

· 药学前沿 ·

小分子抗肿瘤共价药物的研究进展

张丹凤, 焦 宇, 刘 勇, 张艳敏, 张智敏, 陆 涛*

(中国药科大学理学院, 南京 211198)

摘要 共价药物是一类能与靶标形成共价键从而发挥生物学功能的药物。随着多个激酶抑制剂类抗肿瘤共价药物的上市, 共价药物重新回到药物发现的视野并成为抗肿瘤化疗药物的研究热点。本文从共价药物的作用机制、药理学优势、开发策略以及近年来出现的抗肿瘤共价药物及候选药物的研究进展进行综述, 为新型抗肿瘤共价药物的设计提供参考。

关键词 共价药物; 抗肿瘤; 开发策略; 进展

中图分类号 R914 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2017)01-0001-07

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20170101

引用本文 张丹凤, 焦宇, 刘勇, 等. 小分子抗肿瘤共价药物的研究进展[J]. 中国药科大学学报, 2017, 48(1):1-7.

Cite this article as: ZHANG Danfeng, JIAO Yu, LIU Yong, et al. Progress of small molecule anti-tumor covalent drugs[J]. J China Pharm Univ, 2017, 48(1):1-7.

Progress of small molecule anti-tumor covalent drugs

ZHANG Danfeng, JIAO Yu, LIU Yong, ZHANG Yanmin, ZHANG Zhimin, LU Tao*

School of Sciences, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China

Abstract Covalent drugs are a type of inhibitors which exert their biological functions by irreversibly binding to the target through covalent bonds. With the marketing of kinase inhibitor covalent drugs against tumor, covalent drugs have regained the attention for drug discovery and have become a recent hotspot of anti-tumor drugs. In this paper, the action mechanisms, pharmacological advantages and the development strategies of modern covalent drugs are discussed and the recent research progress of anti-tumor covalent inhibitors is summarized, which provides a reference for the design of new anti-tumor covalent drugs.

Key words covalent drugs; anti-tumor; development strategy; progress

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81302634) and the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. BK20130662)

共价药物是指通过与靶标形成共价键从而发挥其生物学功能的一类药物。文献表明约30%的已上市药物是通过与靶蛋白形成共价复合物而发挥作用^[1-2]。近年来抗肿瘤药物的热点领域靶向激酶抑制剂的研究倍受重视, 已有多个针对不同靶标的共价药物进入临床研究。

本文着眼于共价药物中的抗肿瘤药物领域, 对其作用机制、药理学优势、开发策略以及近年来出

现的抗肿瘤共价药物及候选药物的研究进展进行综述, 为设计结构简单、药效好的新型抗肿瘤共价药物提供参考。

1 共价药物的作用机制

药物与靶标的结合过程通常分为两个步骤^[3] (图1)。

步骤一: 药物与靶蛋白特定结合口袋发生非共

价结合形成非共价复合物 E·I, 其生成速率常数是 k_1 , 解离速率常数是 k_{-1} 。步骤二: 非共价复合物 E·I 中, 药物结构里特定的亲电基团与靶蛋白中的亲核氨基酸残基发生共价结合形成共价键, 生成共价复合物 E-I, 其生成速率常数是 k_2 , 解离速率常数是 k_{-2} 。当 $k_{-2} = 0$ 时, 该化合物为不可逆共价抑制剂。当 $k_{-2} \neq 0$ 时, 该化合物为可逆共价抑制剂。

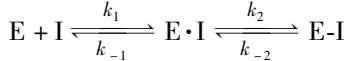


图1 共价药物的作用机制

2 共价药物的药理学优势

在传统的药物发现过程中, 由于共价药物脱靶往往会引起严重的毒性反应, 因此在较长时间里并没有受到特别的关注。近年来, 随着理性药物设计的不断发展及对靶标作用机制的深刻理解, 人们逐渐认识到共价药物的特殊作用机制使其相对于传统的非共价药物在多个方面具有明显的药理学优势。包括:(1)由于与内源性物质的竞争减少, 共价药物具有较高的生化效率;(2)共价药物作用较强并且持久, 给药剂量以及给药频率减少, 整体上减轻了患者负担;(3)在共价药物作用机制中, 药效学与药代动力学分离, 共价药物与靶蛋白持久结合, 即使药物被迅速清除也能够维持效力;(4)由于共价药物对靶蛋白能够产生持续抑制作用, 因此, 它能够预防耐药性的产生^[3–4]; 同时, 共价药物对耐药性突变细胞也维持较好的活性^[5], 对于共价药物而言, 耐药突变并不影响药物对靶标的抑制程度, 仅仅是减缓了药物与靶标的结合速率, 因此, 将药物暴露于突变靶点足够长的时间, 可以将其完全抑制;(5)共价弹头能够靶向特定蛋白罕见的、非保守残基, 从而达到较高的选择性;(6)共价药物可以有效地靶向具有浅结合口袋的蛋白, 这使得共价药物相对于传统非共价药物而言具有更强的效力。

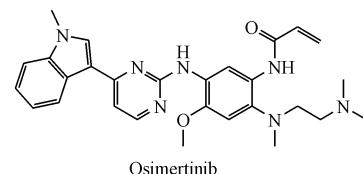
3 已上市和在研的小分子抗肿瘤共价抑制剂

随着激酶抑制剂类抗肿瘤药物耐药问题的日益突出, 多个公司开始研发具有更好抗耐药性的激酶抑制剂共价药物。目前已有多个进入临床研究, 其中3个已被批准上市。激酶抑制剂类共价药物的研究主要集中在能够和药物分子发生共价结合

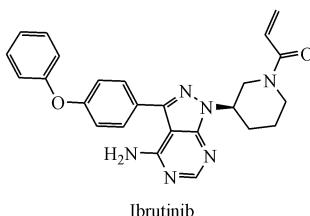
的激酶中, 如 BTK、ErbB、c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)等。

3.1 已上市小分子抗肿瘤共价药物

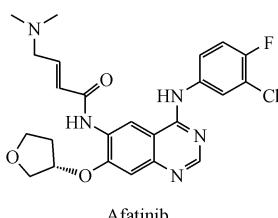
3.1.1 Osimertinib Osimertinib 是由阿斯利康制药有限公司研发的一种口服有效的选择性表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)突变体不可逆抑制剂, 于2015年11月由美国食品药品监督管理局(FDA)加速批准通道批准上市, 用于EGFR的T790M突变或对其他EGFR抑制剂耐药的非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)的治疗。对外显子19缺失型EGFR、L858R/T790M EGFR 和野生型EGFR的IC₅₀分别为12.92, 11.44和493.8 nmol/L^[6]。EGFR抑制剂对EGFR突变的非小细胞肺癌患者虽然疗效显著, 但所有患者最终几乎都会产生耐药性。其中大约50%~60%患者的耐药是由EGFR T790M突变引起^[7]。前期的不可逆EGFR抑制剂, 如dacomitinib和afatinib对于上述提及的突变型和野生型受体均具有抑制作用, 能够用于T790M阳性患者的治疗, 然而它们对野生型受体的强抑制作用及毒性反应限制了dacomitinib和afatinib的应用^[8]。



3.1.2 Ibrutinib Ibrutinib 是由 Pharmacyclics 公司和 Johnson&Johnson 公司开发的口服小分子 BTK 抑制剂, 对 BTK 的 IC₅₀ 达到 0.5 nmol/L^[9], 同时它是一个多靶点的抑制剂, 对 TEC 家族激酶和一些 SRC 家族激酶几乎具有等同的活力^[10]。Ibrutinib 分别于 2013 年 11 月和 2014 年 2 月被美国 FDA 批准用于套细胞淋巴瘤(mantle cell lymphoma, MCL) 和慢性淋巴细胞白血病(chronic lymphocytic leukemia, CLL) 的治疗^[11], 于 2015 年被美国和欧盟批准用于 Waldenstrom 巨球蛋白血症(Waldenstrom's macroglobulinemia, WM) 的治疗。Ibrutinib 联合苯达莫司汀和利妥昔单抗用于复发性、难治性边缘区淋巴瘤(marginal zone lymphoma, MZL)、MCL 以及 CLL 的治疗正处于临床Ⅲ期研究阶段, 用于一线治疗转移性胰腺癌正处于临床Ⅱ/Ⅲ期研究阶段。



3.1.3 Afatinib Afatinib 是由 Boehringer Ingelheim 公司开发的一种 EGFR/HER2 的强效双重不可逆抑制剂, 其对 EGFR (wt), EGFR (L858R), EGFR (L858R/T790M) 和 HER2 的 IC_{50} 分别为 0.5, 0.4, 10 和 14 nmol/L^[12]。于 2013 年 7 月被美国 FDA 批准用于一线治疗 EGFR 外显子 19 缺失突变或外显子 21(L858R) 替代突变的转移性非小细胞肺癌。其对转移性乳腺癌、头颈部鳞状细胞癌的治疗处于临床Ⅲ期研究阶段^[13]。FDA 分别于 2012、2014 和 2015 年授予 afatinib 治疗表皮生长因子受体突变阳性非小细胞肺癌、恶性脑和神经系统肿瘤以及鳞状细胞癌孤儿药称号。Afatinib 对 EGFR 和 HER-2 的双重抑制作用,使得其与第一代药物相比具有更强的疗效和更为广泛的适应证。由于 afatinib 的不可逆抑制作用,使得其对于第一代药物产生耐药性的受体具有很好的疗效。



3.2 在研的小分子抗肿瘤共价药物

3.2.1 Neratinib Neratinib 是 Puma 公司开发的一种口服 pan-erbB 不可逆抑制剂, 能选择性的抑制 HER2 和 EGFR, IC_{50} 分别为 59 和 92 nmol/L^[14], 对于非小细胞肺癌、转移性脑癌, 实体瘤的治疗处于临床Ⅱ期, 乳腺癌、转移性乳腺癌等的治疗处于临床Ⅲ期研究阶段。Neratinib 能够体外抑制 HER2 基因扩增的癌肉瘤细胞增殖、信号传导、细胞周期进展和肿瘤生长, 同时也能够体内抑制移植 HER2 基因扩增的癌肉瘤小鼠模型的肿瘤生长, 提高其生存期^[15]。Korface 等^[16] 2014 年证实, neratinib 是 HER2/neu 基因扩增的子宫浆液性癌 (uterine serous carcinoma, USC) 的潜在治疗方案。Becker 等^[17] 发现, neratinib 对于放疗和化疗无效的

HER2/neu 基因突变宫颈癌或许是一种新型的治疗方案。

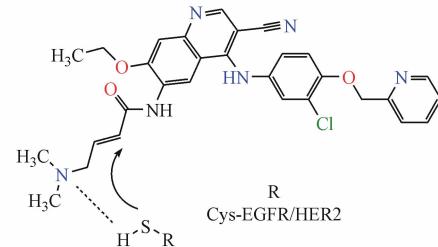
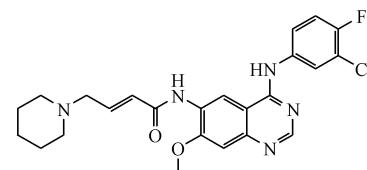


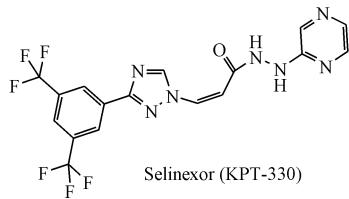
图 2 Neratinib 的作用机制

3.2.2 Dacomitinib Dacomitinib 是由辉瑞公司开发的 pan-erbB 不可逆抑制剂, 对 EGFR、ErbB2 以及 ErbB4 的 IC_{50} 分别为 6.0、45.7 和 73.7 nmol/L^[18]。2015 年, 被美国授予 EGFR, HER2, HER4, 或 DDR2 突变的非小细胞肺癌治疗孤儿药称号。目前对 NSCLC 的治疗正处于临床Ⅲ期研究阶段, 而对转移性脑癌、胶质母细胞瘤以及实体瘤的治疗处于临床Ⅱ期研究阶段。体内外研究表明, dacomitinib 相较于可逆抑制剂 CI-1033 具有更好的药效和药代动力学性质, 这是由于 dacomitinib 能够与受体酪氨酸激酶 ErbB 家族的 ATP 结合口袋的半胱氨酸发生共价结合。同时 dacomitinib 对 EGFR 突变 (L858R/T790M) 和对 gefitinib 耐药的非小细胞肺癌患者具有很好的治疗效果^[19]。

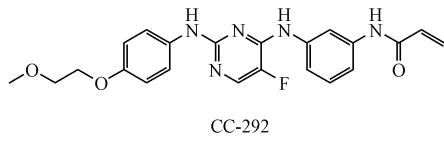


3.2.3 Selinexor Selinexor 是由美国 Karyopharm 制药公司开发的基于 XPO1 介导核输出机制的口服有效的选择性核输出蛋白抑制剂 (selective inhibitors of nuclear export protein, SINE)。核运输蛋白 XPO1(也称 CRM1)是 p53、p73、FOXO、pRB、BRCA1 和 PP2A 等肿瘤抑制蛋白及生长调节因子的唯一核输出协助蛋白^[20]。靶向核运输蛋白 XPO1 调节关键蛋白的核质定位是治疗肿瘤的一个研究方向。Selinexor 于 2012 年首次进入临床, 迄今为止共开展了 21 项临床试验, 目前对于转移性乳腺癌、小细胞肺癌、去势抗性前列腺癌、鳞状细胞癌、女性生殖系统恶性肿瘤、胶质母细胞瘤、急性

髓性白细胞病、T 细胞淋巴瘤、弥漫性大 B 细胞淋巴瘤、多发性脊髓瘤、神经内分泌癌的研究处于临床Ⅱ期研究阶段,对于直肠癌、糖尿病的治疗研究处于临床Ⅰ期研究阶段。2014 年,FDA 和 EMA 授予 selinexor 治疗急性髓性白血病和弥漫性大 B 细胞淋巴瘤的孤儿药称号。2015 年,FDA 授予 selinexor 治疗多发性骨髓瘤孤儿药资格。



3.2.4 CC-292 CC-292 是由 Celgene 公司开发的一种可口服的 BTK 共价抑制剂,具有高度选择性,对 BTK 的 IC_{50} 小于 0.5 nmol/L,也能够抑制原代 B 细胞增殖和活化, EC_{50} 约为 10 nmol/L^[21]。CC-292 最初由 Avila 公司开发,于 2014 年 3 月由 Celgene 公司继续研究,目前对于类风湿性关节炎的治疗处于临床Ⅱ期研究阶段,慢性淋巴细胞白血病和弥漫性大 B 细胞淋巴瘤的治疗处于临床Ⅰ期研究阶段。2014 年被欧盟授予慢性淋巴细胞白血病/小淋巴细胞淋巴瘤治疗孤儿药称号。CC-292 最新的临床研究表明单剂量给药 1~2 mg/kg,能够完全抑制 BTK 分子靶标,并且支持每日 1 次的给药方案^[21]。



3.2.5 QL-47 QL-47 是由哈佛大学研发的一种强效、高选择性的 BTK 激酶共价抑制剂,对 BTK 的 IC_{50} 达 7 nmol/L, EC_{50} 为 475 nmol/L^[22],目前处于临床前研究阶段。QL-47 的丙烯酰胺结构能够与 Cys481 发生共价结合(图 3),抑制 BTK 激酶的自磷酸化。此外,QL-47 不仅能够抑制 BTK 激酶活性,也能够诱导 BTK 的降解。相比较于 ibrutinib,QL-47 对 BTK 家族的选择性更高^[22]。

3.2.6 DHM25 DHM25 是由越南国立大学开发的哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin,mTOR)共价抑制剂,其开发思路如下:从对 I 类磷脂酰肌醇-3-羟激酶(phosphatidylinositol

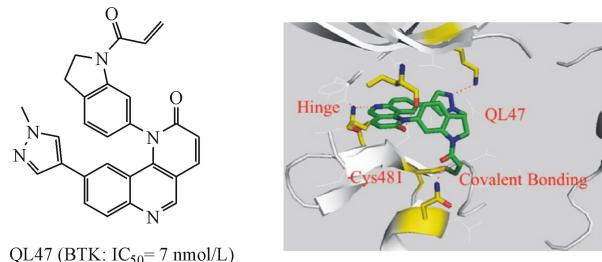
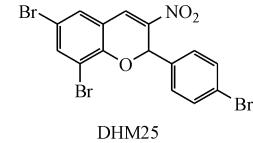


图 3 QL47 与 BTK 的作用模式图

3-kinase,PI3K)催化亚基具有抑制活性的色烯基本骨架出发,合成了一系列色烯类似物,展现出对 PI3K 依赖的肿瘤细胞强烈的杀灭能力,能够抑制 akt473 位丝氨酸的磷酸化进而抑制 PI3K/mTOR 通路的激活。初步筛选出 DHM25,展现出对乳腺癌细胞强烈的抗肿瘤活性(对 PI3K 的 IC_{50} 为 1.768 $\mu\text{mol/L}$)。生物化学和细胞分析、建模、人类激酶组的酶活性测试结果表明,DHM25 是一种选择性的 mTOR 共价抑制剂,体内试验表明 DHM25 能够抑制三阴性乳腺癌细胞(triple negative breast cancer,TNBC)的生长和转移^[23]。目前,尚没有批准靶向治疗 TNBC 的药物^[24],TNBC 患者前 3 年病死率较高,这不仅是由于肿瘤细胞的强侵略性,更是由于该疾病缺乏针对性的治疗方案^[25],人们迫切需要针对该病症的针对性治疗方案。经金属蛋白酶水解后,可溶性 CD95L 通过激活非典型 PI3K/mTOR 信号通路,促进三阴性乳腺癌细胞转移的传播^[26]。DHM25 不仅能够在体外和体内杀死三阴性乳腺癌细胞,它还可以阻止暴露于无细胞毒性(低)浓度可溶性 CD95L 中的 TNBC 细胞的迁移。这表明,DHM25 单独或与经典的化疗组合,可能不仅是三阴性乳腺癌患者首选治疗方案,同时还能减少/防止高浓度的血清 CD95L 的三阴性乳腺癌患者的转移性发生的危险。



4 共价抑制剂的开发策略

研究抗肿瘤共价药物的研发过程,可总结归纳出此类药物的开发通常采用两种策略^[27]:一种是利用现有的非共价抑制剂结合结构导向设计;另一种是建立潜在的共价激酶抑制剂库和广泛的激酶

谱进而发现新的共价抑制剂。在实践中,这两种方法往往相辅相成交叉使用。

4.1 基于结构的共价抑制剂设计

早期报道的“基于灵感”的不可逆抑制剂,是通过在非共价抑制剂接近半胱氨酸、赖氨酸、苏氨酸或者酪氨酸残基的部分引入亲电基团进而构建出共价抑制剂。如 PD168393(第一代 EGFR 抑制剂)、FIIN-1 [成纤维细胞生长因子受体(fibroblast growth factor receptor, FGFR)抑制剂]、JH295(NEK2 抑制剂)、FMK(核糖体 S6 蛋白激酶抑制剂(ribosomal S6 kinase, RSK))、ibrutinib(BTK 抑制剂)、QL-47(BTK 抑制剂)等。随着激酶-配体复合物结构的广泛公布,这种共价药物设计方法的应用范围也愈发广泛。同样,这种方法也面临着挑战,一是如何找到既能够在微摩尔水平发生非共价键结合又能够在众多的激酶中呈现选择性的模板。二是获得一个骨架,使得引入的亲电基团与靶标亲核基团的相对位置契合^[10]。理想情况下,这种方法设计的化合物的亲电基团能够与激酶结合位点迅速形成共价键。

FIIN-1 的开发过程正是运用了这种方法^[28](图 5)。对已知的 ATP 竞争性 FGFR 抑制剂包括 Chir258、SU5402、SU6668、NP603 和 PD173074 的调查后,基于效力、选择性和与 FGFR 的共结晶结构的可获得性的考虑,最终选择了 PD173074 作为初始的可逆抑制剂(图 4)。结构检测显示 FGFR1 的

P loop 的 Cys486 距离 PD173074 吡啶的 N 原子大约 10 Å,可以作为一个亲核基团。模型研究表明,在嘧啶并嘧啶环的 1 位 N 原子上引入含有丙烯酰胺的苯基是一种合理的设计方案,为此设计了化合物 I,采用 KinomeScan 方法对 402 种激酶进行筛选,化合物 I 展现了较好的选择性,然而细胞活性为 1.5 μmol/L,相对于 PD173074 减少了 99.7%,这表明并没有共价键的形成。对化合物 I 进行结构改进,增加 1 个 C 原子,延长苯基弹头的长度得到化合物 II,其 EC₅₀ 为 400 nmol/L。对化合物 II 的结构进行进一步的改造,在核心骨架上引入常用的 2,6-二氯-3,5-二甲氧基片段得到 FIIN-1,其对 FGFR 依赖性细胞的 EC₅₀ 达到 14 nmol/L。目前,这种结构导向设计方法的主要不足在于成功率偏低。

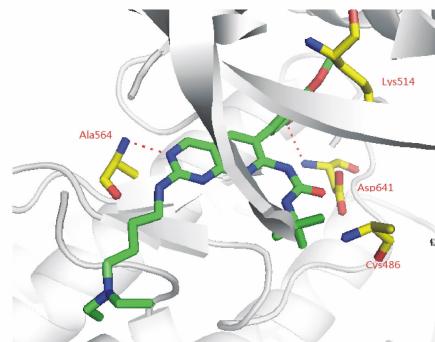


图 4 PD173074 与 FGFR 的作用模式图

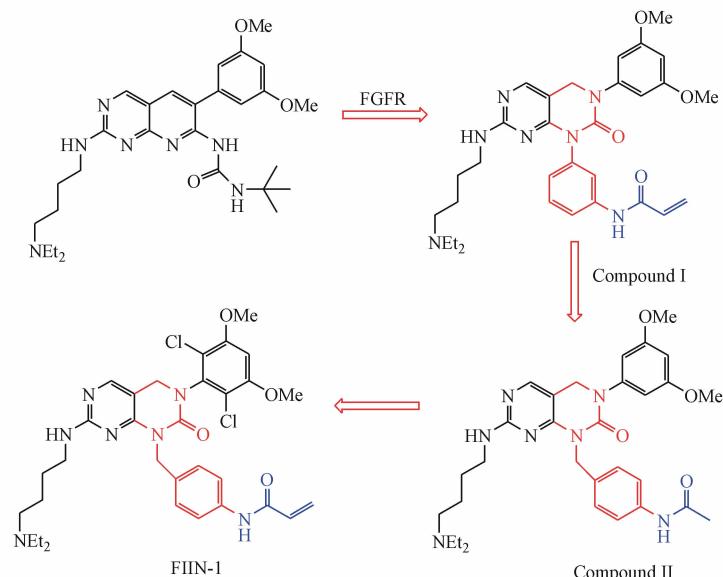
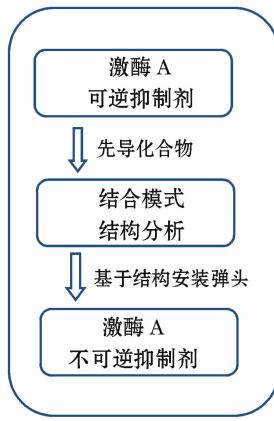


图 5 FIIN-1 的开发过程

4.2 基于数据的不可逆抑制剂设计

许多激酶抑制剂是在偶然观察到其交叉反应活性时发现的。大量的激酶分析数据表明,每一个化合物类别可以有效地靶向于特定的激酶类别。这些化合物可以非常小,如拉帕替尼相关的化合物,主要靶向EGFR家族,也可以非常大,如星形孢菌素相关化合物。

JNK-IN-8的开发过程是数据分析法的一个实施例子(图6)^[29]。广泛的数据分析表明,伊马替尼对Ab1、C-Kit、血小板源性生长因子受体(platelet-derived growth factor receptor, PDGF)、盘状结构

域受体1(discoidin domain receptor 1, DDR1)、盘状结构域受体2(discoidin domain receptor 1, DDR2)具有相对较高的亲和力,NK1,2,3和Raf具有中等亲和力。C-Kit和PDGFR均含有半胱氨酸,将伊马替尼的哌嗪环替换以使得能够接近半胱氨酸,从而发生共价作用^[31]。然而,数据分析表明该化合物也对JNK1,2,3具有抑制活性。对该化合物进行进一步的结构优化,利用结构-活性引导的方法将该化合物的吡啶嘧啶ATP官能团引入丙烯酰胺结构,发现了化合物JNK-IN-8(图7)。

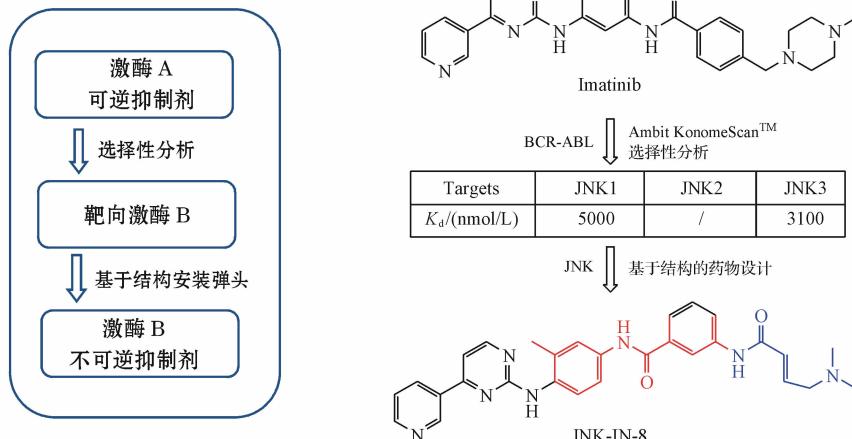


图6 JNK-IN-8 的开发过程

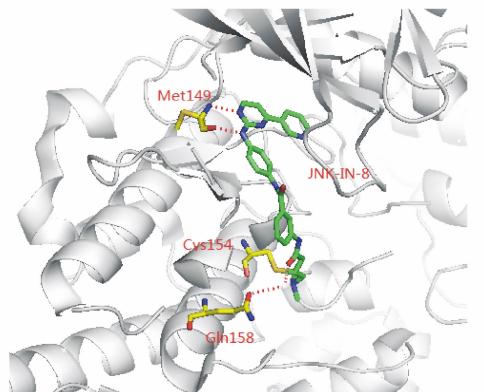


图7 JNK-IN-8 与 JNK 的结合模式图

5 结语

随着激酶抑制剂类抗肿瘤药物耐药问题的日益突出,科学家们正在重新审视共价药物的优势和不足。共价不可逆激酶抑制剂能与靶酶进行稳定的结合,在药效、药代动力学及抗耐药等方面具有

显著优势。近年来,通过合理药物设计获得共价不可逆激酶抑制剂已经成为抗肿瘤药物研究的热点,可以预见,今后10年共价药物仍将在化学药发现领域占据重要地位。

笔者所在课题组针对抗肿瘤药物重要靶标VEGFR-2进行研究。通过解析晶体结构,初步判断VEGFR-2铰链区的3个半胱氨酸(Cys1045、Cys919、Cys1024)可作为潜在的共价不可逆抑制剂结合位点。目前正在对先导化合物进行共价结合基团的引入和进一步结构优化,期望能得到具有高活性的KDR共价不可逆抑制剂,为获得具有自主知识产权的抗肿瘤候选药物奠定理论基础。

参考文献

- [1] Robertson JG. Enzymes as a special class of therapeutic target: clinical drugs and modes of action [J]. *Curr Opin Struct Biol*, 2007, 17(6):674-679.
- [2] Robertson JG. Mechanistic basis of enzyme-targeted drugs [J].

- Biochemistry, 2005, **44**(15) :5561 – 5571.
- [3] Singh J, Petter RC, Baillie TA, et al. The resurgence of covalent drugs[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2011, **10**(4) :307 – 317.
- [4] Johnson DS, Weerapana E, Cravatt BF. The synthesis of possible transition state analogue inhibitors of thymidine phosphorylase[J]. *Future Med Chem*, 2015(56) :406 – 409.
- [5] Kwak EL, Sordella R, Bell DW, et al. Irreversible inhibitors of the EGF receptor may circumvent acquired resistance to gefitinib [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, **102**(21) :7665 – 7670.
- [6] Butterworth S, Finlay MRV, Ward RA, et al. 2-(2,4,5-Substituted-anilino) pyrimidine derivatives as EGFR modulators useful for treating cancer: WO, 2013014448A [P]. 2012-01-31 [2016-01-06].
- [7] U. S. Food and Drug Administration. Osimertinib [EB/OL]. <http://www.fda.gov/Drugs/InformationOnDrugs/Approved-Drugs/ucm472565.htm>.
- [8] Ou SH. Second-generation irreversible epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitors (TKIs): a better mousetrap? A review of the clinical evidence[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2012, **83**(3) :407 – 421.
- [9] Honigberg LA, Smith AM, Sirisawad M, et al. The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 blocks B-cell activation and is efficacious in models of autoimmune disease and B-cell malignancy [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, **107**(29) :13075 – 13080.
- [10] Liu Q, Sabnis Y, Zhao Z, et al. Developing irreversible inhibitors of the protein kinase cyeistinome[J]. *Chem Biol*, 2013, **20**(2) :146 – 159.
- [11] Huang F, Zhu HJ, Zhou X, et al. Progress of bruton's tyrosine kinase (BTK) and its inhibitors[J]. *J China Pharm Univ(中国药科大学学报)*, 2014, **45**(6) :617 – 624.
- [12] Li D, Ambrogio L, Shimamura T, et al. BIBW2992, an irreversible EGFR/HER2 inhibitor highly effective in preclinical lung cancer models[J]. *Oncogene*, 2008, **27**(34) :4702 – 4711.
- [13] Giordano P, Manzo A, Montanino A, et al. Afatinib: an overview of its clinical development in non-small-cell lung cancer and other tumors[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2016, **97** :143 – 151.
- [14] Rabindran SK, Discipoli CM, Rosfjord EC, et al. Antitumor activity of HKI-272, an orally active, irreversible inhibitor of the HER-2 tyrosine kinase[J]. *Cancer Res*, 2004, **64**(11) :3958 – 3965.
- [15] Schwab CL, English DP, Black J, et al. Neratinib shows efficacy in the treatment of HER2 amplified carcinosarcoma *in vitro* and *in vivo*[J]. *Gynecol Oncol*, 2015, **139**(1) :112 – 117.
- [16] Korfage IJ, Essink-Bot ML, Westenberg SM, et al. How distressing is referral to colposcopy in cervical cancer screening [J]? *Gynecol Oncol*, 2014, **132**(1) :142 – 148.
- [17] Becker D, Walters Haygood CL, Smith B, et al. Survival and toxicity of a modified GOG 172 IP chemotherapy regimen in patients with ovarian, fallopian tube or primary peritoneal carcinoma[J]. *Gynecol Oncol*, 2015, **137**(1) :176 – 177.
- [18] Engelman JA, Zejnullah K, Gale CM, et al. PF00299804, an irreversible pan-erbB inhibitor, is effective in lung cancer models with EGFR and ERBB2 mutations that are resistant to gefitinib [J]. *Cancer Res*, 2007, **67**(24) :11924 – 11932.
- [19] Gonzales AJ, Hook KE, Althaus IW, et al. Antitumor activity and pharmacokinetic properties of PF-00299804, a second-generation irreversible pan-erbB receptor tyrosine kinase inhibitor[J]. *Mol Cancer Ther*, 2008, **7**(7) :1880 – 1889.
- [20] Matsuyama A, Arai R, Yashiroda Y, et al. ORFeome cloning and global analysis of protein localization in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* [J]. *Nat Biotechnol*, 2006, **24**(7) :841 – 847.
- [21] Evans E, Ponader S, Karp R, et al. Covalent inhibition of btk with clinical development compound AVL-292 disrupts signaling that maintains the microenvironment necessary for chronic lymphocytic leukemia growth[J]. *Cl Lymph Myelom Leuk*, 2011, **11**(2) :S173 – S174.
- [22] Wu H, Wang WC, Liu FY, et al. Discovery of a potent, covalent BTK inhibitor for B-cell lymphoma[J]. *ACS Chem Biol*, 2014, **9**(5) :1086 – 1091.
- [23] Janssen I. A study to investigate the effects of itraconazole on the pharmacokinetics of JNJ-42165279 in healthy male participants [EB/OL]. <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02065739>.
- [24] Fouqué A, Delalande O, Jean M, et al. A novel covalent mTOR inhibitor, DHM25, shows *in vivo* antitumor activity against triple-negative breast cancer cells[J]. *J Med Chem*, 2015, **58**(16) :6559 – 6573.
- [25] Peto R, Davies C, Godwin, et al. Comparisons between different polychemotherapy regimens for early breast cancer: meta-analyses of long-term outcome among 100,000 women in 123 randomised trials[J]. *Lancet*, 2012, **379**(9184) :432 – 444.
- [26] Malleter M, Tauzin S, Bessede A, et al. CD95L cell surface cleavage triggers a prometastatic signaling pathway in triple-negative breast cancer[J]. *Cancer Res*, 2013, **73**(22) :6711 – 6721.
- [27] Zhou W, Hur W, McDermott U, et al. A structure-guided approach to creating covalent FGFR inhibitors[J]. *Chem Biol*, 2010, **17**(3) :285 – 295.
- [28] Zhang T, Inesta-vaquera F, Niepel M, et al. Discovery of potent and selective covalent inhibitors of JNK[J]. *Chem Biol*, 2010, **19**(1) :140 – 154.
- [29] Leproult E, Barluenga S, Moras D, et al. Cysteine mapping in conformationally distinct kinase nucleotide binding sites: application to the design of selective covalent inhibitors[J]. *J Med Chem*, 2011, **54**(5) :1347 – 1355.