

新型 BCR-ABL 激酶抑制剂的研究进展

崔文禹[#], 赵若熙[#], 韩路路, 倪伟伟, 李飞^{*}, 韩进松^{*}

(中国药科大学, 天然药物活性组分与药效国家重点实验室, 国家中药材加工研发专业中心,
工学院食品质量与安全系, 江苏 南京 211109)

摘要: 融合基因 BCR-ABL 在人体内表达的蛋白质是一种异常的酪氨酸激酶, 可导致慢性髓系白血病 (chronic myeloid leukemia, CML)。随着对 CML 发病机制的进一步研究, 人们发现开发选择性抑制异常 BCR-ABL 酪氨酸激酶的化合物是值得关注的研究方向。前三代 BCR-ABL 抑制剂为正构抑制剂, 该抑制剂竞争性阻断 ABL 蛋白酪氨酸激酶与 ATP 的结合, 阻止其激活下游信号。第四代 BCR-ABL 抑制剂通过与肉豆蔻酰口袋结合, 变构抑制 ABL 蛋白酪氨酸激酶, 具有更强的选择性且保持对耐药性突变蛋白的活性。蛋白水解靶向嵌合 (proteolytic targeting chimera, PROTAC)、共价抑制剂和双重靶向抑制剂等新型药物设计策略也为 BCR-ABL 激酶抑制剂的开发提供了新的方向。本文综述了近年来有关 BCR-ABL 激酶抑制剂的研究进展, 并讨论了各种新型 BCR-ABL 抑制剂的药物设计策略。

关键词: 慢性髓系白血病; BCR-ABL; 抑制剂; 药物设计策略

中图分类号: R914 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)02-0258-16

Advances in the study of new BCR-ABL kinase inhibitors

CUI Wen-yu[#], ZHAO Ruo-xi[#], HAN Lu-lu, NI Wei-wei, LI Fei^{*}, HAN Jin-song^{*}

(State Key Laboratory of Natural Medicines and National R&D Center for Chinese Herbal Medicine Processing,
Department of Food Quality and Safety, College of Engineering, China Pharmaceutical University, Nanjing 211109, China)

Abstract: The oncogenic product of BCR-ABL is an abnormal tyrosine kinase that causes chronic myeloid leukemia (CML). With further research into the pathogenesis of CML, the discovery of compounds that selectively inhibit abnormal BCR-ABL tyrosine kinases is a research focus worthy of attention. The first three generations of BCR-ABL inhibitors are orthosteric inhibitors, which competitively block the binding of ABL protein tyrosine kinase to ATP and prevent it from activating downstream signals. The fourth-generation BCR-ABL inhibitors allosterically inhibit ABL protein tyrosine kinase by binding to the myristoyl pocket, providing greater selectivity and maintaining activity against drug-resistant mutations proteins. Novel drug design strategies such as proteolytic targeting chimera (PROTAC), covalent inhibitors and dual targeting inhibitors also provide new directions for the development of BCR-ABL kinase inhibitors. This paper reviews recent research advances on BCR-ABL kinase inhibitors and discusses drug design strategies for various novel BCR-ABL inhibitors.

Key words: chronic myeloid leukemia; BCR-ABL; inhibitor; drug design strategy

收稿日期: 2022-07-04; 修回日期: 2022-08-25.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82072017, 52003298); 江苏省自然科学基金 (BK20200578); 天然药物国家重点实验室 (sklnmzz2030).

[#]同等贡献.

^{*}通讯作者 Tel: 18205186685, E-mail: fei.li@cpi.edu.cn;

Tel: 18801784191, E-mail: Jinsong.han@cpi.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-0807

慢性髓系白血病 (chronic myeloid leukemia, CML) 是一种由于造血干细胞获得性基因突变而引起的骨髓增殖性疾病, 占有新发癌症病例的 0.5%。全世界的发病率大致相似, 发病率为 0.04%, 男女比例为 2.5/1.5, 患病中位数年龄约为 65 岁, 20 岁以下患者人数占有患者人数的 2.1% (<http://seer.cancer.gov/statfacts/html/cm1l>).

html)。CML有3个不同阶段:慢性期(chronic myeloid leukemia-chronic phase, CML-CP)、加速期(chronic myeloid leukemia-accelerate phase, CMP-AP)和暴发期(chronic myeloid leukemia-blastic phase, CML-BP),通常在慢性期时被诊断出来,患者血液中粒细胞明显增多,并无其他特殊症状。但是当疾病从慢性期发展到加速期时,随着粒细胞的快速增多和细胞危象的发生,患者会出现类似于急性白血病的症状,并导致癌细胞的转移、器官衰竭和患者死亡^[1]。

历史上,白血病最早采用化疗药物进行治疗,但治疗效果普遍较差^[2]。在2001年,伊马替尼作为第一个治疗慢性粒细胞白血病的BCR-ABL1激酶抑制剂上市,通过使用BCR-ABL1激酶抑制剂类药物,CML几乎已经从一个预后很差的恶性肿瘤转变为一种慢性疾病(图1)。

1960年,在费城工作的Peter Nowell和David Hun-

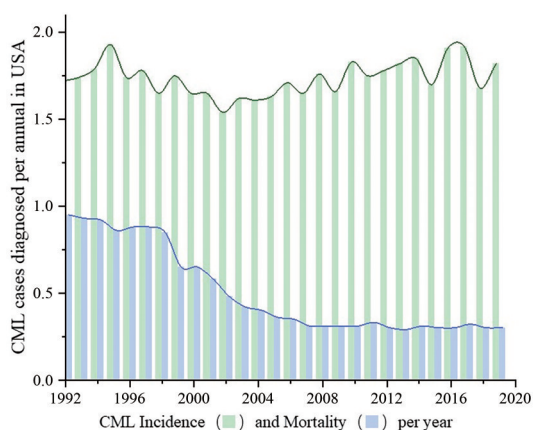


Figure 1 Changes in chronic myeloid leukemia (CML) incidence and mortality in the United States, based on the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) program of the National Cancer Institute (<http://seer.cancer.gov/statfacts/html/cmly1.html>). In 2000, there were 2 300 deaths from CML compared with 600 in 2006, a 74% decline attributable primarily to imatinib. In 2006, the number of patients with CML was 24 800, and in 2010 the number of patients increased to 36 800, reflecting the control of malignancy

gerford首先确定了CML患者大都出现的染色体异常现象,该染色体随后被称为费城(Philadelphia, Ph)染色体^[3],超过90%的CML患者显示出Ph染色体阳性(Ph⁺)^[4]。1972年,Rowley发现Ph染色体是由两个因素导致:①基因的交互异位;②9号染色体上的酪氨酸激酶(Abelson, ABL)基因和22号染色体上的断点聚集区(break point cluster region, BCR)基因的融合^[5]。由此产生的嵌合BCR-ABL致癌基因编码了一个融合蛋白[在大于90%的Ph⁺CML患者和30%~35%的急性淋巴细胞白血病(acute lymphoblastic leukemia, ALL)患者中出现],该蛋白具有异常的ABL酪氨酸激酶活性,已被证明在CML中起至关重要的作用^[6,7]。

在BCR-ABL融合蛋白中,BCR序列的N端与c-ABL融合,组成性激活ABL酪氨酸激酶。这种融合蛋白有两种最常见的异构体:p210和p190,这两种异构体与不同的白血病有关,并显示出截然不同的信号网络。其中p210亚型是CML的标志^[6],它包含两个重要的结构域:DH(Dbl-homology)结构域和PH(Pleckstrin-homology)结构域,而p190亚型的结构中则不含有DH结构域和PH结构域(图2)^[8]。DH结构域可介导GEF活性,PH结构域则发挥磷脂结合域的膜识别作用。此外,中心SH3-SH2-激酶结构域也已被表征,该结构域是BCR-ABL激酶变构调节自抑制构象和活性构象的关键,SH3和SH2结构域可分别介导与含有脯氨酸和磷酸酪氨酸结合位点的蛋白质配体结合的模块化结构域^[9]。上述各种结构域的生物学作用为变构抑制剂的开发提供理论依据。

在正常的造血干细胞中(图3A),细胞因子(IL-3或GM-CSF)受体被激活后,JAK2会磷酸化靠近SH2结构域的下游信号STAT5的关键酪氨酸残基。随后,下游信号STAT5形成二聚体并移位到细胞核,并在靶基因的启动子上与DNA结合,调控细胞增殖。但在CML细胞中(图3B),BCR-ABL会直接磷酸化接近SH2结构域的STAT5的相同关键酪氨酸残基,并诱导与JAK2相同的下游信号的激活,并导致骨髓细胞增

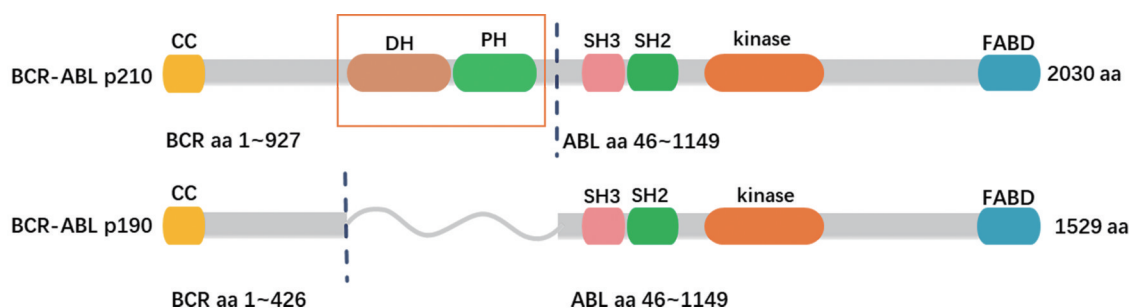


Figure 2 Domain organization of BCR-ABL (two isoforms: p210 and p190). The breakpoint of BCR and ABL is indicated with a dotted line. CC: Coiled-coil; DH: Dbl-homology; PH: Pleckstrin-homology; SH3/SH2: Src-homology 3/2; FABD: F-actin binding domain

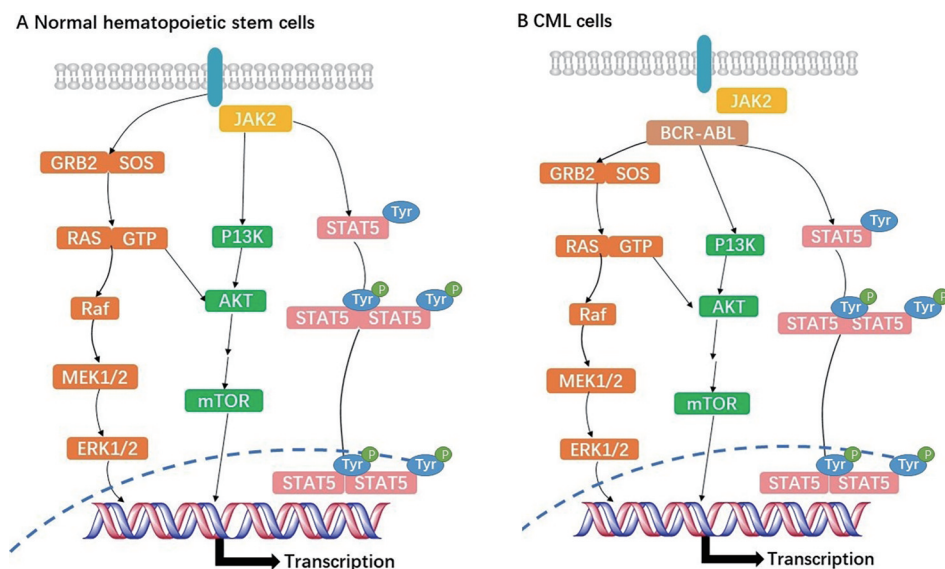


Figure 3 The function of BCR-ABL. (A) Normal hematopoietic stem cells; (B) CML cells

殖失控^[10, 11]。因此, BCR-ABL 激酶已经成为治疗 CML 的理想药物靶点。

晶体研究表明, BCR-ABL 的蛋白结构 (图 4) 包括: SH2 结构域、SH3 结构域、C-末端结构域及 N-末端结构域。较小的 N-末端由一个五链 β -折叠和一个称为“ α -C”的 α -螺旋组成 (图 4)。C-末端比 N-末端大, 以螺旋为主。位于 N-端和 C-端之间的单条多肽链作为铰链, 这两个结构域在与 ATP 底物结合时可以相对旋转^[12]。ATP 结合位点是一个深裂隙, 位于一个高度灵活的 P-环下方。变构位点也被单晶衍射证实, 为一个肉豆蔻酰的口袋^[13]。

通常情况下, ABL1 激酶域的变构位点被其自身的肉豆蔻酰肽占据, 诱导 SH3-SH2-激酶结构域发生交联, 可发挥负向调控 ABL1 激酶活性的关键作用, 调控着细胞正常增殖信号的传导。当 BCR 与 ABL1 基因融合后, BCR-ABL1 激酶的自身肉豆蔻酰肽丢失, 导致 ABL1 激酶域上的变构位点空缺, 无法诱导 SH3-SH2-激酶结构域交联, 自抑制平衡被打破, 处于活化开放构象, 致使 BCR-ABL1 激酶持续激活, 诱发细胞增殖和肿瘤形成^[14]。

1 BCR-ABL 抑制剂

BCR-ABL 抑制剂根据其于 BCR-ABL 蛋白结合位点的不同, 可以分为 3 个类型的抑制剂 (图 5)^[15]。博苏替尼和达沙替尼通过使用“DFG-in”构象结合于 BCR-ABL 的 ATP 位点, 属于 I 型抑制剂 (图 5B); 伊马替尼、尼洛替尼和泊那替尼通过使用“DFG-out”构象结合于 BCR-ABL 的 ATP 位点, 以防止底物磷酸化, 属于 II 型抑制剂 (图 5A、5C 及 5D 右); GNF-2 和 asciminib 通过与 BCR-ABL 的肉豆蔻酰口袋结合, 变构抑制酪氨酸激酶

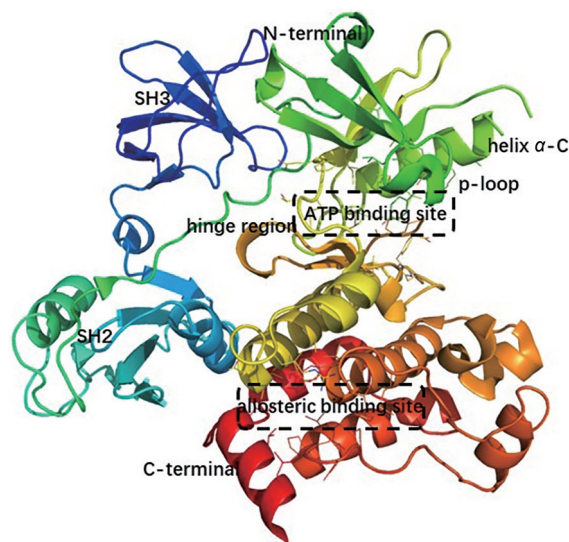


Figure 4 The crystal structure of BCR-ABL and binding sites to different inhibitors

活性, 属于 IV 型抑制剂, 也叫做变构抑制剂 (图 5D 左)。

1.1 已上市的 BCR-ABL 抑制剂

随着结构生物学等技术的发展, 以及对 BCR-ABL 结合位点的解析, 为小分子抑制剂的开发提供了全新思路。迄今为止, 药学研究者们针对 BCR-ABL 激酶开发了一系列酪氨酸激酶抑制剂 (tyrosine kinase inhibitors, TKIs), 按照上市时间的不同共分为四代药物。其结构、生物活性及研发公司等信息总结为表 1。

1.1.1 第一代 TKIs 2001 年, 甲磺酸伊马替尼 (imatinib, 表 1) 被美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 批准用于治疗 CML, 这是由诺华公司开发的首个小分子靶向 BCR-ABL 的药物。伊马替尼竞争性阻断 BCR-ABL 激酶 (与 ATP 位点结

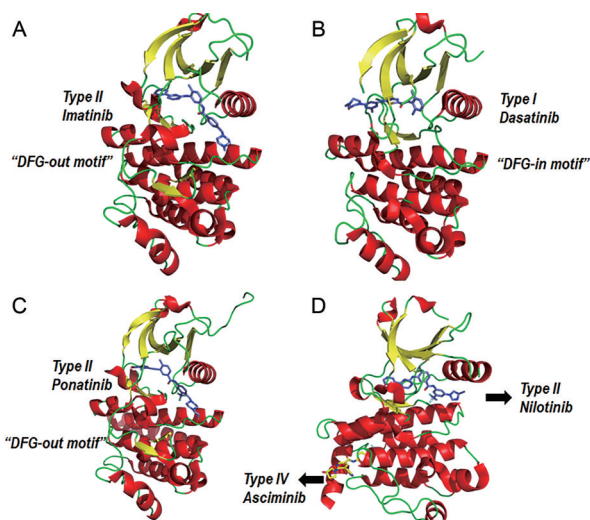


Figure 5 The co-crystal structure of different compounds with BCR-ABL. A: Imatinib; PDB ID: 2HYY; B: Dasatinib; PDB ID: 3OCT; C: Ponatinib; PDB ID: 3OY3; D: Nilotinib and asciminib; PDB ID: 5MO4

合), 特异性抑制白血病相关信号转导通路的异常激活^[16], 进而抑制了癌细胞的增殖, 同时由于其高选择性, 大大降低了对正常细胞的毒性和不良反应^[17, 18]。伊马替尼改革了CML的治疗, 但无法有效治愈白血病, 大约60%的CML-BP患者和几乎所有的ALL患者在治疗后的几周或几个月内复发^[19]。

伊马替尼是II型激酶抑制剂, 它不仅与ATP结合位点相结合, 同时也可与“DFG-out”构象的疏水变构口袋结合^[20]。尽管伊马替尼可以有效治疗CML, 但同时也带来了获得性耐药。已知的获得性耐药的原因是BCR-ABL激酶结构域的点突变、抗性基因表达失调和信号通路交替等。CML患者中有超过70个点突变, 复发患者中最常见突变是T315I、E225K、Y253F和M351T, 约占所有伊马替尼耐药性相关突变的60%。T315I是ATP结合位点的守门突变体, 其占有临床观察突变体的15%~20%。该突变是由于BCR-ABL基因上315位的苏氨酸被异亮氨酸所取代, 导致ATP结合口袋的几何形状发生改变, 继而阻碍几个关键位点, 氨基酸残基与配体的相互作用并消除它们之间用于紧密结合的关键氢键。随着临床中伊马替尼耐药的突变体越来越多, 下一代“泛BCR-ABL抑制剂”不仅需要克服T315I耐药, 还需对多个BCR-ABL突变体表现出广泛的抑制活性。

1.1.2 第二代TKIs 为解决伊马替尼耐药或不耐受问题, 第二代BCR-ABL抑制剂被开发上市, 其可以克服ABL激酶区域的大部分突变。以下将详细介绍3种获批药物, 包括达沙替尼、尼洛替尼和博苏替尼。

2006年, 达沙替尼(dasatinib, 表1)被FDA批准用于治疗伊马替尼耐药或不耐药的CML患者。它是一种多酶抑制剂, 对BCR-ABL和Src激酶都具有较高抑制活性, 以催化活性形式靶向ATP结合位点(“DFG-in”基序)。通过在ATP结合位点处的强结合, 达沙替尼可与ATP有效竞争, 从而抑制激酶活性。与伊马替尼情况相同, CML患者(特别是部分晚期患者)对达沙替尼产生耐药性, 通常是BCR-ABL1的点突变, 阻碍药物与ABL1激酶结构域结合, 最常见的单个突变有T315I、F317L/V/I/C和V299L^[12]。

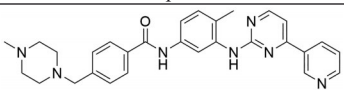
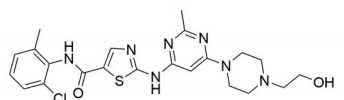
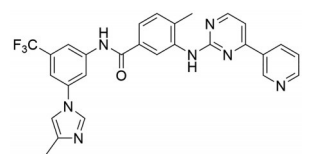
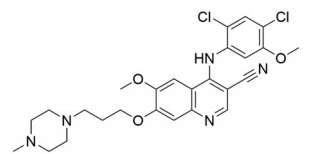
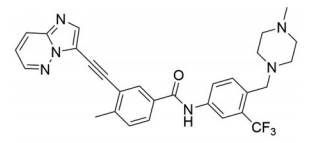
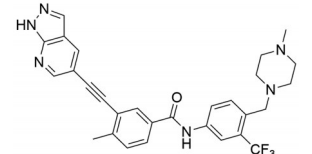
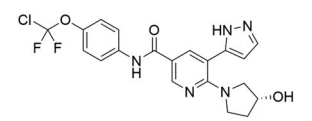
尼洛替尼(nilotinib, 表1)已经在2007年被批准作为CML的一线治疗药物。尼洛替尼是伊马替尼的衍生物, 通过用甲基咪唑基取代了伊马替尼分子中的N-甲基哌嗪环。这种结构上的改变不仅增加了对野生型BCR-ABL非活性构象的亲和力, 并且改善了亲脂性和溶解度。尼洛替尼可以抑制33种耐伊马替尼BCR-ABL1突变体中的32种, 但对T315I突变保持耐药^[21]。该药物经过3期临床试验, 可以产生持续的细胞遗传和血液学反应, 特别是对慢性期和加速期的CML患者有良好疗效。

2012年, 博舒替尼(bosutinib, 表1)获得FDA批准, 用于治疗慢速期、加速期或暴发期的Ph⁺CML患者。它是一种口服4-苯胺-3-喹啉甲胍衍生物, 具有Src和ABL酪氨酸激酶双重抑制活性^[22]。博舒替尼在CML细胞系K562细胞中显示出的抗增殖活性是伊马替尼的10倍, 但由于其严重的不良反应, 包括胃肠道毒性、转氨酶升高、皮疹和血小板减少, 不支持用于一线治疗。

1.1.3 第三代TKIs 虽然第一代和第二代TKIs极大地提高了CML的治疗效果, 但均对T315I突变无效。第三代TKI泊那替尼(ponatinib, 表1)的出现给克服T315I突变带来了极大的希望。2012年FDA批准了泊那替尼用于治疗临床上对TKIs产生耐药性或不耐受的CML-CP/-AP/-BP和Ph⁺ALL患者。泊那替尼是一种治疗难治性CML患者, 尤其是T315I突变患者的高效口服TKIs^[23]。然而, 在接受泊那替尼治疗的患者中, 有9%的患者观察到严重的动脉血栓形成, 这使泊那替尼收到了FDA的黑框警告, 并限制其在安全监测下的使用。

泊那替尼(II型抑制剂)是基于BCR-ABL^{T315I}变异的微观结构“量体裁衣”式的设计而得。蛋白的Thr315变异为Ile, 大体积的异亮氨酸产生显著的空间位阻, 阻止抑制剂与靶点结合。残基侧链的CH₂OH变成CH(Me)Et, 失去了OH, 使尼洛替尼中的嘧啶与苯环之间的-NH-不能形成氢键。泊那替尼用炔键连接两个芳环, 炔基体积和位阻减小, 并且苯基可以与Ile315的疏水侧链形成强的疏水相互作用, 有利于疏水结合, 因而对ABL^{T315I}变异的瘤株抑制有显著性提高^[24]。

Table 1 Launched BCR-ABL inhibitors

Compound	Company	BCR-ABL kinase activity (IC_{50})
 Imatinib	Novartis	$25 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$
 Dasatinib	Bristol-Myers Squibb	$< 1.0 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$
 Nilotinib	Novartis	$< 30 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$
 Bosutinib	Pfizer	$1.0 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$
 Ponatinib	Ariad	$0.37 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (WT) $2.0 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (T315I)
 Asciminib	Ascentage Pharma	$0.34 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (WT) $0.68 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (T315I)
 Olverembatinib	Novartis	$1.0 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (WT) $25.0 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (T315I)

奥瑞巴替尼 (olverembatinib, 表 1, II 型抑制剂)^[25], 既往使用编号为 GZD824、HQP1351 等, 是中国亚盛医药开发的一款口服第三代 BCR-ABL 抑制剂, 为亚盛医药的核心品种。先后被国家药品监督管理局纳入优先审评和突破性治疗品种, 也被美国 FDA 授予快速通道资格及孤儿药资格。该化合物对 BCR-ABL 及包括 T315I 突变在内的多种 BCR-ABL 突变体有效, 能够克服一、二代 ABL 抑制剂的临床耐药问题, 具有良好的口服生物利用度 (48.7%)、合理的半衰期 (10.6 h) 和良好的体内抗肿瘤作用。并解决了第三代药物泊那替尼心血管风险和肝脏毒性大的问题, 已于 2021 年上市。

1.1.4 第四代 TKIs 前三代 TKIs 都是 ATP 竞争性抑制剂, 这将导致不可避免的突变和耐药性, 阻碍药物与蛋白结合。Scemblix (asciminib, 表 1)^[26] 是诺华公司开

发的第一个变构 BCR-ABL 抑制剂。通过利用核磁共振和 X 射线片段筛选得到了 BCR-ABL 变构位点肉豆蔻酸口袋的配体, 基于核磁共振的构象分析引导这些无活性配体转化为 ABL1 抑制剂。通过对构效关系、物理化学、药代动力学和药物性质的进一步优化, 最终得到 asciminib。

Asciminib 对 ABL1 激酶的 IC_{50} 值为 $0.5 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 对 Luc-Ba/F3 BCR-ABL1^{WT} 和 Luc-Ba/F3 BCR-ABL1^{T315I} 融合细胞的 GI_{50} 值分别为 $1.0 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $25 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。与 ATP 竞争性抑制剂比较, asciminib 对所有耐药突变体的 GI_{50} 值均小于 $12 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 有良好的抑制作用。其体外抗肿瘤活性较好, 在 $7.5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的给药量下, 能明显抑制肿瘤生长。Asciminib 口服给药后, 化合物被迅速吸收, 虽然溶液配方在啮齿类动物中生物利用度

低,但固体分散配方在犬中具有中等的生物利用度。这表明 asciminib 在大鼠和狗身上的药物安全性实验取得了成功,可以进入临床前开发。经过后续一系列的临床试验, asciminib 最终在 2021 年被 FDA 批准上市。Asciminib 是第一个成功上市的变构 BCR-ABL1 抑制剂。Asciminib 结合到 BCR-ABL1 的肉豆蔻酰口袋,并对 ATP 位点突变的 TKIs 耐药细胞保持活性^[27]。尽管肉豆蔻酸位点突变可能导致耐药性的出现,但这些突变对 ATP 竞争抑制剂很敏感,因此 asciminib 与 ATP 竞争 TKIs 组合可以抑制耐药性的出现^[26]。

作为变构抑制剂, asciminib 与预期的结合方式相符,结合在 ABL1 蛋白的变构位点,吡啶环与谷氨酸 E481 的主链羰基形成氢键相互作用,与苏氨酸 T453 形成疏水作用。CF₂ClO 基团上的氯原子通过范德华力与口袋深处的 I508、V487 和 L448 残基相互作用。吡咯环上的羟基伸向溶剂区,为后续的 PROTAC 技术及双重靶向技术的引入提供了理论支持。

1.2 处于临床试验阶段的 BCR-ABL 抑制剂

目前,还有许多 BCR-ABL 抑制剂正在进行临床试验或临床前实验,展示出丰富的结构多样性及潜在的抑制活性。由于 BCR-ABL 基因在临床上出现了大量的突变位点,更多的药物针对不同的突变体,特别是 T315I,以期克服其耐药性。表 2 为处于临床试验阶段

的 BCR-ABL 抑制剂。

Bafetinib (表 2, INNO-406)^[28]是一种 BCR-ABL/Lyn 双重抑制剂,具有小鼠体内抗肿瘤活性。由伊马替尼的分子结构设计而来,其体外活性为伊马替尼的 25~50 倍,体内活性为伊马替尼的 10 倍。并且, bafetinib 还可通过血脑屏障到达大脑,抑制存在于大脑中的 Ph⁺ 细胞。

Vodobatinib (表 2)^[29]是第三代 TKI (II 型抑制剂),其对大多数 BCR-ABL 突变有效,如 L248R (167 nmol·L⁻¹)、Y253H (154 nmol·L⁻¹) 及 E255V (165 nmol·L⁻¹),但对 T315I 无效。目前, Vodobatinib 正在对几种适应症进行临床评估,包括急性髓细胞白血病 (acute myelocytic leukemia, AML)、CML 和早期帕金森病。

PF-114^[30] (表 2, II 型抑制剂) 是泊那替尼的衍生物,其对 BCR-ABL 野生型和临床上发生的大量突变具有良好的抑制作用,如 T315I、E255K、Y253F 等,并且对 BCR-ABL 的抑制具有良好的选择性。PF-114 的体内生物活性较好,以可耐受的剂量口服,在裸鼠体内的移植被完全抑制,240 天内没有肿瘤再生长。

此外,还有一些化合物正在进行临床前研究,如 S116836、GZD856 和 HSN459,这些化合物显示出很强的抗 T315I 突变的能力。特别是 SHC004-221A1 和 UM-9107 可以抑制几乎所有的 BCR-ABL 临床突变株,且无明显毒性,有望成为临床前候选药物,为 BCR-

Table 2 BCR-ABL inhibitors in the clinical phase

Chemical structure	Activity	Status
	BCR-ABL/Lyn dual-inhibitor BCR-ABL: IC ₅₀ = 5.8 nmol·L ⁻¹ Lyn: IC ₅₀ = 19 nmol·L ⁻¹	Phase I/II
	BCR-ABL ^{WT} : IC ₅₀ = 0.9 nmol·L ⁻¹ BCR-ABL ^{L248R} : IC ₅₀ = 167 nmol·L ⁻¹ BCR-ABL ^{Y253H} : IC ₅₀ = 154 nmol·L ⁻¹ BCR-ABL ^{E255V} : IC ₅₀ = 165 nmol·L ⁻¹ BCR-ABL ^{T315I} : IC ₅₀ = 1967 nmol·L ⁻¹	Phase I/II
	K562 cells: IC ₅₀ = 1-5 nmol·L ⁻¹	Phase I/II
	ABL ^{WT} : IC ₅₀ = 5 nmol·L ⁻¹ ABL ^{T315I} : IC ₅₀ = 14 nmol·L ⁻¹ K562 cells: IC ₅₀ = 33 nmol·L ⁻¹	Phase I

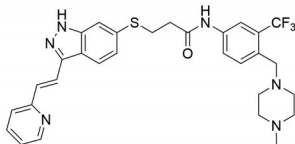
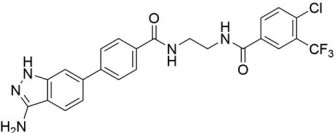
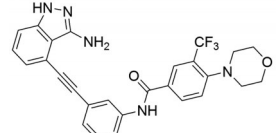
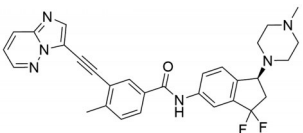
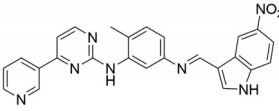
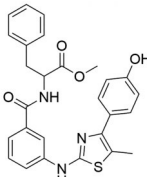
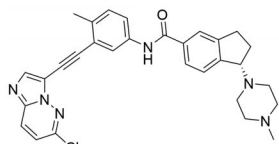
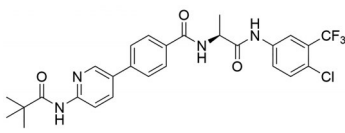
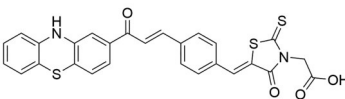
ABL激酶抑制剂的设计提供有价值的指导。

1.3 新型BCR-ABL正构抑制剂

虽然市场上的BCR-ABL抑制剂已经取得了很大

的成功,但由于越来越多的耐药突变的出现,特别是T315I,因此仍需开发新的BCR-ABL抑制剂。本节将介绍近年来发现的新型BCR-ABL正构抑制剂(表3^[31-39])。

Table 3 Novel BCR-ABL orthosteric inhibitor

Chemical structure	Activity	Ref.
 <p>CHMFL-ABL-121</p>	<p>p210-BaF3 cells: $IC_{50} = 7 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ p210/T315I-BaF3 cells: $IC_{50} = 6 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$</p>	[31]
 <p>Y9</p>	<p>ABL^{WT}: $IC_{50} = 43 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABL^{T315I}: $IC_{50} = 170 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$</p>	[32]
 <p>9h</p>	<p>ABL^{WT}: $IC_{50} = 4.6 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABL^{T315I}: $IC_{50} = 227 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ K562 cells: $IC_{50} = 20 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$</p>	[33]
 <p>3a-P1</p>	<p>BaF3 native BCR-ABL cells: $IC_{50} = 2.1 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ BaF3 T315I BCR-ABL cells: $IC_{50} = 4.7 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$</p>	[34]
 <p>71</p>	<p>ABL^{WT}: $IC_{50} = 30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ K562 cells: $IC_{50} = 0.64 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$</p>	[35]
 <p>3m</p>	<p>ABL-1: $IC_{50} = 1.27 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABL^{T315I}: $IC_{50} = 39.89 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$</p>	[36]
 <p>CT-721</p>	<p>ABL^{WT}: $IC_{50} = 21.3 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABL^{T315I}: $IC_{50} = 65.0 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$</p>	[37]
 <p>AA2</p>	<p>ABL^{WT}: $IC_{50} = 0.041 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABL^{T315I}: $IC_{50} = 0.53 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ K562 cells: $IC_{50} = 7.45 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$</p>	[38]
 <p>6a</p>	<p>K562 cells: $IC_{50} = 37.02 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$</p>	[39]

Liu 等^[31]通过分子对接和结构优化(图 6A), 将 axitinib (I型结合模式) 优化为 CHMFL-ABL-121 (II型结合模式, 表 3), 可有效地抑制 BCR-ABL 激酶 WT 突变型 (wild type) 及 T315I 突变型活性。其对亲本 BaF3 细胞、p210-BaF3 (BCR-ABL-BaF3) 细胞株和 p210/T315I-BaF3 (BCR-ABL^{T315I}-BaF3) 细胞株的 IC₅₀ 值分别为 2.48 μmol·L⁻¹、7 nmol·L⁻¹ 和 6 nmol·L⁻¹。通过对 axitinib 的 linker 区和尾部亲水区进行改造, 使所得化合物由改造前与 ABLT315I 激酶采用 I 型结合模式, 改变成典型的 II 型结合模式。CHMFL-ABL-121 对接结果证明了这一点(图 6B), 在铰链结合区, 吡唑与 Phe317 和 Met318 形成两个氢键, 直接进入溶剂暴露区域的 N-甲基哌嗪部分与 Arg362 形成氢键, 酰胺部分与 c-螺旋中的 Glu286 和 DFG 基序中的 Asp381 形成两个明显的氢键。此外, 烷基硫醇醚键远离 Ile315 残基, 产生了足够的空间容纳这个比 Thr315 更大的残基, 增加了其抗 BCR-ABL^{T315I} 活性。并且, CHMFL-ABL-121 具有良好的激酶选择性和体内药物代谢动力学 (pharmacokinetic, PK) 谱, 使其成为 CML 治疗的潜在候选药物。

Pan 等^[32]在他们之前工作的基础上, 设计并合成了一类以 6 苯基-1*H*-吡唑-3-胺为铰链结合部分 (hinge binding moiety, HBM), 该铰链区的选择来源于多靶点 ATP 竞争性酪氨酸激酶抑制剂。N,N'-二酰基哌嗪或 N,N'-二酰基乙二胺为柔性连接剂, 这两种柔性连接剂先前被报道合成 BCR-ABL 抑制剂。对取代苯基环为选择性位点结合部分 (selective site binding moiety, SBM) 的新型 BCR-ABL 抑制剂, 并对其生物活性进行了评价。其中化合物 Y9 (表 3) 对 BCR-ABL^{WT} 和 BCR-ABL^{T315I} 激酶的 IC₅₀ 值分别为 0.043 和 0.17 μmol·L⁻¹, 对

K562 细胞的 IC₅₀ 值为 1.65 μmol·L⁻¹。化合物 Y9 对 BCR-ABL 具有良好的选择性, 对 Hck 的抑制作用较弱, 对 p38α 和 Src 激酶有一定的抑制活性, IC₅₀ 值分别为 34.5 和 15.1 μmol·L⁻¹。化合物 Y9 的安全性较好, 对 Hek293 (人胚肾 293 细胞) 和 EA.hy 926 (人血管内皮细胞) 这两种细胞系的毒性较小。化合物 Y9 对 K562 细胞具有较强的抑制活性, 但对 BCR-ABL 磷酸化水平仅适度降低。这一发现说明化合物 Y9 可能通过除靶向 BCR-ABL 外的其他信号途径发挥作用, 这可能需要在后续工作中进一步探索。

Shan 等^[40]曾经报道过一系列基于氨基吡唑的 BCR-ABL 抑制剂, 但其在 BCR-ABL 依赖的 K562 细胞系上抑制活性一般。为了进一步优化, El-Damasy 等^[33]将泊那替尼的关键结构域引入其中, 合成了化合物 9h (表 3)。化合物 9h 对白血病 K562 细胞具有高选择性, 对白血病细胞 K562 (GI₅₀ = 20 nmol·L⁻¹) 以及正常细胞 L132 (GI₅₀ = 9.27 mmol·L⁻¹) 具有不同的抗增殖活性。化合物 9h 对 FMS 和 FLT3 还有一定抑制效果, 说明可能对 AML 和 ALL 有治疗作用。对接结果表明, 化合物 9h 对 BCR-ABL^{WT} (图 7A) 和 BCR-ABL^{T315I} (图 7B) 激酶结合均采用典型 II 型结合模式 (DFG-out 构象), c-螺旋中的 Glu286 和位于 DFG 基序中的 Asp381 可以与化合物 9h 的酰胺键形成两个氢键。化合物 9h 和 3-氨基吡唑部分的 NH 和氮与铰链区残基 Glu316 和 Met318 形成多个与 BCR-ABL 激酶抑制活性相关的氢键。此外, 4-吗啉基-3-三氟甲基苯基环结合到 DFG 移位所产生的疏水异位口袋中, 3D 结合模型显示, 化合物 9h 中的乙炔连接键与守门残基 Ile315 形成有利于避免空间冲突的范德华力相互作用, 这一点恰好说明了该化合

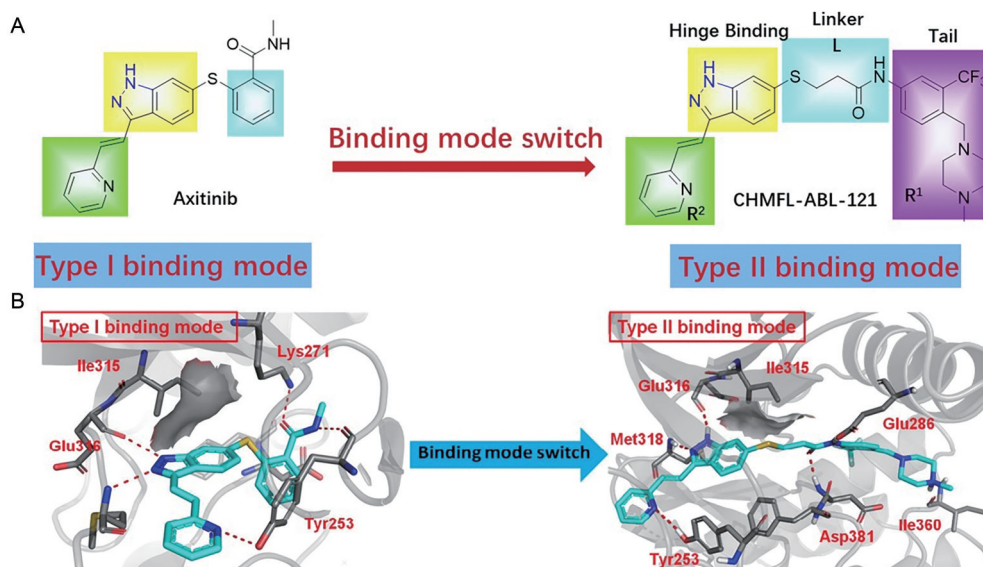


Figure 6 A: The design of CHMFL-ABL-121. B: The molecular docking and structure optimization of CHMFL-ABL-121

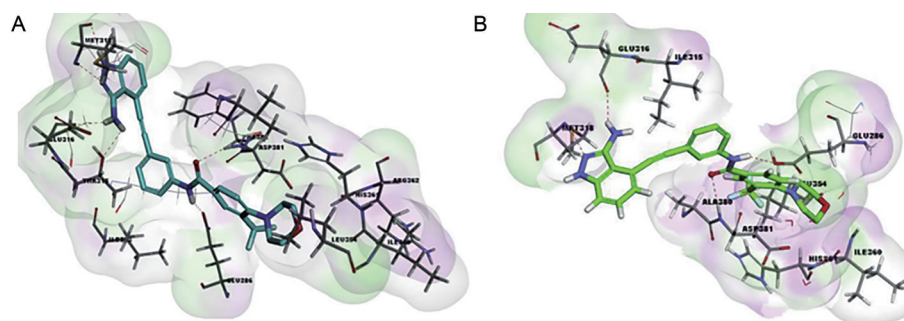


Figure 7 The binding mode of compound **9h** in the kinase domain of BCR-ABL^{WT} (A) and BCR-ABL^{T315I} (B)

物对 BCR-ABL^{T315I} 的有效抑制作用。

泊那替尼及其类似物的芳基乙炔(头部)和*N*-甲基哌嗪(尾部)与其克服守门突变体 BCR-ABL^{T315I} 耐药性起着至关重要的作用。在此分析基础上, Zhang 等^[34] 设计合成并筛选出化合物 **3a-P1** (表 3)。相比于泊那替尼, 其对无突变的或 T315I 突变的 BCR-ABL 细胞显示出更高的抑制活性, IC₅₀ 值分别为 2.1 和 4.7 nmol·L⁻¹。以 hERG 抑制实验验证这系列化合物的初步成药性, 结果表明, 化合物 **3a-P1** (II 型抑制剂) 对 hERG 的 IC₅₀ 为 11.1 μmol·L⁻¹, 低于泊那替尼 (IC₅₀ = 8 μmol·L⁻¹), 这说明了该化合物的心脏毒性可能较小。对接结果表明 (图 8), **3a-P1** 结构中的咪唑并[1,2-*b*]吡嗪的酰胺键可以与 Met318、Met290、Glu286 和 Asp381 形成 4 个氢键相互作用。**3a-P1** 的苯基和“标记甲基”部分可与守门残基 Ile315 形成范德华力, 其结构中的二氟苄部分不仅可以和 *N*-甲基哌嗪结合到疏水口袋中, 还可以与 Ile293 和 Leu354 形成更多的范德华力相互作用。**3a-P1** 可以更紧密的结合到有 P 环、DFG 基序和催化环形成的疏水口袋中。进一步解释了 **3a-P1** 可达到与泊那替尼相似的 BCR-ABL 磷酸化抑制活性。

Rahim 等^[35] 将存在于不同抗癌药物中的吡啶/羟吡啶结构与 BCR-ABL 正构抑制剂中存在的苯氨基嘧啶

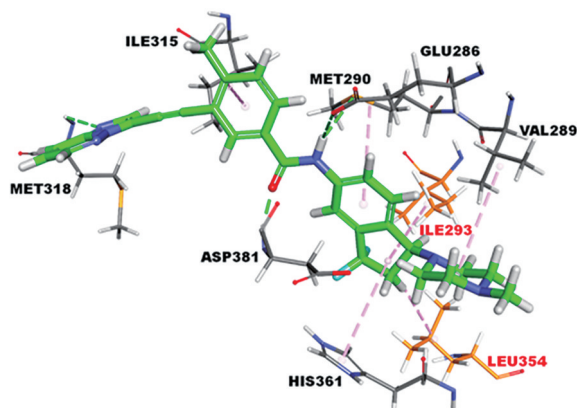


Figure 8 The predict binding mode of **3a-P1** with BCR-ABL^{T315I} (PDB ID: 3IK3)

结构相连, 设计出化合物 **7l** (表 3), K562 细胞活性较为理想 (IC₅₀ = 0.65 μmol·L⁻¹), 是伊马替尼的两倍。结果表明, 在吡啶衍生物中, 缺电子基团的存在比吸电子基团表现出更好的生物活性。

Liu 等^[36] 将伊马替尼上的嘧啶基团替换成小体积基团, 来降低其在 BCR-ABL^{T315I} 突变型蛋白空腔中的位阻。他们将伊马替尼中的 1,3-嘧啶环结构替换成 1,3-噻唑环, 保留了具有药效作用的苯甲酰胺结构, 设计并合成了一系列新型噻唑酰胺-苯甲酰胺衍生物, 并对其生物活性进行评估。分析结果显示, 化合物 **3m** (表 3, II 型抑制剂) 不仅对 BCR-ABL 有强烈抑制作用 (IC₅₀ = 1.27 μmol·L⁻¹), 对 BCR-ABL^{T315I} 突变型也有明显抑制作用 (IC₅₀ = 39.89 μmol·L⁻¹)。

Sun 等^[37] 利用计算机建模和构效关系分析探索新型 BCR-ABL 抑制剂, 他们通过保留伊马替尼中与 ABL 激酶结合的嘧啶氨基苯甲酰基, 选择泊那替尼中的炔基作为连接体, 尾部选择体积较小的 1,3-噻唑环, 得到了化合物 CT-721 (表 3, II 型抑制剂)。通过对生物活性数据的分析显示, CT-721 对 BCR-ABL 激酶和 BCR-ABL^{T315I} 突变型激酶的抑制作用与泊那替尼相似, IC₅₀ 值分别为 21.3 和 65.0 nmol·L⁻¹。CT-721 对其他 6 个伊马替尼耐药突变体 (E225K、G250E、Y253F、H369P、M351T 和 Q252H) 也有抑制作用。此外, CT-721 还显著抑制 c-Kit (IC₅₀ = 9.2 nmol·L⁻¹)、VEGFR2 (IC₅₀ = 48.9 nmol·L⁻¹)、PDGFRβ (IC₅₀ = 106 nmol·L⁻¹) 和 EFGR (IC₅₀ = 130 nmol·L⁻¹), 这也就意味着该化合物除了可以靶向 BCR-ABL 外, 还可以对 CML 发挥额外作用。CT-721 对游离 ABL 激酶的亲和力 (K_i) 值为 7.3 nmol·L⁻¹, 高于对激酶-ATP 复合物的亲和力 (K_i = 775 nmol·L⁻¹), 这一点证明了 CT-721 可作为 ATP 竞争性抑制剂来抑制 BCR-ABL。

Pan 等^[38] 通过提高连接体的灵活性, 选择柔性连接体, 研究出具有新型主体支架的 BCR-ABL 抑制剂。在该团队设计合成的一系列化合物中, 化合物 AA2 (表 3) 对 BCR-ABL^{WT} 突变体和 BCR-ABL^{T315I} 突

变体显示出较好的抑制活性, IC_{50} 值分别为 0.041 和 $0.53 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。研究人员还发现化合物 AA2 还可以剂量依赖性地诱导 K562 细胞凋亡。Western blot (WB) 结果显示, 化合物 AA2 是通过下调 BCR-ABL 的磷酸化水平来抑制 K562 细胞的生长, 进而诱导其细胞凋亡。

Muhammad 等^[39]详细描述了酚噻嗪类、查尔酮类和罗丹宁类的药理活性, 将其结合在一起设计合成了一系列罗丹宁衍生物 BCR-ABL^{T315I} 抑制剂, 并对其抗增殖活性进行了评价。多数化合物对 K562 细胞具有一定的抑制作用, 且呈剂量依赖性, 其中化合物 6a (表 3) 的抑制作用最强, MTT 法 IC_{50} 值为 $37.02 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。进一步的对接研究表明 (图 9), 上述化合物对 BCR-ABL^{T315I} 蛋白具有良好的结合亲和力, 表明该系列化合物具有第三代抑制剂的作用。

1.4 新型 BCR-ABL 变构抑制剂

虽然 BCR-ABL 正构抑制剂在治疗 CML 方面具有较高的活性及丰富的经验, 但由于同类激酶 ATP 位点相似, 容易发生多靶点抑制, 降低其选择性; 并且由于 ATP 位点的突变, 不可避免的会产生耐药性 (特别是 T315I), 为 BCR-ABL 正构抑制剂的开发带来了巨大的障碍。BCR-ABL 变构抑制剂因为其独特的变构结合模式, 作用于靶蛋白的不同位点, 基于不同的作用机制, 这使变构调节剂有可能克服正构调节剂的耐药性; 并且变构位点的同源序列较低, 使得其具有更高的选择性、更低的脱靶毒性和更低的给药剂量。表 4^[26,41-44] 为近年来开发的新型 BCR-ABL 变构抑制剂 (IV 型抑制剂)。

GNF-2 和 GNF-5 (表 4) 为最早的 BCR-ABL 激酶的 IV 型变构抑制剂, 利用新的化合物骨架作为先导, 尝试扩大变构 BCR-ABL 抑制剂的多样性, 但其成药性并不十分理想^[45]。因此, Schoepfer 等^[26]并未将其作为先导化合物, 而是通过基于片段的药物设计和计算

机辅助药物设计, 设计合成了一系列芳基酰胺类化合物, 并测试了他们的生物活性。

其中, 化合物 N7 对 ABL1 激酶的 IC_{50} 值为 $2.3 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 对 Luc-Ba/F3 BCR-ABL1^{WT} 和 Luc-Ba/F3 BCR-ABL1^{T315I} 融合细胞的 GI_{50} 值分别为 1.7 和 $73 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。他们将化合物 N7 (表 4) 作为先导化合物进一步优化, 最终筛选出 asciminib 作为其临床候选药物。

中国塔吉瑞公司根据 asciminib 的构效关系, 设计合成了一系列苯基酰胺类化合物, 并测试了其生物活性^[43,44]。其中化合物 T1、T2、T3 和 T4 (表 4) 对 Luc-Ba/F3 BCR-ABL1^{T315I} 的活性最好, IC_{50} 值均小于 $100 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。并且在后续的动物实验中, 发现化合物 T4 拥有比 asciminib 更好的口服生物利用度 (大鼠) 和更好的 Luc-Ba/F3 BCR-ABL^{T315I} 皮下抗肿瘤活性。化合物 T4 是成为第四代 BCR-ABL 抑制剂 best-in-class 的潜在药物。

1.5 新型 PROTAC 类 BCR-ABL 抑制剂

在发现了包括 Von Hippel-Lindau (VHL) 配体、Nutlin-3a (MDM2) 配体、pomalidomide (CRBN) 配体及 bestatin (cIAP) 配体 (图 10) 在内的几个小分子 E3 配体后, PROTAC 技术作为一种药物策略引起了人们的关注。

PROTAC 是一种新的靶向蛋白降解的技术, 一个 PROTAC 分子由 3 部分组成, 包括靶蛋白配体、连接子和 E3 泛素连接酶配体 (图 11)。具有活性的 PROTAC 应诱导靶标 (如 BCR-ABL) 和 E3 连接酶 (如 CRBN 或 VHL) 之间形成三元复合物。随后, E2 酶催化泛素转移到目标蛋白上, 使目标蛋白多聚泛素化, 被蛋白酶体识别。最后, 目标蛋白与 E3 连接酶之间发生解离, 导致蛋白酶体识别和降解。该技术已应用于疾病相关蛋白的降解, 并广泛应用于药物发现。最近, 一些专门针对 BCR-ABL 的 PROTAC 被报道 (表 5^[46-48])。

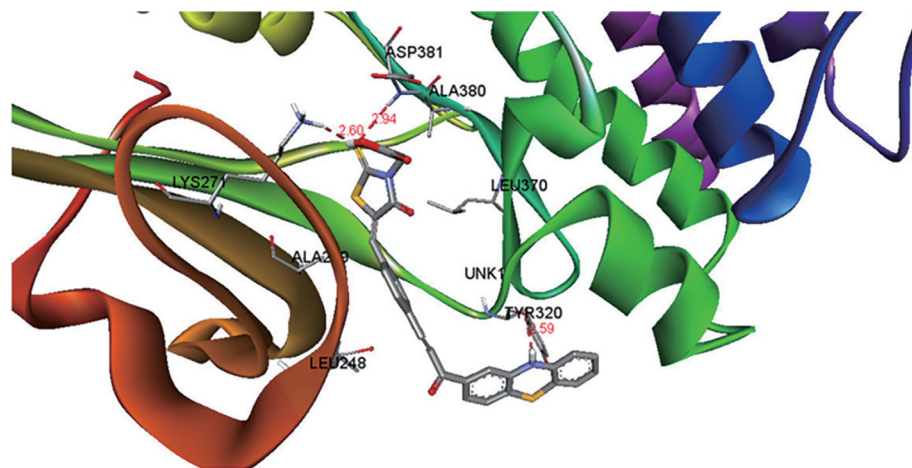
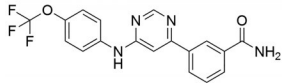
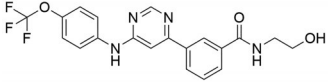
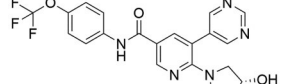
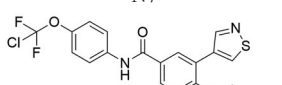
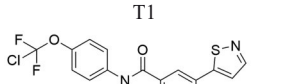
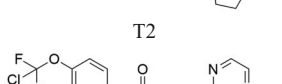
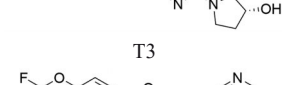
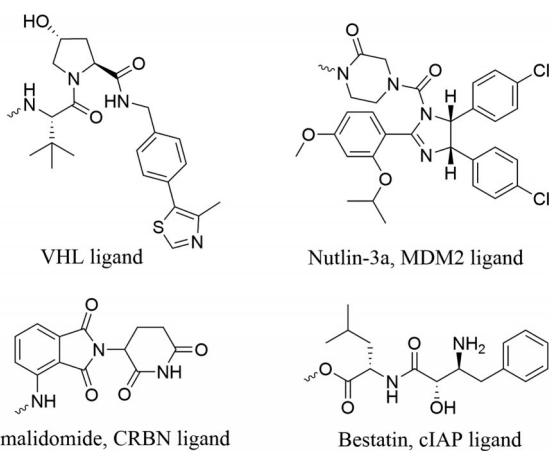


Figure 9 The binding mode of compound 6a with the active site of BCR-ABL (PDB ID: 2V7A)

Table 4 Novel BCR-ABL allosteric inhibitor

Chemical structure	Activity	Ref.
	<i>Luc</i> -Ba/F3 BCR-ABL ^{WT} : IC ₅₀ = 0.576 μmol·L ⁻¹ <i>Luc</i> -Ba/F3 BCR-ABL ^{T315I} : IC ₅₀ > 10 μmol·L ⁻¹	[41]
	<i>Luc</i> -Ba/F3 BCR-ABL ^{WT} : IC ₅₀ = 0.145 μmol·L ⁻¹ <i>Luc</i> -Ba/F3 BCR-ABL ^{T315I} : IC ₅₀ > 10 μmol·L ⁻¹	[42]
	ABL1: IC ₅₀ = 2.3 nmol·L ⁻¹ <i>Luc</i> -Ba/F3 BCR-ABL1 ^{WT} cells: IC ₅₀ = 1.7 nmol·L ⁻¹ <i>Luc</i> -Ba/F3 BCR-ABL1 ^{T315I} cells: IC ₅₀ = 73 nmol·L ⁻¹	[26]
	<i>Luc</i> -Ba/F3 BCR-ABL ^{T315I} cells: IC ₅₀ ≤ 100 nmol·L ⁻¹	[43]
	<i>Luc</i> -Ba/F3 BCR-ABL ^{T315I} cells: IC ₅₀ ≤ 100 nmol·L ⁻¹	[43]
	<i>Luc</i> -Ba/F3 BCR-ABL ^{T315I} cells: IC ₅₀ ≤ 100 nmol·L ⁻¹	[44]
	<i>Luc</i> -Ba/F3 BCR-ABL ^{T315I} cells: IC ₅₀ ≤ 100 nmol·L ⁻¹	[44]

**Figure 10** Reported E3 ubiquitinase ligands

Zhao 等^[46]通过将 VHL E3 泛素连接酶引入 ABL 抑制剂达沙替尼, 设计合成了一系列 BCR-ABL 降解剂, 并对其生物活性进行了评价。达沙替尼与 ABL 复合物的共晶结构显示, 达沙替尼中的哌嗪暴露于溶剂中, 使其成为设计 PROTAC 的潜在配体。其中 SIAIS178

(表 5) 对 K562 的细胞抑制活性 IC₅₀ 值为 24 nmol·L⁻¹, 在 K562 细胞中的蛋白降解活性 DC₅₀ 值为 8.5 nmol·L⁻¹。他们进一步做了激酶选择性图谱, 发现 SIAIS178 比达沙替尼有更好的选择性; 蛋白质组学分析显示, 降解谱远比结合谱更具选择性。SIAIS178 通过将 VHL E3 泛素连接酶引入 ABL 抑制剂达沙替尼, 是当时报道的具有良好选择性的最有效的 BCR-ABL 降解剂。

泊那替尼暴露于溶剂区的部分衍生出一个标志性的炔基, 后通过“点击反应”与 CRBN 配体连接, 快速合成目标 PROTAC。聚乙二醇 (PEG) 因其生物相容性较好、对化合物水溶性的提高较大, 对 3 个结合口袋的兼容性较优, 被选择作为连接子。为了更精准靶向 BCR-ABL 激酶, Yang 等^[47]选择了伊马替尼 (II 型抑制剂)、达沙替尼 (I 型抑制剂)、asciminib (IV 型抑制剂) 和泊那替尼 (II 型抑制剂) 作为 PROTAC 靶向蛋白的配体, 并合成了一系列化合物。通过分析所有化合物的激酶数据发现, 选择达沙替尼和伊马替尼作为靶蛋白配体时, 该 PROTAC 无法降解 T315I 突变激酶, 只有选择泊那

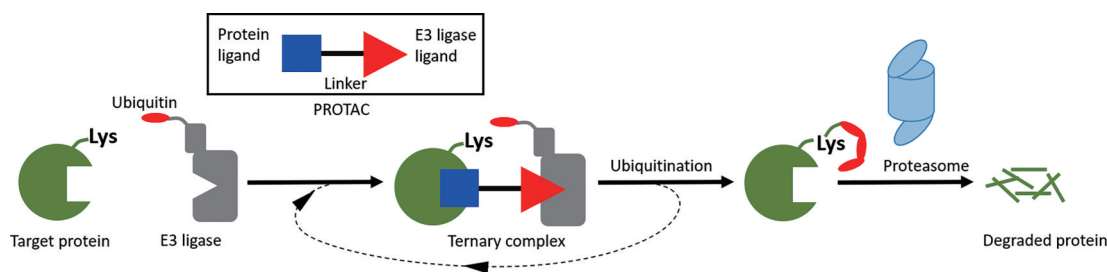
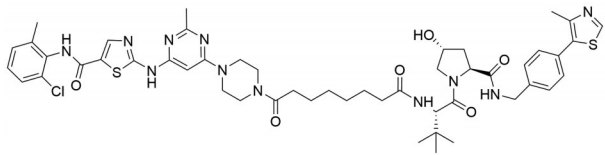
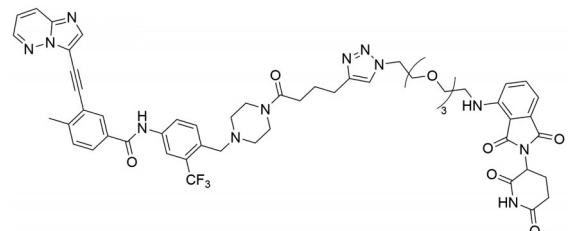
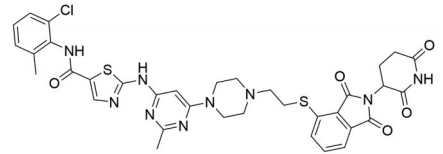


Figure 11 The mechanisms of proteolytic targeting chimera (PROTAC)

Table 5 Novel BCR-ABL protein degrader

Chemical structure	Activity	Ref.
 <p>SIAIS178</p>	K562 cells: $IC_{50} = 24 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $DC_{50} = 8.5 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$	[46]
 <p>P19P</p>	K562 cells: $IC_{50} = 7.5 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ $DC_{50} \approx 20 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ <i>Luc</i> -Ba/F3 BCR-ABL ^{T315I} cells: $IC_{50} = 28.5 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$	[47]
 <p>SIAIS056</p>	K562 cells: $IC_{50} = 0.49 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ $DC_{50} = 0.18 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$	[48]

替尼和 asciminib 作为靶蛋白配体时, 该 PROTAC 才可能具有降解 T315I 突变激酶的活性。在这一系列化合物中, 化合物 P19P (表 5) 的降解活性较好, DC_{50} 值为 $20 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。同时该团队发现配体与 BCR-ABL 的结合亲和力对于三元复合物的形成十分重要。

后续 Yang 等^[47]评估了化合物 P19P 对具有代表性的耐药突变体的降解能力, 包括守门残基的 T315I 突变、p 环的 E255K 突变、激活环上的 H396R 突变及 c 螺旋上的 V468F 突变。结果表明, 化合物 P19P 可降低 BCR-ABL 转化的 BaF3 小鼠细胞中 T315I 突变体的蛋白水平, 但其 DC_{50} 值大于 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 明显大于野生型 BCR-ABL 转化的人类 K562 细胞的 DC_{50} 值为 $20 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。导致这一现象的原因可能是化合物 P19P 与突变体的结合亲和力降低以及 CRBN 的物种差异, 但是化合物 P19P 仍对 T315I 突变体显示出实际的抗增殖活性 ($EC_{50} = 28.5 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)。除了 T315I 突变体, 化合物 P19P 还可降解 V468F 及在瞬时转染的 HeLa 细胞中表达的

BCR-ABL 激酶其他突变体, 包括 E255K 和 H386R。泊那替尼对亲代 BaF3 细胞具有毒性和脱靶效应, 并且具有严重的心血管毒性。而化合物 P19P 即使在 $10 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的条件下, 也不会对大鼠心肌细胞 (H9C2) 和人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 产生抑制。

Liu 等^[48]研究发现, 在 PROTAC 领域中, 连接子的组成和长度在调节结合动力学和随后的效力以及选择性中起着至关重要的作用。因此, PROTAC 的设计中的一大挑战是选择连接两个配体的最佳连接子。先前利用达沙替尼靶向 BCR-ABL 和用 VHL 靶向 E3 泛素酶来构建 PROTAC, 得到了更稳定的三元复合物 SIAIS178。在此基础上, 该作者探究了连接子的有关优化, 如长度、亲水性和刚性, 并得到以泊马度胺来靶向 E3 泛素连接酶的化合物 SIAIS056 (表 5)。该化合物具有硫取代的连接子, 在体外实验中展现了较好的 BCR-ABL 降解活性, 此外还可以诱导 BCR-ABL 的几种临床相关抗性突变体的降解。

通过分析合成的一系列化合物的激酶数据发现, 当达沙替尼的哌嗪位用酰基取代时不利于 BCR-ABL 的降解, 而通过烷基化取代的偶联化合物降解活性较好, 例如 SIAIS056, DC_{50} 值为 $0.18 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。将化合物 SIAIS056 与其他结构不同、降解活性较差的化合物相比发现, 含有烷基化连接子比具有酰基取代连接子的 PROTAC 在 BCR-ABL 降解中更有效, 连接子末端具有酰基会明显降低其降解活性。WB 实验表明, 化合物 SIAIS056 以剂量依赖性方式显著降低 BCR-ABL 和 c-ABL 的蛋白质水平, 同时也显著抑制了 BCR-ABL 激酶的磷酸化及其下游蛋白质 STAT5 和 CRKL。最终结果表明化合物 SIAIS056 诱导的靶蛋白降解依赖于 CRBN 泛素连接酶。

通过对比化合物 SIAIS056 与先前报道过的 SIAIS178 可以得出: ① 二者的连接子均是碳烷基链类型, 这表明烷基化的连接子可以用于开发降解 BCR-ABL 的新型 PROTAC; ② 化合物 SIAIS056 降解活性和体外抗增殖活性均优于 SIAIS178, 进一步说明 CRBN 较 VHL 更适合作为 PROTAC 的 E3 泛素连接酶配体, 表现出更有效和更广谱的蛋白质降解活性; ③ 化合物 SIAIS056 的相对分子质量比 SIAIS178 小, 一定程度上可能具有更大的 CML 治疗潜力。

1.6 其他类型 BCR-ABL 抑制剂

为克服 BCR-ABL 激酶耐药性的问题, 药物化学工作者也做了其他方面的尝试。将药物化学领域新的策略引入 BCR-ABL 激酶抑制剂的开发, 例如共价抑制剂和双重靶向抑制剂技术。

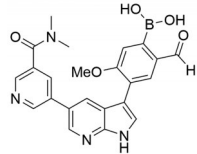
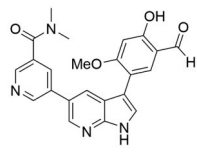
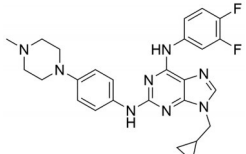
1.6.1 新型 BCR-ABL 共价抑制剂 共价抑制剂是通

过共价键与靶蛋白残基发生不可逆结合, 从而发挥其生物学功能的一类抑制剂。与非共价抑制剂相比, 靶向共价抑制剂具有更强的效价和更长的作用时间。

Quach 等^[49]通过使用羰基硼酸 (carbonyl boronic acid, CBA) 弹头, 设计合成了一系列和赖氨酸可逆共价结合的 BCR-ABL 抑制剂, 并对其生物活性进行了评价。由于缺乏可靶向的半胱氨酸残基, 此前尚无针对任何已知 BCR-ABL 突变体的共价药物报道。该作者所做的基于 CBA 和相应的亚胺硼酸类化合物, 是第一类 BCR-ABL 共价抑制剂。这些化合物针对 BCR-ABL 激酶的催化赖氨酸残基 K271, 对 BCR-ABL 野生型和突变体具有有效和持久的抑制作用。化合物 **Q14** (表 6) 对 ABL^{WT} 和 ABL^{T315I} 有良好的抑制活性, 其 IC_{50} 值分别为 1.7 和 $0.5 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。对接结果表明 (图 12A), 化合物 **Q14** 对赖氨酸残基 K271 有明显的共价相互作用, 并且硼酸和醛的引入似乎没有引起 I315 残基的空间碰撞。

Chen 等^[50]在 Quach 等工作的基础上, 利用 SuFEx 和水杨醛与氨基反应生成亚胺的方法, 合成一系列化合物靶向保守的赖氨酸残基, 为开发蛋白激酶的共价抑制剂提供了一种通用方法。这些化合物中的部分在生物实验中显示出高水平的选择性, 在细胞检测中对内源性 ABL 激酶表现出纳摩尔级别的效力, 并对大多数耐药 ABL 突变具有活性。其中, 化合物 **A5** (表 6) 对 ABL^{WT} 的 IC_{50} 值为 $0.2 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 对 K562 和 Luc-Ba/F3 BCR-ABL 的 IC_{50} 值分别为 55.6 和 $74.8 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。化合物 **A5** 对 ABL^{WT} 的 IC_{50} 值为 $7.3 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 对 K562 和 Luc-Ba/F3 BCR-ABL 的 IC_{50} 值分别为 135 和 $116 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

Table 6 Novel BCR-ABL inhibitors

Chemical structure	Activity	Ref.
 <p>Q14</p>	ABL ^{WT} : $IC_{50} = 1.7 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABL ^{T315I} : $IC_{50} = 0.5 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$	[49]
 <p>A5</p>	ABL ^{WT} : $IC_{50} = 0.2 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ K562 cells: $IC_{50} = 55.6 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, Luc-Ba/F3 BCR-ABL cells: $IC_{50} = 74.8 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$	[50]
 <p>5d</p>	ABL kinases: $IC_{50} = 40 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ BTK kinases: $IC_{50} = 580 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$	[51]

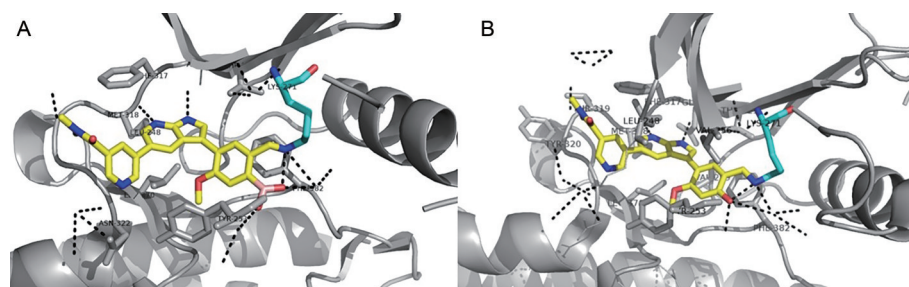


Figure 12 The co-crystal structure of ABL kinase domain with **Q14** (A, PDB ID:7DT2) and **A5** (B, PDB ID:7W7Y)

含水杨醛的化合物**A5**是第一个有细胞活性、有时间依赖性ABL抑制作用的可逆共价ABL抑制剂,在K562细胞中滞留时间长,细胞脱靶率低。并通过对接结果(图12B)证实了化合物**A5**对赖氨酸残基K271有明显的共价相互作用。

1.6.2 新型BCR-ABL双重靶向抑制剂 通过将具有协同作用两个靶点的抑制剂结合起来,使其能同时抑制两个不同的靶点,从而增强疾病治疗效果,降低药物毒副作用的抑制剂,叫做双重靶向抑制剂。

Bertrand等^[51]通过将BCR-ABL抑制剂与布鲁顿酪氨酸激酶(Bruton's tyrosine kinase, BTK)抑制剂结合,设计合成了一系列同时靶向BCR-ABL和BTK的双重靶向抑制剂,并对其生物活性进行了评价。BTK是B细胞受体信号通路的关键调控因子和主要激酶,在B细胞活化、生存、增殖和分化中发挥重要作用。BTK介导B细胞增殖和凋亡,可被认为是治疗自身免疫性疾病和癌症的一个潜在靶点。已有研究表明,BCR-ABL可与BTK协同作用来治疗白血病。根据已报道的BCR-ABL和BTK抑制剂,设计合成了化合物**5d**(表6),其对BCR-ABL和BTK激酶都有不错的抑制作用,对ABL激酶的 IC_{50} 值为 $40\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$,对BTK激酶的 IC_{50} 值为 $580\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。BCR-ABL抑制剂还可与其他抑制剂联用治疗白血病,例如HDAC6抑制剂抑制乙酰化热休克蛋白转变为热休克蛋白,从而使得BCR-ABL蛋白失去分子伴侣的保护,更易被蛋白酶体降解,来达到与BCR-ABL抑制剂联用的目的^[52]等。关于BCR-ABL双重靶向抑制剂的开发还有待进一步的研究。

2 结论与展望

本文综述了近年来各种类型的BCR-ABL激酶抑制剂作为潜在的CML治疗药物的研究进展,以强调新型BCR-ABL激酶抑制剂研发的重要性。随着BCR-ABL正构抑制剂的迅速发展,CML治疗进入了一个逐渐成熟的新阶段。然而伴随着长期使用,部分患者出现了因BCR-ABL点突变而产生的耐药,特别是守门残基T315I突变耐药。这种突变的治疗已经是目前

BCR-ABL抑制剂领域最有研究价值的难题。各类新型BCR-ABL抑制剂的设计策略,包括PROTAC和双重靶向抑制剂等新兴技术的引入,为药物设计工作者提供了许多有价值的解决方案。值得注意的是,基于独特的作用位点和机制,第四代TKI BCR-ABL1变构抑制剂不仅可以用于治疗对正构抑制剂耐药(守门残基T315I突变耐药)或不耐受的CML患者,通过与正构抑制剂的联合应用还可用于治疗多重耐药突变患者,减少给药剂量,降低毒副作用,有望使患者实现功能性治愈^[53]。期待未来这种联合用药模式能解决更多白血病患者的耐药问题,开启靶向治疗的新篇章,为更多克服耐药性药物的研发指引新方向。

作者贡献: 崔文禹和赵若熙对这项工作做出了同样的贡献。崔文禹、赵若熙和韩路路负责文献检索及论文撰写;韩进松、李飞负责文章选题、指导写作;倪伟伟修改和校对文章。

利益冲突: 作者声明没有竞争的经济利益。

References

- [1] Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, et al. Chronic myelogenous leukemia: biology and therapy [J]. *Ann Intern Med*, 1999, 131: 207-219.
- [2] Manley PW, Stiefl NJ. Progress in the discovery of BCR-ABL kinase inhibitors for the treatment of leukemia [M] // Waring MJ. *Topics in Medicinal Chemistry* (Vol 28). Cham: Springer, 2017: 1-37.
- [3] Nowell PCHD. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia [J]. *Science*, 1960, 132: 1497.
- [4] Erikson J, Griffin CA, Rushdi A, et al. Hetero-geneity of chromosome 22 breakpoint in Philadelphia-positive (Ph⁺) acute lymphocytic leukemia [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1986, 83: 1807-1811.
- [5] Rowley JD. Letter: a new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining [J]. *Nature*, 1973, 243: 290-293.
- [6] Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia [J]. *Blood*, 2000, 96: 3343-3356.

- [7] Kantarjian HM, Talpaz M, Giles F, et al. New insights into the pathophysiology of chronic myeloid leukemia and imatinib resistance [J]. *Ann Intern Med*, 2006, 145: 913-923.
- [8] Reckel S, Gehin C, Tardivon D, et al. Structural and functional dissection of the DH and PH domains of oncogenic Bcr-Abl tyrosine kinase [J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 2101.
- [9] Van Etten RA. Cycling, stressed-out and nervous: cellular functions of c-Abl [J]. *Trends Cell Biol*, 1999, 9, 179-186
- [10] Sillaber C, Gesbert F, Frank DA, et al. STAT5 activation contributes to growth and viability in Bcr/Abl-transformed cells [J]. *Blood*, 2000, 95: 2118-2125.
- [11] Kurzrock R, Gutterman JU, Talpaz M. The molecular genetics of Philadelphia chromosome-positive leukemias [J]. *N Engl J Med*, 1988, 319: 990-998.
- [12] Tokarski JS, Newitt JA, Chang CY, et al. The structure of dasatinib (BMS-354825) bound to activated ABL kinase domain elucidates its inhibitory activity against imatinib-resistant ABL mutants [J]. *Cancer Res*, 2006, 66: 5790-5797.
- [13] Hantschel O, Nagar B, Guettler S, et al. A myristoyl/phosphotyrosine switch regulates c-Abl [J]. *Cell*, 2003, 112: 845-857.
- [14] Jahnke W, Grotzfeld RM, Pellé X, et al. Binding or bending: distinction of allosteric Abl kinase agonists from antagonists by an NMR-based conformational assay [J]. *J Am Chem Soc*, 2010, 132: 7043–7048.
- [15] Cox KJ, Shomin CD, Ghosh I. Tinkering outside the kinase ATP box: allosteric (type IV) and bivalent (type V) inhibitors of protein kinases [J]. *Future Med Chem*, 2011, 3: 29-43.
- [16] Hochhaus A, Kreil S, Corbin AS, et al. Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to imatinib (STI571) therapy [J]. *Leukemia*, 2002, 16: 2190-2196.
- [17] Deininger MW, Goldman JM, Lydon N, et al. The tyrosine kinase inhibitor CGP57148B selectively inhibits the growth of BCR-ABL-positive cells [J]. *Blood*, 1997, 90: 3691-3698.
- [18] Gambacorti-Passerini C, Coutre P, Mologni L, et al. Inhibition of the ABL kinase activity blocks the proliferation of BCR/ABL⁺ leukemic cells and induces apoptosis [J]. *Blood Cells Mol Dis*, 1997, 23: 380-394.
- [19] Nardi V, Azam M, Daley GQ. Mechanisms and implications of imatinib resistance mutations in BCR-ABL [J]. *Curr Opin Hematol*, 2004, 11: 35-43.
- [20] Cowan-Jacob SW, Fendrich G, Floersheimer A, et al. Structural biology contributions to the discovery of drugs to treat chronic myelogenous leukaemia [J]. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2007, 63: 80-93.
- [21] Weisberg E, Catley L, Wright RD, et al. Beneficial effects of combining nilotinib and imatinib in preclinical models of BCR-ABL⁺ leukemias [J]. *Blood*, 2007, 109: 2112-2120.
- [22] Boschelli F, Arndt K, Gambacorti-Passerini C. Bosutinib: a review of preclinical studies in chronic myelogenous leukaemia [J]. *Eur J Cancer*, 2010, 46: 1781-1789.
- [23] O'Hare T, Shakespeare WC, Zhu X, et al. AP24534, a pan-BCR-ABL inhibitor for chronic myeloid leukemia, potently inhibits the T315I mutant and overcomes mutation-based resistance [J]. *Cancer Cell*, 2009, 16: 401-412.
- [24] Zhou T, Commodore L, Huang WS, et al. Structural mechanism of the Pan-BCR-ABL inhibitor ponatinib (AP24534): lessons for overcoming kinase inhibitor resistance [J]. *Chem Biol Drug Des*, 2011, 77: 1-11.
- [25] Ren X, Pan X, Zhang Z, et al. Identification of GZD824 as an orally bioavailable inhibitor that targets phosphorylated and nonphosphorylated breakpoint cluster region-Abelson (Bcr-Abl) kinase and overcomes clinically acquired mutation-induced resistance against imatinib [J]. *J Med Chem*, 2013, 56: 879-894.
- [26] Schoepfer J, Jahnke W, Berellini G, et al. Discovery of asciminib (ABL001), an allosteric inhibitor of the tyrosine kinase activity of BCR-ABL1 [J]. *J Med Chem*, 2018, 61: 8120-8135.
- [27] Qiang W, Antelope O, Zabriskie MS, et al. Mechanisms of resistance to the BCR-ABL1 allosteric inhibitor asciminib [J]. *Leukemia*, 2017, 31: 2844-2847.
- [28] Kimura S, Naito H, Segawa H, et al. NS-187, a potent and selective dual Bcr-Abl/Lyn tyrosine kinase inhibitor, is a novel agent for imatinib-resistant leukemia [J]. *Blood*, 2005, 106: 3948-3954.
- [29] Antelope O, Vellore NA, Pomicter AD, et al. BCR-ABL1 tyrosine kinase inhibitor K0706 exhibits preclinical activity in Philadelphia chromosome-positive leukemia [J]. *Exp Hematol*, 2019, 77: 36-40.
- [30] Ivanova ES, Tatarskiy VV, Yastrebova MA, et al. PF114, a novel selective inhibitor of BCR-ABL tyrosine kinase, is a potent inducer of apoptosis in chronic myelogenous leukemia cells [J]. *Int J Oncol*, 2019, 55: 289-297.
- [31] Liu X, Wang B, Chen C, et al. Discovery of (*E*)-*N*-(4-((4-methylpiperazin-1-yl)methyl)-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-((3-(2-(pyridin-2-yl)vinyl)-1*H*-indazol-6-yl)thio)propanamide (CHMFL-ABL-121) as a highly potent ABL kinase inhibitor capable of overcoming a variety of ABL mutants including T315I for chronic myeloid leukemia [J]. *Eur J Med Chem*, 2018, 160: 61-81.
- [32] Pan X, Liang L, Sun Y, et al. Discovery of novel Bcr-Abl (T315I) inhibitors with flexible linker. Part 1: confirmation optimization of phenyl-1*H*-indazol-3-amine as hinge binding moiety [J]. *Eur J Med Chem*, 2019, 178: 232-242.
- [33] El-Damasy AK, Jin H, Seo SH, et al. Design, synthesis, and biological evaluations of novel 3-amino-4-ethynyl indazole derivatives as Bcr-Abl kinase inhibitors with potent cellular antileukemic activity [J]. *Eur J Med Chem*, 2020, 207: 112710.
- [34] Zhang D, Li P, Gao Y, et al. Discovery of a candidate containing an (*S*)-3,3-difluoro-1-(4-methylpiperazin-1-yl)-2,3-dihydro-1*H*-inden scaffold as a highly potent pan-inhibitor of the BCR-ABL kinase including the T315I-resistant mutant for the treatment of chronic myeloid leukemia [J]. *J Med Chem*, 2021, 64: 7434-7452.

- [35] Rahim A, Syed R, Poornachandra Y, et al. Synthesis and biological evaluation of phenyl-amino-pyrimidine and indole/oxindole conjugates as potential BCR-ABL inhibitors [J]. *Med Chem Res*, 2019, 28: 633-645.
- [36] Liu J, Huang H, Deng X, et al. Design, synthesis and broad-spectrum Bcr-Abl inhibitory activity of novel thiazolamide-benzamide derivatives [J]. *RSC Adv*, 2019, 9: 2092-2101.
- [37] Sun Y, Zhao N, Wang H, et al. CT-721, a potent Bcr-Abl inhibitor, exhibits excellent *in vitro* and *in vivo* efficacy in the treatment of chronic myeloid leukemia [J]. *J Cancer*, 2017, 8: 2774-2784.
- [38] Pan X, Liu N, Zhang Q, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of novel Bcr-Abl (T315I) inhibitors incorporating amino acids as flexible linker [J]. *Bioorg Med Chem*, 2021, 48: 116398.
- [39] Muhammad SA, Ravi S, Thangamani A, et al. Synthesis, antiproliferative activity and docking study of novel rhodanine derivatives as Bcr-Abl T1351 inhibitors [J]. *Res Chem Intermediat*, 2017, 43: 5871-5887.
- [40] Shan Y, Dong J, Pan X, et al. Expanding the structural diversity of Bcr-Abl inhibitors: dibenzoylpiperazin incorporated with 1*H*-indazol-3-amine [J]. *Eur J Med Chem*, 2015, 104: 139-147.
- [41] Adrian FJ, Ding Q, Sim T, et al. Allosteric inhibitors of Bcr-abl-dependent cell proliferation [J]. *Nat Chem Biol*, 2006, 2: 95-102.
- [42] Zhang J, Adrian FJ, Jahnke W, et al. Targeting Bcr-Abl by combining allosteric with ATP-binding-site inhibitors [J]. *Nature*, 2010, 463: 501-506.
- [43] Wang YH, Zhao JY. (Hetero)arylamides for inhibition of protein kinase activity: WO, 2018133826A1 [P]. 2018-07-26.
- [44] Wang YH, Zhao JY. (Hetero)arylamides for inhibition of protein kinase activity: WO, 2018133827A1 [P]. 2018-07-26.
- [45] Deng X, Okram B, Ding Q, et al. Expanding the diversity of allosteric Bcr-abl inhibitors [J]. *J Med Chem*, 2010, 53: 6934-6946.
- [46] Zhao Q, Ren C, Liu L, et al. Discovery of SIAIS178 as an effective BCR-ABL degrader by recruiting von hippel-lindau (VHL) E3 ubiquitin ligase [J]. *J Med Chem*, 2019, 62: 9281-9298.
- [47] Yang Y, Gao H, Sun X, et al. Global PROTAC toolbox for degrading BCR-ABL overcomes drug-resistant mutants and adverse effects [J]. *J Med Chem*, 2020, 63: 8567-8583.
- [48] Liu H, Ding X, Liu L, et al. Discovery of novel BCR-ABL PROTACs based on the cereblon E3 ligase design, synthesis, and biological evaluation [J]. *Eur J Med Chem*, 2021, 223: 113645.
- [49] Quach D, Tang G, Anantharajan J, et al. Strategic design of catalytic lysine-targeting reversible covalent BCR-ABL inhibitors [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2021, 60: 17131-17137.
- [50] Chen P, Sun J, Zhu C, et al. Cell-active, reversible, and irreversible covalent inhibitors that selectively target the catalytic lysine of BCR-ABL kinase [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2022, 61: e202203878.
- [51] Bertrand J, Dostalova H, Krystof V, et al. New 2,6,9-trisubstituted purine derivatives as Bcr-Abl and Btk inhibitors and as promising agents against leukemia [J]. *Bioorg Chem*, 2020, 94: 10336.
- [52] Losson H, Gajulapalli SR, Lernoux M, et al. The HDAC6 inhibitor 7b induces BCR-ABL ubiquitination and downregulation and synergizes with imatinib to trigger apoptosis in chronic myeloid leukemia [J]. *Pharmacol Res*, 2020, 160: 105058.
- [53] Christopher AE, Matthew SZ, Samantha LSS, et al. Combining the allosteric inhibitor asciminib with ponatinib suppresses emergence of and restores efficacy against highly resistant BCR-ABL1 mutants [J]. *Cancer Cell*, 2019, 36: 431-443.