

学校编码: 10384

分类号____密级____

学号: 21620141152592

UDC____

廈門大學

碩 士 學 位 論 文

酪氨酸激酶 RET 的小分子抑制剂研究

Discovery of small molecule inhibitors
of tyrosine kinase RET

杨燕茹

指导教师姓名: 邓贤明教授

专业名称: 转化医学

论文提交日期: 2017 年 4 月

论文答辩时间: 2017 年 5 月

学位授予日期:

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2017 年 5 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为（）课题（组）的研究成果，获得（）课题（组）经费或实验室的资助，在（）实验室完成。（请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。）

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月

目录

中文摘要

Abstract

中英文缩略词

第一章 前言	1
1.1 Ba/F3 激酶小分子抑制剂筛选系统	1
1.1.1 Ba/F3 细胞的特点	1
1.1.2 Ba/F3 激酶系统	1
1.2 RET 的概述	3
1.2.1 RET 受体酪氨酸激酶概述	3
1.2.2 RET 的配体	5
1.2.3 RET 相关信号通路	6
1.2.4 RET 的基因重组	8
1.2.5 RET 的点突变	10
1.2.6 RET 的抑制剂	12
1.2.7 针对 RET 的其他治疗方式	13
1.2.8 RET 研究展望	14
1.3 课题研究背景与目的	15
第二章 材料与方法	16
2.1 材料	16
2.1.1 化合物	16
2.1.2 细胞株及其来源	16
2.1.3 菌株	16
2.1.4 质粒及其来源	16
2.1.5 药品及试剂盒	17
2.1.6 主要试剂的配制	19

2.1.7 耗材和仪器.....	22
2.2 实验方法	24
2.2.1 载体构建.....	24
2.2.2 细胞复苏、传代与冻存.....	29
2.2.3 细胞转染.....	30
2.2.4 RT-PCR.....	32
2.2.5 细胞存活率的测定.....	34
2.2.6 细胞凋亡的检测.....	36
2.2.7 Western blot	36
第三章 结果与分析	39
3.1 依赖 RET 激酶的 Ba/F3 稳转细胞系的构建.....	39
3.1.1 瞬转验证 RET 系列质粒能够正常表达.....	39
3.1.2 稳转过程结果.....	40
3.1.3 RNA 水平验证确定稳转株的正确性.....	41
3.1.4 蛋白水平验证确定稳转株的正确性.....	41
3.2 化合物筛选获得激酶 RET 的小分子抑制剂.....	42
3.2.1 从 600 多种化合物中筛选得到 3 种活性较好的化合物.....	42
3.2.2 进一步改造后从 150 个化合物中筛选获得 5 个活性更好的化合物.....	44
3.3 5 个化合物在蛋白水平均对激酶 RET 有抑制作用	46
3.4 化合物 YZY002 可以引起 CCDC6-RET Ba/F3 细胞凋亡.....	54
第四章 小结与讨论	55
参考文献	62
附录.....	68
致谢.....	103

Table of Contents

Abstract in Chinese

Abstract in English

Abbreviation

Chapter 1 Introduction1

1.1 TK-Ba/F3 screening platform for drug discovery 1

1.1.1 Characteristics of Ba/F3 1

1.1.2 TK-Ba/F3 system 1

1.2 Overview of RET.....3

1.2.1 RET receptor tyrosine kinase 3

1.2.2 Ligands of RET 5

1.2.3 Related signal paths of RET 6

1.2.4 Gene recombinations of RET 8

1.2.5 Point mutations of RET 10

1.2.6 Inhibitors of RET 12

1.2.7 Other treatments for RET 13

1.2.8 Research Prospects for RET 14

1.3 Background and purpose of this thesis15

Chapter 2 Materials and Methods16

2.1 Materials 16

2.1.1 Compounds 16

2.1.2 Cell lines and their sources 16

2.1.3 Strains 16

2.1.4 Plasmids and their sources 16

2.1.5 Reagents and kits 17

2.1.6 Preparation of major solutions 19

2.1.7 Consumables and apparatuses 22

2.2 Methods.....24

2.2.1	Construct of vectors	24
2.2.2	Resuscitation and passage and cryopreservation of cells	29
2.2.3	Transfection	30
2.2.4	RT-PCR.....	32
2.2.5	Measure of cell survival.....	34
2.2.6	Measure of apoptosis	36
2.2.7	Western blot	36
Chapter 3 Results and Analysis.....		39
3.1 Construct of RET positive Ba/F3 cells		39
3.1.1	Transient transfection confirmed that the RET vectors could be expressed normally	39
3.1.2	Stable transfection process is normal.....	40
3.1.3	Validate the correctness of RET positive Ba/F3 cell lines at RNA level	41
3.1.4	Validate the correctness of RET positive Ba/F3 cell lines at molecule level...	41
3.2 Screened compounds and obtained small molecule inhibitors of RET		42
3.2.1	Three compounds with better activity were obtained from more than 600 compounds	42
3.2.2	Five compounds with better activity were obtained from 150 compounds after further modification	44
3.3 Five compounds all inhibited RET at the protein level		46
3.4 Compound YZY002 can induce apoptosis of CCDC6-RET Ba/F3 cells.....		54
Chapter 4 Summary and discussion		55
References		62
Appendix.....		68
Acknowledgments		103

中文摘要

RET (The REarranged during Transfection) 是一种受体酪氨酸激酶, 与细胞增殖、迁移、分化及神经嵴细胞的生存、肾脏器官的形成、精子发生等过程的信号转导有关。其异常表达、突变和重组与多种癌症的发生发展密切相关, 如乳头状甲状腺癌、多发性内分泌腺瘤病 2 型、髓样甲状腺癌、嗜铬细胞瘤和甲状腺旁腺瘤等。在肺癌方面, RET 基因的异常重组 KIF5B-RET 和 CCDC6-RET 与约 1~2% 的肺腺癌相关, 其中 KIF5B-RET 更是占到了其中 70~90% 的比例, CCDC6-RET 约占 10~25%。然而, 至今还没有特异性的 RET 小分子抑制剂的报道, 因此发展高活性、高选择性的 RET 抑制剂具有十分重要的意义。

本课题以酪氨酸激酶 RET 为靶点, 针对其异常基因重组 KIF5B-RET 和 CCDC6-RET 展开研究。我们首先构建了包含 6 株稳转 RET 融合基因及其点突变的 Ba/F3 细胞作为 RET 抑制剂的靶向细胞毒筛选平台。利用该平台, 我们对实验室化合物库中的 750 个小分子化合物进行了抑制 RET 活性初筛, 再利用野生型 Ba/F3 细胞进行选择评价, 最终得到以下 5 个具有良好的抑制 RET 活性和选择性的化合物: HZX125、YZY002、ZT043、LXY027、LXY052 对 CCDC6-RET Ba/F3 的 IC_{50} 分别是 12.29 nmol/L、34.58 nmol/L、54.39 nmol/L、20.66 nmol/L、53.72 nmol/L; 对 KIF5B-RET Ba/F3 的 IC_{50} 分别是 12.66 nmol/L、32.73 nmol/L、74.14 nmol/L、85.70 nmol/L、74.29 nmol/L; 而阳性化合物 Cabozantinib 对 CCDC6-RET Ba/F3 和 KIF5B-RET Ba/F3 的 IC_{50} 分别是 226.5 nmol/L 和 301.8 nmol/L。分子水平的实验进一步验证了它们对激酶 RET 具有显著的抑制作用, 5 个化合物中活性最好的 HZX125 在 0.1 μ mol/L 水平即能完全抑制 RET 的磷酸化, 而其他 4 个也能在 0.5 μ mol/L 即完全抑制 RET 的磷酸化。通过流式细胞初步分析表明 YZY002 引起 CCDC6-RET Ba/F3 细胞的死亡是通过凋亡途径。

综上, 本论文建立了 RET 的靶向细胞毒筛选模型, 通过筛选获得了 5 个结构各异, 具有良好活性和选择性的 RET 小分子抑制剂。这些化合物为进一步发展 RET 的靶向药物提供了先导化合物, 为发展 RET 相关肿瘤的靶向治疗奠定了

基础。

关键词：RET；小分子抑制剂；筛选

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Abstract

The REarranged during Transfection (RET) receptor protein was one of the first Receptor tyrosine kinases (RTKs) that play a role in neoplasia. Expressed primarily in neural crest-derived and urogenital cells, RET is thought to be involved in the signal transduction required for proliferation, migration, differentiation and survival of neural crest cells, kidney organogenesis and spermatogenesis. Aberrant RET expression or mutation was found in multiple human diseases such as papillary thyroid carcinoma (PTC), multiple endocrine neoplasia type 2 (MEN 2), an inherited cancer syndrome characterised by medullary thyroid carcinoma (MTC), pheochromocytoma, and parathyroid adenomas. RET aberrant fusions, KIF5B-RET and CCDC6-RET, contribute approximately 1.2% to 2.0% patients in Lung adenocarcinoma (LADC). Among them, KIF5B-RET is the major subtype, which presents in approximately 70% to 90% of cases reported to date. Meanwhile, CCDC6-RET presents in approximately 10% to 25%. There's no specific small molecule inhibitor of RET reported till now. It's an urgent need to develop highly potent and selective RET inhibitors.

In this study, to discovery RET inhibitors, we firstly developed a targeted differential cytotoxic screening platform containing six kinds of Ba/F3 cells which stably transfected RET fusion genes including CCDC6-RET, KIF5B-RET, CCDC6-RET[V804M], KIF5B-RET[V804M], CCDC6-RET[M918T] and KIF5B-RET[M918T], respectively. With this platform in hand, we carried out a large-scale anti-RET activity screen using an in-house compound library with 750 small molecules, followed by a counter screen to exclude the general cytotoxicity using wild-type Ba/F3 cells. Finally, we successfully identified five potential specific RET inhibitors with good anti-RET activity and selectivity, including HZX125,

YZY002, ZT043, LXY027, and LXY052. Their antiproliferative IC₅₀ values against CCDC6-RET Ba/F3 were 12.29 nmol/L, 34.58 nmol/L, 54.39 nmol/L, 20.66 nmol/L and 53.72 nmol/L, respectively. And the IC₅₀ values against KIF5B-RET Ba/F3 were 12.66 nmol/L, 32.73 nmol/L, 74.14 nmol/L, 85.70 nmol/L and 74.29 nmol/L, respectively. While, the positive control compound Cabozantinib exhibited antiproliferative IC₅₀ values of 226.5 nmol/L and 301.8 nmol/L against CCDC6-RET Ba/F3 and KIF5B-RET Ba/F3, respectively. The molecular level experiments further confirmed that they had significant inhibitory effect on RET signaling. Among the five compounds, HZX125 could completely inhibit the phosphorylation of RET at a concentration of 0.1 μmol/L, while the other four were active at the concentration of 0.5 μmol/L. Additionally, our FACS data showed that YZY002 induced CCDC6-RET Ba/F3 cell death via apoptosis pathway.

In summary, in this thesis we have established a RET-targeted screening platform and identified five potent and selective small molecule inhibitors of RET. These inhibitors will serve as good starting-points for medicinal development of RET-targeted therapy, which have potential applications for RET-related cancers.

Key words : RET; Small molecule inhibitors; screening

中英文缩略词

缩写	英文全称	中文全称
Amp	Ampicillin	氨苄青霉素
APS	Ammonium persulfate	过硫酸氨
BSA	Bovine serum albumin	牛血清白蛋白
ddH ₂ O	Double distilled water	双蒸水
DMEM	Dulbecco's modified of Eagle's medium	细胞培养液
DMSO	Dimethylsulfoxide	二甲基亚砷
Dok1/4/5/6	downstream of kinase 1/4/5/6	下游激酶 1/4/5/6
dNTP	Deoxyribonucleoside triphosphate	脱氧核糖核苷三磷酸
EB	Ethidium bromide	溴化乙锭
EGFR	Epidermal growth factor receptor	表皮生长因子受体
ECL	Enhanced chemiluminescent	免疫印迹化学发光
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid	乙二胺四乙酸
ERK	Extracellular signal regulated kinase	胞外信号调节激酶
FBS	Fetal bovine serum	胎牛血清
FITC	Fluoresceine isothiocyanate	异硫氰酸荧光素
GDNF	Glial cell- derived neurotrophic factor	胶质细胞源性神经营养因子
GFLs	The GDNF family of ligands	胶质细胞源性神经营养因子家族配体
HBS	HEPES buffered solution	HEPES 缓冲液
HEPES	2-hydroxyethyl	羟乙基哌嗪乙硫磺酸
IC ₅₀	Half maximal inhibitory concentration	半抑制浓度
IL-3	Interleukin 3	白介素 3
IRS1/2	insulin receptor substrate 1/2	胰岛素受体底物 1/2

JAK	Janus Kinase	雅努斯激酶
mg	Milligram	毫克
min	Minute	分钟
mL	Milliliter	毫升
MEN 2A/2B	Multiple endocrine neoplasia	多发性内分泌瘤病 2 型
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium	3-(4, 5- 二 甲 基 噻 唑 -2-基)-5-(3-羧甲氧基苯)-2-(4-磺苯基)-2H-四唑
MTC	Medullary thyroid cancer	髓样甲状腺癌
nM	Nanomole	纳摩尔每升
OD	Optical density	光密度
PBS	Phosphate-buffered saline buffer	磷酸缓冲液
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
PDGFR	platelet-derived growth factor receptor	血小板源性生长因子受体
PEI	Polyethylenimine	聚乙烯亚胺
PKC α	protein kinase C α	蛋白激酶 C α
PES	Phenazine methosulfate	吩嗪硫酸甲酯
PH	Pondus hydrogenii	酸度值
PI	Propidium iodide	碘化丙啶
PTC	Papillary thyroid cancer	乳头状甲状腺癌
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase	磷脂酰肌醇 3-激酶
PLC- γ	Phospholipase C- γ	磷脂酶 C- γ
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride	苯甲基磺酰氟
PVDF	Polyvinylidene difluoride	聚偏二氟乙烯
RET	REarranged during Transfection	转染重组
RPMI	Roswell Park Memorial Institute	细胞培养液
RTK	Receptor tyrosine kinase	受体酪氨酸激酶
s	Second	秒

Shank3	multiple ankyrin repeat domains 3	多个锚蛋白重复结构域 3
SDS	Sodium dodecyl sulfonate	十二烷基磺酸钠
STAT3	Signal transducer and activator of transcription	信号转导与转录激活因子
Shc	Srchomology collagen	高血压胶原蛋白
SNT/FRS2	fibroblast growth factor receptor substrate 2	成纤维细胞生长因子受体底物 2
TEMED	Tetramethylethylenediamine	四甲基乙二胺
TK	Tyrosine kinase	酪氨酸激酶
TKI	Tyrosine kinase inhibitors	酪氨酸激酶抑制剂
Tris	Hydroxymethyl-aminomethane	三羟甲基氨基甲烷
μL	Microliter	微升
μM	Micromole	微摩尔每升
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor	血管内皮细胞生长因子受体

第一章 前言

1.1 Ba/F3 激酶小分子抑制剂筛选系统

Ba/F3 是鼠源的造血细胞系，培养条件下需要依赖白介素 3(interleukin 3, IL-3) 而存活，该细胞最早是由 Palacios 和 Steinmetz 从 BALB/c 小鼠的骨髓中分离而得^[1]。1988 年，Daley 和 Baltimore 用实验证明利用反转录病毒可以介导酪氨酸激酶 Bcr-Abl 在细胞内的表达。他们还首次发现在转染融合酪氨酸激酶到 Ba/F3 细胞内的条件下，该细胞在缺乏 IL-3 的情况下也能存活^[2]。这项实验的成功使得 Ba/F3 细胞成为癌症研究中的重要工具，尤其是癌基因及其突变的研究和与之相应的小分子激酶抑制剂的筛选。

1.1.1 Ba/F3 细胞的特点

Ba/F3 细胞具有以下三个特点使之成为癌症研究的有效工具^[3]：第一，Ba/F3 细胞是悬浮细胞，其较快的生长速度能够有效缩短实验周期，从而提高实验效率；第二，Ba/F3 细胞可适应慢病毒转染、反转录病毒转染以及电穿孔转染等多种转染方式，对于构建稳定表达外源基因的稳转系细胞非常有利；第三，野生型 Ba/F3 细胞必须依赖 IL-3 才能存活和生长，但是能够稳定表达持续性激活的酪氨酸激酶或者其他癌基因的 Ba/F3 细胞则可以依赖激酶活性存活，从而脱离 IL-3，如 Bcr-Abl、NPM-Alk 和 Flt3^[2, 4, 5]。因此，Ba/F3 被广泛地应用于多种激酶及其突变以及对应的下游信号通路的研究。除此之外，Ba/F3 还有多种用途，例如用于评价激酶小分子抑制剂的体内和体外活性，获取激酶对耐受性小分子抑制剂的突变等。

1.1.2 Ba/F3 激酶系统

野生型 Ba/F3 是依赖于 IL-3 才能生长的前体 B 细胞，一旦稳定转染了外源致癌基因，并且该基因能够表达持续性激活的酪氨酸激酶，Ba/F3 便可在无 IL-3

的培养基中生存。但是，如果致癌基因的表达或者激酶的活性受到抑制，那么 Ba/F3 细胞的生长就会停止，甚至发生凋亡等情况，若及时添加 IL-3 则可成功挽救抑制剂处理过的 Ba/F3 细胞，使其恢复生长和增殖。基于这个原理，利用 Ba/F3 对激酶的小分子抑制剂进行筛选成为一种重要手段，不仅方便于鉴别个别候选药物的细胞毒性，甚至可用于鉴别整个化合物库的细胞毒差异。它的优势在大规模筛选激酶的小分子抑制剂时更能得到充分体现。

Ba/F3 激酶系统的细胞毒性检测法相较于传统的体外生化分析法具有几个突出的优势^[3]：首先，传统体外激酶实验因为受到激酶活化程度、蛋白重组长度及反应条件等多重因素的制约，通常难以准确反映化合物真实的活性水平，而 Ba/F3 检测则没有这些问题，能够较为精确地测定分子抑制剂的活性。其次，Ba/F3 分析系统不同于传统体外激酶分析，所用到的激酶底物是细胞的增殖和生长所必需的完整且具有生物学功能的蛋白，而非体外人工合成的短肽。第三，Ba/F3 分析系统不存在由于质膜蛋白的结合而导致的膜渗透和能量转变等问题，而这些是体外生化分析不可避免的。最后，由于具有与生理条件下相似的细胞背景，通过 Ba/F3 分析系统获得的结果更贴近化合物在体内的活性水平。

除了可以用于激酶抑制剂的高通量筛选之外，通过转染突变激酶的基因到 Ba/F3 细胞中还可以更快速地了解这些突变激酶的生物学特性。如表皮生长因子受体 EGFR，它的两个点突变激酶 EGFR[G719S] 和 EGFR[L858R] 不仅能使 Ba/F3 细胞脱离 IL-3 存活，而且突变激酶在没有表皮生长因子刺激的情况下就能发生自磷酸化，引起信号转导与转录激活因子 5 的激活以及 ERK1/2、ERK5 和 AKT 信号通路的持续性激活^[6-8]。另外，为了更有效地预测激酶抑制剂的临床学耐受性，也可以用 Ba/F3 系统进行药物耐受的突变体的筛选。比如 Azam^[9]等人就利用 Ba/F3 激酶系统筛选得到了对 imatinib 耐受的 Bcr-Abl 突变 Ba/F3 细胞株。利用类似的方法，人们发现了越来越多的药物耐受性的激酶突变^[10-12]。

本课题基于 Ba/F3 激酶系统，着重于对癌基因及其突变的研究和与之相应的小分子激酶抑制剂的筛选。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库