

## ALK抑制剂在NSCLC中的耐药机制及逆转策略的研究进展

张迪<sup>1,2</sup>, 冉冬芝<sup>1</sup>, 余瑜<sup>1</sup>, 甘宗捷<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>重庆医科大学药学院, 重庆 400016; <sup>2</sup>重庆食品药品检验检测研究院, 重庆 401121)

**摘要** 间变性淋巴瘤激酶(ALK)抑制剂是目前治疗NSCLC伴ALK阳性的有效药物,然而,耐药性的产生严重限制了其临床应用。本文对ALK抑制剂耐药产生的主要机制如二次基因突变、基因扩增、旁路通路激活等进行了简要介绍,并对联合用药、开发新型PROTAC降解剂等逆转耐药策略进行了综述,以期为ALK抑制剂药物的未来发展提供参考。

**关键词** 非小细胞肺癌;ALK抑制剂;耐药;逆转策略;进展

中图分类号 R914 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2020)06-0655-09

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.20200603

引用本文 张迪,冉冬芝,余瑜,等.ALK抑制剂在NSCLC中的耐药机制及逆转策略的研究进展[J].中国药科大学学报,2020,51(6):655-663.

Cite this article as: ZHANG Di, RAN Dongzhi, YU Yu, et al. Research progress of the resistance mechanism and reversal strategies of ALK inhibitors in NSCLC[J]. *J China Pharm Univ*, 2020, 51(6): 655-663.

## Research progress of the resistance mechanism and reversal strategies of ALK inhibitors in NSCLC

ZHANG Di<sup>1,2</sup>, RAN Dongzhi<sup>1</sup>, YU Yu<sup>1</sup>, GAN Zongjie<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>School of Pharmacy, Chongqing Medical University, Chongqing 400016;

<sup>2</sup>Chongqing Institute for Food and Drug Control, Chongqing 401121, China

**Abstract** Anaplastic lymphoma kinase (ALK) inhibitors are regarded as effective drugs for the treatment of ALK-positive NSCLC. However, the emergence of drug resistance has limited its further clinical application. This article briefly introduces the resistance mechanism of ALK inhibitors including acquired secondary mutations, gene amplification, bypass signaling pathway activation and reviews the recent advances on the reversal strategies such as drug combination, developing novel PROTACs to overcome drug resistance, so as to provide some reference for the development of ALK inhibitors.

**Key words** NSCLC; ALK inhibitors; drug resistance; reversal strategies; advances

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 21907013) and the Scientific and Technological Research Program of Chongqing Municipal Education Commission (No. KJQN201900431)

间变性淋巴瘤激酶(anaplastic lymphoma kinase, ALK)属于胰岛素受体(insulin receptor, IR)超家族,是一种高度保守的受体酪氨酸激酶。在成人中,ALK主要在神经系统、睾丸和小肠中表达并参与调控神经系统的功能和发育<sup>[1]</sup>。然而,已有研究表明,ALK的异常表达如基因突变、重排及

扩增与多种人类恶性肿瘤如神经母细胞瘤、非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)、卵巢癌等密切相关<sup>[2]</sup>。例如在NSCLC中,即检测到约3%~7%的NSCLC患者伴有ALK与棘皮动物微管结合蛋白4(Echinoderm micro tubule-associated protein-like 4, EML4)的基因融合突变<sup>[3]</sup>,而该融合

收稿日期 2020-02-25 \*通信作者 Tel:023-68485161 E-mail:gzy@cqmu.edu.cn

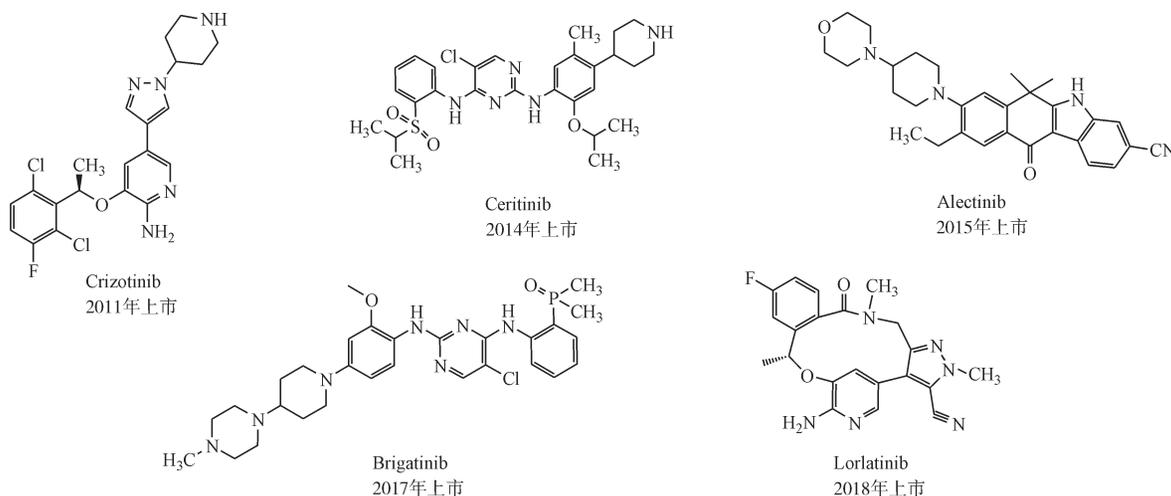
基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 21907013);重庆市教委科学技术研究资助项目(No. KJQN201900431)

基因编码形成的 EML4-ALK 嵌合蛋白会导致 ALK 二聚化,从而激活 ALK 及其下游 RAS/MEK/ERK 以及 JAKs/STAT3 等多种信号转导通路,促进细胞的快速增殖与分化,最终导致肿瘤的发生与发展<sup>[4]</sup>。因此,EML4-ALK 融合基因突变(也称为 ALK 阳性突变)已被证明是导致 NSCLC 的重要驱动基因突变之一,针对该靶点的 ALK 抑制剂的研发一直是当前热点之一<sup>[5-6]</sup>。

## 1 ALK 抑制剂

近年来,全球已研发出不少针对 ALK 的小分子靶向药物,其中,2011 年上市的克唑替尼(crizotinib)是治疗 ALK 依赖的 NSCLC 的第 1 个 ALK 抑制剂<sup>[7]</sup>,也是目前 NSCLC 伴 ALK 阳性患者公认的一线用药,但是由于 EML4-ALK 融合蛋白 ATP 口

袋附近发生的基因突变、基因扩增以及信号通路的旁路激活等因素影响,绝大部分患者在使用克唑替尼约 8~12 个月后即出现耐药<sup>[8]</sup>,限制了克唑替尼的临床使用。因此,针对克唑替尼的耐药,又开发了对 ALK 激酶专属性和亲和力更强的第 2 代 ALK 抑制剂色瑞替尼(certitinib),阿来替尼(alectinib),布格替尼(brigatinib)和第 3 代 ALK 抑制剂洛拉替尼(lorlatinib)。然而,尽管色瑞替尼、阿来替尼等第 2 代 ALK 抑制剂能够克服克唑替尼的耐药性,但是长期使用之后也会由于多种原因不可避免的获得性耐药<sup>[9]</sup>。即使是第 3 代 ALK 抑制剂洛拉替尼在临床使用过程中也被指出存在有耐药性问题<sup>[10]</sup>。因此,ALK 抑制剂的耐药问题,严重影响了其在临床上的应用。



## 2 ALK 抑制剂的耐药机制

目前公认的 ALK 抑制剂的耐药主要包括原发性耐药和获得性耐药,原发性耐药机制目前尚不明确,初步认为与肿瘤内在因素或患者/药物特异性因素有关<sup>[11]</sup>。而获得性耐药产生的机制则主要包括 ALK 依赖型和 ALK 非依赖型耐药<sup>[11-13]</sup>。

### 2.1 激酶结构域的二次基因突变

该机制已被证明与多种激酶类药物耐药的产生密切相关<sup>[14]</sup>,其机制主要是因为激酶结构域内的二次基因突变导致激酶与药物结合区的空间构象发生改变或者增强激酶与 ATP 的结合力,从而会影响药物与激酶的结合,致使耐药性的产生。研究表明,约有 20%~30% 的克唑替尼耐药患者体

内能够检测到二次基因突变,而在第 2 代 ALK 抑制剂耐药的 NSCLC 患者中,基因突变率更是超过了 50%<sup>[12]</sup>,因而二次基因突变已成为 NSCLC 肿瘤细胞对第 1 代、第 2 代 ALK 抑制剂耐药的主要原因。

不同 ALK 抑制剂诱发的二次突变区不甚相同,比如在克唑替尼耐药的患者中观察到,ALK 激酶域中位于 ATP 结合口袋底部的亮氨酸残基 L1196,会突变为蛋氨酸(Met),蛋氨酸更长的硫醚侧链会增加空间位阻,从而阻碍了克唑替尼与 ALK 激酶的结合,该突变也被称为 L1196M“守门员”突变。此外,位于 ATP 结合区的甘氨酸残基会点突变为位阻更大的缬氨酸,该突变(G1269A)也是引起克唑替尼耐药的主要突变之一<sup>[15]</sup>。而对于

第 2 代 ALK 抑制剂(如色瑞替尼、阿来替尼等),突变则主要发生在溶剂前沿区和  $\alpha$ C 螺旋的碳末端区,比如 G1202R、F1174L 突变等(图 1-A)<sup>[9]</sup>。其中,甘氨酸残基突变为体积更大的精氨酸的 G1202R 溶剂区突变是第 2 代 ALK 抑制剂最常见的

基因突变之一,占 35%~60%。该突变会引起色瑞替尼和阿来替尼结构中的哌啶环与激酶的结合障碍(图 1-B,图 1-C)<sup>[16]</sup>,而 F1174 突变则会促进 ALK 活化构象的产生,二者均不利于第 2 代抑制剂与 ALK 的结合,最终导致耐药的产生<sup>[17]</sup>。

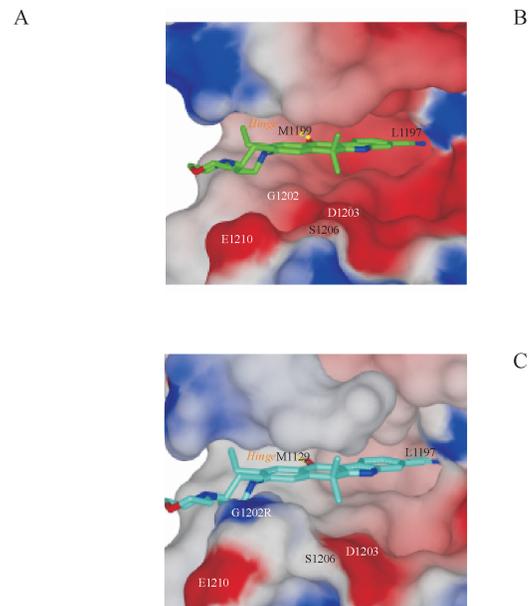
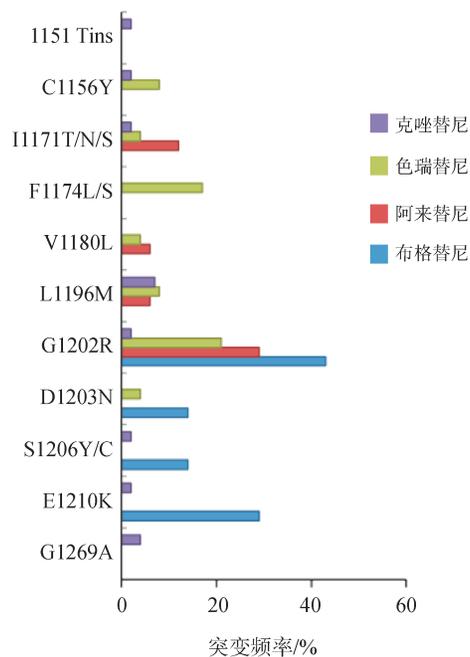


图 1 第 1 代、第 2 代 ALK 抑制剂诱发的常见二次基因突变

A: 各种基因突变的频率<sup>[9]</sup>; B: 阿来替尼与 ALK<sup>WT</sup>(PDB:3AOX) 的共晶结合模式图; C: 阿来替尼与 ALK G1202R 突变体的共晶结合模式图<sup>[16]</sup>

## 2.2 基因扩增与拷贝数增加

ALK 扩增目前仅在少部分克唑替尼耐药的患者发现,而且扩增的发生频率远低于二次突变,因此目前在临床上,基因扩增已不被认为是导致第 2 代及其之后开发的 ALK 抑制剂的主要耐药机制<sup>[15,18]</sup>。

## 2.3 旁路信号通路的激活

当 ALK 的信号通路被抑制之后,与其密切关联的其他肿瘤蛋白信号通路(如 EGFR、KIT、IGF1R 等)会因为反馈机制而补偿性激活<sup>[13]</sup>。比如,在克唑替尼耐药的细胞株上,就发现了表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)的异常磷酸化,其下游信号 ERK 和 Akt 也出现了异常活化,因而肿瘤细胞即使在 ALK 通路被阻滞之后,仍然可以继续增生与分化,继而导致了肿瘤对克唑替尼耐药<sup>[19]</sup>。

## 2.4 上皮细胞间质转化(epithelial mesenchymal transition, EMT)

肿瘤细胞表型的改变比如 EMT 会使肿瘤细胞获得间质形态并具有迁移和侵袭能力,这也被认为是导致肿瘤转移以及产生耐药的原因之一。研究发现<sup>[20]</sup>,在多种 ALK 抑制剂耐药肺癌细胞中可以观察到与 EMT 密切相关的间质标记物如波形蛋白(VIM)的表达上调,而上皮标志物如 E-钙黏蛋白会下调甚至消失,说明耐药的产生与 EMT 有一定关联。

除了以上几种耐药机制,药物转运蛋白 P 糖蛋白(P-glycoprotein)的过度表达导致的药物外排增加,从而使中枢神经系统(central nervous system, CNS)药物暴露量低引起 ALK 抑制剂的耐药也有文献报道<sup>[21]</sup>。因此,针对 ALK 抑制剂的耐药机制,临床上发展了多种策略来克服 ALK 抑制剂出现的

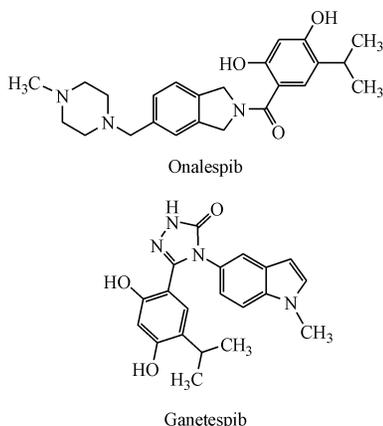
耐药性问题,并在一定程度上取得了积极的效果。

### 3 克服 ALK 抑制剂耐药策略

#### 3.1 与其他药物联用克服耐药

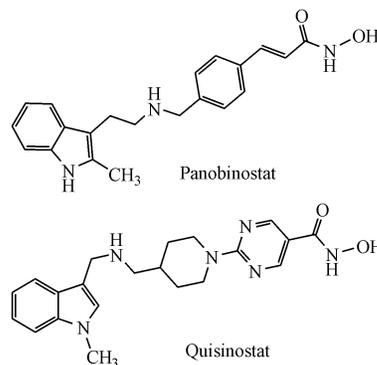
不同抗肿瘤药物的合理联用是目前临床上克服肿瘤耐药性的一种常用手段和方法<sup>[22-23]</sup>。目前已报道可以通过将 ALK 抑制剂与多种其他靶点的抗肿瘤药物联用来克服其存在的耐药性问题。

**3.1.1 与 Hsp90 抑制剂联用** 研究表明, EML4-ALK 融合蛋白是热休克蛋白 90(heat shock protein 90, Hsp90)高度敏感的客户蛋白,干扰该分子伴侣蛋白功能可以有效地降低 EML-ALK 的表达并抑制 ALK 的激酶活性<sup>[24]</sup>。因此, ALK 抑制剂与 Hsp90 抑制剂具有潜在的协同作用。Sang 等<sup>[25]</sup>就在体内和体外证实了将 Hsp90 抑制剂 Ganetespib 与克唑替尼合用,可以表现出优于克唑替尼的抗肿瘤活性,而且对多种耐药细胞如非小细胞肺癌 H3122 克唑替尼耐药细胞株, NB-39-nu 神经母细胞瘤细胞(ALK 扩增型)表现出更强的耐受性和抑制活性。目前,克唑替尼与 Hsp90 抑制剂 Onalespib 的联合用药已进入 II 期临床研究(NCT01712217),主要用于 NSCLC 的治疗<sup>[26]</sup>。因此,与 Hsp90 抑制剂合用是治疗多种 ALK 驱动的恶性肿瘤的潜在有效策略。

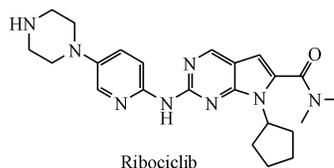


**3.1.2 与 HDAC 抑制剂联用** 2018 年, Yun 等<sup>[27]</sup>的团队从表观遗传学的角度报道了色瑞替尼的获得性耐药产生的作用机制,同时他们也发现,当色瑞替尼与组蛋白去乙酰化酶抑制剂(histone deacetylase inhibitor, HDACi)帕比司他(panobinostat)合用时,可以对 AXL 受体的磷酸化及表达产生抑制作用,同时也会下调与 EMT 密切相关的神

经-钙黏素(CDH2)、波形蛋白的表达,通过以上协同作用,增强了色瑞替尼对耐药细胞的敏感性及抑制活性,使其对 H3122 耐药细胞株及其体内小鼠移植瘤产生了强效的抑制作用,最终达到逆转耐药的目的。此外, Fukada 等<sup>[28]</sup>也开展了类似的研究工作,他们也发现 HDAC 抑制剂 Quisinostat 可以使克唑替尼对耐药细胞重新敏感。Shen 等<sup>[29]</sup>发现 HDAC8 亚型抑制剂 PCI-34051 与克唑替尼合用可以有效杀死 ALK 野生型、ALK 扩增型、ALK<sup>F1174L</sup> 突变型等神经母细胞瘤细胞株。

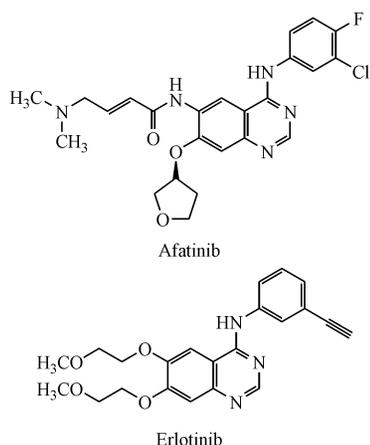


**3.1.3 与 CDK 抑制剂联用** 细胞周期蛋白依赖性激酶(cyclin dependent kinase, CDK)是多种细胞周期进程的主要调节因子,它能与相应的调节亚基细胞周期蛋白(cyclin)结合形成有活性的二聚体,参与细胞周期的调节<sup>[30]</sup>。前期研究表明<sup>[31]</sup>, ALK 抑制剂和 CDK 抑制剂联用可以协同降低两条信号通路中 p-ALK 和 p-Rb 的表达,增强 ALK 抑制剂对 ALK 的抑制活性及对耐药肿瘤细胞的敏感性,比如在 ALK-F1174L 和 F1245C 这两种全新耐药突变的异种神经母细胞瘤模型上,即发现 CDK4/6 的双重抑制剂瑞博西尼(ribociclib)和 ALK 抑制剂色瑞替尼的组合用药会显示出更高的细胞毒性和协同作用。与单用这两种药物相比,联合治疗可增强生长抑制、细胞周期阻滞和促进细胞死亡,并阻止耐药性的出现。



**3.1.4 与 EGFR 抑制剂联用** EGFR 通路的异常激活是导致肿瘤耐药的重要机制之一。在多种

ALK 抑制剂耐药细胞株及患者体内均发现,肿瘤细胞中的 NGR1-HER3-EGFR 这条信号通路被代偿性激活,因而肿瘤细胞即使在 ALK 信号通路被阻断之后仍可以通过其他信号通路增生分化,继而对 ALK 抑制剂产生了耐药<sup>[32]</sup>。因此,与 EGFR 抑制剂合用则可以同时阻断这两条信号通路,从而协同发挥抗肿瘤作用,提高治疗效果。例如 EGFR 抑制剂阿法替尼(afatinib)与色瑞替尼或者阿来替尼合用,就可以对 H3122 色瑞替尼耐药细胞株产生强效抑制作用<sup>[36]</sup>。此外,在同时具有 ALK 和 EGFR 突变的 NSCLC 患者体内也观察到,在使用 EGFR 抑制剂厄洛替尼(erlotinib)治疗后,可以使肿瘤细胞对 ALK 抑制剂也产生部分响应<sup>[33]</sup>。

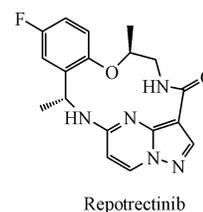


**3.1.5 与 PD-1 抑制剂联用** 最近几年,免疫治疗已成为抗肿瘤药物的研究热点。研究表明,如果 EML4-ALK 融合蛋白过表达,会在缺氧或者有氧状态下通过介导缺氧诱导因子 HIF-1 $\alpha$  和信号传导转录激活蛋白 STAT3 的上调,增加程序性死亡受体配体 1(programmed death ligand-1, PD-L1) 的表达,从而导致 T 细胞抑制,致使肿瘤细胞发生免疫逃逸<sup>[34]</sup>。因而 ALK 抑制剂和 PD-1/PD-L1 抑制剂联用,已被认为是治疗 NSCLC 特别是耐药型 NSCLC 的一种新选择<sup>[35]</sup>。目前,多种 PD-1/PD-L1 抑制剂如纳武单抗(nivolumab)和 Avelumab 与 ALK 抑制剂合用来治疗进展性 NSCLC 已进入临床研究(NCT02393625, NCT02584634)<sup>[36]</sup>。

### 3.2 通过合理设计新型药物分子克服耐药

**3.2.1 第 4 代 ALK 抑制剂 Repotrectinib (TPX-0005)**,是由美国 TP Therapeutics 公司研发的一种具有特殊环状结构的 ALK/ROS1/TRK/SRC 小分子

抑制剂,也被誉为第 4 代 ALK 抑制剂<sup>[37]</sup>。研究表明,Repotrectinib 对多种第 1 代、第 2 代 ALK 抑制剂产生的耐药突变如 L1196M 和 G1202R 等有效,抑制野生型、L1196M 突变型和 G1202R 突变型 ALK 的亲和力分别为 0.87, 0.65 和 0.81 nmol/L,对野生型 ALK 的抑制活性强于克唑替尼,对 G1202R 突变型 ALK 的抑制活性也强于所有第 2 代 ALK 抑制剂。Ba/F3 细胞增殖实验也验证了 TPX-0005 对各种突变型细胞株具有强效的抑制活性(野生型 IC<sub>50</sub> 21.1 nmol/L, L1196M 50 nmol/L 和 G1202R 20.5 nmol/L)<sup>[38]</sup>,而且,Repotrectinib 对克唑替尼难治性并且有脑转移的 NSCLC 也已被证明了有效<sup>[37]</sup>。研究表明,Repotrectinib 克服耐药的主要机制是通过抑制 SRC/FAK 信号通路,继而抑制肿瘤转录因子 YB-1 的磷酸化,导致 EGFR、CD44 和波形蛋白的表达下调,最终从多个角度阻碍肿瘤细胞的增生、分化和迁徙<sup>[39]</sup>。此外,由于其特殊的环状结构可以直接与 ATP 结合区结合,而不与溶剂区发生作用,因而可以有效克服 G1202R 等一系列突变<sup>[37]</sup>。目前 Repotrectinib 治疗 ROS1、NTRK、ALK 融合实体瘤的 I/II 期临床研究正在进行中,登记号 NCT03093116,结果令人期待。



**3.2.2 Type-II 型 ALK 抑制剂** 酪氨酸激酶的晶体结构表明,几乎所有酪氨酸激酶都具有相似的催化结构域。其中,在 ATP 结合位点附近,有一段由 3 个氨基酸形成的保守活性链段序列,天冬氨酸-苯丙氨酸-甘氨酸(Asp-Phe-Gly, DFG)。DFG 的构象非常关键,当 Asp 处于 ATP 结合位点附近的疏水腔外时,激酶处于活性构象(DFG-in),而当其位于激酶的内部时,激酶则处于非活性构象(DFG-out)<sup>[40]</sup>。因此,根据激酶是否处于活性构象,可以与其结合的抑制剂主要分为:Type-I 型和 Type-II 型<sup>[41]</sup>。其中 Type-I 型是指在激酶处于 DFG-in 构象时,与其 ATP 口袋结合的抑制剂,主要属于 ATP 竞争性的抑制剂。而 Type-II 型则是指在激酶处于非活性构象(DFG-out)时,主要与其变构位点

发生结合的抑制剂。此外,还有一种 Type- I 1/2 型抑制剂,是指在激酶处于活化构象时,同时也可与 II 型抑制剂主要结合部位发生结合的抑制剂。根据定义,前期开发的第 1 代、第 2 代抑制剂均属于 Type- I 型或 Type- I 1/2 型抑制剂<sup>[42]</sup>。由于 Type- I 型抑制剂主要与 ATP 区域的位点结合,而该位点处的氨基酸序列高度保守,导致此类抑制剂容易产生耐药性。而 Type- II 型抑制剂则未完全与 ATP 结合位点发生结合,因而虽然其对激酶亲和力弱于 I 型抑制剂,但是这也提高了它们对激酶的选择性,并且降低了耐药潜力<sup>[43]</sup>,因此开发

Type- II 型抑制剂也成为了获得不易产生耐药的抗肿瘤药物的新选择。Tu 等<sup>[44]</sup>就首次报道了一类新型的以吡唑啉为母核的 Type- II 型 ALK 抑制剂,其中化合物 **5a** 对 ALK 的体外抑制活性最强( $IC_{50} = 177 \text{ nmol/L}$ )。通过共晶结构分析发现(图 2),**5a** 结构中的 5-氨基吡唑啉环仍可以与 ALK 的铰链区形成氢键。但与克唑替尼不同的是,其结构中的丁基异噁唑脲基团会伸展到变构口袋中与变构位点结合,从而诱导 ALK 构象发生变化,最终表现出与克唑替尼不同的 ALK 结合模式。该项工作将为 Type- II 型 ALK 抑制剂的开发提供重要思路。

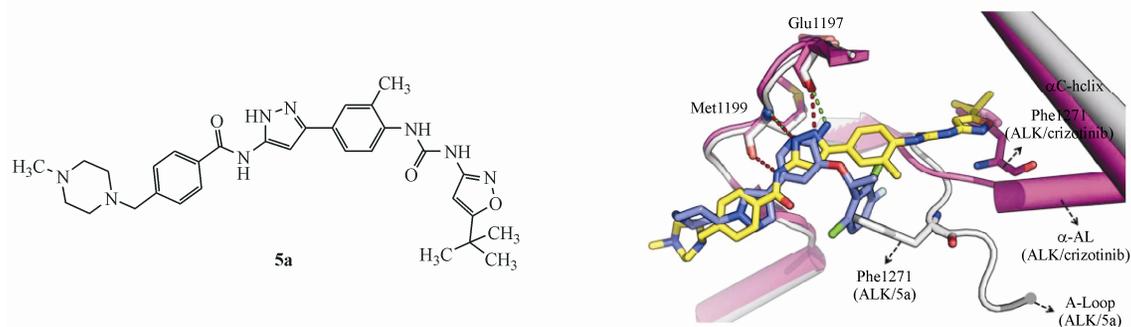
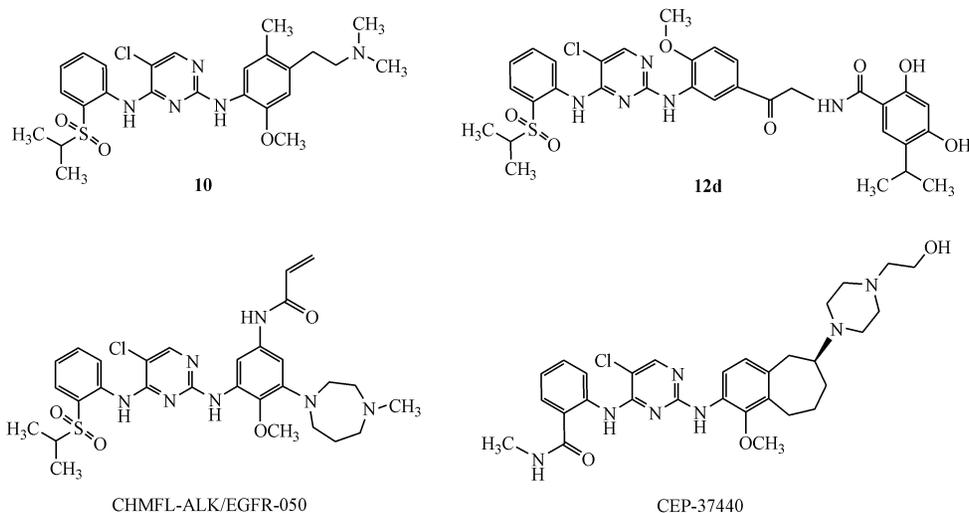


图 2 化合物 **5a**(黄色)、克唑替尼(蓝色)与 ALK 的共晶复合物叠合图(PDB:2XP2)<sup>[44]</sup>

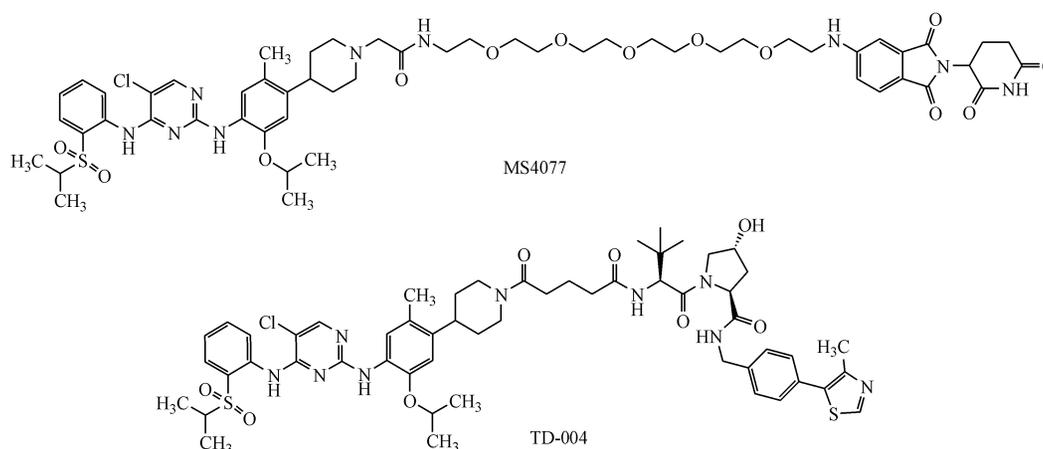
3.2.3 其他新型的 ALK 抑制剂 为了克服耐药,研究者也设计合成了一些新型的小分子抑制剂。比如针对 G1202R 激酶区突变导致的耐药,Mathi 等<sup>[45]</sup>和 Geng 等<sup>[46]</sup>用空间位阻更小的基团如柔性的脂肪胺或者甘氨酸侧链替换了色瑞替尼结构中的哌啶环(化合物 **10** 与 **12d**),增强了化合物与 G1202R 突变型 ALK 激酶的结合力,增加了疗效,并在一定程度上克服了耐药性。另外,鉴于 EGFR

与 ALK 抑制剂的协同作用,Chen 等<sup>[47]</sup>也报道了一种 ALK/EGFR 双重抑制剂 CHMFL-ALK/EGFR-050,该化合物在体内外展现了强效的肿瘤抑制活性。同时,CEP-37440<sup>[48]</sup>,一种 ALK/FAK 双靶点抑制剂,也被证实对各种突变型的 ALK 激酶均有效,而且该化合物具有更好的脑内药物暴露量,可能对脑转移的肿瘤患者具有潜在的治疗优势,目前该化合物已进入 I/II 期临床研究。



### 3.3 ALK 的 PROTAC 分子

蛋白降解靶向嵌合体 (proteolytic targeting chimera, PROTAC) 是一类能够通过诱导靶蛋白的多聚泛素化而导致靶蛋白降解的化合物。PROTAC 技术作为新兴的药物研发技术,已成为目前肿瘤治疗领域的研发热点。研究表明,通过设计合适的 PROTAC 分子可以在一定程度上克服小分子抑制剂的缺陷 (例如耐药)<sup>[49]</sup>。最近,也报道了许多以 ALK 为靶蛋白的 PROTAC 分子。2018 年, Zhang 等<sup>[50]</sup>以色瑞替尼作为 ALK 配体, PEG 作为连接链, 来拿度胺作为 E3 连接酶配体, 报道了



## 4 总结与展望

ALK 抑制剂作为目前 ALK 阳性 NSCLC 的主要治疗药物,改善了 NSCLC 的治疗模式,延长了广大病患的总生存期和无进展生存期,取得了良好的治疗效果。但是,原发性或获得性耐药的发生,使其在临床上的应用也受到了明显的限制。近年来,随着二次基因突变、旁路激活、上皮间质转化等耐药机制的不断明晰,已逐渐开发出针对这些耐药机制的多种治疗策略。例如,设计开发出可以克服基因突变的新 1 代 ALK 抑制剂或者将 ALK 抑制剂与多种化疗药物或免疫治疗药物联用。此外,利用 PROTAC 技术开发的靶向蛋白降解药物在解决耐药问题方面的潜力也备受关注。然而,虽然这些策略在一定程度上改善了 ALK 抑制剂的治疗效果,但均存在着或多或少的不足,比如新型的 ALK 抑制剂的研发周期过长、投入大,不能立即满足临床的迫切需求,而联合用药导致的不同药物之间潜在的相互作用以及药代动力学性质差异

等问题,不仅会降低疗效,而且可能会增强毒性。另外,PROTAC 药物分子结构过大,水溶性和 PK/PD 性质不佳,脱靶毒性严重等,也制约着该技术的进一步应用。因此,如何解决现有的关键问题,将很有可能是未来的研究热点和方向。

### 参 考 文 献

- [1] Morris SW, Kirstein MN, Valentine MB, *et al.* Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma[J]. *Science*, 1994, **263**(5151): 1281-1284.
- [2] Chiarle R, Voena C, Ambrogio C, *et al.* The anaplastic lymphoma kinase in the pathogenesis of cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2008, **8**(1): 11-23.
- [3] Sasaki T, Rodig SJ, Chirieac LR, *et al.* The biology and treatment of EML4-ALK non-small cell lung cancer[J]. *Eur J Cancer*, 2010, **46**(10): 1773-1780.
- [4] Soda M, Choi YL, Enomoto M, *et al.* Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer [J]. *Nature*, 2007, **448**(7153): 561-566.
- [5] Golding B, Luu A, Jones R, *et al.* The function and therapeutic

- targeting of anaplastic lymphoma kinase (ALK) in non-small cell lung cancer (NSCLC)[J].*Mol Cancer*, 2018, **17**(1): 1-15.
- [6] Roskoski R. Anaplastic lymphoma kinase (ALK) inhibitors in the treatment of ALK-driven lung cancers [J].*Pharmacol Res*, 2017, **117**: 343-356.
- [7] Kwak EL, Bang YJ, Camidge DR, et al. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer [J].*N Engl J Med*, 2010, **363**(18): 1693-1703.
- [8] Casalupe F, Sgambato A, Sacco PC, et al. Resistance to crizotinib in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) with ALK rearrangement: mechanisms, treatment strategies and new targeted therapies [J].*Curr Clin Pharmacol*, 2016, **11**(2): 77-87.
- [9] Gainor J, Dardaei L, Yoda S, et al. Molecular mechanisms of resistance to first- and second-generation ALK inhibitors in ALK-rearranged lung cancer [J].*Cancer Discov*, 2016, **6**(10): 1118-1133.
- [10] Shaw AT, Friboulet L, Leshchiner I, et al. Resensitization to crizotinib by the lorlatinib ALK resistance mutation L1198F [J].*N Engl J Med*, 2016, **374**(1): 54-61.
- [11] Yarden Y, Elkabets M. *Resistance to anti-cancer therapeutics targeting receptor tyrosine kinases and downstream pathways* [M]. Cham: Springer International Publishing, 2018.
- [12] Lin JJ, Riely GJ, Shaw AT. Targeting ALK: precision medicine takes on drug resistance [J].*Cancer Discov*, 2017, **7**(2): 137-155.
- [13] Kong X, Pan P, Sun H, et al. Drug discovery targeting anaplastic lymphoma kinase (ALK) [J].*J Med Chem*, 2019, **62**(24): 10927-10954.
- [14] Lin JJ, Shaw AT. Resisting resistance: targeted therapies in lung cancer [J].*Trends Cancer*, 2016, **2**(7): 350-364.
- [15] Doebele RC, Pilling AB, Aisner DL, et al. Mechanisms of resistance to crizotinib in patients with ALK gene rearranged non-small cell lung cancer [J].*Clin Cancer Res*, 2012, **18**(5): 1472-1482.
- [16] Katayama R, Shaw AT, Khan TM, et al. Mechanisms of acquired crizotinib resistance in ALK-rearranged lung cancers [J].*Sci Transl Med*, 2012, **4**(120): 120ra17.
- [17] Ou SHI, Azada M, Hsiang DJ, et al. Next-generation sequencing reveals a novel NSCLC ALK F1174V mutation and confirms ALK G1202R mutation confers high-level resistance to alectinib (CH5424802/RO5424802) in ALK-rearranged NSCLC patients who progressed on crizotinib [J].*J Thorac Oncol*, 2014, **9**(4): 549-553.
- [18] Jamme P, Descarpentries C, Gervais R, et al. Relevance of detection of mechanisms of resistance to ALK inhibitors in ALK-rearranged NSCLC in routine practice [J].*Clin Lung Cancer*, 2019, **20**(4): 297-304.
- [19] Yamaguchi N, Lucena-Araujo AR, Nakayama S, et al. Dual ALK and EGFR inhibition targets a mechanism of acquired resistance to the tyrosine kinase inhibitor crizotinib in ALK rearranged lung cancer [J].*Lung Cancer*, 2014, **83**(1): 37-43.
- [20] Kim HR, Kim WS, Choi YJ, et al. Epithelial-mesenchymal transition leads to crizotinib resistance in H2228 lung cancer cells with EML4-ALK translocation [J].*Mol Oncol*, 2013, **7**(6): 1093-1102.
- [21] Katayama R, Sakashita T, Yanagitani N, et al. P-glycoprotein mediates ceritinib resistance in anaplastic lymphoma kinase-rearranged non-small cell lung cancer [J].*EBioMedicine*, 2016, **3**: 54-66.
- [22] Nijenhuis CM, Haanen JB, Schellens JH, et al. Is combination therapy the next step to overcome resistance and reduce toxicities in melanoma [J]? *Cancer Treat Rev*, 2013, **39**(4): 305-312.
- [23] Shi JY, Bai Y, Peng KW, et al. Research progress of PARP-1 inhibitors in combination with other drugs to overcome drug resistance [J].*J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2019, **50**(5): 523-530.
- [24] Chen Z, Sasaki T, Tan X, et al. Inhibition of ALK, PI3K/MEK, and HSP90 in murine lung adenocarcinoma induced by EML4-ALK fusion oncogene [J].*Cancer Res*, 2010, **70**(23): 9827-9836.
- [25] Sang J, Acquaviva J, Friedland JC, et al. Targeted inhibition of the molecular chaperone Hsp90 overcomes ALK inhibitor resistance in non-small cell lung cancer [J].*Cancer Discov*, 2013, **3**(4): 430-443.
- [26] Jhaveri K, Ochiana SO, Dunphy MP, et al. Heat shock protein 90 inhibitors in the treatment of cancer: current status and future directions [J].*Expert Opin Investig Drugs*, 2014, **23**(5): 611-628.
- [27] Yun MR, Lim SM, Kim SK, et al. Enhancer remodeling and MicroRNA alterations are associated with acquired resistance to ALK inhibitors [J].*Cancer Res*, 2018, **78**(12): 3350-3362.
- [28] Fukuda K, Takeuchi S, Katayama R, et al. HDAC inhibition overcomes crizotinib-resistance by mesenchymal-epithelial transition (MET) in EML4-ALK lung cancer cells [J].*J Thorac Oncol*, 2017, **12**(1): S382-S383.
- [29] Shen J, Najafi S, Stable S, et al. A kinome-wide RNAi screen identifies ALK as a target to sensitize neuroblastoma cells for HDAC8-inhibitor treatment [J].*Cell Death Differ*, 2018, **25**(12): 2053-2070.
- [30] Asghar U, Witkiewicz AK, Turner NC, et al. The history and future of targeting cyclin-dependent kinases in cancer therapy [J].*Nat Rev Drug Discov*, 2015, **14**(2): 130-146.
- [31] Wood AC, Krytska K, Ryles HT, et al. Dual ALK and CDK4/6 inhibition demonstrates synergy against neuroblastoma [J].*Clin Cancer Res*, 2017, **23**(11): 2856-2868.
- [32] Isozaki H, Ichihara E, Takigawa N, et al. Non-small cell lung cancer cells acquire resistance to the ALK inhibitor alectinib by activating alternative receptor tyrosine kinases [J].*Cancer*

- Res*, 2016, **76**(6): 1506–1516.
- [33] Sasaki T, Koivunen J, Oginio A, *et al.* A novel ALK secondary mutation and EGFR signaling cause resistance to ALK kinase inhibitors[J]. *Cancer Res*, 2011, **71**(18): 6051–6060.
- [34] Koh J, Jang JY, Keam B, *et al.* EML4-ALK enhances programmed cell death-ligand 1 expression in pulmonary adenocarcinoma via hypoxia-inducible factor (HIF)-1 $\alpha$  and STAT3[J]. *Oncoimmunology*, 2016, **5**(3): e1108514.
- [35] Bylicki O, Paleiron N, Margery J, *et al.* Targeting the PD-1/PD-L1 immune checkpoint in EGFR-mutated or ALK-translocated non-small-cell lung cancer[J]. *Target Oncol*, 2017, **12**(5): 563–569.
- [36] Felip E, de Braud FG, Maur M, *et al.* Ceritinib plus nivolumab (NIVO) in patients (pts) with anaplastic lymphoma kinase positive (ALK<sup>+</sup>) advanced non-small cell lung cancer (NSCLC)[J]. *J Clin Oncol*, 2017, **35**(15\_suppl): 2502.
- [37] Drilon A, Ou SI, Cho BC, *et al.* Repotrectinib (TPX-0005) is a next-generation ROS<sub>1</sub>/TRK/ALK inhibitor that potently inhibits ROS<sub>1</sub>/TRK/ALK solvent-front mutations [J]. *Cancer Discov*, 2018, **8**(10): 1227–1236.
- [38] Cui JJ, Zhai D, Deng W, *et al.* TPX-0005, a novel ALK/ROS<sub>1</sub>/TRK inhibitor, effectively inhibited a broad spectrum of mutations including solvent front ALK G1202R, ROS1 G2032R and TRKA G595R mutants[J]. *Eur J Cancer*, 2016, **69**: S32.
- [39] Zhai DY, Deng W, Huang J, *et al.* Abstract 3161: TPX-0005, an ALK/ROS<sub>1</sub>/TRK inhibitor, overcomes multiple resistance mechanisms by targeting SRC/FAK signaling[C]. *Cancer Res*, 2017, **77**(13\_suppl): 3161.
- [40] Xu M. Predicting inactive conformations of protein kinases (蛋白激酶非活性构象的预测方法研究)[D]. Shanghai: Fudan University, 2019.
- [41] Blanc J, Geney R, Menet C. Type II kinase inhibitors: an opportunity in cancer for rational design[J]. *Anti-Cancer Agents Med Chem*, 2013, **13**(5): 731–747.
- [42] Pan P, Yu H, Liu Q, *et al.* Combating drug-resistant mutants of anaplastic lymphoma kinase with potent and selective type-II/2 inhibitors by stabilizing unique DFG-shifted loop conformation [J]. *ACS Cent Sci*, 2017, **3**(11): 1208–1220.
- [43] Zhao Z, Wu H, Wang L, *et al.* Exploration of type II binding mode: a privileged approach for kinase inhibitor focused drug discovery[J]. *ACS Chem Biol*, 2014, **9**(6): 1230–1241.
- [44] Tu CH, Lin WH, Peng YH, *et al.* Pyrazolylamine derivatives reveal the conformational switching between type I and type II binding modes of anaplastic lymphoma kinase (ALK) [J]. *J Med Chem*, 2016, **59**(8): 3906–3919.
- [45] Mathi GR, Kang CH, Lee HK, *et al.* Replacing the terminal piperidine in ceritinib with aliphatic amines confers activities against crizotinib-resistant mutants including G1202R [J]. *Eur J Med Chem*, 2017, **126**: 536–549.
- [46] Geng K, Xia Z, Ji Y, *et al.* Discovery of 2,4-diarylamino pyrimidines bearing a resorcinol motif as novel ALK inhibitors to overcome the G1202R resistant mutation [J]. *Eur J Med Chem*, 2018, **144**: 386–397.
- [47] Chen YF, Wu JX, Wang AL, *et al.* Discovery of *N*-(5-((5-chloro-4-(2-(isopropylsulfonyl) phenyl) amino) pyrimidin-2-yl) amino)-4-methoxy-2-(4-methyl-1,4-diazepan-1-yl) phenyl) acrylamide (CHMFL-ALK/EGFR-050) as a potent ALK/EGFR dual kinase inhibitor capable of overcoming a variety of ALK/EGFR associated drug resistant mutants in NSCLC [J]. *Eur J Med Chem*, 2017, **139**: 674–697.
- [48] Ott GR, Cheng M, Learn KS, *et al.* Discovery of clinical candidate CEP-37440, a selective inhibitor of focal adhesion kinase (FAK) and anaplastic lymphoma kinase (ALK) [J]. *J Med Chem*, 2016, **59**(16): 7478–7496.
- [49] Sun X, Rao Y. PROTACs as potential therapeutic agents for cancer drug resistance [J]. *Biochemistry*, 2020, **59**(3): 240–249.
- [50] Zhang C, Han X, Yang X, *et al.* Proteolysis targeting chimeras (PROTACs) of anaplastic lymphoma kinase (ALK) [J]. *Eur J Med Chem*, 2018, **151**: 304–314.
- [51] Kang CH, Lee DH, Lee CO, *et al.* Induced protein degradation of anaplastic lymphoma kinase (ALK) by proteolysis targeting chimera (PROTAC) [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, **505**(2): 542–547.