由幫助致癌性蛋白質的合成，使癌細胞持續生長與抗凋亡 (Polivka Jr *et al.*, 2014)，且 Akt 為一已知 HSP90 受質蛋白，所也接著探討 MPT0G256 對於 PI3K-Akt-mTOR pathway 的影響。於 A549 細胞以不同濃度 MPT0G256 (0.03~3 μ M) 及 BIIB021 (1 μ M) 處理 24 小時後 (Figure 6A)，發現 MPT0G256 會以濃度依賴性方式造成 PTEN、Akt、mTOR 的總蛋白表現及 p-Akt、p-mTOR 的下降，使得 mTOR 下游的抑制性蛋白 4EBP1 總蛋白表現上升，促蛋白質轉譯的 eIF4E、P70S6K 總蛋白下降，而抑制致癌性蛋白質的合成 (4EBP1 藉由與 eIF4E 結合，抑制 eIF4E 幫助蛋白質轉譯的活性，而當 4EBP1 磷酸化會使其與 eIF4E 分離造成 eIF4E 的活化 (Hinnebusch, 2012))。而在 Figure 6B 也發現 MPT0G256 能以時間依賴性 (6/12/24/48 小時) 的方式得到與 Figure 6A 一致的結論。BIIB021 於本實驗用來當作正對照組化合物。

八、MPT0G256 抑制 A549 的 MAPK 路徑活化

MAPK/ERK kinase 是 K-Ras 的下游訊息傳遞蛋白，是調控癌細胞增生、分化與生長的關鍵角色 (Hatzivassiliou *et al.*, 2013)。A549 是一株具有高度表現 EGFR，且具有 K-Ras 點突變 (G12S) 的細胞 (Qian *et al.*, 2014)，K-Ras 的突變會導致下游的 MAPK/ERK kinase 路徑脫離 EGFR 的控制，自發性的持續活化，幫助癌細胞增生、分化與生長 (Hatzivassiliou *et al.*, 2013)。由於 K-Ras 下游的 MEK1/2 本身是 HSP90 的受質蛋白，在 A549 細胞以不同濃度 MPT0G256 (0.03~3 μ M) 及 BIIB021 (1 μ M) 處理 24 小時後，藉由西方墨點法觀察蛋白質表現變化，可發現 MPT0G256 能以濃度依賴性 (0.03~3 μ M)(Figure 7A) 與時間依賴性 (6/12/24/48 小時)(Figure 7B) 的方式抑制 MEK1/2 及 ERK1/2 總蛋白與活化態的表現。由於 K-Ras 上游的 EGFR 同為 HSP90 的受質蛋白，所以在給予 MPT0G256 抑制 HSP90 以後也能造成其總蛋白質表現量與活化下降。BIIB021 於本實驗用來當作正對照組化合物。

九、MPT0G256 與 gemcitabine 或 Ver155008 合併使用於 A549 具有細胞毒殺協同性作用

目前臨床上用於治療非小細胞肺癌的藥物，如影響 DNA 合成的抗代謝藥物 gemcitabine，於正常細胞與癌細胞間選擇性毒性差，而骨髓抑制為最常見之副作用 (Chi *et al.*, 2012)；而 HSP90 抑制劑的同時，也發現其他種類的 HSP，如 HSP70，會有代償性上升現象，幫助細胞抗凋亡 (Khalil *et al.*, 2011)。有鑑於此，我們在非小細胞肺癌細胞 A549 中檢視合併 gemcitabine、MPT0G256 (HSP90 inhibitor) 及 Ver155008 (HSP70 inhibitor) 對於細胞生長抑制的現象。由 48 小時的細胞存活測試，發現於 A549 細胞中合併給予 MPT0G256 和 gemcitabine (Figure 8A) 或 MPT0G256 和 Ver15008 (Figure 8B)，皆可以呈現出協同性 (synergism) 的細胞毒殺作用，且於 Combination index plot 的統計圖顯示的 CI (Combination Index) 值皆小於 1，顯示該協同性毒殺 A549 細胞作用具有統計上的意義。

十、MPT0G256 與 gemcitabine 或 Ver155008 合併使用於 A549 細胞週期上的作用

接著利用 PI 染色觀察合併使用 MPT0G256 和 gemcitabine/Ver155008 對於細胞週期的影響。在 A549 細胞給予 24 小時藥物處理 (Figure 9A/9B, left panel)，可以發現單獨使用 MPT0G256 於低濃度 (0.05~0.2 μ M) 時對於細胞週期並不會有明顯的改變，而 gemcitabine 及 Ver155008 單獨使用時可以濃度依賴性方式使的細胞有 G₀/G₁ arrest 的情形，且 sub-G₁ 期的細胞 (凋亡的細胞) 增多，而合併藥物處理，MPT0G256 併用 gemcitabine (Figure 9A, left panel) 對於細胞週期影響大致與 gemcitabine 單獨使用相似，且於兩者低濃度併用時，sub-G₁ 期細胞的有些微協同性累積的情形，而 MPT0G256 併用 Ver155008 (Figure 9B, left panel) 於 24 小時藥物處理就有明顯的 subG₁ 期細胞的協同性累積；兩組合併藥物治療於 48 小時藥物處理後 (Figure 9A/9B, right panel) 皆有明顯的 sub-G₁ 期細胞的協同性累積，顯示 MPT0G256 合併使用 gemcitabine 或 Ver155008 能較單獨使用呈現出更佳的治疗效果。

十一、MPT0G256 與 gemcitabine 合併使用對於 A549 蛋白表現的影響

為了解合併使用 MPT0G256 與 gemcitabine 對於 A549 細胞中致癌蛋白的影



響，利用西方墨點法，在 A549 細胞以不同濃度 MPT0G256 (0.05-0.1 μ M) 及 gemcitabine (0.0625~1 μ M) 單獨或合併處理 48 小時後 (Figure 10A)，發現 MPT0G256 能有效抑制 HSP90 受質蛋白，如幫助細胞生長的 EGFR、抗凋亡的 Akt 蛋白質表現，且在併用 gemcitabine 後，此抑制現象有明顯的加強作用；單獨使用或併用兩者皆不會影響 HSP90 的蛋白表現，而 HSP90 的 co-chaperone HSP70 則是在有加入 MPT0G256 的組別有明顯代償性上升的情形；幫助細胞由 G₂ 期進入 M 期的 p-MPM2 在 MPT0G256 組別有些微上升；細胞凋亡途徑蛋白，如 p53 在單獨使用兩者時有濃度依賴性上升情形，且在併用 0.1 μ M MPT0G256 及 0.25 μ M gemcitabine 時有最明顯的加強作用；caspase-3 及 PARP 在單獨使用 MPT0G256 可發現 caspase-3 的活化 pro-form 下降與下游受質 PARP 被切割，cleavage-form 增加，且在合併藥物組別也可看見細胞凋亡途徑蛋白有被增強的表現。由於在併用 MPT0G256 與 gemcitabine 時發現 Akt 相較於兩者單獨使用有更明顯的下降情形，於是藉由細胞轉染將 A549 細胞中的 Akt 過度表現，觀察其對於細胞凋亡途徑蛋白 PARP 活化的影響 (Figure 10B)，發現 Akt 的活化確實能部分逆轉藥物誘導 PARP 活化的情形，顯示 Akt 確實在 A549 細胞扮演重要抗凋亡的角色。

十二、MPT0G256 與 Ver155008 合併使用對於 A549 細胞蛋白表現的影響

為了解合併使用 MPT0G256 與 Ver155008 對於 A549 細胞中致癌蛋白的影響，利用西方墨點法，在 A549 細胞以不同濃度 MPT0G256 (0.1~0.2 μ M) 及 Ver155008 (10~40 μ M) 單獨或合併處理 48 小時後 (Figure 11A)，發現 MPT0G256 能有效抑制 HSP90 受質蛋白，如幫助細胞生長的 EGFR 在單獨使用 MPT0G256 就能明顯降低其表現，單獨使用 Ver155008 則是有濃度依賴性抑制情形，而在 40 μ M 時抑制情形最明顯，併用兩者後也能有效抑制其表現；而抗凋亡的 Akt 在單獨使用 MPT0G256 有濃度依賴性下降，單獨使用 Ver155008 則是在 40 μ M 時才有下降的情形，併用兩者使用時則可以看到抑制作用明顯加強作用；HSP90 在 Ver155008 組別有下降的情形，而 HSP90 的 co-chaperone HSP70 則是在有加入 MPT0G256 的組別有明顯代償性上升；幫助細胞由 G₂ 期進入 M 期的 p-MPM2 在 MPT0G256 組別有些微上升；抑制細胞停留在 G₁ 期 p27 則是在 Ver155008 及其併用組別有濃度依賴性上升情形；細胞凋亡途徑蛋白，如 p53 在單獨使用 MPT0G256 有上升的情

形，但 Ver155008 並不會誘導 p53 的上升，在兩者併用組別 p53 表現大致與單獨使用 MPT0G256 相當；caspase-3 及 PARP 在單獨使用 MPT0G256 或 HSP70 inhibitor Ver155008 可發現 caspase-3 的活化 pro-form 下降與下游受質 PARP 被切割，cleavage-form 增加，且在併用兩者組別也可看見細胞凋亡途徑蛋白有被增強的表現。由於併用 MPT0G256 與 Ver155008 時發現 Akt 有較兩者單獨使用更明顯的下降情形，於是藉由細胞轉染將 A549 細胞過度表現 Akt，觀察其對於細胞凋亡途徑蛋白 PARP 的影響 (Figure 11B)，發現 Akt 的過度表現確實能部分逆轉藥物誘導 PARP 的活化，顯示 Akt 確實在 A549 細胞扮演重要抗凋亡的角色。

十三、MPT0G256 與 gemcitabine 或 Ver155008 合併使用於 NCI-H1975 具有細胞毒殺協同性作用

由前述實驗得知在 MPT0G256 在 A549 (mutant K-Ras, wild-type EGFR) 細胞，相較於其他非小細胞肺癌細胞，有較佳毒殺細胞的能力 (Table 2)，且合併使用 gemcitabine 或 Ver155008 在 A549 細胞具有細胞毒殺協同性作用。我們接著探討在不同突變情形的非小細胞肺癌細胞，如 NCI-H1975 (wide-type K-Ras, mutant EGFR)，MPT0G256 併用 gemcitabine 或 Ver155008 是否也能呈現出協同性毒殺細胞的作用。有鑑於此，我們首先在非小細胞肺癌細胞 NCI-H1975 中檢視合併 gemcitabine、MPT0G256 及 Ver155008 對於細胞生長抑制的現象。由 48 小時的細胞存活測試，發現於 NCI-H1975 細胞中合併給予 MPT0G256/gemcitabine (Figure 12A) 或 MPT0G256/Ver15008 (Figure 12B)，皆可呈現出協同性 (synergism) 的細胞毒殺作用，且於 Combination index plot 的統計圖顯示的 CI (Combination Index) 值皆小於 1，顯示該協同性毒殺 NCI-H1975 細胞作用具有統計上的意義。

十四、MPT0G256 與 gemcitabine 或 Ver155008 對於 NCI-H1975 蛋白表現的影響

為了解 MPT0G256 合併使用 gemcitabine 或 Ver155008 對於 NCI-H1975 細胞中致癌蛋白的影響，利用西方墨點法，在 NCI-H1975 細胞以不同濃度 MPT0G256 (0.05~0.2 μ M)、gemcitabine (0.25~5 μ M) 及 Ver155008 (10~40 μ M) 單獨或合併處理 48 小時。於 MPT0G256 併用 gemcitabine 組別 (Figure 13A)，MPT0G256 能有效抑制 HSP90 受質蛋白表現，如幫助細胞生長的 EGFR 及幫助細胞抗凋亡的 Akt



在單獨使用 MPT0G256 就能以濃度依賴性方式降低其表現，且併用 gemcitabine 後也能呈現出更好的抑制作用；兩種藥物皆不影響 HSP90 的表現，且在使用 MPT0G256 組別，co-chaperone HSP70 有代償性上升；幫助細胞由 G₂ 期進入 M 期的 p-MPM2 在 MPT0G256 組別有上升；細胞凋亡途徑蛋白，如 p53 在單獨使用 MPT0G256 有上升的情形，併用 gemcitabine 後有更加誘導 p53 上升的情形，且在 0.1 μ M MPT0G256 併用 0.25 或 1 μ M gemcitabine 時有最明顯的加強性誘導作用；caspase-3 及 PARP 在單獨使用 MPT0G256 或 gemcitabine 可發現 caspase-3 的活化 pro-form 下降與下游受質 PARP 被切割，cleavage-form 增加，合併藥物組別也可看見細胞凋亡途徑蛋白有被增強的表現。而在於 MPT0G256 併用 Ver155008 組別 (Figure 13B)，單獨使用 MPT0G256 與 Ver155008 都能使 EGFR 表現下降，併用後抑制效果顯著；Akt 則是在 0.1 μ M MPT0G256 或 40 μ M Ver155008 才有明顯下降，併用兩者後抑制作用有明顯的加強作用；HSP90 則是在 Ver155008 組別有下降情形，HSP70 則是在使用 HSP90 inhibitor MPT0G256 組別有代償性上升；幫助細胞由 G₂ 期進入 M 期的 p-MPM2 在 MPT0G256 組別有上升；細胞凋亡途徑蛋白，如 p53 在單獨使用 MPT0G256 及 Ver155008 都有上升情形，在 0.05 或 0.1 μ M MPT0G256 併用 20 μ M Ver155008 組別有明顯誘導情形，但當 Ver155008 提到高 40 μ M，p53 誘導情形有下降情形；caspase-3 及 PARP 在單獨使用 MPT0G256 或 Ver155008 可發現 caspase-3 的活化 pro-form 下降與下游受質 PARP 被切割，cleavage-form 增加，並用兩者也可看見細胞凋亡途徑蛋白有被增強的表現，特別是在併用 40 μ M Ver155008 的組別。

十五、HSP90 在肺癌組織相較於正常組織有較高的表現情形

為了解 HSP90 在正常組織與癌症組織中的表現情形，利用 tissue microarrays 的方法，將多種癌症病患的癌症組織與病患的正常組織利用石蠟包埋於同一切片，再利用 HSP90 抗體做 immunohistochemistry (IHC) 染色。由 Figure 14 發現在乳癌 (infiltrating duct carcinoma)、肝癌 (signet ring cell carcinoma) 組織相較於正常組織，HSP90 表現量並沒有比較高；而在肺癌組織 (adenocarcinoma) 相較於正常組織，HSP90 則有高度表現的情形，有鑒於此，針對肺癌高度表現 HSP90 發展的 HSP90 inhibitor MPT0G256 確實保有其發展潛力。

十六、MPT0G256 與 gemcitabine 的合併使用可有效的在 A549 Xenograft 中抑制腫瘤生長及產生細胞凋亡

將人類非小細胞肺癌細胞 A549 皮下注射於 4 週大雌性裸鼠，當腫瘤組織生長至 100 mm³，分別給予 D5W (vehicle control)、每天口服 MPT0G256 50 mg/kg、兩週一次腹腔注射 gemcitabine 100 mg/kg，及併用口服 MPT0G256 50 mg/kg 和腹腔注射 gemcitabine 100 mg/kg，當腫瘤體積達到 1200 mm³ 結束試驗。*In vivo* 實驗發現單獨使用 MPT0G256 (50 mg/kg) 或 gemcitabine (100 mg/kg)，皆能較 control 組有效抑制腫瘤組織的生長 (* $P < 0.05$)，且合併使用以後呈現出更強力的抑制腫瘤生長作用 (** $P < 0.001$)(Figure 15A)。而小鼠體重方面，加藥組別與 control 組別並無統計上差異 (Figure 15B)。接著將腫瘤組織磨碎，藉由西方墨點法分析 EGFR、HSP90、HSP70、caspase-3 的蛋白質表現 (Figure 15C)，發現單獨使用 MPT0G256 能有效抑制 EGFR 的表現，且合併使用 gemcitabine 後此抑制作用有被增強；HSP90 並不會受到 MPT0G256 與 gemcitabine 的影響；且在有使用 MPT0G256 組別可發現有 HSP70 代償性上升的情形；細胞凋亡蛋白水解酶 caspase-3 在單獨使用 MPT0G256 或 gemcitabine 後皆有活化情形，cleavage-form 上升，且在合併使用組也看到活化情形更為明顯。

第五章 討論



癌症，又被稱作基因的疾病 (genetic disease)，透過逐漸累積基因的突變，由良性轉為惡性。西元 2000 年，Hanahan 和 Weinberg 提出假設，將維持腫瘤組織進程的因子，分作六大方向：幫助癌細胞逃脫細胞凋亡、維持癌細胞血管新生、幫助癌細胞無限制複製、幫助癌細胞侵犯與轉移至其他組織、幫助癌細胞自我活化生長訊息、使癌細胞對於生長抑制訊息不敏感 (Sidera *et al.*, 2014)。雖然許多的癌症化療與標靶藥物能針對上述六大方向的其中幾項做抑制，並沒有藥物可以同時抑制六大方向的癌症進程因子 (Pearl *et al.*, 2008)。

HSP90 是一個 molecular chaperone，經由幫助其「受質蛋白 (clients)」正確的折疊與增強蛋白間的作用力，使其能正常的運作，維持細胞中蛋白質的恆定。目前已有 200 種以上的 HSP90 受質蛋白被發現，而這之中許多與維持細胞訊息傳遞與抵抗外界壓力有關，癌細胞會藉由 HSP90 保護其致癌性受質蛋白，維持其突變與過度表現來幫助癌細胞存活 (Trepel *et al.*, 2010)。上述六大方向的癌症進程因子都有部分是 HSP90 的受質蛋白，也因此，抑制 HSP90 被認為是具有相較於傳統化療與標靶藥物抑制單一路徑，更能有效抑制癌細胞的存活的潛力 (Sidera *et al.*, 2014)。

截至目前為止，尚未有任何一個 HSP90 抑制劑被美國 FDA 核准，但已有幾個 HSP90 抑制劑進入臨床試驗，廣泛用於血液性腫瘤與固態腫瘤的臨床試驗，如：tanespimycin (17-AAG) 針對 multiple myeloma 治療，由於肝毒性與水溶性差，因而終止於臨床 III 期；而其衍生物 17-DMAG 針對 myeloid leukemia 終止於臨床二期，但仍有 17-AAG 併用其他機轉藥物於臨床 I/II 期 (Hong *et al.*, 2013a)；NYP-AUY922 是目前被認為最強效的小分子 HSP90 抑制劑，於 2007 年進入臨床試驗 I/II 期 (適應症 relapsed and refractory multiple myeloma 和 HER2+及 ER+ metastatic breast cancer)，並於 2012 年進入臨床 II 期 (適應症 ALK+ and EGFR-mutated NSCLC)(Sidera *et al.*, 2014)；BIIB021 則是針對 gastrointestinal stromal tumors (GIST) 於臨床 II 期 (Dickson *et al.*, 2013)，另外與 exemestane (Aromasin) 併用針對 HER2+乳癌病患於臨床試驗 II 期 (Dickson *et al.*, 2013)。

本篇論文主要探討新合成的 HSP90 抑制劑 MPT0G256 於人類非小細胞肺癌細



胞之抗癌機轉探討。由 *in vitro* 實驗發現 MPT0G256 具有比正對照組 BIIB021 更強的抑制細胞增生與毒殺 A549 細胞的效果，且具有與 BIIB021 相當抑制 HSP90 α 的活性，並藉由抑制 PI3K/Akt/mTOR pathway、MAPK kinase pathway、影響細胞週期表現的方式，最終造成 caspase-9、caspase-3、caspase-6、caspase-7、PARP 的活化導致細胞凋亡。進一步於 A549 細胞合併使用 MPT0G256 與 gemcitabine 或 HSP90 inhibitor Ver155008，發現兩種合併方式都能協同性的抑制細胞生長，且增強 HSP90 受質蛋白的降解，也經由實驗證實細胞轉染 Akt 能部分逆轉 MPT0G256 單獨使用或併用 gemcitabine/Ver155008 誘發 PARP 活化造成細胞凋亡的情形，顯示 Akt 在 A549 中扮演重要抗凋亡的角色；而兩種合併治療方式在不同 EGFR 基因型態的 NCI-H1975，也能協同性的抑制細胞生長，並增強 HSP90 受質蛋白的降解。在 *in vivo* 實驗藉由癌症病患的正常組織與癌症組織的 tissue microarrays 發現在非小細胞肺癌中 HSP90 確實較正常肺組織有高度表現的情形，而在 A549 xenograft model 也發現 MPT0G256 併用 gemcitabine 能協同性抑制腫瘤組織生長，並增強腫瘤組織 HSP90 受質蛋白的降解作用。以下針對幾點實驗結果進行延伸討論。

一、MPT0G256 對於不同 EGFR 基因型非小細胞肺癌細胞之抑制生長作用

EGFR 和 K-Ras 在非小細胞肺癌細胞中常有突變的情形，且兩種突變具有互斥 (mutually exclusive) 情形，並不會同時存在 (Schmid *et al.*, 2009)。EGFR 的基因表現型，高加索人約有 10~15 % 具有 EGFR 突變，而東方亞洲人約有 50 % 的病患是具有 EGFR 的突變，傳統 EGFR TKIs 對於有 EGFR 突變的非小細胞肺癌病患效果較佳 (Chougule *et al.*, 2013)。在初期篩選 MPT0G256 於不同人類癌症細胞株時，我們同時也篩選 MPT0G256 於不同 EGFR 及 K-Ras 基因型的非小細胞癌細胞中毒殺細胞能力，發現其在 A549 細胞 (wild-type EGFR, mutant K-Ras) 中較 NCI-H1975 (mutant EGFR, wild-type K-Ras) 與 PC-9 (mutant EGFR, wild-type K-Ras) 有較佳毒殺細胞生長的能力，與 EGFR TKIs 不同。可能的原因除了 A549 相較於其他 wild-type EGFR 基因型的非小細胞肺癌是有高度表現的 EGFR 及 HER2 (Diaz *et al.*, 2010)，另一方面 A549 細胞具有 K-Ras 的突變，使得 K-Ras 能脫離上游 EGFR 的控制，自發性的活化下游的 Ras/Raf/MEK/ERK pathway，這也是 K-Ras 突變肺癌病患對於 EGFR TKIs 有先天抗藥性的原因之一 (Mao *et al.*,

2010)。 HSP90 抑制劑除了會降解受質蛋白 EGFR 外，同時也會降解 Akt 及 MEK1/2 等受質蛋白，而 HSP90 抑制劑也已被證實對於 K-Ras 突變的非小細胞肺癌細胞有較佳的生長抑制作用，且被用來預測 HSP90 抑制劑的療效 (Sos *et al.*, 2009)；當然，每種 HSP90 受質蛋白對於 HSP90 的抑制感受性不一樣 (Burrows *et al.*, 2004) 亦有可能是原因之一。

二、MPT0G256 對於 $\text{PI3K/Akt/mTOR pathway}$ 及 $\text{MAPK kinase pathway}$ 的調控

K-Ras 突變的非小細胞肺癌病患約占總肺癌人數的 20~30%，雖然突變情形沒有 EGFR 來的高，但由於 K-Ras 的突變會使病患對於許多標靶藥物具有抗藥性，使得此類病患一直是肺癌治療上有待解決的問題 (Engelman *et al.*, 2008)。

$\text{PI3K/Akt/mTOR pathway}$ 與 $\text{MAPK kinase pathway}$ 是幫助癌細胞抗凋亡與生存的兩條訊息途徑，而這兩條途徑下游的交集是 TSC1/TSC2 複合物， AKT 與 MEK 可藉由磷酸化 TSC2 ，使得抑制型 TSC1/TSC2 複合物不活化，間接促進 RHEB 的活化，最終導致下游 mTOR (mTORC1) 的活化來幫助癌細胞存活 (Knowles *et al.*, 2015)；抑制其中一條 pathway 時常會有另一條代償性活化而導致抗藥性，先前的研究顯示併用 Akt 與 MEK 抑制劑 (Engelman, 2009) 或 PI3K 與 MEK 抑制劑 (Engelman *et al.*, 2008) 對於 K-Ras 突變的非小細胞肺癌病患是有效的；而這兩條訊息途徑中的 EGFR 、 Akt 、 MEK1/2 是 HSP90 的受質蛋白，使得 HSP90 得以同時抑制兩條途徑的活化 (Acquaviva *et al.*, 2012)。雖然實驗結果發現 MPT0G256 會使 $\text{PI3K/Akt/mTOR pathway}$ 中抑制 Akt 活化的 PTEN ，給藥後有濃度依賴性下降的情形，先前的研究顯示， $\text{HSP90 inhibitor 17-AAG}$ 在 glioblastoma 中能藉由 PTEN-independent 的方式，藉由直接抑制下游受質蛋白 Akt 與其他致癌性受質蛋白的表現，來抑制癌細胞的生長 (Sauvageot *et al.*, 2009)，可用來解釋此現象。

三、MPT0G256 對於細胞週期的調控

藉由流式細胞儀發現 MPT0G256 與 BIIB021 都能導致 A549 細胞週期 G_2/M arrest，而後細胞凋亡。當我們進一步利用西方墨點法測定藥物對於細胞週期蛋白的影響，發現 MPT0G256 能依濃度依賴性與時間依賴性方式使 cyclin B1 上升，而在正對照組 BIIB021 卻觀察到 cyclin B1 下降的情形。

Cyclin B1 是 HSP90 α 的受質蛋白，於細胞週期中負責和 Cdk1 形成複合物，幫助細胞由 G2 期進入 M 期。既然 Cyclin B1 是 HSP90 α 的受質蛋白，理論上兩者表現量應有正相關的表現，也因此 Cyclin B1 和 HSP90 α 廣泛被認為是癌症進程與惡化的指標 (Huang *et al.*, 2014)。

近年來臨床發現，乳癌、大腸癌、肝癌病患若有過度表現 Cyclin B1 會對放射治療有抗藥性且預後差 (Huang *et al.*, 2014)，但在 follicular lymphoma 病患又發現若病患高度表現 Cyclin B1，則在化療後的預後較佳 (Bjorck *et al.*, 2005)，也因此有學者提出 Cyclin B1 的表現與癌症的預後沒有絕對的關係 (Peters *et al.*, 2004)。

而在 HSP90 抑制劑與 cyclin B1 的部分，也發現說於癌症病患中使用 HSP90 inhibitor geldanamycin (GA) 或有 HSP90 突變時，會有 cyclin B1 mRNA level 上升與細胞內 cyclin B1 累積的情形 (Basto *et al.*, 2007)；且在鱗狀細胞食道癌也發現在瘤組織的不同位置，HSP90 α 與 cyclin B1 的表現量不同，於癌細胞密集區 (keratin pearls)，HSP90 α 與 cyclin B1 呈負相關，而在其他組織兩者則呈正相關 (Huang *et al.*, 2014)。癌細胞通常處於缺氧的環境，面對這樣的氧化壓力 (oxidative stress)，癌細胞必須靠 HSP90 來維持 cyclin B1 的表現，使細胞週期正常運行，當使用 HSP90 抑制劑如 17-DMAG，會導致細胞內 p- γ H2，抑制 proteasome 的活性，導致細胞內 cyclin B1 累積，亦會導致 14-3-3 δ protein 活化，而 14-3-3 δ protein 會螯合細胞質中的 cyclin B1/Cdk1 complex，導致細胞穩定的 G₂/M 期停滯 (Huang *et al.*, 2014)，這可用來解釋 MPT0G256 抑制 HSP90 卻造成 cyclin B1 上升與 G₂/M arrest 的情形。

最後是 BIIB021 在 cyclin B1 下降依然能造成 G₂/M arrest 現象，在淋巴瘤細胞 BC-3 中使用 BIIB021 也可看到同樣的現象 (Gopalakrishnan *et al.*, 2013)。由於每種 HSP90 細胞週期受質蛋白對於 HSP90 的抑制感受性不一樣，使用 HSP90 抑制劑導致細胞週期停滯情形，在每種癌細胞並不具有一致性，且在同一種癌細胞不同藥物濃度作用下也可能產生不一樣的細胞週期停滯情形 (Burrows *et al.*, 2004)。細胞週期調控相關蛋白如 Cdk1、Cdk2、Cdk4、Cdk6、Cyclin B1、Cyclin C、Cyclin E、Myt-1、Wee-1、PLK1、Aurora B、Survivin 等都會受到 HSP90 直接或 HSP90 受質蛋白間接調控，HSP90 抑制劑能藉由對於不同時期的受質蛋白產生不同強度的抑制作用，導致癌細胞週期停滯於 G₀/G₁ 或 G₂/M 期 (Burrows *et al.*, 2004)。

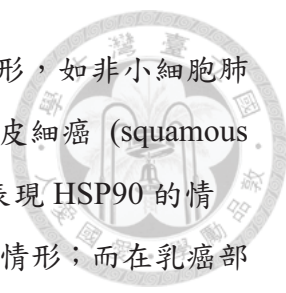
四、HSP90 與 Gemcitabine 協同性抑制細胞生長作用

Gemcitabine 為一 DNA 損害藥物，藉由抑制癌細胞的 DNA 合成，造成細胞週期停滯與細胞凋亡 (附圖 13)，是非小細胞肺癌的第一線用藥，同時也與 5-FU 被認為是胰臟癌最有效的第一線用藥。HSP90 抑制劑 tanespimycin (17-AAG) 合併使用 gemcitabine 的治療方式最早在 stage IV 胰臟癌病患做臨床試驗 (Pedersen *et al.*, 2015)。DNA 損害藥物，如 gemcitabine、5-FU 等，雖能有效抑制癌細胞的 DNA 合成，但使用這些 DNA 損害藥物時常會誘導 Chk1 的表現，幫助細胞染色體重建、DNA 的複製與修復，導致癌症的復發或是抗藥性；Chk1 同時是 HSP90 的受質蛋白，而整個試驗由於對病患壽命延長沒有達到終點指標，且 tanespimycin 劑量未掌控好而導致過大的副作用試驗而終止於臨床 II 期 (Pedersen *et al.*, 2015)。

本篇實驗合併使用 HSP90 inhibitor MPT0G256 與 gemcitabine，發現此併用方式在體外 A549 細胞與 NCI-H1975 細胞能協同性的抑制細胞生長，在 A549 xenograft model 也能呈現出較單獨使用兩者更好的抑制腫瘤生長能力，而 gemcitabine 本身對於 EGFR 和 Akt 這些 HSP90 受質蛋白表現影響不大，合併使用卻能較單獨使用 MPT0G256 呈現出更強力的降解受質蛋白的作用。癌細胞的 DNA 損害，會導致 EGFR-dependent PI3K/Akt pathway 的活化 (Chen *et al.*, 2007)，且會誘導 HSP90 α 的快速上升，幫助細胞 EGFR、Akt 受質蛋白正確的折疊與運作，使癌細胞中這些生存相關蛋白高度表現，對於 HSP90 抑制劑更為敏感 (Sidera *et al.*, 2014)；另一方面 gemcitabine 這類 DNA 損害藥物會導致癌細胞週期停滯於 G₁ 或 S 期，一般癌細胞大多也處於 G₀/G₁ 期，較無法誘導細胞凋亡，合併使用會造成細胞 G₂/M 停滯的 MPT0G256 後，除了多方抑制癌細胞週期的運作，同時藉由流式細胞儀我們也觀察到 Sub-G₁ (凋亡的細胞) 於兩藥併用後有加成性上升，且在 *in vitro* 或 *in vivo* 實驗也發現凋亡途徑蛋白也有協同性被活化的情形。

五、HSP90 於癌症中的表現

目前 HSP90 抑制劑進行臨床試驗的適應症有乳癌、胃腸道間質腫瘤 (GIST)、皮膚惡性黑色素瘤 (melanoma)、多發性骨髓瘤 (Multiple myeloma)、非小細胞肺癌 (NSCLC)、卵巢癌、前列腺癌、腎癌 (papillary and clear cell) 與 solid tumors。而在 human tissue arrays，我們測定了 30 種癌症病患的正常組織與癌症組織的



HSP90 表現量，並非所有的癌症組織都有高度表現 HSP90 的情形，如非小細胞肺癌中，腺癌 (adenocarcinoma，約佔總肺癌病患 40 %) 與鱗狀上皮細胞癌 (squamous cell carcinoma，約佔總肺癌病患 25 %) 具有較正常肺組織高度表現 HSP90 的情形，而在大細胞肺癌 (large cell carcinoma) 則沒有觀察到這樣的情形；而在乳癌部分，HSP90 抑制劑的臨床試驗都是針對 Her2 positive 的乳癌病患進行，先前的研究也顯示 HER2/ErbB2 會活化 HSP90 的 transcription factor HSF-1 來活化 HSP90，穩定細胞表面 HER2 的表現 (Schulz *et al.*, 2014)，而我們實驗中選擇的乳癌切片是 infiltrating duct carcinoma，該種類乳癌病患約有 23.9 % 具有 HER2 amplification 情形 (Castellano *et al.*, 2008)，而 tissue microarrays 中發現其並沒有 HSP90 高度表現情形，可能只是剛好病患是 HER2 negative 的病患，並不能代表全部 infiltrating duct carcinoma 或乳癌病患的 HSP90 表現。

六、HSP90 及其 co-chaperones

在 A549 細胞單獨使用 MPT0G256 時候，發現 HSP70 有代償性上升的情形。HSP70 和 HSP27 為已知 HSP90 的 co-chaperone (Munje *et al.*, 2014)，當細胞受到外在壓力，如高溫、輻射線、氧化壓力、使用化療藥物等，或是 HSP90 抑制劑抑制多種受質蛋白，影響多條癌症相關途徑與細胞週期，導致細胞內蛋白質不平衡，這時細胞內的 ATP 會降低，這時細胞會活化 ATP-independent chaperone，如 HSP27，防止受損的蛋白質產生致命性聚合；而當細胞的 ATP level 恢復水平後，則會誘導 ATP-dependent chaperone，如 HSP70 來調控蛋白正確折疊、運送及降解，也因此 HSP27 及 HSP70 被認為具有細胞保護 (cytoprotective) 的功能 (Garrido *et al.*, 2003)，於實驗中觀察到使用 MPT0G256 時，HSP70 代償性上升的現象一致；而在併用 MPT0G256 與 Ver155008 的實驗中，發現 MPT0G256 並不會影響 HSP70 的蛋白質表現，使用 Ver155008 則是有 HSP70 蛋白質表現下降，合併使用不影響 HSP70 的情形，由上述的文獻我們推斷，併用藥物時雖然 Ver155008 應造成 HSP70 下降，但由於 MPT0G256 對於 HSP90 的抑制，導致更多的 HSP70 代償性活化，來因應這樣的外在壓力，且 HSP90 的抑制導致的代償性活化效力可能較 Ver155008 導致 HSP70 下降的能力，更具有主導的地位。

第六章 結論與展望

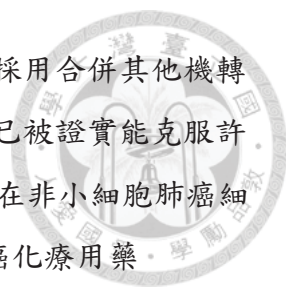


惡性腫瘤已蟬聯 32 年台灣十大死因之首，肺癌不論在全球或台灣，都位居癌症致死率之首，主要原因都認為跟呼吸的空氣品質高度相關。除了抽煙及汽機車以外，來自工廠固定汙染源的汙染更是空氣汙染的主要原因。所有肺癌病患中，約有 85 %是非小細胞肺癌，五年平均存活率<15%，具有高復發、高轉移的特性，且由於確診時通常是病灶晚期或已有轉移現象，使得的這個疾病不易根治，為極度惡性的腫瘤類型。

目前針對非小細胞肺癌晚期的標靶治療藥物，如 EGFR TKIs，雖然病患有不錯的反應且提高了生存率，但病患平均使用 10 個月後會產生後天抗藥性，如產生 EGFR T790M 點突變或是 MET 過度表現，使得 TKIs 失去作用；而具有 K-Ras 突變的肺癌病患通常預後不好且對傳統化療或 EGFR TKIs 有抗藥性，針對這類病人則有使用其下游 MEK 的抑制劑或併用 AKT 抑制劑的臨床實驗在進行，臨床療效尚未確定。因此，尋求同時抑制多種致癌訊息傳遞路徑或是併用不同機轉藥物，降低彼此毒性與延緩抗藥性的產生，是近年來的發展趨勢。

Heat shock protein 90 (HSP90) 已知的受質蛋白超過兩百種，藉由幫助其受質蛋白正確的折疊與增強蛋白質間作用力，使其正常運作，而癌症中許多的致癌性蛋白同時也是 HSP90 的受質蛋白，且在許多癌症組織中也發現 HSP90 有高度表現的情形，使得針對 HSP90 研發抑制劑，抑制多種致癌性蛋白與癌症進程相關途徑的活化，是近年來的發展趨勢之一。

本研究經由檢視一系列新合成的 HSP90 抑制劑對於多株人類癌症細胞株的生長抑制於毒殺細胞作用，發現 MPT0G256 在人類非小細胞肺癌細胞株 A549 細胞中具有顯著抑制細胞生長與毒殺細胞的能力，且具有良好抑制 HSP90 α 的能力。機轉方面，HSP90 inhibitor MPT0G256 藉由抑制多種 HSP90 受質蛋白，如 EGFR、Akt、MEK、Cdk1 等，抑制多種細胞增生與生長訊息傳遞路徑，如 PI3K/Akt/mTOR pathway、MAPK kinase pathway 等，進而抑制下游的 mTOR 代償性訊息傳遞路徑活化的現象；而 MPT0G256 對於同時為 HSP90 受質蛋白的細胞週期蛋白作用，導致 A549 細胞有 G₂/M 期停滯的情形，細胞週期無法正常運作，最終導致 MPT0G256 造成 A549 細胞濃度依賴性或時間依賴性的細胞凋亡。



由於 HSP90 的抑制會影響眾多的受質蛋白，臨床上大多會採用合併其他機轉藥物方式以期降低彼此劑量與副作用的可能，且 HSP90 抑制劑已被證實能克服許多傳統化療藥，如 5-FU、EGFR TKIs 的抗藥性，因此我們接著在非小細胞肺癌細胞 A549 體外實驗，嘗試併用 MPT0G256 與第一線非小細胞肺癌化療用藥 gemcitabine；且由之前的文獻顯示，HSP90 受到抑制時，會導致其他的熱休克蛋白，如 HSP70 代償性上升來因應，所以我們也嘗試於體外實驗合併使用 MPT0G256 與 HSP70 inhibitor Ver155008。MPT0G256 併用 gemcitabine 或 Ver155008 都能在體外呈現出協同性抑制細胞生長的作用，且對於 HSP 90 受質蛋白降解也有不一樣程度的增強作用；在細胞週期的部分，MPT0G256 會造成 A549 細胞 G₂/M 期停滯，併用會造成細胞 G₀/G₁/及 S 期停滯的 gemcitabine 與 Ver155008 後，也有更明顯的細胞凋亡有情形。接著我們探討 MPT0G256 併用 gemcitabine 或 Ver155008 的合併治療方式是否也能應用在不同 EGFR 基因表現型非小細胞肺癌細胞 NCI-H1975 細胞上，由實驗結果顯示，MPT0G256 併用兩種藥物在 NCI-H1975 細胞體外實驗也能呈現出協同性抑制細胞生長的作用，且對於 HSP 90 受質蛋白降解也有不一樣程度的增強作用。

接著由癌症病患的正常組織與癌症組織的 tissue microarray，發現相較於正常肺組織，肺腺癌 (A549 同為肺腺癌細胞) 組織的 HSP90 有高度表現的情形，所以我們嘗試於 A549 xenograft model 探討單獨使用 MPT0G256 或併用 gemcitabine 的作用，由實驗結果顯示，單獨使用兩者都能有效抑制腫瘤組織生長 (** $P < 0.01$)，且併用後能呈現出更佳的腫瘤生長抑制作用 (** $P < 0.01$)，且能夠有效的抑制腫瘤組織中 HSP90 受質蛋白的表現。

目前臨床 HSP90 抑制劑普遍存在有毒性，如 17-AAG，該類藥物由於具有 benzoquinone 結構，藥物代謝後會產生肝毒性，且溶解度不佳無法口服，終止於臨床試驗第三期；NVP-AUY922 於臨床試驗第 II 期，發現有部分病患有眼毒性；BIIB021 是第一個可以口服的 HSP90 抑制劑，但口服可能造成腸胃道出血及腹瀉，且可能導致精子下降情形，目前併用 exemestane (Aromasin) 針對 HER2+乳癌病患於臨床試驗 II 期；先前的研究顯示 HSP90 抑制劑產生的毒性與其抑制 HSP90 的能力呈正相關，且在各類結構 HSP90 抑制劑中都可看到藥物毒性，除了結構專一性的毒性，更可能與藥物抑制 HSP90 導致下游多種受質蛋白受到抑制有關。



MPT0G256 為小分子藥物，結構相對簡單，具有能夠大量合成的優勢，於 *in vitro* 具有較 BIIB021 更佳的抑制 A549 細胞生長與毒殺細胞能力，口服有效，雖然在 *in vivo* 實驗無法排除體重減輕以外的可能副作用，但經由實驗結果已證實 MPT0G256 併用 gemcitabine 在體外與體內都具有協同性抑制癌細胞生長，且增強 HSP90 受質蛋白降解的作用，使其得以合併治療方式降低彼此的劑量與可能副作用的風險，仍然保有其發展的潛力。未來我們可以進一步探討併用藥物對於 MAPK kinase pathway 蛋白質表現的影響，或是經由轉染實驗，使細胞過度表現 HSP90 受質蛋白 MEK，觀察其是否能逆轉併用藥物造成凋亡途徑蛋白活化的情形；或是進一步併用不同機轉的藥物或於不同的適應症觀察併用藥物是否也能呈現出更佳的腫瘤抑制作用。

Table 1. The growth inhibitory effects and the inhibition of HSP90 α activities by synthetic HSP90 inhibitors and BIIB021.

Compounds	The growth-inhibitory effects in different cell lines			Inhibition of HSP90 α activity IC ₅₀ (nM $\pm$ S.E.)
	Screened by SRB assays, GI ₅₀ (μ M $\pm$ S.E.)			
	A549	HCT116	Hep3B	
MPT0G251	>10	>10	>10	>10000
MPT0G252	>10	>10	>10	>10000
MPT0G253	>10	>10	>10	>10000
MPT0G254	>10	>10	>10	>10000
MPT0G255	1.64 $\pm$ 0.21	2.45 $\pm$ 0.55	5.19 $\pm$ 0.44	172.21 $\pm$ 3.74
MPT0G256	0.18 $\pm$ 0.02	0.19 $\pm$ 0.01	0.33 $\pm$ 0.03	149.06 $\pm$ 0.63
MPT0G257	>10	>10	>10	>10000
MPT0G258	>10	>3	>10	>10000
MPT0G305	>10	>10	>10	>10000
MPT0G306	2.46 $\pm$ 0.31	1.21 $\pm$ 0.13	3.17 $\pm$ 0.47	196.06 $\pm$ 15.88
MPT0G307	>10	>10	>10	>10000
MPT0G283	>10	>10	>10	>10000
BIIB021	0.33 $\pm$ 0.02	0.15 $\pm$ 0.02	0.52 $\pm$ 0.047	132.75 $\pm$ 14.75

Human cancer cell lines A549, HCT116 and Hep3B were treated with a series of HSP90 inhibitors for 48 hr, and the median growth-inhibition concentration (GI₅₀) was measured by SRB assay. By using the HSP90 α activity assay kit, the median inhibition of HSP90 α activity (IC₅₀) was measured by the ability of compounds to disrupt the interaction between FITC-geldanamycin and HSP90. The data are presented the means $\pm$ S.E. of three independent experiments.

Table 2. Molecular characteristics and cytotoxicity of MPT0G256 and BIIB021.

Cell line	Characters	G256 (IC ₅₀)	BIIB021 (IC ₅₀)
A549	K-Ras mut, EGFR wt	0.43 ± 0.025	2.19 ± 0.18
NCI-H1975	K-Ras wt, EGFR mut (T790M/L858R)	0.65 ± 0.02	2.41 ± 0.17
PC9	K-Ras wt, EGFR mut (exon 19 del)	0.92 ± 0.02	2.34 ± 0.08

Abbreviations: Del, deletion; Mut, mutant; WT, wild-type.

Cytotoxicity of MPT0G256 or BIIB021, and the mutation status of the EGFR and K-Ras genes in human NSCLC cell lines are shown. The cytotoxicities of MPT0G256 or BIIB021 were determined by MTT assays after 48 h of drug treatment, and are expressed as the IC₅₀ (μM). Each value represents the mean ± standard deviation (S.D.) from at least three independent experiments.

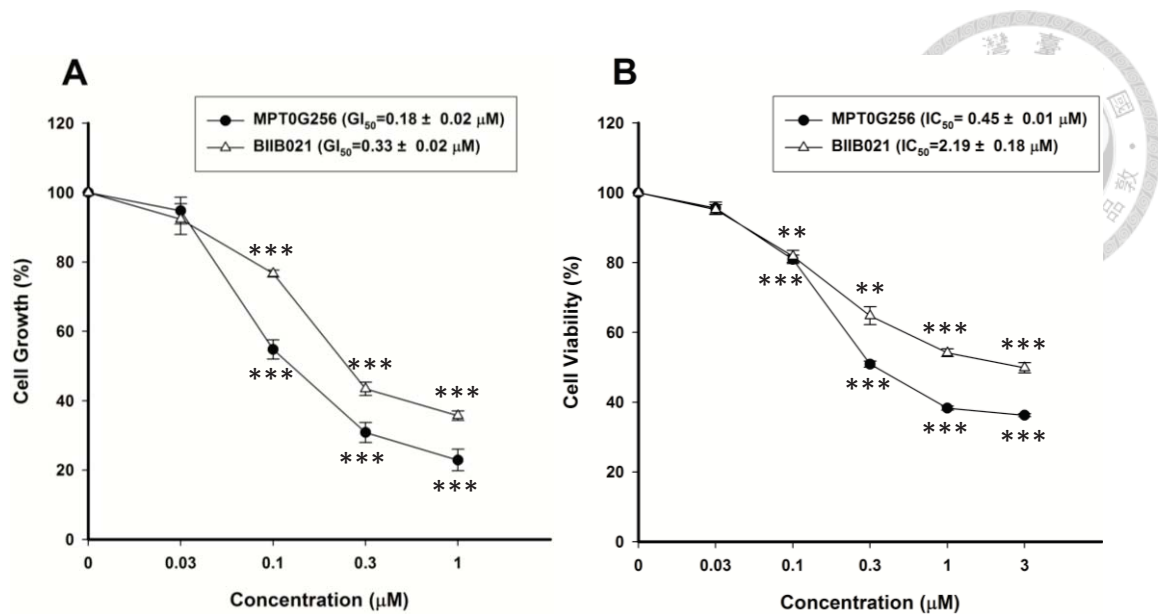


Figure 1. Effect of MPT0G256 on cell growth and cell viability in A549 human

lung adenocarcinoma cells. (A) Concentration-dependent effect of MPT0G256 and

BIIB021 on cell growth in A549 cells. A549 cells were incubated without or with indicated concentrations of MPT0G256 or BIIB021 for 48 hr. Cell growth was evaluated by

SRB assay. (B) Concentration-dependent effect of MPT0G256 and BIIB021 on cell viability. A549 cells were treated without or with indicated concentrations of MPT0G256

or BIIB021 for 48 hr. Cell viability was evaluated by MTT assay. Data represented the

means ± SEM from at least three independent experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** P

< 0.001 compared with control by Student's paired t -test.

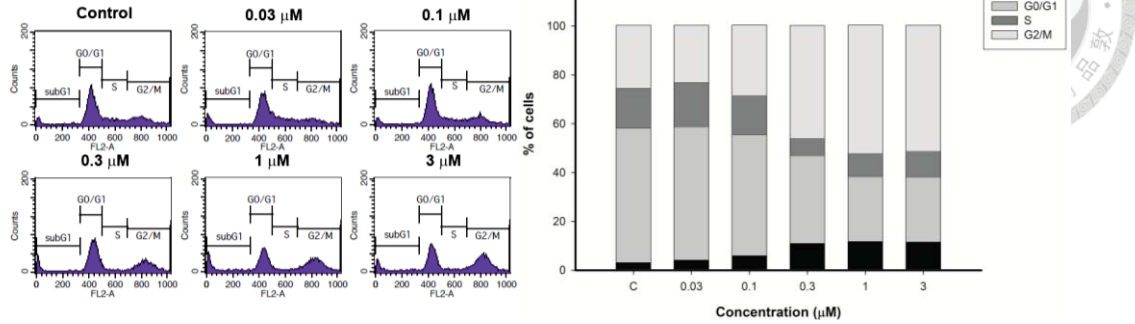
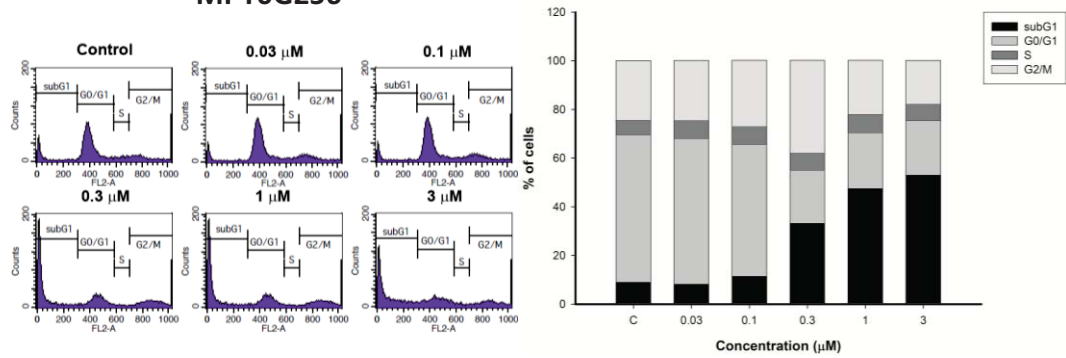
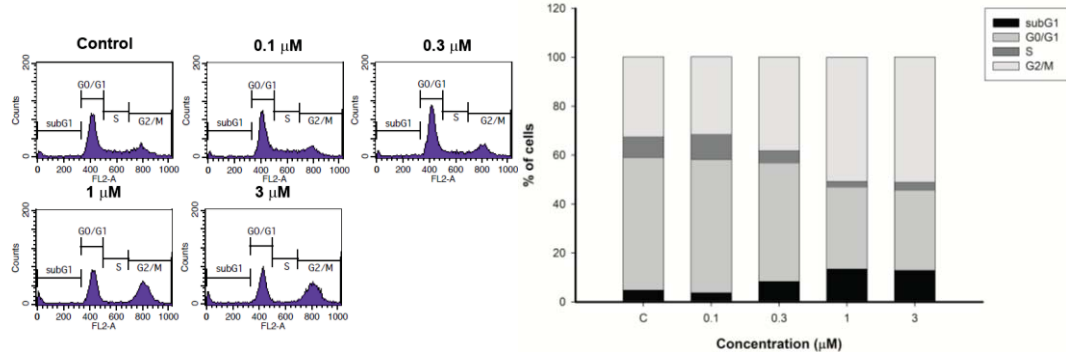
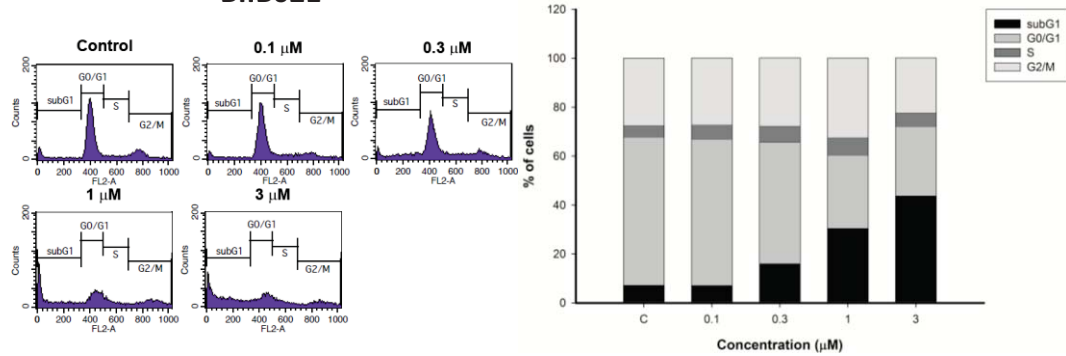
A**MPT0G256****24 hr****B****MPT0G256****48 hr****C****BIIB021****24 hr****D****BIIB021****48 hr**

Figure 2. MPT0G256 and BIIB021 induced cell cycle arrest in the G₂/M phase

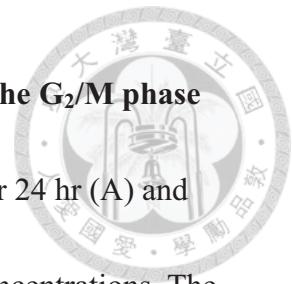
and cell apoptosis. A549 cells were incubated with MPT0G256 for 24 hr (A) and

48hr (B) or BIIB021 for 24 hr (C) and 48 hr (D) at the indicated concentrations. The

cells were stained with PI and then analyzed by flow cytometry to determine cell cycle

distribution patterns. Quantitative data were based on histograms. Similar results were

obtained in at least three other independent experiments.



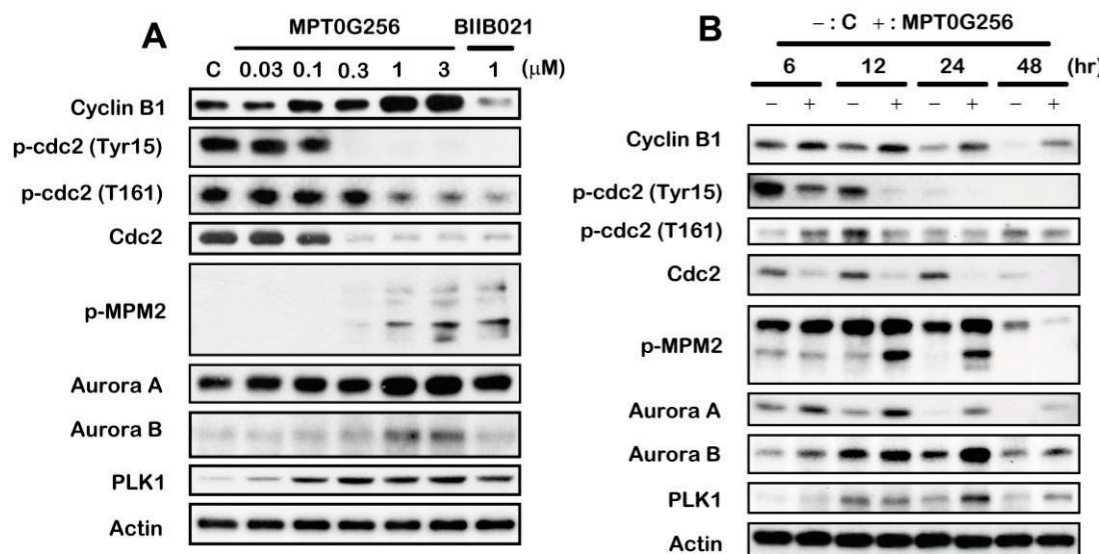


Figure 3. Effect of MPT0G256 on the expression of G₂/M related proteins in A549

cells. (A) A549 cells were treated with vehicle (0.1% DMSO, C) or different concentrations of MPT0G256 or 1 μM BIIB021 for 24 hr. Then, cells were harvested for detection of cyclin B1, cdc2, p-MPM2, aurora A, aurora B and PLK1 by Western blot analysis. (B) A549 cells were incubated in the absence or presence of 1 μM MPT0G256 for indicated times. Then, cells were harvested and lysed for detection of cyclin B1, cdc2, p-MPM2, aurora A, aurora B and PLK1 by Western blot analysis. Actin was used as the internal control. Data are representative of three independent experiments.

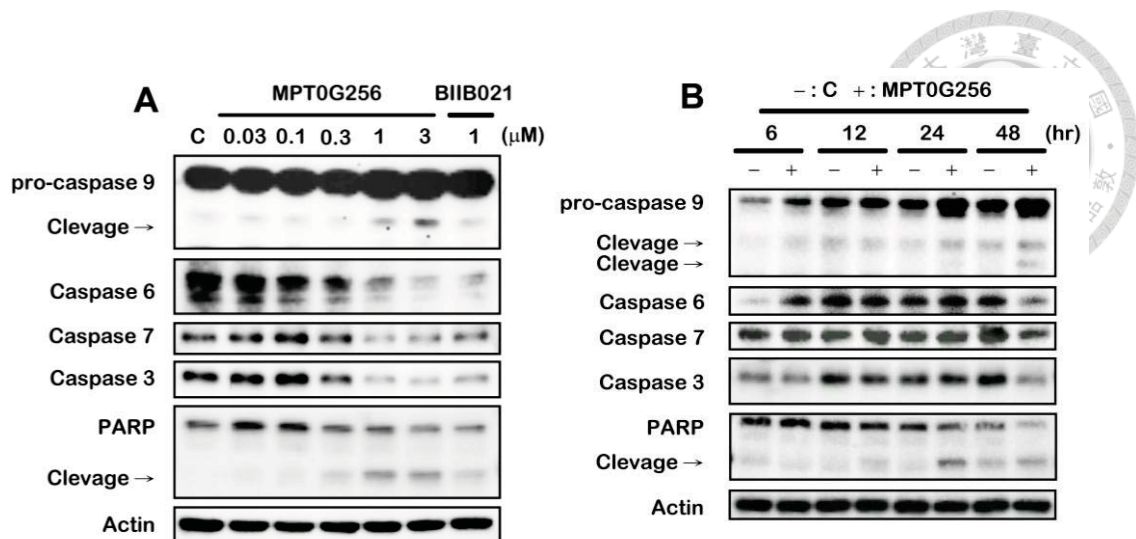


Figure 4. Effect of MPT0G256 on the biomarkers associated with cell apoptosis in A549 cells. (A) A549 cells were treated with vehicle (0.1% DMSO, C) or different concentrations of MPT0G256 or 1 μM BIIB021 for 48 hr. After treatment, cells were harvested and lysed for detection of apoptosis-related proteins by Western blot analysis. (B) A549 cells were incubated in the absence or presence of 1 μM MPT0G256 for indicated times. Then, cells were harvested and lysed for detection of apoptosis-related proteins by Western blot analysis. Actin was used as the internal control. Data are representative of three independent experiments.

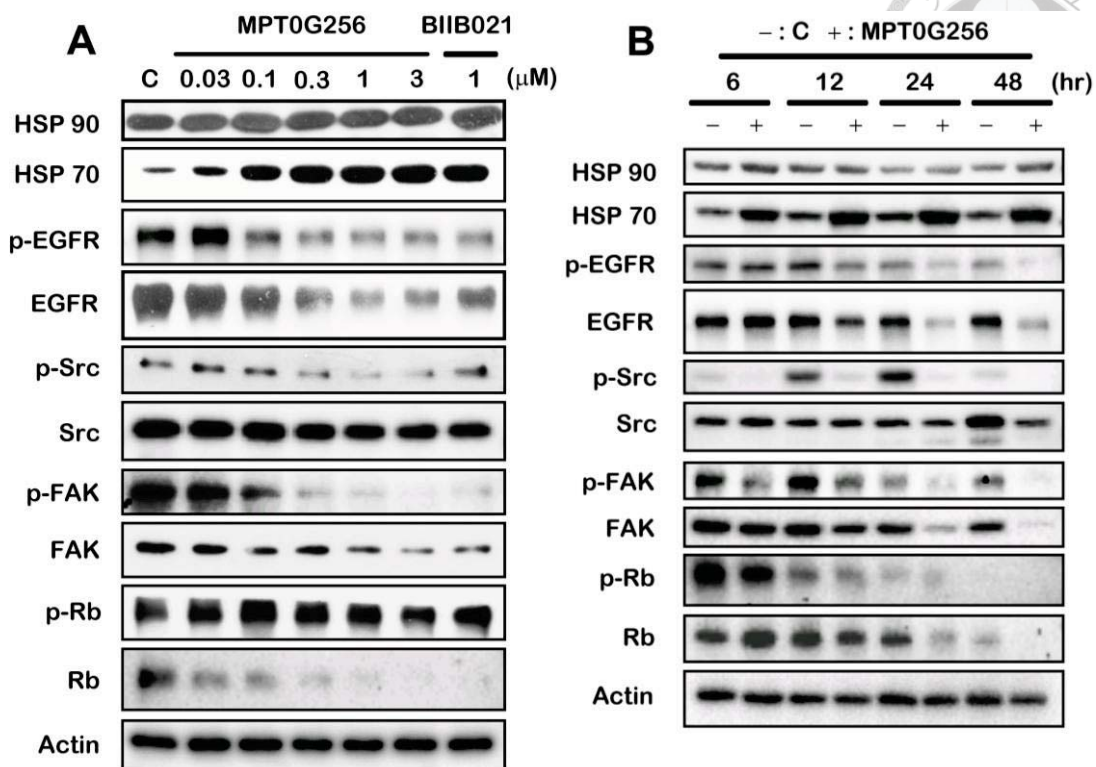


Figure 5. Effect of MPT0G256 on multiple HSP90 client proteins in A549 human lung adenocarcinoma cells. (A) A549 cells were incubated with vehicle (0.1% DMSO, C) or different concentrations of MPT0G256 or 1 μM BIIB021 for 24 hr. Cells were harvested for detection of various HSP90 client proteins by Western blot analysis. (B) A549 cells were treated with vehicle 0.1% DMSO, C or 1 μM MPT0G256 for indicated times. Total cell lysates were harvested for detection of various HSP90 client proteins by Western blot analysis. Actin was used as the internal control.

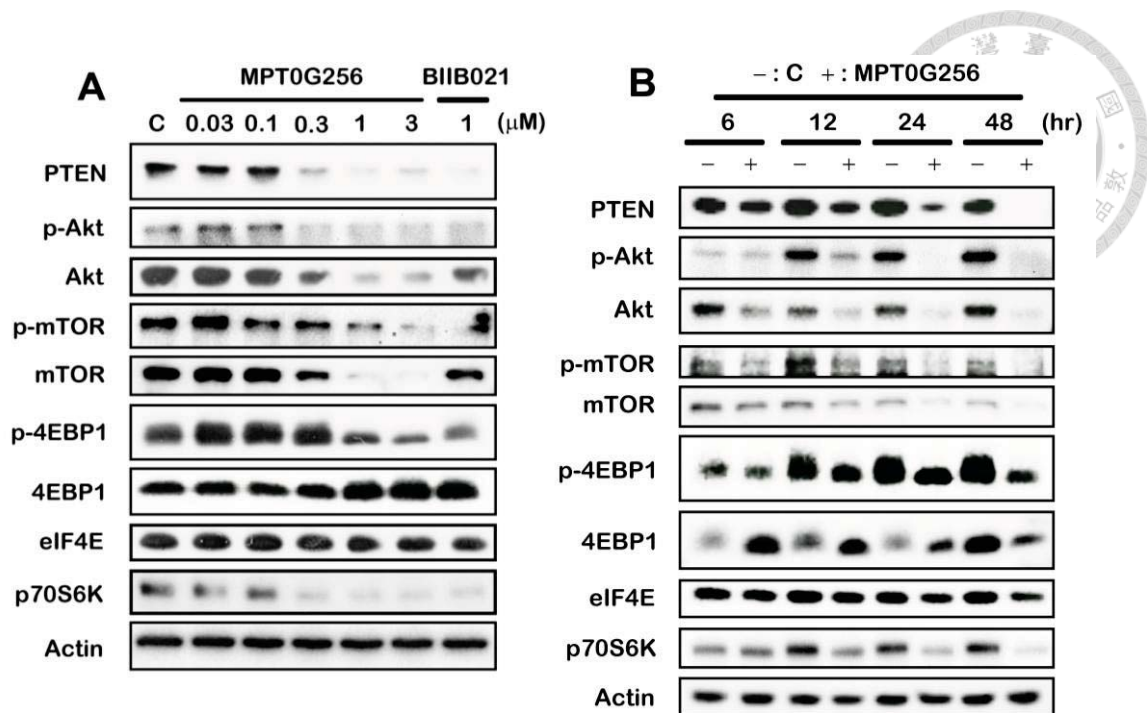


Figure 6. Effect of MPT0G256 on PI3K-Akt-mTOR signaling pathway in A549 cells.

(A) A549 cells were treated with vehicle (0.1% DMSO, C) or different concentrations of MPT0G256 or 1 μM BIIB021 for 24 hr. Then, cells were harvested for detection of PTEN, Akt, mTOR, 4EBP1, eIF4E and p70S6K by Western blot analysis. (B)

Time-dependent effect of MPT0G256 on PI3K-Akt-Mtor signaling pathway proteins in A549 cells. Cells were treated with 1 μM MPT0G256 for indicated times. Then, cells were harvested for detection of PTEN, Akt, mTOR, 4EBP1, eIF4E and p70S6K by Western blot analysis. Actin was used as the internal control. Data are representative of three independent experiments.

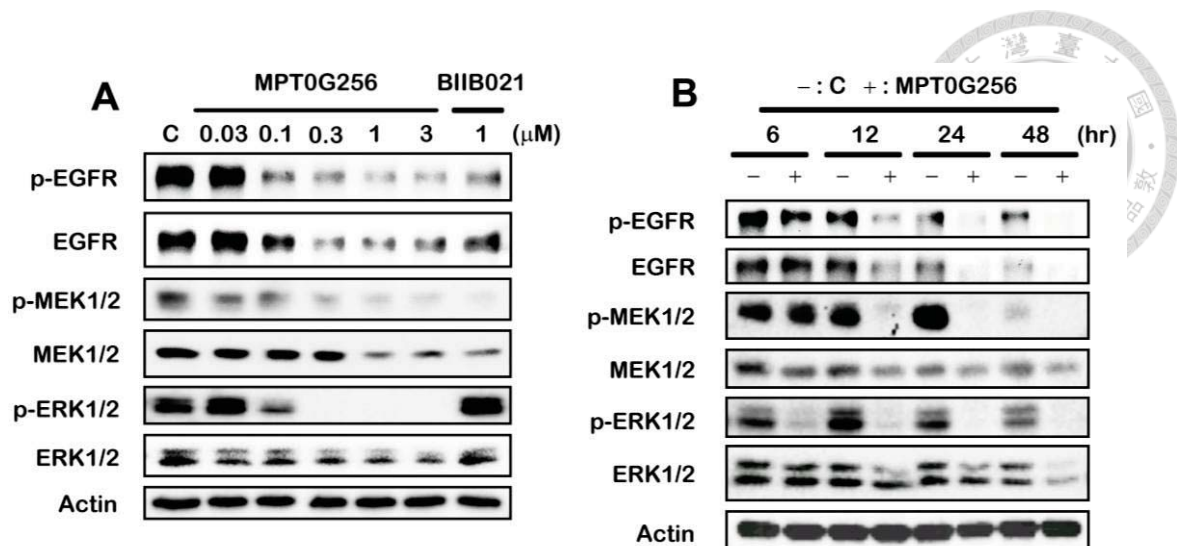


Figure 7. Effect of MPT0G256 on activation of MAPK signaling pathway in

K-Ras mutant A549 cell lines. (A) Concentration-dependent effect of MPT0G256 and

BIIB021 on the expression of MAPK proteins in A549 cells. Cells were treated with

vehicle (0.1% DMSO, C) or different concentrations of MPT0G256 or 1 μM BIIB021

for 24 hr. Then, cells were harvested for detection of EGFR, ERK and MEK by

Western blot. (B) Time-dependent effect of MPT0G256 on the expression of MAPK

proteins in A549 cells. Cells were treated with 1 μM MPT0G256 for indicated times.

Then, cells were harvested for detection of EGFR, ERK and MEK by Western blot.

Actin was used as the internal control. Similar results were obtained in at least three

independent experiments.

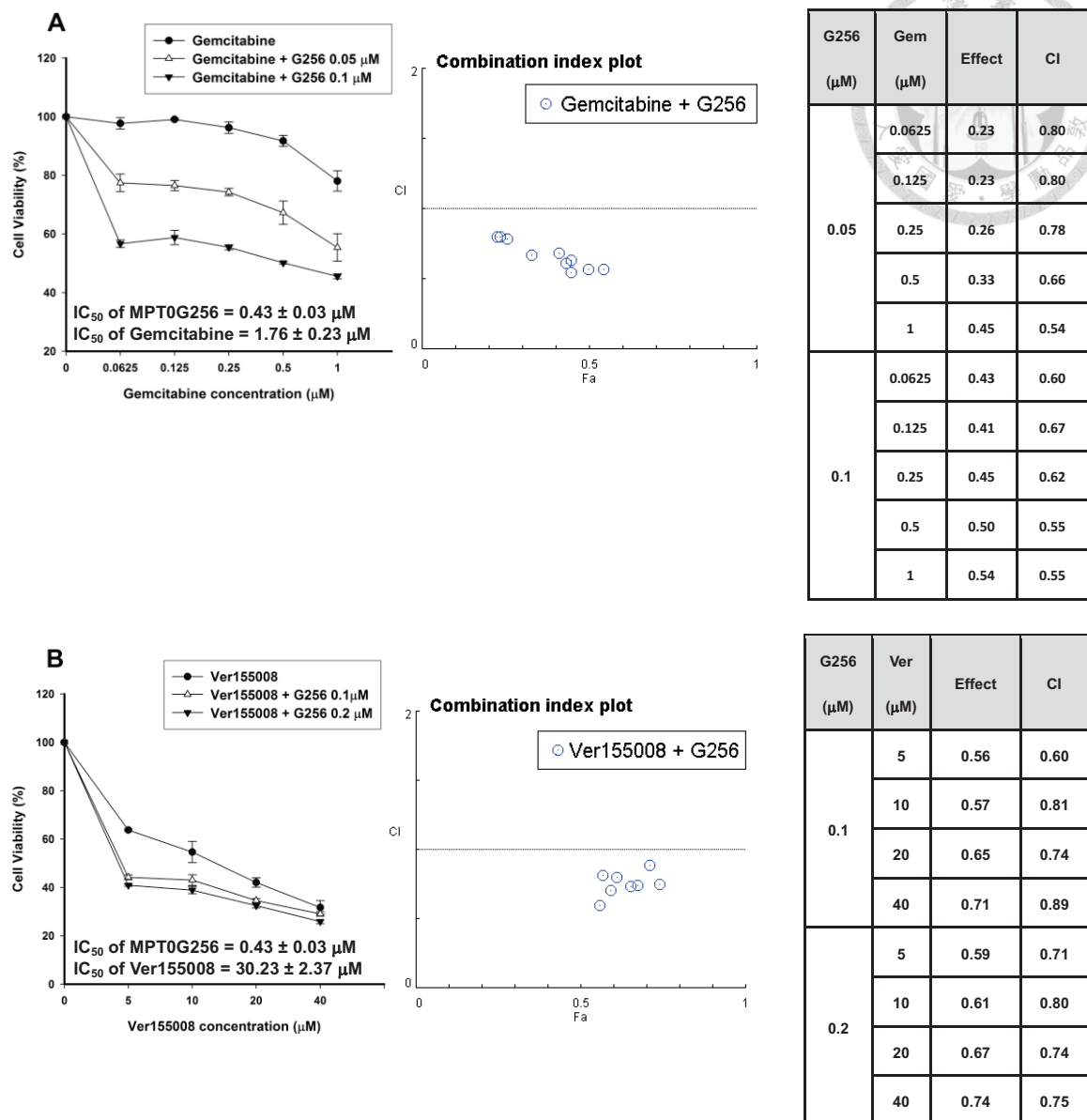


Figure 8. Cytotoxic synergism of MPT0G256 and gemcitabine/Ver155008 in A549

cells. A549 cells were co-treated with increasing concentrations of MPT0G256 (G256) and the indicated concentration of (A) Gemcitabine (Gem) or (B) Ver155008 (Ver) for 48 hr. Left panel, growth inhibition was determined by MTT assays. Right panel, the combination index (CI) for combination of MPT0G256 and Gemcitabine/Ver155008 in A549 cells after 48 hr of incubation. Also shown is a combination index plot. The horizontal line is the line of additivity. Points, mean; bars, S.E.M.(n=3)

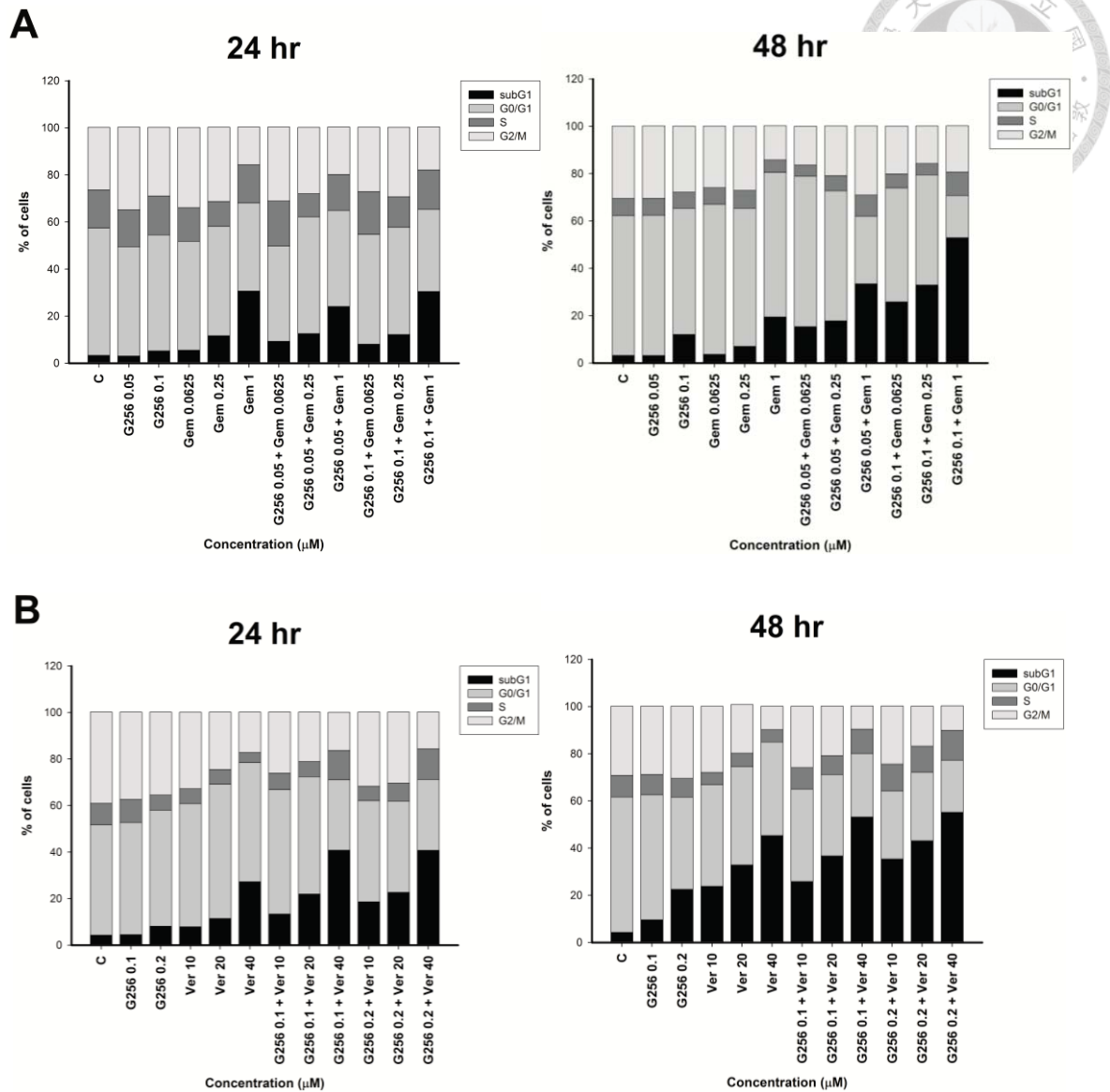


Figure 9. The drug effect of MPT0G256 in combination with gemcitabine or Ver155008 on cell cycle. A549 cells were incubated with MPT0G256 and the indicated concentrations of (A) gemcitabine or (B) Ver155008 for 24 hr and 48 hr. The cells were stained with PI and then analyzed by flow cytometry to determine cell cycle distribution patterns. Quantitative data were based on histograms. Similar results were obtained in at least three other independent experiments.

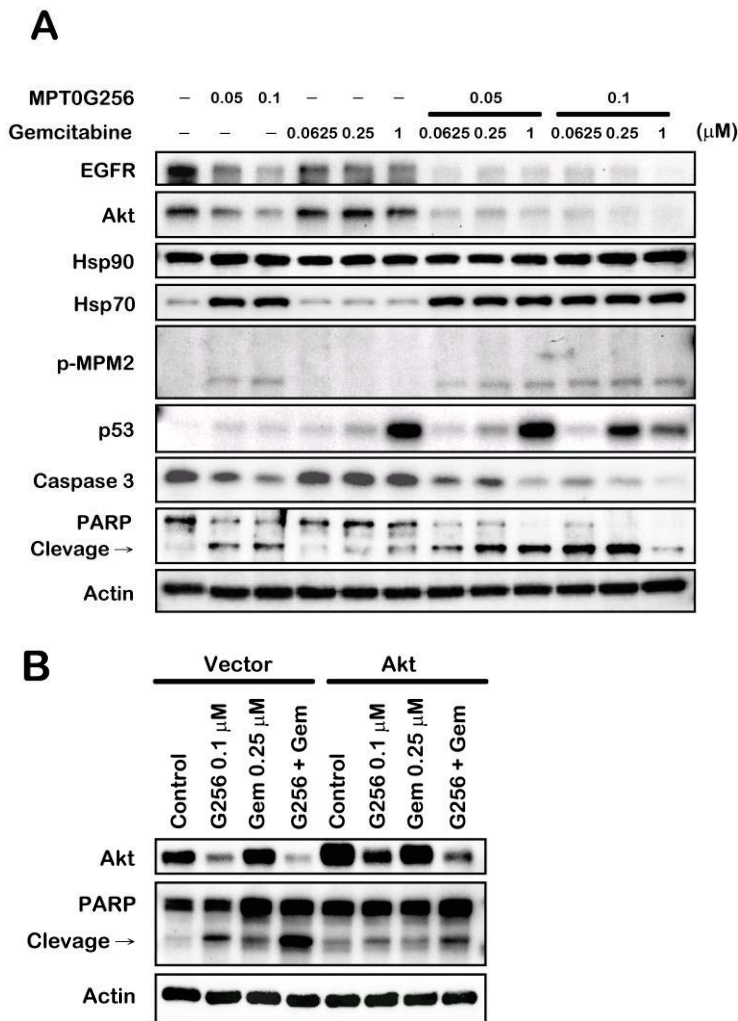


Figure 10. The effect of MPT0G256 and gemcitabine versus drug combination

on A549 cells. A549 cells were seeded at an initial concentration of 1.5×10^5 cell mL^{-1} for 24 hr and then treated with MPT0G256 either alone or in combination with gemcitabine at the indicated concentrations. (A) Cells were treated with drugs for 48 hr, and then followed by Western blot analysis to assess changes in protein levels with the indicated antibodies. (B) Akt overexpression inhibited PARP activation. A549 cells were transiently transfected with control vector (pcDNA3.1) or wt Akt plasmid for 24 hr and then exposed to MPT0G256 either alone or in combina-

tion with gemcitabine for 48 hr. Whole-cell extracts were subjected to Western blot analysis.



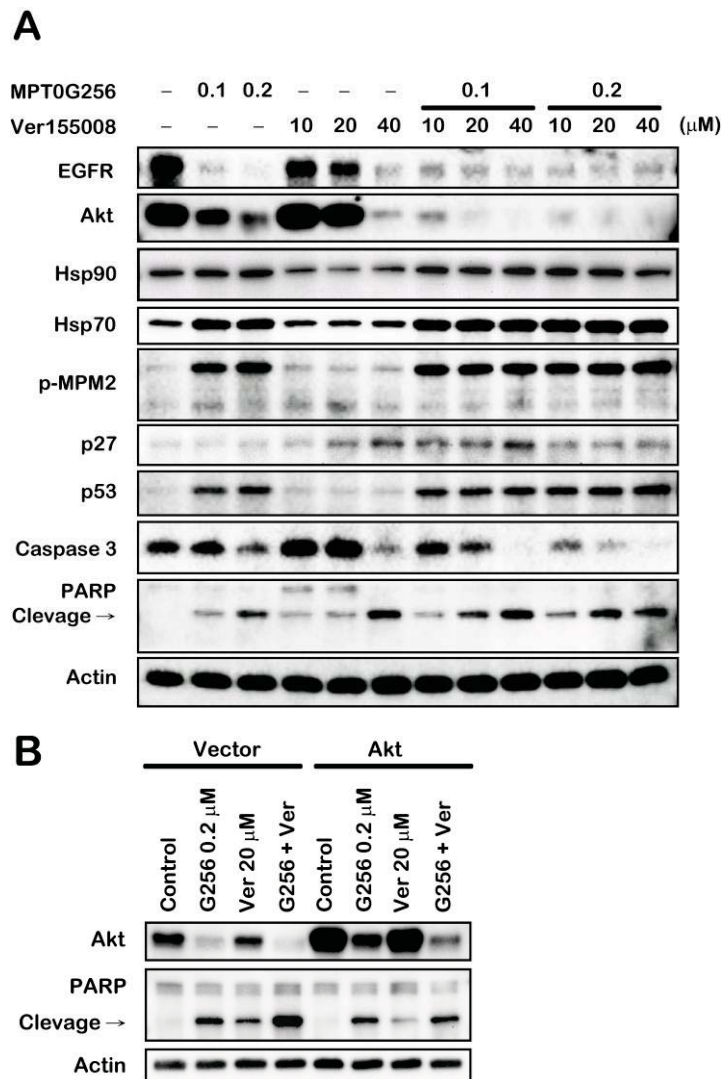


Figure 11. The effect of MPT0G256 and Ver155008 versus drug combination

on A549 cells. A549 cells were seeded at an initial concentration of 1.5×10^5 cell mL^{-1} for 24 hr and then treated with MPT0G256 either alone or in combination with Ver155008 at the indicated concentrations. (A) Cells were treated with drugs for 48 hr, and then followed by Western blot analysis to assess changes in protein levels with the indicated antibodies. (B) Akt overexpression inhibited PARP activation. A549 cells were transiently transfected with control vector (pcDNA3.1) or wt

Akt plasmid for 24 hr and then exposed to MPT0G256 either alone or in combination with Ver155008 for 48 hr. Whole-cell extracts were harvested and subjected to Western blot analysis.



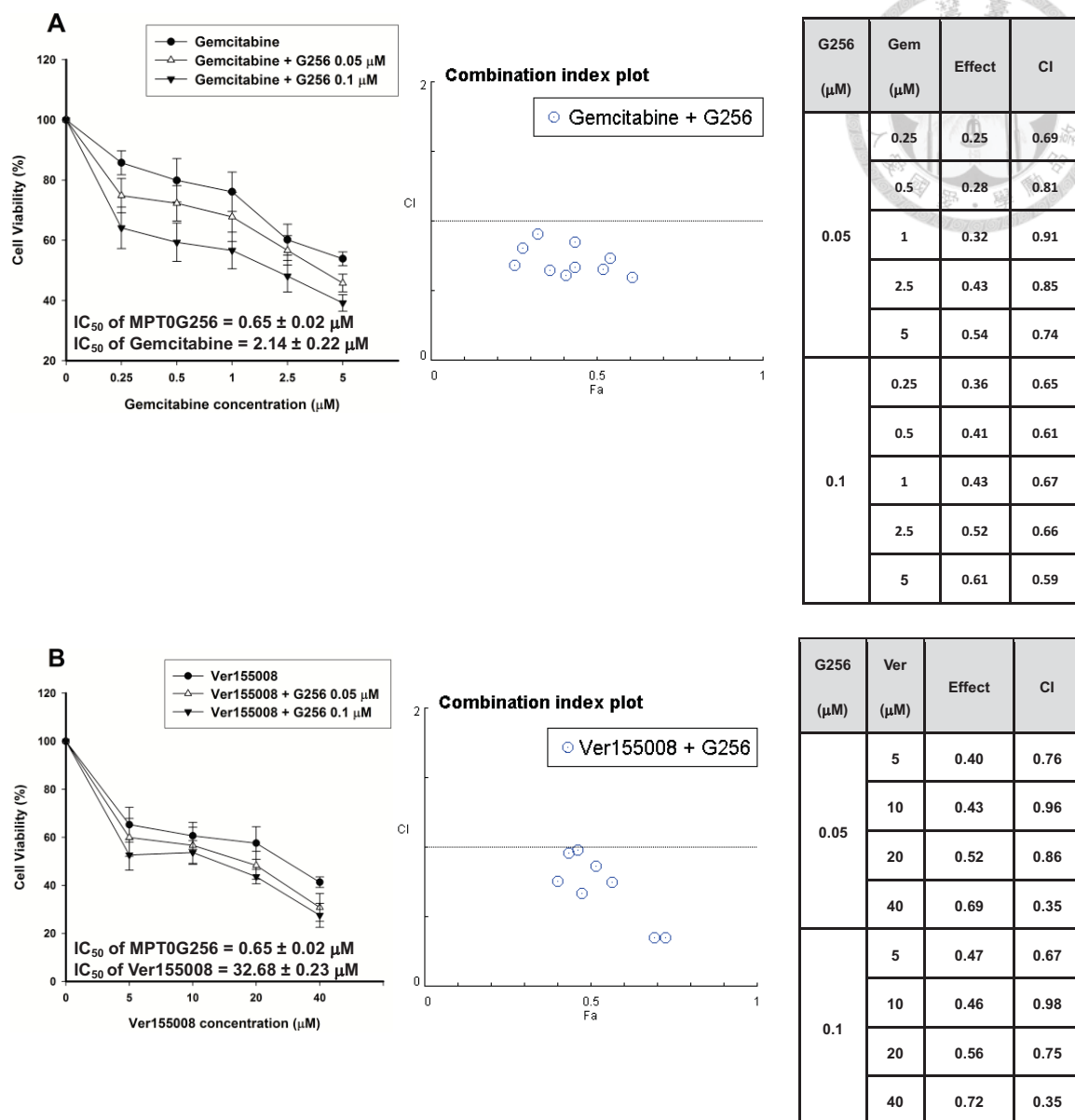


Figure 12. Cytotoxic synergism of MPT0G256 and gemcitabine/Ver155008 in

NCI-H1975 cells. NCI-H1975 cells were incubated with increasing concentrations of

MPT0G256 (G256) and the indicated concentration of (A) Gemcitabine (Gem) or (B)

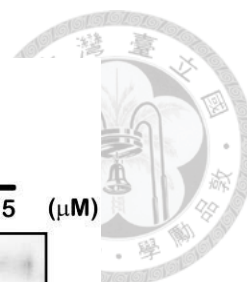
Ver155008 (Ver) for 48 hr. Left panel, growth inhibition was determined by MTT assays.

Right panel, the combination index (CI) for combination of MPT0G256 and Gemcita-

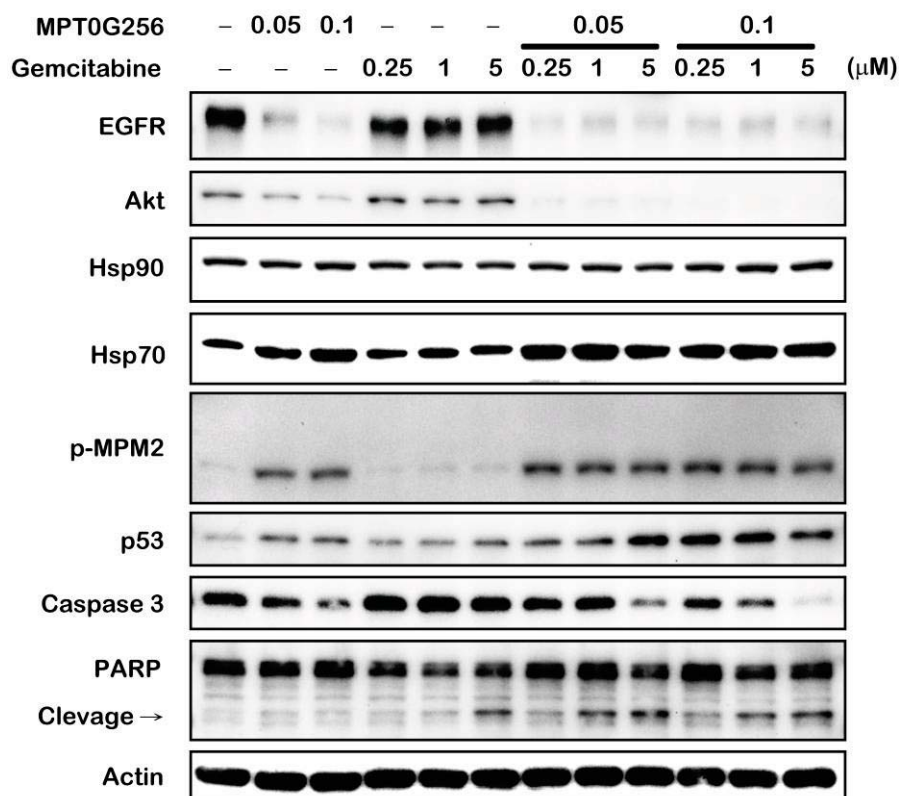
bine/Ver155008 in NCI-H1975 cells after 48 hr of incubation. Also shown is a combina-

tion index plot. The horizontal line is the line of additivity.





A



B

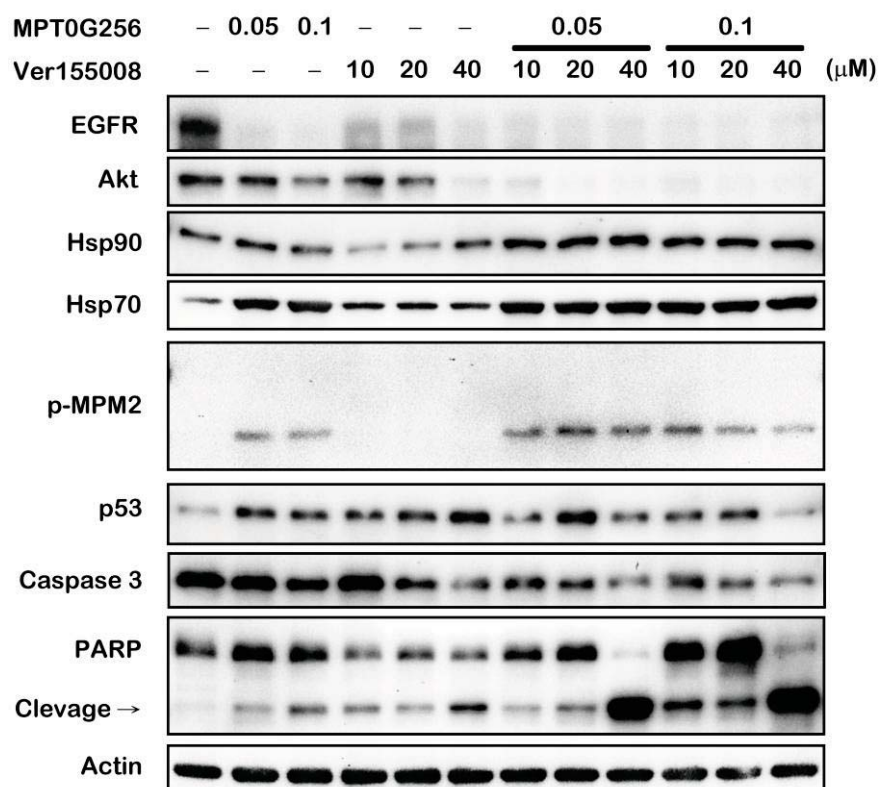
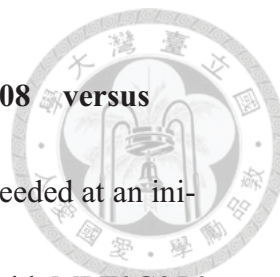


Figure 13. The effect of MPT0G256, gemcitabine and Ver155008 versus drug combination on NCI-H1975 cells. NCI-H1975 cells were seeded at an initial concentration of 1.5×10^5 cell mL^{-1} for 24 hr and then treated with MPT0G256 either alone or in combination with gemcitabine (A) or Ver155008 (B) in the indicated concentrations. Cells were treated with drugs for 48 hr, and then followed by Western blot analysis to assess changes in protein levels with the indicated antibodies. Whole-cell extracts were subjected to Western blot analysis.



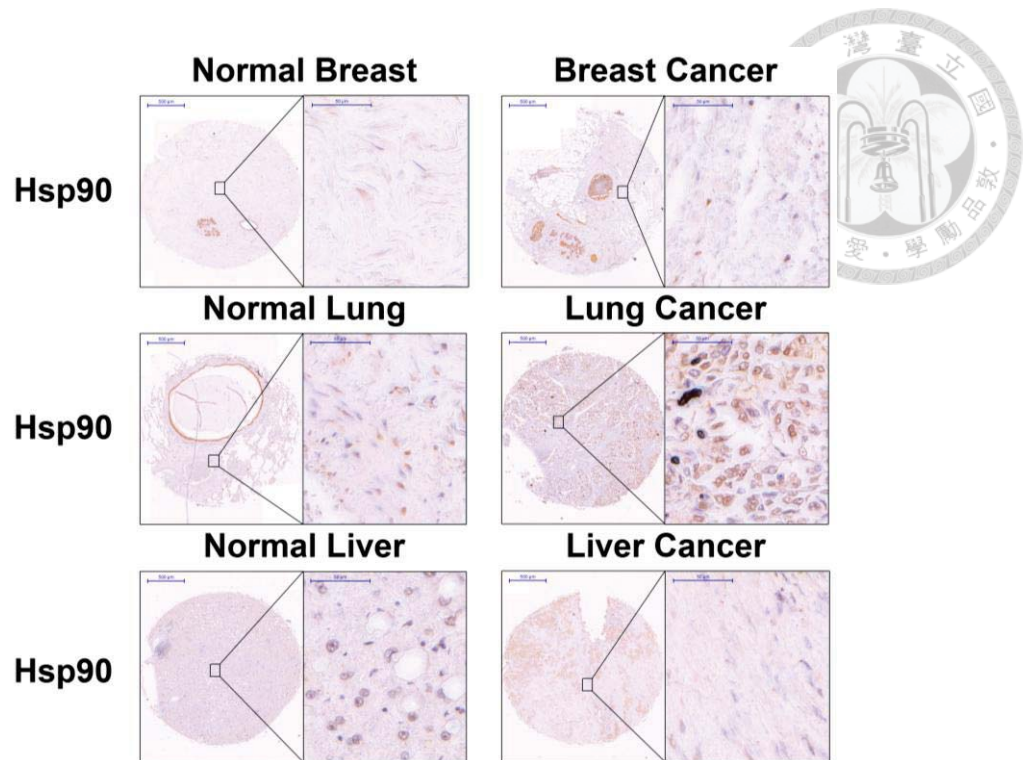
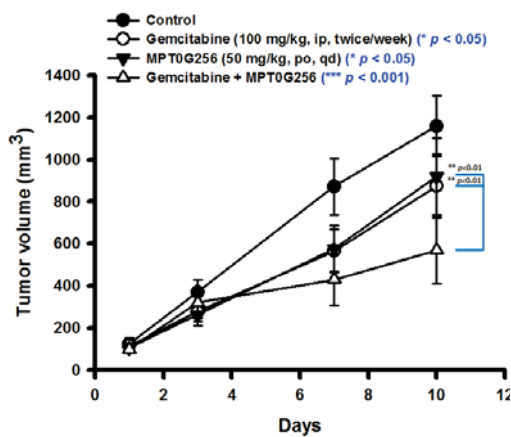
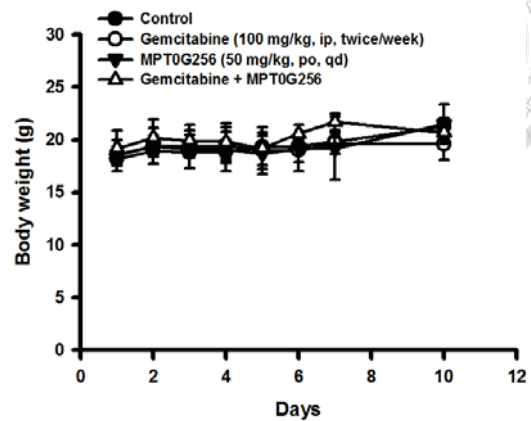


Figure 14. Representative immunostaining of HSP90 in human normal tissue and cancer tissue microarrays. Heat shock protein 90 expression was detected by immunohistochemical analysis of a tissue microarray containing normal breast, normal lung, normal liver, breast cancer (infiltrating duct carcinoma), lung cancer (adenocarcinoma) and liver cancer (signet ring cell carcinoma). Note the strong expression of HSP90 protein found in lung cancer samples.

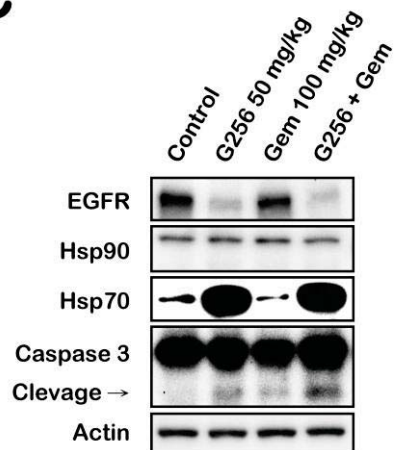
A



B



C



D

A549 xenografts

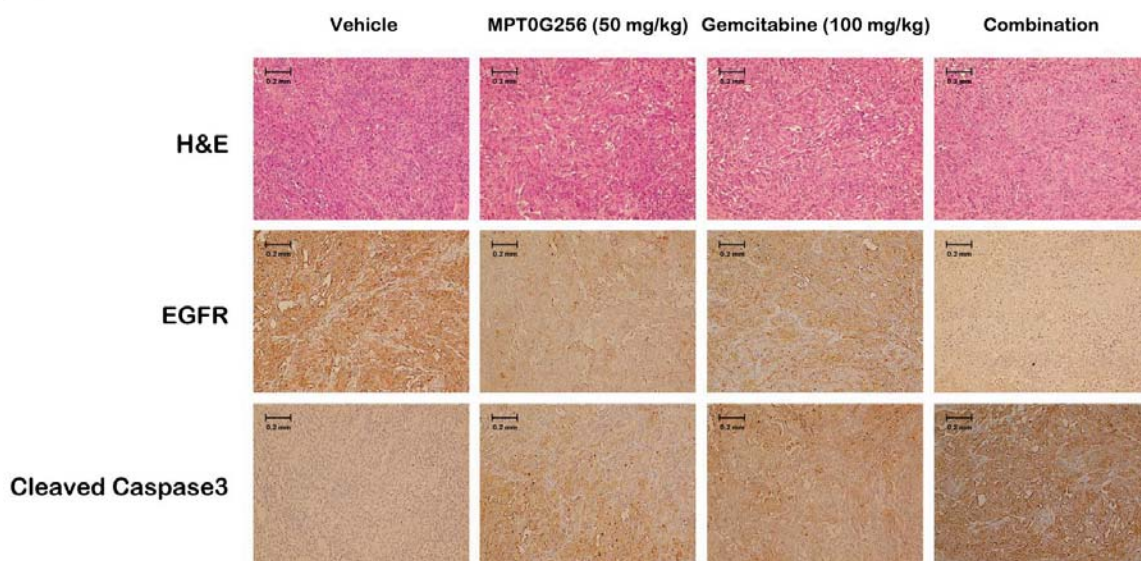
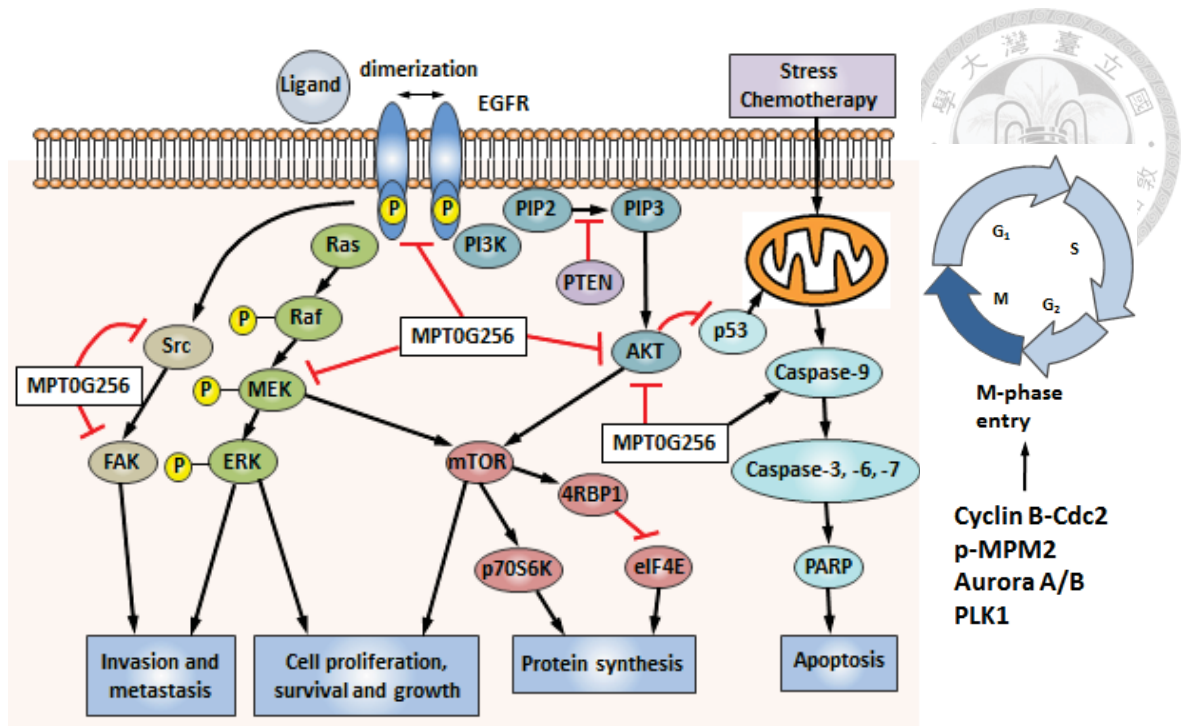
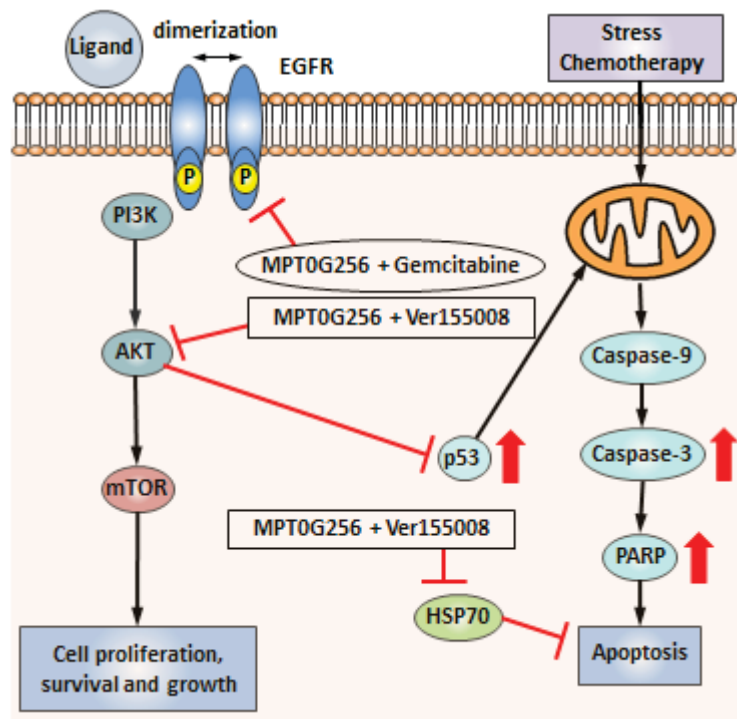


Figure 15. MPT0G256 and gemcitabine synergize in A549 xenograft. Mice bearing the established A549 tumors (~100 mm³) were treated with vehicle control (D5W), MPT0G256 (50 mg/kg by daily oral administration), gemcitabine (100 mg/kg by intraperitoneal injection twice a week), or MPT0G256 + gemcitabine for 10 days. Then, mice were euthanized and tumors were harvested. At least six mice per group were used in the xenograft experiment. (A) The co-treated group of MPT0G256 and gemcitabine showed significant synergistic effects *in vivo*. ****P*<0.01 (B) Drugs treatments did not cause significant body weight loss of tested animals. (C) Tumors from representative mice of each group were harvested and subjected to Western blot analysis using the indicated antibodies. Actin was used as the internal control. (D) Paraffin sections of vehicle-treated, MPT0G256-treated, gemcitabine-treated or combination-treated A549 xenografts were stained with hematoxylin and eosin (H&E) or stained with EGFR or cleaved caspase 3 antibodies. Then sections were measured at x 200 magnifications. Brown color means EGFR- or cleaved caspase 3-positive area.



Appendix 1. Schematic overview of MPT0G256 affected signaling pathways.



Appendix 2. Mechanisms of synergism between MPT0G256 and gemcitabine and Ver155008.

參考文獻



Acquaviva J, Smith DL, Sang J, Friedland JC, He S, Sequeira M, *et al.* (2012). Targeting KRAS-mutant non-small cell lung cancer with the Hsp90 inhibitor ganetespib. *Molecular cancer therapeutics* **11**(12): 2633-2643.

Agatsuma T, Ogawa H, Akasaka K, Asai A, Yamashita Y, Mizukami T, *et al.* (2002). Halohydrin and oxime derivatives of radicicol: synthesis and antitumor activities. *Bioorganic & medicinal chemistry* **10**(11): 3445-3454.

Ahearn IM, Haigis K, Bar-Sagi D, Philips MR (2012). Regulating the regulator: post-translational modification of RAS. *Nature reviews. Molecular cell biology* **13**(1): 39-51.

Akerfelt M, Morimoto RI, Sistonen L (2010). Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. *Nature reviews. Molecular cell biology* **11**(8): 545-555.

Alamgeer M, Ganju V, Watkins DN (2013). Novel therapeutic targets in non-small cell lung cancer. *Current Opinion in Pharmacology* **13**(3): 394-401.

Ali MM, Roe SM, Vaughan CK, Meyer P, Panaretou B, Piper PW, *et al.* (2006). Crystal structure of an Hsp90-nucleotide-p23/Sba1 closed chaperone complex. *Nature* **440**(7087): 1013-1017.

Basto R, Gergely F, Draviam VM, Ohkura H, Liley K, Raff JW (2007). Hsp90 is required to localise cyclin B and Msp/ch-TOG to the mitotic spindle in *Drosophila* and humans. *Journal of cell science* **120**(Pt 7): 1278-1287.

Bjorck E, Ek S, Landgren O, Jerkeman M, Ehinger M, Bjorkholm M, *et al.* (2005). High expression of cyclin B1 predicts a favorable outcome in patients with follicular lymphoma. *Blood* **105**(7): 2908-2915.

Burdach S (2014). Molecular precision chemotherapy: overcoming resistance to targeted therapies? *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **20**(5): 1064-1066.

Burlison JA, Avila C, Vielhauer G, Lubbers DJ, Holzbeierlein J, Blagg BS (2008). Development of novobiocin analogues that manifest anti-proliferative activity against several cancer cell lines. *The Journal of organic chemistry* **73**(6): 2130-2137.

Burrows F, Zhang H, Kamal A (2004). Hsp90 activation and cell cycle regulation. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* **3**(12): 1530-1536.

Campiglio M, Locatelli A, Olgiati C, Normanno N, Somenzi G, Vigano L, *et al.* (2004). Inhibition of proliferation and induction of apoptosis in breast cancer cells by the epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitor ZD1839 ('Iressa') is independent of EGFR expression level. *Journal of cellular physiology* **198**(2): 259-268.

Castedo M, Perfettini JL, Roumier T, Kroemer G (2002). Cyclin-dependent kinase-1: linking apoptosis to cell cycle and mitotic catastrophe. *Cell death and differentiation* **9**(12): 1287-1293.

Castellano I, Sapino A, Arisio R, Viale G, Bussolati G, Bandelloni R, *et al.* (2008). Fluorescent in situ hybridization as a screening test for HER2 amplification in G2 and G3 breast cancers of lobular and ductal histotype and metastases. *Oncology reports* **19**(5): 1271-1275.

Chan BA, Coward JIG (2013). Chemotherapy advances in small-cell lung cancer. *Journal of Thoracic Disease*: S565-S578.

Chan BA, Hughes BGM (2014). Targeted therapy for non-small cell lung cancer: current standards and the promise of the future. *Translational Lung Cancer Research* **4**(1): 36-54.

Chen DJ, Nirodi CS (2007). The epidermal growth factor receptor: a role in repair of radiation-induced DNA damage. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **13**(22 Pt 1): 6555-6560.

Cheung KM, Matthews TP, James K, Rowlands MG, Boxall KJ, Sharp SY, *et al.* (2005). The identification, synthesis, protein crystal structure and in vitro biochemical evaluation of a new 3,4-diarylpyrazole class of Hsp90 inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **15**(14): 3338-3343.

Chi DC, Brogan F, Turenne I, Zelonis S, Schwartz L, Saif MW (2012).

Gemcitabine-induced pulmonary toxicity. *Anticancer research* **32**(9): 4147-4149.

Chougule A, Prabhash K, Noronha V, Joshi A, Thavamani A, Chandrani P, *et al.* (2013). Frequency of *EGFR* Mutations in 907 Lung Adenocarcinoma Patients of Indian Ethnicity. *PloS one* **8**(10): e76164.

Collins LG, H. C, P. R, Enck RE (2007). Lung Cancer: Diagnosis and Management. *American Family Physician* **75**.

Diaz R, Nguewa PA, Parrondo R, Perez-Stable C, Manrique I, Redrado M, *et al.* (2010). Antitumor and antiangiogenic effect of the dual EGFR and HER-2 tyrosine kinase inhibitor lapatinib in a lung cancer model. *BMC cancer* **10**: 188.

Dickson MA, Okuno SH, Keohan ML, Maki RG, D'Adamo DR, Akhurst TJ, *et al.* (2013). Phase II study of the HSP90-inhibitor BIIB021 in gastrointestinal stromal tumors. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* **24**(1): 252-257.

Didelot C, Lanneau D, Brunet M, Joly AL, De Thonel A, Chiosis G, *et al.* (2007). Anti-cancer therapeutic approaches based on intracellular and extracellular heat shock proteins. *Current medicinal chemistry* **14**(27): 2839-2847.

Elmore S (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology* **35**(4): 495-516.

Engelman JA (2009). Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nat Rev Cancer* **9**(8): 550-562.

Engelman JA, Chen L, Tan X, Crosby K, Guimaraes AR, Upadhyay R, *et al.* (2008). Effective use of PI3K and MEK inhibitors to treat mutant Kras G12D and PIK3CA H1047R murine lung cancers. *Nature medicine* **14**(12): 1351-1356.

Erlichman C (2009). Tanespimycin: the opportunities and challenges of targeting heat shock protein 90. *Expert Opinion on Investigational Drugs* **18**(6): 861-868.

Evans CG, Chang L, Gestwicki JE (2010). Heat shock protein 70 (hsp70) as an emerging drug target. *Journal of medicinal chemistry* **53**(12): 4585-4602.

Gainor JF, Varghese AM, Ou SH, Kabraji S, Awad MM, Katayama R, *et al.* (2013). ALK rearrangements are mutually exclusive with mutations in EGFR or KRAS: an analysis of 1,683 patients with non-small cell lung cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **19**(15): 4273-4281.

Garrido C, Schmitt E, Candé C, Vahsen N, Parcellier A, Kroemer G (2003). HSP27 and HSP70: Potentially Oncogenic Apoptosis Inhibitors. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* **2**(6): 578-583.

Gaspar N, Sharp SY, Eccles SA, Gowan S, Popov S, Jones C, *et al.* (2010). Mechanistic evaluation of the novel HSP90 inhibitor NVP-AUY922 in adult and pediatric glioblastoma. *Molecular cancer therapeutics* **9**(5): 1219-1233.

Gopalakrishnan R, Matta H, Chaudhary PM (2013). A purine scaffold HSP90 inhibitor BIIB021 has selective activity against KSHV-associated Primary Effusion Lymphoma and blocks vFLIP K13-induced NF- κ B. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **19**(18): 5016-5026.

Guo W, Reigan P, Siegel D, Zirrolli J, Gustafson D, Ross D (2006). The bioreduction of a series of benzoquinone ansamycins by NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 to more potent heat shock protein 90 inhibitors, the hydroquinone ansamycins. *Molecular pharmacology* **70**(4): 1194-1203.

Hadchity E, Aloy MT, Paulin C, Armandy E, Watkin E, Rousson R, *et al.* (2009). Heat shock protein 27 as a new therapeutic target for radiation sensitization of head and neck squamous cell carcinoma. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* **17**(8): 1387-1394.

Hanahan D, Weinberg RA (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell* **100**(1): 57-70.

Harrington EA, Bebbington D, Moore J, Rasmussen RK, Ajose-Adeogun AO, Nakayama T, *et al.* (2004). VX-680, a potent and selective small-molecule inhibitor of the Aurora kinases, suppresses tumor growth in vivo. *Nature medicine* **10**(3): 262-267.

Hatzivassiliou G, Haling JR, Chen H, Song K, Price S, Heald R, *et al.* (2013). Mechanism of MEK inhibition determines efficacy in mutant KRAS- versus BRAF-driven cancers. *Nature* **501**(7466): 232-236.

Hinnebusch Alan G (2012). Translational Homeostasis via eIF4E and 4E-BP1. *Molecular Cell* **46**(6): 717-719.

Hollander MC, Blumenthal GM, Dennis PA (2011). PTEN loss in the continuum of common cancers, rare syndromes and mouse models. *Nat Rev Cancer* **11**(4): 289-301.

Hong DS, Banerji U, Tavana B, George GC, Aaron J, Kurzrock R (2013a). Targeting the molecular chaperone heat shock protein 90 (HSP90): Lessons learned and future directions. *Cancer Treatment Reviews* **39**(4): 375-387.

Hong DS, Banerji U, Tavana B, George GC, Aaron J, Kurzrock R (2013b). Targeting the molecular chaperone heat shock protein 90 (HSP90): lessons learned and future directions. *Cancer Treat Rev* **39**(4): 375-387.

Huang T, Chen S, Han H, Li H, Huang Z, Zhang J, *et al.* (2014). Expression of Hsp90alpha and cyclin B1 were related to prognosis of esophageal squamous cell carcinoma and keratin pearl formation. *International journal of clinical and experimental pathology* **7**(4): 1544-1552.

Ischia J, So AI (2013). The role of heat shock proteins in bladder cancer. *Nature reviews. Urology* **10**(7): 386-395.

Janin YL (2010). ATPase inhibitors of heat-shock protein 90, second season. *Drug Discov Today* **15**(9-10): 342-353.

Janjigian YY, Azzoli CG, Krug LM, Pereira LK, Rizvi NA, Pietanza MC, *et al.* (2011). Phase I/II trial of cetuximab and erlotinib in patients with lung adenocarcinoma and acquired resistance to erlotinib. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **17**(8): 2521-2527.

Janne PA, Shaw AT, Pereira JR, Jeannin G, Vansteenkiste J, Barrios C, *et al.* (2013). Selumetinib plus docetaxel for KRAS-mutant advanced non-small-cell lung cancer: a randomised, multicentre, placebo-controlled, phase 2 study. *The Lancet. Oncology* **14**(1): 38-47.

Jhaveri K, Modi S (2012). HSP90 inhibitors for cancer therapy and overcoming drug resistance. *Advances in pharmacology (San Diego, Calif.)* **65**: 471-517.

Khalil AA, Kabapy NF, Deraz SF, Smith C (2011). Heat shock proteins in oncology: Diagnostic biomarkers or therapeutic targets? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* **1816**(2): 89-104.



Knowles MA, Hurst CD (2015). Molecular biology of bladder cancer: new insights into pathogenesis and clinical diversity. *Nat Rev Cancer* **15**(1): 25-41.

Kuhn DJ, Zeger EL, Orlowski RZ (2006). Proteasome inhibitors and modulators of heat shock protein function. *Update on Cancer Therapeutics* **1**(2): 91-116.

Kwak EL, Bang YJ, Camidge DR, Shaw AT, Solomon B, Maki RG, *et al.* (2010). Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *The New England journal of medicine* **363**(18): 1693-1703.

Lamottke B, Kaiser M, Mieth M, Heider U, Gao Z, Nikolova Z, *et al.* (2012). The novel, orally bioavailable HSP90 inhibitor NVP-HSP990 induces cell cycle arrest and apoptosis in multiple myeloma cells and acts synergistically with melphalan by increased cleavage of caspases. *European journal of haematology* **88**(5): 406-415.

Lubin JH, Boice JD, Jr., Edling C, Hornung RW, Howe GR, Kunz E, *et al.* (1995). Lung cancer in radon-exposed miners and estimation of risk from indoor exposure. *Journal of the National Cancer Institute* **87**(11): 817-827.

Mao C, Qiu LX, Liao RY, Du FB, Ding H, Yang WC, *et al.* (2010). KRAS mutations and resistance to EGFR-TKIs treatment in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis of 22 studies. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)* **69**(3): 272-278.

Marcu MG, Schulte TW, Neckers L (2000). Novobiocin and related coumarins and depletion of heat shock protein 90-dependent signaling proteins. *Journal of the National Cancer Institute* **92**(3): 242-248.

Massey AJ, Williamson DS, Browne H, Murray JB, Dokurno P, Shaw T, *et al.* (2010). A novel, small molecule inhibitor of Hsc70/Hsp70 potentiates Hsp90 inhibitor induced apoptosis in HCT116 colon carcinoma cells. *Cancer chemotherapy and pharmacology* **66**(3): 535-545.

Meng J, Dai B, Fang B, Bekele BN, Bornmann WG, Sun D, *et al.* (2010). Combination treatment with MEK and AKT inhibitors is more effective than each drug alone in

human non-small cell lung cancer in vitro and in vivo. *PloS one* **5**(11): e14124.

Miller VA, Hirsh V, Cadranel J, Chen YM, Park K, Kim SW, *et al.* (2012). Afatinib versus placebo for patients with advanced, metastatic non-small-cell lung cancer after failure of erlotinib, gefitinib, or both, and one or two lines of chemotherapy (LUX-Lung 1): a phase 2b/3 randomised trial. *The Lancet. Oncology* **13**(5): 528-538.

Millson SH, Chua CS, Roe SM, Polier S, Solovieva S, Pearl LH, *et al.* (2011). Features of the *Streptomyces hygroscopicus* HtpG reveal how partial geldanamycin resistance can arise with mutation to the ATP binding pocket of a eukaryotic Hsp90. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **25**(11): 3828-3837.

Modi S, Stopeck A, Linden H, Solit D, Chandarlapaty S, Rosen N, *et al.* (2011). HSP90 inhibition is effective in breast cancer: a phase II trial of tanespimycin (17-AAG) plus trastuzumab in patients with HER2-positive metastatic breast cancer progressing on trastuzumab. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **17**(15): 5132-5139.

Mok TS, Wu Y-L, Thongprasert S, Yang C-H, Chu D-T, Saijo N, *et al.* (2009). Gefitinib or Carboplatin–Paclitaxel in Pulmonary Adenocarcinoma. *New England Journal of Medicine* **361**(10): 947-957.

Munje C, Shervington L, Khan Z, Shervington A (2014). Could Upregulated Hsp70 Protein Compensate for the Hsp90-Silence-Induced Cell Death in Glioma Cells? *International Journal of Brain Science* **2014**: 9.

Neckers L, Workman P (2012). Hsp90 molecular chaperone inhibitors: are we there yet? *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **18**(1): 64-76.

Pearl LH, Prodromou C (2006). Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone machinery. *Annual review of biochemistry* **75**: 271-294.

Pearl LH, Prodromou C, Workman P (2008). The Hsp90 molecular chaperone: an open and shut case for treatment. *The Biochemical journal* **410**(3): 439-453.

Pedersen KS, Kim GP, Foster NR, Wang-Gillam A, Erlichman C, McWilliams RR

(2015). Phase II trial of gemcitabine and tanespimycin (17AAG) in metastatic pancreatic cancer: a Mayo Clinic Phase II Consortium study. *Investigational new drugs*.

Peters MG, Vidal Mdel C, Gimenez L, Mauro L, Armanasco E, Cresta C, *et al.* (2004). Prognostic value of cell cycle regulator molecules in surgically resected stage I and II breast cancer. *Oncology reports* **12**(5): 1143-1150.

Pines J (2011). Cubism and the cell cycle: the many faces of the APC/C. *Nature reviews. Molecular cell biology* **12**(7): 427-438.

Piper PW, Millson SH (2011). Mechanisms of Resistance to Hsp90 Inhibitor Drugs: A Complex Mosaic Emerges. *Pharmaceuticals* **4**(11): 1400-1422.

Pocaly M, Lagarde V, Etienne G, Ribeil JA, Claverol S, Bonneu M, *et al.* (2007). Overexpression of the heat-shock protein 70 is associated to imatinib resistance in chronic myeloid leukemia. *Leukemia* **21**(1): 93-101.

Polivka Jr J, Janku F (2014). Molecular targets for cancer therapy in the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Pharmacology & Therapeutics* **142**(2): 164-175.

Powers MV, Clarke PA, Workman P (2008). Dual targeting of HSC70 and HSP72 inhibits HSP90 function and induces tumor-specific apoptosis. *Cancer cell* **14**(3): 250-262.

Qian Y, Qiu M, Wu Q, Tian Y, Zhang Y, Gu N, *et al.* (2014). Enhanced cytotoxic activity of cetuximab in EGFR-positive lung cancer by conjugating with gold nanoparticles. *Sci. Rep.* **4**.

Richardson PG, Chanan-Khan AA, Lonial S, Krishnan AY, Carroll MP, Alsina M, *et al.* (2011). Tanespimycin and bortezomib combination treatment in patients with relapsed or relapsed and refractory multiple myeloma: results of a phase 1/2 study. *British journal of haematology* **153**(6): 729-740.

Riely GJ, Johnson ML, Medina C, Rizvi NA, Miller VA, Kris MG, *et al.* (2011). A phase II trial of Salirasib in patients with lung adenocarcinomas with KRAS mutations. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* **6**(8): 1435-1437.

Roe SM, Prodromou C, O'Brien R, Ladbury JE, Piper PW, Pearl LH (1999). Structural basis for inhibition of the Hsp90 molecular chaperone by the antitumor antibiotics radicicol and geldanamycin. *Journal of medicinal chemistry* **42**(2): 260-266.

Ronnen EA, Kondagunta GV, Ishill N, Sweeney SM, Deluca JK, Schwartz L, *et al.* (2006). A phase II trial of 17-(Allylamino)-17-demethoxygeldanamycin in patients with papillary and clear cell renal cell carcinoma. *Investigational new drugs* **24**(6): 543-546.

Rossi A, Maione P, Palazzolo G, Sacco PC, Ferrara ML, Falanga M, *et al.* (2008). New Targeted Therapies and Small-Cell Lung Cancer. *Clinical Lung Cancer* **9**(5): 271-279.

Samuni Y, Ishii H, Hyodo F, Samuni U, Krishna MC, Goldstein S, *et al.* (2010). Reactive oxygen species mediate hepatotoxicity induced by the Hsp90 inhibitor geldanamycin and its analogs. *Free radical biology & medicine* **48**(11): 1559-1563.

Sauvageot CM, Weatherbee JL, Kesari S, Winters SE, Barnes J, Dellagatta J, *et al.* (2009). Efficacy of the HSP90 inhibitor 17-AAG in human glioma cell lines and tumorigenic glioma stem cells. *Neuro-oncology* **11**(2): 109-121.

Schmid K, Oehl N, Wrba F, Pirker R, Pirker C, Filipits M (2009). EGFR/KRAS/BRAF mutations in primary lung adenocarcinomas and corresponding locoregional lymph node metastases. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **15**(14): 4554-4560.

Schulz R, Steller F, Scheel AH, Ruschoff J, Reinert MC, Dobbstein M, *et al.* (2014). HER2/ErbB2 activates HSF1 and thereby controls HSP90 clients including MIF in HER2-overexpressing breast cancer. *Cell death & disease* **5**: e980.

Senju M, Sueoka N, Sato A, Iwanaga K, Sakao Y, Tomimitsu S, *et al.* (2006). Hsp90 inhibitors cause G2/M arrest associated with the reduction of Cdc25C and Cdc2 in lung cancer cell lines. *J Cancer Res Clin Oncol* **132**(3): 150-158.

Sequist LV, von Pawel J, Garmey EG, Akerley WL, Brugger W, Ferrari D, *et al.* (2011). Randomized phase II study of erlotinib plus tivantinib versus erlotinib plus placebo in previously treated non-small-cell lung cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **29**(24): 3307-3315.

Shen G, Blagg BS (2005). Radester, a novel inhibitor of the Hsp90 protein folding

machinery. *Organic letters* **7**(11): 2157-2160.

Shi J, Van de Water R, Hong K, Lamer RB, Weichert KW, Sandoval CM, *et al.* (2012). EC144 is a potent inhibitor of the heat shock protein 90. *Journal of medicinal chemistry* **55**(17): 7786-7795.

Shimamura T, Perera SA, Foley KP, Sang J, Rodig SJ, Inoue T, *et al.* (2012). Ganetespib (STA-9090), a nongeldanamycin HSP90 inhibitor, has potent antitumor activity in in vitro and in vivo models of non-small cell lung cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **18**(18): 4973-4985.

Shukuya T, Takahashi T, Tamiya A, Ono A, Igawa S, Tsuya A, *et al.* (2009). Evaluation of the safety and compliance of 3-week cycles of vinorelbine on days 1 and 8 and cisplatin on day 1 as adjuvant chemotherapy in Japanese patients with completely resected pathological stage IB to IIIA non-small cell lung cancer: a retrospective study. *Japanese journal of clinical oncology* **39**(3): 158-162.

Sidera K, Patsavoudi E (2014). HSP90 inhibitors: current development and potential in cancer therapy. *Recent patents on anti-cancer drug discovery* **9**(1): 1-20.

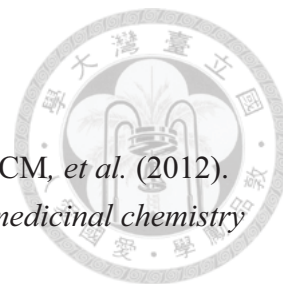
Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A (2014). Cancer statistics, 2014. *CA: a cancer journal for clinicians* **64**(1): 9-29.

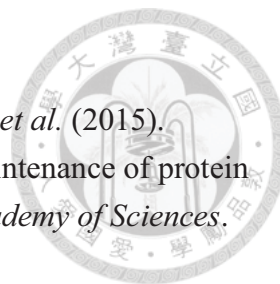
Soga S, Shiotsu Y, Akinaga S, Sharma SV (2003). Development of radicicol analogues. *Current cancer drug targets* **3**(5): 359-369.

Sos ML, Michel K, Zander T, Weiss J, Frommolt P, Peifer M, *et al.* (2009). Predicting drug susceptibility of non-small cell lung cancers based on genetic lesions. *The Journal of clinical investigation* **119**(6): 1727-1740.

Stenderup K, Rosada C, Gavillet B, Vuagniaux G, Dam TN (2014). Debio 0932, a new oral Hsp90 inhibitor, alleviates psoriasis in a xenograft transplantation model. *Acta dermato-venereologica* **94**(6): 672-676.

Suda K, Tomizawa K, Mitsudomi T (2010). Biological and clinical significance of KRAS mutations in lung cancer: an oncogenic driver that contrasts with EGFR mutation. *Cancer metastasis reviews* **29**(1): 49-60.





Takeuchi T, Suzuki M, Fujikake N, Popiel HA, Kikuchi H, Futaki S, *et al.* (2015). Intercellular chaperone transmission via exosomes contributes to maintenance of protein homeostasis at the organismal level. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.

Taldone T, Gozman A, Maharaj R, Chiosis G (2008). Targeting Hsp90: small-molecule inhibitors and their clinical development. *Curr Opin Pharmacol* **8**(4): 370-374.

Trepel J, Mollapour M, Giaccone G, Neckers L (2010). Targeting the dynamic HSP90 complex in cancer. *Nat Rev Cancer* **10**(8): 537-549.

Ueno H, Kiyosawa K, Kaniwa N (2007). Pharmacogenomics of gemcitabine: can genetic studies lead to tailor-made therapy? *British Journal of Cancer* **97**(2): 145-151.

Vanneman M, Dranoff G (2012). Combining immunotherapy and targeted therapies in cancer treatment. *Nat Rev Cancer* **12**(4): 237-251.

W D. Travis TVC, B. Corrin Y. Shimosato, and E. Brambilla (1999). Histological typing of lung and pleural tumours. *World Health Organization*.

Wayne N, Bolon DN (2007). Dimerization of Hsp90 is required for in vivo function. Design and analysis of monomers and dimers. *The Journal of biological chemistry* **282**(48): 35386-35395.

Whitesell L, Lindquist SL (2005). HSP90 and the chaperoning of cancer. *Nat Rev Cancer* **5**(10): 761-772.

Workman P, Burrows F, Neckers L, Rosen N (2007a). Drugging the cancer chaperone HSP90: combinatorial therapeutic exploitation of oncogene addiction and tumor stress. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1113**: 202-216.

Workman P, Powers MV (2007b). Chaperoning cell death: a critical dual role for Hsp90 in small-cell lung cancer. *Nat Chem Biol* **3**(8): 455-457.

Yu XM, Shen G, Neckers L, Blake H, Holzbeierlein J, Cronk B, *et al.* (2005). Hsp90 inhibitors identified from a library of novobiocin analogues. *Journal of the American Chemical Society* **127**(37): 12778-12779.

Zarogoulidis K, Zarogoulidis P, Darwiche K, Boutsikou E, Machairiotis N, Tsakiridis K, *et al.* (2013). Treatment of non-small cell lung cancer (NSCLC). *Journal of Thoracic Disease*: S389-S396.

Zhang H, Neely L, Lundgren K, Yang YC, Lough R, Timple N, *et al.* (2010). BIIB021, a synthetic Hsp90 inhibitor, has broad application against tumors with acquired multidrug resistance. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **126**(5): 1226-1234.

Zhang L, Fok JJL, Mirabella F, Aronson LI, Fryer RA, Workman P, *et al.* (2013). Hsp70 inhibition induces myeloma cell death via the intracellular accumulation of immunoglobulin and the generation of proteotoxic stress. *Cancer Letters* **339**(1): 49-59.