

靶向FLT3的抗急性髓系白血病药物的研究进展

贾会亚, 杨波, 张晓梦, 弓建红, 吴亚*, 支燕乐*

(河南中医药大学, 河南 郑州 450000)

摘要: 急性髓系白血病 (acute myeloid leukemia, AML) 是原始和幼稚髓性细胞在骨髓、外周血和其他组织中异常增殖或积聚, 导致正常造血功能受损的一种基因异质性疾病。研究表明, 大约30%的AML患者体内存在FMS样酪氨酸激酶3 (FMS-like tyrosine kinase 3, FLT3) 激活突变, FLT3的异常调节与AML的发生及发展密切相关。FLT3已经成为开发小分子靶向药物的重要靶点, 截至目前, 以FLT3为靶点开发出来了多种FLT3抑制剂和FLT3降解剂, 相关化合物表现出较好的抗AML活性。本文总结了以FLT3为靶点的AML治疗药物的研究进展, 以期为AML药物研发和设计提供参考。

关键词: 急性髓系白血病; FLT3; FLT3抑制剂; 白血病; FLT3降解剂

中图分类号: R914 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)03-0605-11

Research progress of anti-acute marrow leukemia drugs by targeting FLT3

JIA Hui-ya, YANG Bo, ZHANG Xiao-meng, GONG Jian-hong, WU Ya*, ZHI Yan-le*

(Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China)

Abstract: Acute myeloid leukemia (AML) is a genetic heterogeneous disease in which primordial and juvenile myeloid cells proliferate or accumulate abnormally in bone marrow, peripheral blood and other tissues, resulting in damage to normal hematopoietic function. Studies have shown that about 30% of AML patients have FMS-like tyrosine kinase 3 (FLT3), FLT3 abnormal regulation is closely related to the occurrence and development of AML. At present, FLT3 has become an important target for developing small molecular targeted drugs. Currently, a variety of FLT3 inhibitors and FLT3 degraders have been developed targeting FLT3, and some compounds have exhibited good anti-AML activity. This article summarizes and sorts out the current mainstream drugs for AML therapeutic targeting FLT3, in order to provide a reference for the development and design of AML drugs.

Key words: acute myeloid leukemia; FLT3; FLT3 inhibitor; leukemia; FLT3 degrading agent

急性髓系白血病 (acute myeloid leukemia, AML) 是成人中最常见的白血病之一, 属于造血系统恶性肿瘤, 具有强侵袭性和高异质性的特点, 主要表现为髓系分化受阻, 未成熟髓系祖细胞增生^[1,2]。据统计, 全世界每年有超过25万的成年人被诊断为AML, AML患者的5年

总生存期 (OS) 小于50%^[3]。尽管在过去几十年中, AML的治疗取得了相当大的进展, 但仍有2/3的年轻患者和90%的老年患者死于这种疾病^[4]。美国癌症协会估计, 2021年AML新发病例和死亡人数将分别增加到20 240例和11 400例^[5]。因此, 开发新型抗AML药物迫在眉睫。目前, 分子靶向治疗已成为肿瘤治疗的重要手段之一, FMS样酪氨酸激酶3 (FMS-like tyrosine kinase 3, FLT3) 是治疗AML的重要靶点之一。

1 FLT3的结构及功能

FLT3是编码酪氨酸激酶的基因, 由993个氨基酸

收稿日期: 2022-07-05; 修回日期: 2022-07-28.

基金项目: 国家自然科学基金青年基金 (82003566); 河南省科技攻关资助项目 (192102310408).

*通讯作者 Tel: 13783696291,

E-mail: zhiy_l@163.com; wuya0723@126.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-0818

构成,属于III型受体酪氨酸激酶家族^[5]。在造血干细胞的生存、增殖和分化过程中发挥着重要作用。FLT3与同样属于RTK家族的c-Kit、cFMS和PDGFR高度同源,其结构是由5个细胞外结构域(extracellular domain, ECD)、1个跨膜结构域(transmembrane domain, TMD)、1个近膜结构域(juxtamembrane domain, JMD)、2个由插入结构域分隔的酪氨酸激酶结构域(tyrosine kinase domain, TKD)组成^[6]。FLT3主要在正常的造血干细胞和造血祖细胞的细胞表面表达,其配体主要在骨髓基质细胞中表达^[7]。FLT3配体能选择性刺激CD34+祖细胞的增殖,特异性与FLT3结合,而一旦与FLT3结合,FLT3配体就能诱导受体发生二聚化并使激酶域内的酪氨酸残基自磷酸化。当FLT3被磷酸化后,会激活下游信号传导通路,主要包括RAS/RAF/MEK、PI3K/AKT和JAK/STAT5等,而这些通路均参与调节细胞增殖、分化和细胞存活^[8-10](图1)。FLT3突变通常会导致其异常活化,在不与配体结合的情况下,发生自身磷酸化激活下游信号通路,导致造血细胞和淋巴细胞的异常增殖,引发多种恶性血液疾病。

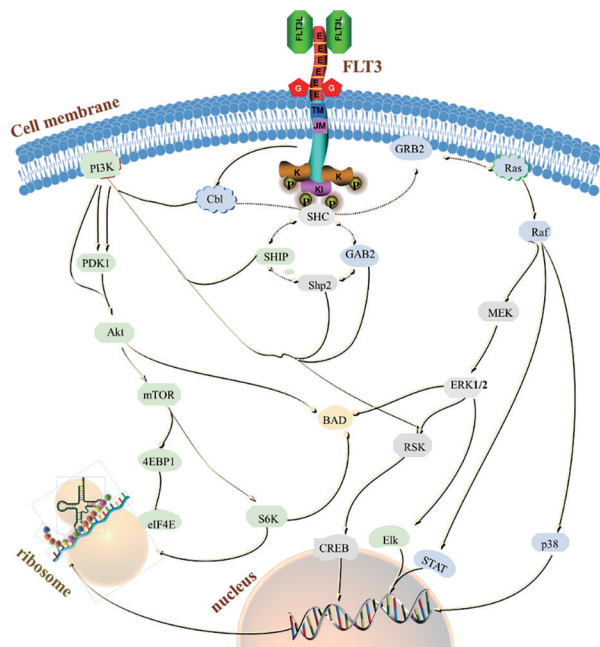


Figure 1 FMS-like tyrosine kinase 3 (FLT3) activation pathway

FLT3突变主要有两种类型:①近膜结构域的内部串联重复突变(internal tandem duplication, ITD): ITD突变是最早被发现的一类FLT3激活突变,是指在FLT3的近膜结构域插入重复串联的氨基酸序列,约25%的AML患者体内会发生这种突变^[11]。具有ITD突变的AML患者,往往伴随有白细胞数目增多,原始骨髓细胞与血细胞百分比增加等临床表现,且携带

FLT3-ITD突变的AML患者复发率高、不良反应多,预后较差^[12];②FLT3点突变(tyrosine kinase domain, TKD), FLT3的点突变主要发生在TKD的活化环(activation loop)上,大约7%的AML患者携带TKD突变。FLT3基因第20位外显子发生插入或者删除,可使FLT3中TKD的C端D835发生突变,这是最常见的点突变。TKD突变一部分来自患者自身携带,另一部分是患者在治疗过程中受药物诱导产生,受药物诱导产生的TKD突变是引起药物耐药和疾病复发的重要原因^[13]。

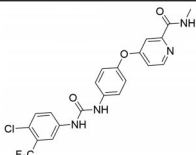
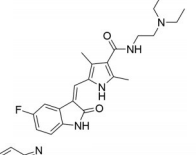
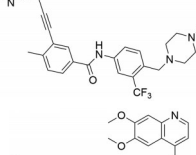
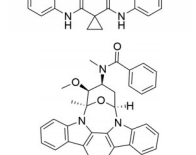
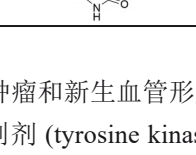
2 经典的FLT3抑制剂

研究发现,FLT3作为细胞信号传导中一种重要的受体酪氨酸激酶,可以导致细胞的异常增殖,诱导肿瘤发生,特别是与AML的发生、发展密切相关,大约70%的AML患者中,FLT3是过表达的。临床研究表明,FLT3的过表达与预后不良有关^[14]。因此,以FLT3为靶点的小分子抗AML药物成为研究热点。根据化合物对FLT3选择性的强弱,可逆FLT3抑制剂分为第一代非选择性FLT3抑制剂和第二代选择性FLT3抑制剂。第一代非选择性抑制剂有化合物1(sorafenib)、化合物2(sunitinib)、化合物3(ponatinib)、化合物4(cabozantinib)、化合物5(midostourin)等,见表1。

Sorafenib(1)是一种II型口服多靶点激酶抑制剂,已分别于2007年和2005年获美国FDA批准,用于治疗不可切除的肝细胞癌(HCC)和晚期肾细胞癌(RCC)患者^[15]。1994年,拜耳和Onyx合作共同致力于靶向作用于Ras-Raf-MEK-ERK通路的药物的研发。使用高通量筛选(high throughput screening, HTS)得到了对Raf激酶具有抑制活性的化合物3-噻吩基尿素,以此为先导化合物,设计得到类似物3-氨基-异噻唑,并逐步进行结构修饰得到了sorafenib^[16,17],它具有双重的抗肿瘤作用:既可通过阻断由Raf/MEK/ERK介导的细胞信号传导通路而直接抑制肿瘤细胞的增殖,还可通过抑制血管内皮生长因子(VEGF)和血小板衍生生长因子(PDGF)受体阻断肿瘤新生血管的形成,间接地抑制肿瘤细胞的生长,sorafenib能够特异性抑制FLT3-ITD,其对FLT3的 IC_{50} 值为 $58.0 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[18]。但是在治疗浓度下,不能有效抑制FLT3-TKD突变的活性,并且会产生严重的不良反应,如腹泻、疲劳和皮肤毒性(如手足综合征)等,导致治疗终止^[19],目前针对AML的临床试验停滞在III期研究阶段。

Sunitinib(2)是一种I型小分子口服多激酶抑制剂,已于2006年被美国FDA批准用于转移性肾细胞癌和胃肠道间质瘤的治疗^[20]。Sunitinib由美国辉瑞公司研发,是以吡啶啉-2-酮为先导化合物进行结构修饰和改造得到的,通过抑制VEGF和PDGF等受体来抑制细

Table 1 The first generation of FLT3 inhibitors. AML: Acute myeloid leukemia

Name	Chemical structure	Target	Clinical research progress (AML)	Inhibitor type
1 (Sorafenib)		FLT3/MEK/PDGFR/VEGFR/KIT/RET/Raf	III	II
2 (Sunitinib)		FLT3/KIT/PDGFR/RET/VEGFR	II	I
3 (Ponatinib)		FLT3/ABL/KIT/PDGFR/FGFR/RET/EPH/VEGFR	II	II
4 (Cabozantinib)		FLT3/RET/MET/KIT/VEGFR	I	II
5 (Midostourin)		FLT3/PRKCA/VEGFR2/PDGFR α/β /KIT	Approved for listing by FDA in 2017	I

胞生长,达到抑制肿瘤和新生血管形成的作用^[21]。与其他酪氨酸激酶抑制剂 (tyrosine kinase inhibitors, TKIs) 相比, sunitinib 具有抑制肿瘤血管生成和抗肿瘤细胞生长的多重作用^[22], 其对 FLT3、PDGFR β 和 VEGFR2 等均具有抑制活性, IC₅₀ 分别为 21.0、2.0 和 80.0 nmol·L⁻¹。其在临床研究期间报告了 5 例死亡病例, 均与感染引起的并发症相关, 其他不良反应有胃肠道并发症、出血、血液计数下降和皮肤并发症^[23]。

Ponatinib (3) 是一种 II 型口服多靶点酪氨酸激酶抑制剂, 能够有效地抑制 Bcr-Abl (包括 T315I 突变)、FLT3 和 Src 激酶的活性。临床上用于治疗成人慢性髓细胞白血病 (CML) 和 Ph 染色体阳性急性淋巴细胞白血病 (Ph⁺ALL) 两种罕见白血病^[24]。Ponatinib 是美国 Ariad 公司利用其基于结构的计算机辅助药物设计得到的高特异性 BCR-ABL 激酶抑制剂^[25], 被认为是费城染色体的抑制剂, 它能有效阻断由费城染色体产生的原始和所有突变形式的蛋白, 具有潜在的抗血管生成和抗肿瘤活性。常见的不良反应有白细胞降低、血小板减少、贫血、肿胀、皮疹和腹泻。

Cabozantinib (4) 是一种 II 型多靶点小分子酪氨酸激酶抑制剂, 于 2012 年获得 FDA 批准用于治疗不可手术切除的恶性局部晚期或转移性甲状腺髓样癌的治疗, 2016 年获 FDA 批准用于晚期肾癌的治疗。其对 KIT、

FLT3 和 AXL 的 IC₅₀ 值分别为 5.0、7.5 和 42.0 nmol·L⁻¹, 对 MET、ROS1、RET、NTRK 等激酶也具有抑制活性^[26-28]。Cabozantinib 由美国 Exelixis 生物制药公司研发^[29], 主要以与前列腺癌增长、扩散有关的 MET 和 VEGFR2 酪氨酸激酶为靶点, 抑制肿瘤的转移和血管生成。Cabozantinib 在甲状腺髓样癌、肾癌、非小细胞肺癌、肝癌、软组织肉瘤、前列腺癌、乳腺癌、卵巢癌、肠癌等多种实体瘤中有较好的治疗效果, 对骨转移患者的治疗效果尤其突出^[30], 但在治疗 AML 方面, 处于 I 期临床研究阶段。

Midostourin (5) 是一种 I 型多靶点激酶抑制剂, 对 FLT3 具有较强的抑制活性, IC₅₀ 为 912.0 nmol·L⁻¹^[31]。临床试验表明, midostourin 联合标准化疗方案治疗组的患者总生存率优于安慰剂联合化疗组, 于 2017 年被批准与标准化疗联合用于治疗原发的含 FLT3 突变的 AML 患者。Midostourin 最初是作为对蛋白激酶 C 具有高度选择性的星孢素衍生物被开发出来的^[32], 可抑制 FLT3 受体信号转导, 诱导细胞周期停滞, 促使表达 FLT3 突变型受体和过表达 FLT3 野生型受体的白血病细胞凋亡^[33]。但是, 经 midostourin 治疗的患者, 会发生 FLT3-F691I/L、FLT3-N676K/S/D 突变, 引起耐药, 导致疾病复发^[34,35]。

综上所述, 第一代 FLT3 抑制剂为多靶点激酶抑制

剂,对FLT3缺乏特异性,在抑制FLT3时,同时会对PDGFR、KIT和VEGFR等激酶产生抑制作用^[36],常因脱靶而引起毒性和不良反应,限制临床治疗效果。随后,人们进一步开发出来了新一代高效、高选择性的FLT3抑制剂,主要有quizartinib (6)、crenolanib (7)、gilteritinib (8)等,见表2。

Quizartinib (6,图2)最初是通过分子筛选发现的首个新型双芳基脲类FLT3抑制剂,于2018年被美国FDA和欧洲药品管理局批准用于治疗复发/难治性AML,该药于2019年在日本获批上市^[37]。Quizartinib既可单药用于治疗携带FLT3-ITD的AML,也可与化疗药物联合使用^[38,39]。Quizartinib与FLT3的晶体复合物表明,二芳基脲中的羰基与Cys828形成氢键,NH与 α C螺旋中的Glu661形成氢键作用,由此可见,quizartinib中的二芳基脲结构对增强FLT3的抑制活性至关重要。Quizartinib中的对取代苯环处于关门残基Phe691和DFG基序Phe830之间,并和这两个残基形成 π - π 键相互作用,进一步增强了其对FLT3的抑制活性^[40]。

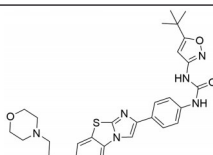
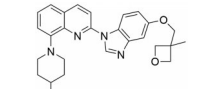
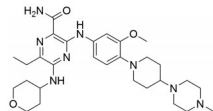
研究表明,quizartinib对复发/难治性AML患者的白血病细胞的 IC_{50} 值达到了 $0.3\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。在 $2\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,quizartinib可显著抑制其细胞中FLT3的磷酸化。Quizartinib对FLT3-ITD突变的 IC_{50} 为 $1.1\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$,对

RS4-11细胞(携带野生型FLT3)的 IC_{50} 为 $4.2\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$,对MV4-11的 IC_{50} 为 $0.56\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[41]。与第一代FLT3抑制剂相比,quizartinib具有更好的药代动力学特性、更高的选择性和更好的耐受性^[42,43]。Quizartinib已经成为临床上FLT3抑制剂的首选药物。

Quizartinib常见的不良反应有发热、中性粒细胞减少、血小板减少、贫血和QTcF延长^[44-46]。其临床应用也受到耐药性的挑战。研究表明,RUNX1在AML细胞的增殖分化过程中发挥重要作用,RUNX1的高表达是引起quizartinib耐药的一个重要原因^[47,48]。还有一些研究表明,下游FGF/Ras/ERK和Wnt信号传导通路的激活是quizartinib耐药的重要原因^[49]。FGF2通过激活FGFR1和下游的MAPK效应因子而引起耐药^[50]。另外,FLT3与quizartinib的共晶体结构表明,quizartinib的结合依赖于分子中的二芳基脲结构与关门残基F691和F830的相互作用,F691和F830的突变都可能导致其对FLT3的抑制活性显著减弱而产生耐药^[51]。

Crenolanib (7)最初作为PDGFR抑制剂开发,但后续研究表明其对FLT3-ITD和FLT3-TKD突变亚型均有较好活性,故后续作为FLT3抑制剂用于AML的治疗^[52],crenolanib对PDGFR α 、PDGFR β 和FLT3三者的 K_d 值分别为 3.2 、 2.1 和 $0.74\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[53]。Crenolanib对

Table 2 The second generation of FLT3 inhibitors

Name	Chemical structure	Target	Clinical research progress (AML)	Inhibitor type
6 (Quizartinib)		FLT3	Approved by Japan in 2019	II
7 (Crenolanib)		FLT3, PDGFR- α , PDGFR- β	III	I
8 (Gilteritinib)		FLT3, AXL	Approved in United States and Japan in 2018	I

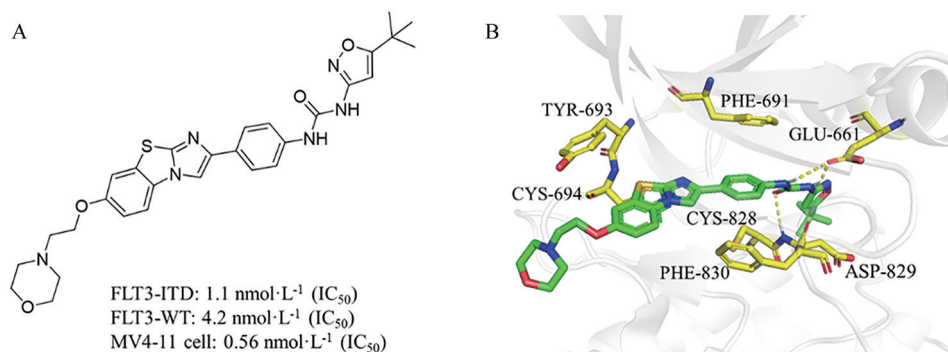


Figure 2 A: The chemical structure of quizartinib (6). B: The binding mode of quizartinib (6) with FLT3 (PDB: 4xuf)

FLT3-ITD突变的MV4-11和Molm-13均具有显著抑制活性, IC_{50} 分别为1.3和4.9 $nmol \cdot L^{-1}$ 。Crenolanib对含FLT3-ITD-TKD也具有较好的抑制活性, 可以显著抑制含有FLT3-ITD-TKD双突变的Ba/F3细胞的增殖^[54]。

Crenolanib可联合阿糖胞苷和蒽环类诱导化疗, 该疗法在新诊断的FLT3突变AML患者中产生较高的缓解率。与quizartinib相比, crenolanib对红细胞集落生长的破坏较小, 这有利于降低骨髓抑制的不良反应。相关研究表明, crenolanib能显著抑制Molm细胞和含FLT3-D835V突变的AML患者细胞中的FLT3磷酸化^[52]。

Gilteritinib (8, 图3) 由Astellas与Kotobuki Pharmaceutical合作研发, 是一种I型酪氨酸激酶抑制剂, 对FLT3和AXL具有高度选择性, 但对c-KIT的抑制活性较弱。对于治疗携带FLT3突变的复发/难治性AML具有显著临床优势, 被FDA授予治疗AML的突破性疗法资格, 于2018年在日本和美国先后上市, 是全球首个获批的单药治疗携带FLT3突变的复发/难治性AML的FLT3抑制剂^[55,56]。

Gilteritinib对含有FLT3-ITD、FLT3-D835Y、FLT3-ITD-D835Y、FLT3-ITD-F691L、FLT3-ITD-F691I突变的Ba/F3细胞均具有显著的抗增殖活性, IC_{50} 值分别为1.8、1.6、2.1、22.0和49.0 $nmol \cdot L^{-1}$ ^[57]。临床试验表明, gilteritinib对携带FLT3-ITD和FLT3-D835突变的AML患者治疗效果较好。在gilteritinib与FLT3的结合模式中, 氨基甲酰与Glu692和Cys694形成两个氢键, 增强了其对FLT3的抑制活性^[58]。

与化疗相比, 在复发/难治性FLT3突变的AML患者中, gilteritinib治疗组的生存期更长、患者缓解比例更高^[59]。Gilteritinib能有效抑制FLT3-ITD-TKD复合突变, 从而降低了继发耐药风险^[60]。Gilteritinib联合标准诱导化疗在新诊断的携带FLT3突变AML患者中表现出良好的耐受性和较好的疗效^[61]。作为第二代FLT3抑制剂, gilteritinib具有高度特异性, 没有相关的“脱靶”活性, 并显示出可接受的毒性。Gilteritinib治

疗相关的常见不良反应有腹泻(37%)、贫血(34%)、疲劳(33%)、天冬氨酸转氨酶升高(26%)和丙氨酸转氨酶升高(19%)^[62]。

3 不可逆FLT3抑制剂

尽管FLT3抑制剂在治疗AML方面取得了一定的效果, 但是这些可逆的FLT3抑制剂, 在用药一段时间后, 会使患者体内会产生新的点突变, 如D835V/Y/F/H、F691I/L、Y842C/H、A848P和A627P^[63], 导致患者对FLT3抑制剂产生耐药。因此, 开发结构新颖、对多种FLT3突变均有抑制作用的不可逆FLT3抑制剂, 对弥补当前复发或难治性AML治疗的不足具有重要价值。迄今为止, 共价结合的TKIs在癌症治疗方面取得了良好的效果, 与可逆抑制剂相比, TKIs具有更长的靶向停留时间、更高的选择性和更长的响应时间^[64]。

FF-10101 (9, 图4) 是Yamaura等^[65]开发的一种高选择性、不可逆的FLT3抑制剂, 它通过共价键与FLT3的Cys695结合, 产生不可逆的抑制作用。FF-10101对多种导致quizartinib耐药的FLT3突变均表现出良好的治疗效果, 对FLT3-WT和FLT3-D835Y的 IC_{50} 分别为0.2和0.16 $nmol \cdot L^{-1}$ 。目前正处于II期临床研究阶段。

体外实验表明, FF-10101对正常的造血功能影响较小, Yamaura等^[65]将表达FLT3-ITD、FLT3-ITD-D835Y和FLT3-ITD-F691I的小鼠骨髓淋巴母细胞(简称32D细胞)皮下接种NOD/SCID小鼠, 评价了FF-10101对携带不同FLT3突变的细胞的抗增殖活性。结果表明, FF-10101对FLT3-ITD突变的32D细胞的抗增殖作用与quizartinib相同, FF-10101对FLT3-ITD-D835Y和FLT3-ITD-F691L突变的32D细胞的抗增殖作用强于quizartinib。在2021年ASCO年会中, 报告了FF-10101的首个I期临床试验数据, 试验显示该药在复发/难治性AML患者中耐受性良好, 并表现出持续的FLT3抑制作用。

Bensinger等^[66]通过对sunitinib的结构进行优化, 在吡啶环上引入迈克尔加成受体, 设计合成了基于Cys828的不可逆FLT3抑制剂BSc5371 (10, 图5)。迈

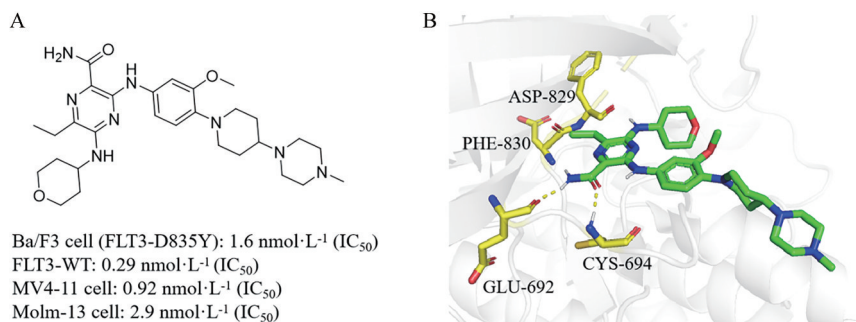


Figure 3 A: The chemical structure of gilteritinib (8). B: The binding mode of gilteritinib (8) with FLT3 (PDB: 6jqr)

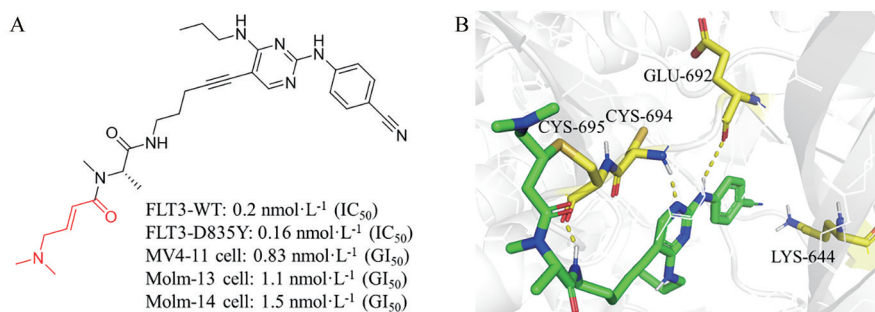


Figure 4 A: The chemical structure of compound **9**. B: The binding mode of compound **9** with FLT3 (PDB: 5x02)

克尔加成受体的引入显著提高了化合物对FLT3的选择性,可以克服FLT3耐药突变,对FLT3及其突变体均具有显著的抑制作用(对FLT3-ITD的IC₅₀为5.8 nmol·L⁻¹,FLT3-ITD-D835V的IC₅₀为0.83 nmol·L⁻¹,FLT3-ITD-F691L的IC₅₀为1.5 nmol·L⁻¹,FLT3-D835H的IC₅₀为1.3 nmol·L⁻¹),对MV4-11和Molm-14细胞的IC₅₀分别为6.0 nmol·L⁻¹和7.8 nmol·L⁻¹,目前该化合物处于临床前研究阶段。

4 FLT3降解剂

蛋白降解靶向嵌合体 (proteolytic targeting chimera, PROTAC) 是 Craig Martin Crews 教授等于 2001 年报道的一种利用泛素-蛋白酶体系统 (ubiquitin-proteasome system, UPS) 降解蛋白质的双功能分子^[67]。小分子 PROTAC 兼具抑制和降解两种功能,它由 3 部分组成: E3 泛素连接酶结合配体、靶蛋白 (protein of interest, POI) 结合的配体和连接两配体的连接链。PROTAC 通过“劫持”UPS 来降解蛋白质,它结合 E3 泛素连接酶和靶蛋白,从而导致靶蛋白上暴露的赖氨酸被 E3 泛素连接酶复合物泛素化,随后 UPS 介导的蛋白降解 (图 6)。PROTACs 不仅提供了结合活性,而且还具有消除传统

抑制剂“无药物作用”或非酶促蛋白的蛋白质靶点的巨大潜力。

Burslem 等^[68]以 FLT3 抑制剂 quizartinib 做靶头,通过一个优化的连接链,用 VHL 配体替代亲水区的吗啉结构,得到化合物 **11** (图 7)。化合物 **11** 抑制 FLT3-ITD 和 FLT3-WT 的 IC₅₀ 值分别为 43.0 和 36.0 nmol·L⁻¹,较 quizartinib 的抑制作用都略有降低,但在两种情况下仍对 FLT3 保持较强的抑制活性。在 MV4-11 细胞中,化合物 **11** 的抗增殖效果优于 quizartinib,化合物 **11** 对 MV4-11 的 IC₅₀ 为 0.6 nmol·L⁻¹,作用效果比 quizartinib (IC₅₀ 值为 1.87 nmol·L⁻¹) 强 3.5 倍^[68]。将 quizartinib 转化为 PROTAC,细胞抗增殖活性比 quizartinib 更强,由此可见,将激酶抑制剂转化为 PROTAC 可以产生活性更好的抗 AML 化合物,进一步揭示了 PROTAC 的优势。

Huang 等^[69]通过将一种多激酶抑制剂与配体结合,得到一种多激酶降解剂化合物 **12** (TL12-186, 图 8)。在 1 mmol·L⁻¹ 时,化合物 **12** 对 FLT3 在内的 193 个激酶的抑制活性 > 90%。使用定量蛋白质组学发现,化合物 **12** 能够使包括 FLT3 在内的 28 种激酶降解,在 Molm-14 细胞中,化合物 **12** 对 FLT3 降解呈时间依赖性,特别是

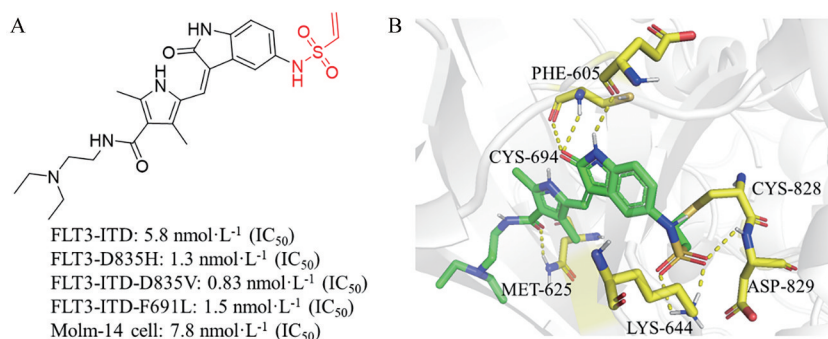


Figure 5 A: The chemical structure of compound **10**. B: The binding mode of compound **10** with FLT3



Figure 6 Mechanism of proteolytic targeting chimera (PROTAC)-mediated protein degradation

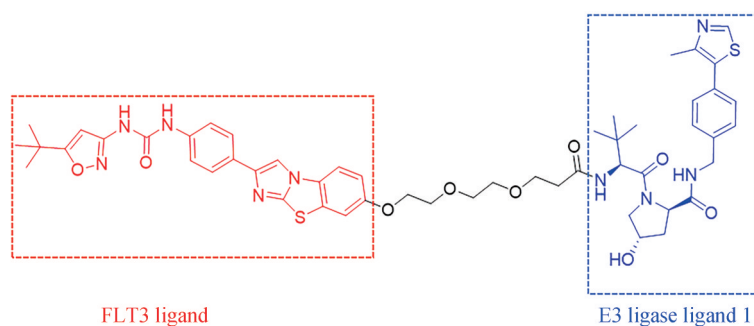


Figure 7 The structure of compound 11

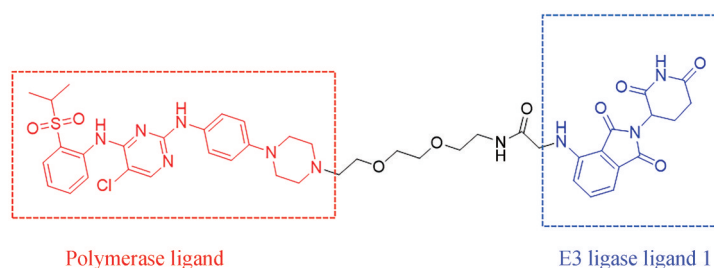


Figure 8 The structure of compound 12

在处理 4~8 h 后 FLT3 的降解较为明显, 此结果表明 FLT3 是一个可以被降解的靶点。

曹升等^[70]将 dovitinib (**13**, 图 9) 经化学修饰转化为招募 CRBN 的 PROTACs, 发现了化合物 **14**, 化合物 **14** 在体内和体外对所有类型的 FLT3 (野生型 FLT3、FLT3-ITD 和 FLT3-D835Y)、PDGFR 和 KIT 都具有抑制作用。化合物 **14** 对携带 FLT3-ITD 突变的 AML 细胞的抗增殖活性比 dovitinib 强, 很大程度上可以降低细胞内 FLT3-ITD 和 KIT 的含量, 抑制 FLT3 和 KIT 的下游信号通路的激活。将 MV4-11 细胞接种于 NOD/SCID 小鼠, 建立小鼠异种移植模型。对照组 CD45+ 的比例为 32.23%, 实验组 (化合物 **14**) 骨髓中 CD45+ 的比例为 5.25%, 由此可见化合物 **14** 显著降低了骨髓中 CD45+ 的比例, 且化合物 **14** 对小鼠体重无显著影响。通过进一步的生物学研究表明, 化合物 **14** 可以诱导 FLT3-ITD 和 KIT 蛋白以泛素-蛋白酶体依赖的方式降解, 完全阻断其下游信号通路, 显著降低了 FLT3-ITD 突变的 AML 细胞的 ROS 水平。ROS 过多产生可导致 DNA 损伤水平增加、双链断裂 (DSBs) 和错误修复频率增加, 从而进一步增加 FLT3-ITD 的突变频率, 这也是发生耐药的重要原因。由此可见, 将小分子改造为蛋白降解剂后可以显著增强其体内抗增殖活性, 减少耐药性。

Chen 等^[71]采用来那度胺作为配体, 结合 E3 泛素连接酶, 三唑作为连接子合成了 PF1~18。在 PF1~18 中, 大多数化合物对 MV4-11 和 Molm-13 均具有显著的抗增殖活性。同时建立了携带 ITD、ITD-D835V 和

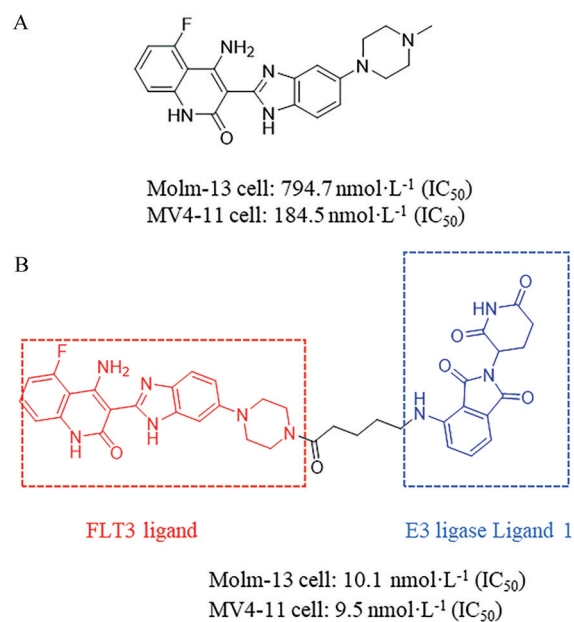


Figure 9 A: The structure of compound 13. B: The structure of compound 14

ITD-F691L 突变的 BaF3 细胞, 以评估化合物 PF1~18 的抗增殖作用, 结果显示化合物 **15** (PF15) 和化合物 **16** (PF16) (图 10) 在 3 个突变细胞中均表现出较强的抑制活性, IC₅₀ 值为 7.85~193.0 nmol·L⁻¹。作用机制研究表明化合物 **15** 和化合物 **16** 均能明显诱导 FLT3 降解, 且均呈剂量依赖性。在 100 nmol·L⁻¹ 时, 连续监测 FLT3 的降解情况发现, 化合物 **15** 和化合物 **16** 在 1~24 h 之间

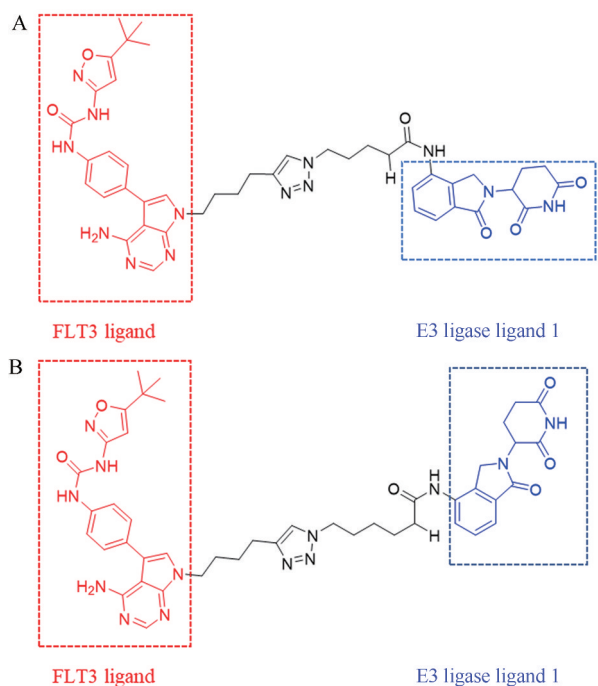


Figure 10 A: The structure of compound 15. B: The structure of compound 16

都能以时间依赖的方式促进 FLT3 的降解, 在 6 h 时, 化合物对 FLT3 的降解效果达到最大值, 直至 24 h 时仍能保持对 FLT3 的完全降解。通过进一步研究表明化合物 15 也能下调 FLT3 和 STAT5 的磷酸化。化合物 15 对 FLT3 的 IC_{50} 值为 $36.0 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 而对 c-Kit 的抑制活性较弱 ($IC_{50} = 1259.0 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 有利于避免骨髓抑制的不良反应, 增大治疗窗。将不同剂量的化合物 15 通过腹腔内注射给药 10 天后, 研究化合物 15 对 BaF3-FLT3-ITD 异种移植瘤的抑瘤效果。结果表明, 低剂量组 ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 抑制肿瘤生长效果良好, 抑瘤率为 58.4%, 同时高剂量组 ($20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 则表现出较高的抑瘤率。分离小鼠外周血清, 进行生化分析, 发现低剂量组和高剂量组都对小鼠的心脏、肝脏和肾脏几乎没有不良反应。为了更准确地反映化合物 15 对 FLT3-ITD+AML 的治疗效果, 建立了 BaF3-FLT3-ITD 原位模型来评价裸鼠的生存期, 结果显示无药物干预的模型组, BaF3-FLT3-ITD 细胞浸润, 中位生存期仅为 11 天。低剂量组每天 $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 腹腔内注射延长中位生存期达 15 天, 然而, $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组每天单次治疗的中位生存期相当于 $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 腹腔内注射每天两次。对 FLT3 野生型细胞的 Kinome scanning 和细胞选择性表明, 与亲本抑制剂相比, PROTAC 分子可以提高安全治疗窗口, 而体内异种移植模型和生存期评估验证了 PROTAC 的有效性。

5 总结与展望

药物耐药是激酶类抗肿瘤药物普遍存在的难题,

尽管研究者在 FLT3 小分子抑制剂用于治疗耐药性 AML 方面进行了很多探索, 但实际治疗过程中却由于复杂多变的疾病机制等因素而使得多数药物因为耐药而限制疗效。截至目前, 第一代 FLT3 抑制剂为多靶点受体酪氨酸激酶抑制剂, 这类抑制剂虽然在临床试验过程中有很好的 FLT3 抑制活性, 但经常因为选择性不高而导致较强的不良反应, 从而限制了临床治疗效果。相比之下, 第二代 FLT3 抑制剂对 FLT3 具有更强的选择性, 在临床上对 FLT3-ITD 突变的 AML 患者有很好的治疗效果, 但这些 FLT3 抑制剂使用一段时间后会因为耐药而导致疾病复发。患者对可逆 FLT3 抑制剂产生耐药主要有以下几种原因: ① 在使用可逆 FLT3 抑制剂治疗的过程中, AML 患者会演化出新的 FLT3 酪氨酸激酶结构域突变 (TKD 突变) 导致患者对 FLT3 抑制剂耐药; ② FLT3 过度表达和骨髓微环境中 FLT3 配体 (FMS-like tyrosine kinase 3 ligand, FL) 浓度升高, 促进两者的结合, 进而重新激活 FLT3 信号通路导致耐药; ③ CYP3A4 代谢, 骨髓基质细胞中的 CYP3A4 可以将游离的 FLT3 抑制剂快速代谢, 降低药物浓度导致耐药; ④ 其他信号旁路的激活以及新的基因突变是产生 FLT3 耐药的重要因素。综上所述, 患者对可逆 FLT3 抑制剂产生耐药是由于 FLT3 突变、细胞微环境变化等多种因素共同作用的结果。可逆 FLT3 抑制剂难以达到理想的治疗效果, 亟需开发新的克服耐药的治疗药物。

开发双重抑制剂是避免激酶抑制剂耐药的有效策略和常用方法。FLT3 与其他激酶的双重抑制剂是克服信号旁路激活导致的抑制剂耐药的有效方法。该类 FLT3 抑制剂的研究进展较快, gilteritinib 是首个上市的 FLT3/AXL 双重抑制剂。目前与 FLT3 联合研究的双重抑制剂涉及的靶点有造血细胞激酶 (hematopoietic cell kinases, HCKs)、细胞周期蛋白依赖性激酶 (cyclin-dependent kinases, CDKs)、Mer、极光激酶 (aurora kinases, AURKs)、AXL、莫洛尼小鼠白血病病毒前病毒插入位点 (proviral integration site of murine leukemia virus, Pim)、TOPK 等多个靶点, 而且已经有多个化合物进入临床研究中。

另外, 以现有的 FLT3 抑制剂为基础设计开发结构新颖、分子作用机制不同的 FLT3 抑制剂和 FLT3 降解剂也是增强药物作用效果、克服药物耐药的有效策略。不可逆抑制剂和靶蛋白通过共价键结合, 一旦结合上去就可以持续抑制靶蛋白的活性, 完全“杀死”靶蛋白, 从而使该靶点永久性失活, 正是由于其独特的作用机制, 不可逆抑制剂可以有效地解决可逆抑制剂选择性差、药效不够强烈和持久以及易引发耐药性等缺点, 这也是开发强效、克服 FLT3 抑制剂耐药的有效方法。

传统的抑制剂是以占用驱动 (occupancy-driven) 的作用模式, 特异性结合于靶蛋白的空腔内。这种模式需要较高的药物浓度, 以维持对靶蛋白的占用水平, 进而发挥药理活性, 获得临床应用价值。相反, PROTAC 是事件驱动 (event-driven) 的作用模式, 其不受均衡占有率 (equilibrium occupancy) 的影响, 在较低浓度就能够实现超 90% 的靶蛋白降解, 这对占用驱动模式是难以实现的。经过近 20 年的发展, PROTAC 在克服肿瘤耐药性方面已获得显著性进展, 且通过引入 PROTAC 技术可以将泛抑制剂转变成选择性降解剂, 从而提高选择性和靶向性。

开发 FLT3 双重抑制剂、不可逆 FLT3 抑制剂及 FLT3 降解剂是目前研究较多的克服经典 FLT3 抑制剂耐药的主要手段, 并且已经取得了一定的效果。相信通过这些不同策略的研究和应用, 联合多种治疗方法, 在未来可以显著改善靶向 FLT3 的抗 AML 药物的临床治疗效果, 减少耐药性, 延长药物响应时间, 为 FLT3 信号通路异常的 AML 患者带来福音。

作者贡献: 贾会亚论文撰写与修改; 杨波、张晓梦文献检索及整理; 支燕乐、吴亚、弓建红确定选题、修订论文并定稿。

利益冲突: 本文内容没有利益冲突。

References

- [1] Ding L, Ley TJ, Larson DE, et al. Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing [J]. *Nature*, 2012, 481: 506-510.
- [2] Döhner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute myeloid leukemia [J]. *N Engl J Med*, 2015, 373: 1136-1152.
- [3] O'Donnell MR, Tallman MS, Abboud CN, et al. Acute myeloid leukemia, version 3.2017, NCCN clinical practice guidelines in oncology [J]. *J Natl Compr Canc Netw*, 2017, 15: 926-957.
- [4] Rowe JM, Tallman MS. How I treat acute myeloid leukemia [J]. *Blood*, 2010, 116: 3147-3156.
- [5] Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, et al. Cancer statistics, 2021 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71: 7-33.
- [6] Tsapogas P, Mooney CJ, Brown G, et al. The cytokine FLT3-ligand in normal and malignant hematopoiesis [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18: 1115-1138.
- [7] Zhong Y, Qiu RZ, Sun SL, et al. Small-molecule Fms-like tyrosine kinase 3 inhibitors: an attractive and efficient method for the treatment of acute myeloid leukemia [J]. *J Med Chem*, 2020, 63: 12403-12428.
- [8] Larrosa-Garcia M, Baer MR. FLT3 inhibitors in acute myeloid leukemia: current status and future directions [J]. *Mol Cancer Ther*, 2017, 16: 991-1001.
- [9] Choudhary C, Schwäble J, Brandts C, et al. AML-associated FLT3 kinase domain mutations show signal transduction differences compared with FLT3 ITD mutations [J]. *Blood*, 2005, 106: 265-273.
- [10] Takahashi S. Downstream molecular pathways of FLT3 in the pathogenesis of acute myeloid leukemia: biology and therapeutic implications [J]. *J Hematol Oncol*, 2011, 4: 13.
- [11] Daver N, Schlenk RF, Russell NH, et al. Targeting FLT3 mutations in AML: review of current knowledge and evidence [J]. *Leukemia*, 2019, 33: 299-312.
- [12] Lagunas-Rangel FA, Chávez-Valencia V. FLT3-ITD and its current role in acute myeloid leukaemia [J]. *Med Oncol*, 2017, 34: 114.
- [13] Patnaik MM. The importance of FLT3 mutational analysis in acute myeloid leukemia [J]. *Leuk Lymphoma*, 2018, 59: 2273-2286.
- [14] Loschi M, Sammut R, Chiche E, et al. FLT3 tyrosine kinase inhibitors for the treatment of fit and unfit patients with FLT3-mutated AML: a systematic review [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22: 5873.
- [15] Abdelgalil AA, Alkahtani HM, Al-jenoobi FI. Sorafenib [J]. *Profiles Drug Subst Excip Relat Methodol*, 2019, 44: 239-266.
- [16] Wilhelm S, Carter C, Lynch M, et al. Discovery and development of sorafenib: a multikinase inhibitor for treating cancer [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2006, 5: 835-844.
- [17] Lowinger TB, Riedl B, Dumas J, et al. Design and discovery of small molecules targeting raf-1 kinase [J]. *Curr Pharm Des*, 2002, 8: 2269-2278.
- [18] Wilhelm SM, Carter C, Tang L, et al. BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis [J]. *Cancer Res*, 2004, 64: 7099-7109.
- [19] Metzelder SK, Schroeder T, Finck A, et al. High activity of sorafenib in FLT3-ITD-positive acute myeloid leukemia synergizes with allo-immune effects to induce sustained responses [J]. *Leukemia*, 2012, 26: 2353-2359.
- [20] Elgebaly A, Menshawy A, El Ashal G, et al. Sunitinib alone or in combination with chemotherapy for the treatment of advanced breast cancer: a systematic review and meta-analysis [J]. *Breast Dis*, 2016, 36: 91-101.
- [21] Sun L, Liang C, Shirazian S, et al. Discovery of 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylaminoethyl) amide, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial and platelet-derived growth factor receptor tyrosine kinase [J]. *J Med Chem*, 2003, 46: 1116-1119.
- [22] Mendel DB, Laird AD, Xin X, et al. *In vivo* antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor receptors: determination of a pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship [J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9: 327-337.

- [23] Fiedler W, Kayser S, Kebenko M, et al. A phase I/II study of sunitinib and intensive chemotherapy in patients over 60 years of age with acute myeloid leukaemia and activating FLT3 mutations [J]. *Br J Haematol*, 2015, 169: 694-700.
- [24] Xia XM. US FDA approves Iclusig (ponatinib) to treat two rare leukemia [J]. *Acta J Guangdong Coll Pharm (广东药学院学报)*, 2012, 28: 597.
- [25] Huang WS, Metcalf CA, Sundaramoorthi R, et al. Discovery of 3-[2-(imidazo [1,2-b]pyridazin-3-yl)ethynyl]-4-methyl-N-{4-[(4-methylpiperazin-1-yl)-methyl]-3-(trifluoromethyl)phenyl}benzamide (AP24534), a potent, orally active pan-inhibitor of breakpoint cluster region-abelson (BCR-ABL) kinase including the T315I gatekeeper mutant [J]. *J Med Chem*, 2010, 53: 4701-4719.
- [26] NIH. Cabozantinib. Drugs and Lactation Database (LactMed) [M]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), 2018.
- [27] Yakes FM, Chen J, Tan J, et al. Cabozantinib (XL184), a novel MET and VEGFR2 inhibitor, simultaneously suppresses metastasis, angiogenesis, and tumor growth [J]. *Mol Cancer Ther*, 2011, 10: 2298-2308.
- [28] Bentzien F, Zuzov M, Heald N, et al. *In vitro* and *in vivo* activity of cabozantinib (XL184), an inhibitor of RET, MET, and VEGFR2, in a model of medullary thyroid cancer [J]. *Thyroid*, 2013, 23: 1569-1577.
- [29] Viola D, Cappagli V, Elisei R. Cabozantinib (XL184) for the treatment of locally advanced or metastatic progressive medullary thyroid cancer [J]. *Future Oncol*, 2013, 9: 1083-1092.
- [30] Czarnecka AM, Synoradzki K, Firlej W, et al. Molecular biology of osteosarcoma [J]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12: 2130.
- [31] Fabbro D, Ruetz S, Bodis S, et al. PKC412--a protein kinase inhibitor with a broad therapeutic potential [J]. *Anticancer Drug Des*, 2000, 15: 17-28.
- [32] Grosman N. Influence of staurosporine, a more selective derivative CGP 41 251 and an inactive analogue CGP 42 700 on histamine release from isolated rat mast cells [J]. *Immunopharmacology*, 1992, 24: 47-55.
- [33] Gallogly MM, Lazarus HM, Cooper BW. Midostaurin: a novel therapeutic agent for patients with FLT3-mutated acute myeloid leukemia and systemic mastocytosis [J]. *Ther Adv Hematol*, 2017, 8: 245-261.
- [34] Stone RM, Mandrekar SJ, Sanford BL, et al. Midostaurin plus chemotherapy for acute myeloid leukemia with a FLT3 mutation [J]. *N Engl J Med*, 2017, 377: 454-464.
- [35] Tvedt TH, Nepstad I, Bruserud Ø. Antileukemic effects of midostaurin in acute myeloid leukemia - the possible importance of multikinase inhibition in leukemic as well as nonleukemic stromal cells [J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2017, 26: 343-355.
- [36] Thomas CM, Campbell P. FLT3 inhibitors in acute myeloid leukemia: current and future [J]. *J Oncol Pharm Pract*, 2019, 25: 163-171.
- [37] Cortes J, Perl AE, Döhner H, et al. Quizartinib, an FLT3 inhibitor, as monotherapy in patients with relapsed or refractory acute myeloid leukaemia: an open-label, multicentre, single-arm, phase 2 trial [J]. *Lancet Oncol*, 2018, 19: 889-903.
- [38] Cortes JE, Khaled S, Martinelli G, et al. Quizartinib *versus* salvage chemotherapy in relapsed or refractory FLT3-ITD acute myeloid leukaemia (quantum-r): a multicentre, randomised, controlled, open-label, phase 3 trial [J]. *Lancet Oncol*, 2019, 20: 984-997.
- [39] Cortes JE, Tallman MS, Schiller GJ, et al. Phase 2b study of 2 dosing regimens of quizartinib monotherapy in FLT3-ITD-mutated, relapsed or refractory AML [J]. *Blood*, 2018, 132: 598-607.
- [40] Zorn JA, Wang Q, Fujimura E, et al. Crystal structure of the FLT3 kinase domain bound to the inhibitor quizartinib (AC220) [J]. *PLoS One*, 2015, 10: e0121177.
- [41] Naqvi K, Ravandi F. FLT3 inhibitor quizartinib (AC220) [J]. *Leuk Lymphoma*, 2019, 60: 1866-1876.
- [42] Chao Q, Sprankle KG, Grotzfeld RM, et al. Identification of *N*-(5-*tert*-butyl-isoxazol-3-yl)-*N'*-{4-[7-(2-morpholin-4-yl-ethoxy)imidazo-[2,1-*b*][1,3]benzothiazol-2-yl]phenyl}urea dihydrochloride (AC220), a uniquely potent, selective, and efficacious FMS-Like tyrosine kinase-3 (FLT3) inhibitor [J]. *J Med Chem*, 2009, 52: 7808-7816.
- [43] Hills RK, Gammon G, Trone D, et al. Quizartinib significantly improves overall survival in FLT3-ITD positive AML patients relapsed after stem cell transplantation or after failure of salvage chemotherapy: a comparison with historical AML database (UK NCRI data) [J]. *Blood*, 2015, 126: 2557.
- [44] Levis M. Quizartinib for the treatment of FLT3/ITD acute myeloid leukemia [J]. *Future Oncol*, 2014, 10: 1571-1579.
- [45] Suarasan S, Simon T, Boca S, et al. Gelatin-coated gold nanoparticles as carriers of FLT3 inhibitors for acute myeloid leukemia treatment [J]. *Chem Biol Drug Des*, 2016, 87: 927-935.
- [46] Li GX, Wang L, Yaghmour B, et al. The role of FLT3 inhibitors as maintenance therapy following hematopoietic stem cell transplant [J]. *Leuk Res Rep*, 2018, 10: 26-36.
- [47] Goyama S, Schibler J, Cunningham L, et al. Transcription factor RUNX1 promotes survival of acute myeloid leukemia cells [J]. *J Clin Invest*, 2013, 123: 3876-3888.
- [48] Hirade T, Abe M, Onishi C, et al. Internal tandem duplication of FLT3 deregulates proliferation and differentiation and confers resistance to the FLT3 inhibitor AC220 by up-regulating RUNX1 expression in hematopoietic cells [J]. *Int J Hematol*, 2016, 103: 95-106.
- [49] Hou P, Wu C, Wang Y, et al. A genome-wide CRISPR screen identifies genes critical for resistance to FLT3 inhibitor AC220 [J]. *Cancer Res*, 2017, 77: 4402-4413.
- [50] Traer E, Martinez J, Javidi-Sharifi N, et al. FGF2 from marrow

- microenvironment promotes resistance to FLT3 inhibitors in acute myeloid leukemia [J]. *Cancer Res*, 2016, 76: 6471-6482.
- [51] Verma S, Singh A, Kumari A, et al. Insight into the inhibitor discrimination by FLT3 F691L [J]. *Chem Biol Drug Des*, 2018, 91: 1056-1064.
- [52] Galanis A, Ma H, Rajkhowa T, et al. Crenolanib is a potent inhibitor of FLT3 with activity against resistance-conferring point mutants [J]. *Blood*, 2014, 123: 94-100.
- [53] Heinrich MC, Griffith D, McKinley A, et al. Crenolanib inhibits the drug-resistant PDGFRA D842V mutation associated with imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumors [J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18: 4375-84.
- [54] Zimmerman EI, Turner DC, Buaboonnam J, et al. Crenolanib is active against models of drug-resistant FLT3-ITD-positive acute myeloid leukemia [J]. *Blood*, 2013, 122: 3607-3615.
- [55] Dhillon S. Gilteritinib: first global approval [J]. *Drugs*, 2019, 79: 331-339.
- [56] Tarver TC, Hill JE, Rahmat L, et al. Gilteritinib is a clinically active FLT3 inhibitor with broad activity against FLT3 kinase domain mutations [J]. *Blood Adv*, 2020, 4: 514-524.
- [57] Mori M, Kaneko N, Ueno Y, et al. Gilteritinib, a FLT3/AXL inhibitor, shows antileukemic activity in mouse models of FLT3 mutated acute myeloid leukemia [J]. *Invest New Drugs*, 2017, 35: 556-565.
- [58] Kawase T, Nakazawa T, Eguchi T, et al. Effect of Fms-like tyrosine kinase 3 (FLT3) ligand (FL) on antitumor activity of gilteritinib, a FLT3 inhibitor, in mice xenografted with FL-overexpressing cells [J]. *Oncotarget*, 2019, 10: 6111-6123.
- [59] Perl AE, Martinelli G, Cortes JE, et al. Gilteritinib or chemotherapy for relapsed or refractory FLT3-mutated AML [J]. *N Engl J Med*, 2019, 381: 1728-1740.
- [60] Zhao J, Song Y, Liu D. Gilteritinib: a novel FLT3 inhibitor for acute myeloid leukemia [J]. *Biomark Res*, 2019, 7: 19.
- [61] Gilteritinib plus azacitidine combination shows promise in newly diagnosed FLT3-mutated AML [J]. *Oncologist*, 2021, 26: S10.
- [62] Perl AE, Altman JK, Cortes J, et al. Selective inhibition of FLT3 by gilteritinib in relapsed or refractory acute myeloid leukaemia: a multicentre, first-in-human, open-label, phase 1-2 study [J]. *Lancet Oncol*, 2017, 18: 1061-1075.
- [63] Barf T, Kaptein A. Irreversible protein kinase inhibitors: balancing the benefits and risks [J]. *J Med Chem*, 2012, 55: 6243-6262.
- [64] Zhang T, Hatcher JM, Teng M, et al. Recent advances in selective and irreversible covalent ligand development and validation [J]. *Cell Chem Biol*, 2019, 26: 1486-1500.
- [65] Yamaura T, Nakatani T, Uda K, et al. A novel irreversible FLT3 inhibitor, FF-10101, shows excellent efficacy against AML cells with FLT3 mutations [J]. *Blood*, 2018, 131: 426-438.
- [66] Bensinger D, Stubba D, Cremer A, et al. Virtual screening identifies irreversible FMS-like tyrosine kinase 3 inhibitors with activity toward resistance-conferring mutations [J]. *J Med Chem*, 2019, 62: 2428-2446.
- [67] Wang Y, Long J, Chang Q, et al. Application of small molecules PROTAC in different target research [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2020, 55: 446-452.
- [68] Burslem GM, Song J, Chen X, et al. Enhancing antiproliferative activity and selectivity of a FLT3 inhibitor by proteolysis targeting chimera conversion [J]. *J Am Chem Soc*, 2018, 140: 16428-16432.
- [69] Huang HT, Dobrovolsky D, Paulk J, et al. A chemoproteomic approach to query the degradable kinome using a multi-kinase degrader [J]. *Cell Chem Biol*, 2018, 25: 88-99.e6.
- [70] Cao S, Ma L, Liu Y, et al. Proteolysis-targeting chimera (PROTAC) modification of dovitinib enhances the antiproliferative effect against FLT3-ITD-positive acute myeloid leukemia cells [J]. *J Med Chem*, 2021, 64: 16497-16511.
- [71] Chen Y, Yuan X, Tang M, et al. Degrading FLT3-ITD protein by proteolysis targeting chimera (PROTAC) [J]. *Bioorg Chem*, 2022, 119: 105508.