

ATR抑制剂抗肿瘤研究进展

赵志鹏, 陆涛*, 焦宇*

中国药科大学理学院, 江苏 南京

收稿日期: 2022年2月20日; 录用日期: 2022年3月18日; 发布日期: 2022年3月25日

摘要

DNA损伤反应(DDR)机制负责检测DNA损伤、暂停细胞周期和启动DNA修复。共济失调毛细血管扩张和Rad3相关蛋白(ATR)是DDR核心的关键激酶,负责感应复制应激(RS)并将其发送到S和G2/M检查点以促进修复。目前,靶向ATR药物已成为多个药企的焦点药物管线,并有多个药物已进入临床阶段。本文阐述了ATR与肿瘤之间的关系,总结了支持ATR抑制剂作为单一疗法以及与化疗、放疗和新型靶向药物如PARP抑制剂联合使用的数据,并讨论了当前的临床试验数据以及将ATR抑制剂应用于临床和识别生物标记物的研究进展。

关键词

ATR激酶, DNA损伤反应, 联合用药, 癌症

Research Progress of ATR Inhibitors in Anti-Tumor

Zhipeng Zhao, Tao Lu*, Yu Jiao*

School of Science, China Pharmaceutical University, Nanjing Jiangsu

Received: Feb. 20th, 2022; accepted: Mar. 18th, 2022; published: Mar. 25th, 2022

Abstract

The DNA damage response (DDR) machinery is responsible for detecting DNA damage, pausing the cell cycle and initiating DNA repair. Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein (ATR) are a key kinase at the heart of the DDR, responsible for sensing replication stress (RS) and signalling it to S and G2/M checkpoints to facilitate repair. At present, targeted ATR drugs have become the focus of drug pipelines for many pharmaceutical companies, and many drugs have entered the clinical

*通讯作者。

stage. This article describes the relationship between ATR and tumors, summarizes the data supporting the use of ATR inhibitors as monotherapy and in combination with chemotherapy, radiotherapy and new targeted drugs such as PARP inhibitors, and discusses current clinical trial data and the use of ATR research progress in the application of inhibitors to the clinic and the identification of biomarkers.

Keywords

ATR Kinase, DDR, Combinational Medication, Cancer

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 概述

细胞每天都会受到数以万计的 DNA 损伤的挑战, 这种 DNA 损伤可能是由于暴露于不同类型的辐射或基因毒性物质而引起的外源性损伤, 或者是通过内源性损伤引起的, 例如, 碱排尿和脱氨或细胞代谢的反应性副产物。如果未修复或异常修复, 这些病变可能对细胞是致命的甚至引起基因有害突变, 这些突变可影响细胞活力或诱导异常细胞行为, 从而导致恶性肿瘤(如癌症)的发生[1]。由于基因改变对细胞以及整个生物体的生存和生存能力具有潜在影响, 细胞已经形成了一个复杂的信号通路网络——统称为 DNA 损伤反应(DNA damage response, DDR), DDR 负责协调 DNA 损伤的早期检测, 并向细胞周期检查点和 DNA 修复途径发送信号, 暂停细胞周期以启动修复, 或在损伤过于严重时启动细胞死亡[2]。因此, DDR 是确保整体基因组稳定性和细胞活力的关键。

目前可以通过两种不同的方式来治疗 DDR 缺陷所导致的人类癌症。首先, 大多数传统的癌症治疗方法, 如化疗和放疗, 都是通过破坏 DNA 来起作用的。DDR 通路的上调为细胞提供了一种避免较重损伤和抵抗细胞死亡的方法[3]。因此, 如果与化疗和放疗联合使用, DDR 抑制剂将阻断这种耐药机制。其次, 如果代偿性 DDR 途径可以被靶向, DDR 成分的缺失可能会产生肿瘤特异性。这利用了合成致死(Synthetic Lethality, SL)的概念, 即两个基因(或通路)中的一个单独失活不会影响细胞存活, 但两个基因的失活都会导致细胞死亡[3]。在 SL 关系中, ATR-ATM 是最有前途的, 因为 ATM 除了参与细胞周期检查点激活外, 还参与 DNA 修复。聚腺苷酸二磷酸核糖基聚合酶(poly ADP-ribose polymerase, PARP)抑制剂作为单一疗法治疗乳腺癌 BRCA 突变癌的成功证明了这一概念的成功应用。这里开发的途径是同源重组修复(homologous recombination re-pair, HRR)途径, 其中乳腺癌 1 号基因(breast cancer 1, BRCA1)和乳腺癌 2 号基因(breast cancer 2, BRCA2)起关键作用。

ATR 与 DNA 损伤反应没有直接联系, 然而, 它涉及保护细胞免受复制压力(replication stress, RS)。它通过激活检查点激酶 CHK1 来防止复制又崩溃和诱导 G2/M 期阻滞来实现这一点。癌细胞快速增殖, 容易受到大量 RS, 因此特别依赖 ATR 信号通路。

1.1. ATR 的结构及功能

共济失调毛细血管扩张突变基因 Rad3 相关激酶(Ataxia telangiectasia and Rad3-related, ATR)是磷脂酰肌醇 3-激酶样激酶(phosphatidylinositol 3-kinase like kinase, PIKK)家族的成员之一, 该家族激酶还包括共

济失调毛细血管扩张突变(ataxia telangiectasia mutated, ATM), DNA 依赖性蛋白激酶(DNA-dependent protein kinase, DNA-PK/PRKDC), 转化/转录相关蛋白(transformation/transcription associated protein, TRRAP), 雷帕霉素的哺乳动物靶点(mammalian target of rapamycin, mTOR)等。

ATR 由 2644 个氨基酸组成, N 端为 ATR 相互作用蛋白(ATR-interacting-protein, ATRIP)结合结构域, 是 ATR 激活的重要结构域。C 端为激酶结构域, 可磷酸化下游蛋白, 具有将靶蛋白如细胞周期检测点激酶 1 (cell cycle checkpoint kinase 1, Chk1)、范可尼贫血症相关蛋白(Fanconi anemia protein, FANCI)、Werner 综合征蛋白(Werner syndrome protein, WRN)、细胞周期检测点激酶 1 (cell cycle checkpoint kinase 1, Chk1) 等丝氨酸或苏氨酸磷酸化的功能。

对 PIKK 家族蛋白质中 PI3K 结构域的序列相似性分析表明, ATR 与 ATM、mTOR 和对生殖器有形态学影响的抑制物 1 (suppressor with morphological effect on genitalia 1, SMG-1)之间的相似性有限, 并且有人认为 ATR、ATM、SMG-1 和 mTOR 可能从一个共同的祖先分化而来[4]。ATR 和 ATM 的磷酸化底物也有相当大的重叠。ATR 和 ATM 都是参与 DNA 复制、重组和修复的磷酸化蛋白, 以及调节细胞周期对 DNA 损伤的反应。ATM 基因不是必需的, 但是种系突变会导致共济失调毛细血管扩张症(ataxia-telangiectasia, A-T)。另一方面, ATR 基因是必需的, 双等位基因丧失 ATR 基因功能会导致早期胚胎死亡。没有关于人类完全缺乏 ATR 功能的记录, 但塞克尔综合征是一种由亚型 ATR 突变引起的疾病, 可导致生长迟缓和小头畸形。患有 Seckel 综合征的小鼠即使与 p53 突变小鼠杂交也不易患癌症[4], 这表明 ATR 抑制不导致癌症。ATR 激活后可通过多种调控细胞生物过程, 包括细胞周期阻滞、启动复制叉、抑制复制起点以及修复 DNA 双链断裂。

1.2. ATR 分子通路

ATR 的分子通路对于维持基因组的稳定性和完整性至关重要, 并进一步促使细胞存活。在典型信号通路中, ATR 被激活, 以响应停滞的复制叉(复制应激)或处理 DNA 双链(double-stranded DNA, dsDNA)断裂(double strand break, DSB)后的 DNA 末端切除。这些类型的 DNA 损伤可在 DNA 复制过程中内源性发生(在 S 期进展失控的癌细胞中可能更为常见), 也可通过暴露于辐射或 DNA 成像化疗药物而外源性发生。ATR 激活的共同信号是复制蛋白 A (replication protein A, RPA)快速结合的单链 DNA (single-stranded DNA, ssDNA)。ATR 相互作用蛋白与 ATR 形成复合物, 然后与 RPA 包裹的单链 DNA 结合, 并将 ATR 招募到 DNA 损伤部位。Rad17 还与 RPA 包被的单链 DNA 结合, 进而招募 9-1-1 复合物(Rad9-Rad1-Hus1)和拓扑异构酶 II 结合蛋白 1 (topoisomerase II binding protein 1, TopBP1), 刺激 ATR 蛋白激酶的活化。ATR 磷酸化并激活 CHK1 激酶和其他效应蛋白, 以诱导细胞周期阻滞和 DNA 修复, 从而防止细胞进入有丝分裂, 并使 DNA 受损或复制不完全。ATR 减缓复制起始点的触发和分叉进程, 并稳定复制以防止折叠成 DNA 双链断裂。ATR 还可以帮助重新启动暂停的复制分叉。如果 DNA 损伤负荷足够高, ATR 的丢失或抑制会导致基因组不稳定或细胞死亡[4] [5] (见图 1)。

2. ATR 与肿瘤之间的关系

由于 ATR-Chk1 检查点途径可确保细胞在复制应激后的存活, 因此正常的检查点被认为是化疗耐药机制。在癌症中靶向 ATR 的基本原理源于对 ATR 活性降低的小鼠模型的研究, ATR 缺失或亚型化与 p53 缺失之间存在 SL 效应, 这显示抑制 ATR 可能对 p53 缺陷肿瘤的治疗有效果。

各种观察结果揭示, 检查点抑制确实可能选择性地使癌细胞致敏。几十年来, 大多数肿瘤细胞都缺乏 G1 检查点。例如, 许多癌症的 p53 或 p53 途径的其他成分发生突变, 导致依赖 S 和 G2 检查点来阻止细胞周期并提供修复和存活, 抑制 S 和 G2 检查点可能会优先杀死这些 p53 缺乏肿瘤细胞。咖啡因是一

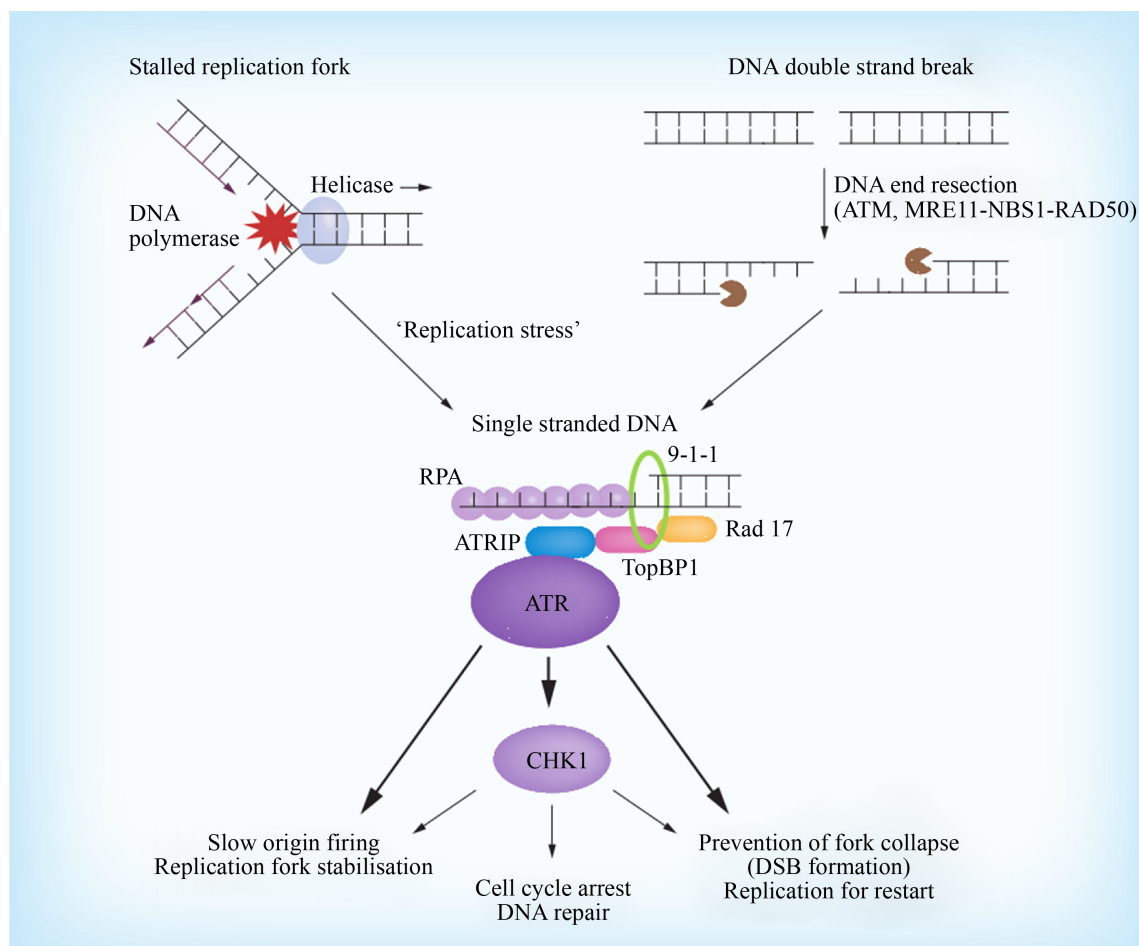


Figure 1. Activation and role of ATR kinase in DNA damage response and genome stability maintenance [6]

图 1. ATR 激酶在 DNA 损伤反应和维持基因组稳定性中的激活和作用[6]

种 PIKK 抑制剂，它优先使 p53 突变细胞对电离辐射敏感。检查点反应的一个或多个其他成分可能在癌细胞中发生突变或受损，由于正常细胞中所有检查点的功能都完好无损，因此，ATR 抑制剂对其余检查点的抑制可能对癌细胞产生比正常细胞更大的有害影响。

在正常细胞中，Chk1 通路和几个 Chk1 非依赖通路在复制分叉停止后都被激活。未转化细胞中的 Chk1 非依赖性机制包括 p38 的激活，p38 与 Chk1 协同阻止有丝分裂进入。在未转化细胞中复制分叉停止后，细胞周期蛋白 B1 启动子活性也发生下调，与 Chk1 或 p38 无关。相反，肿瘤细胞完全依赖 Chk1 通路来获得所需的反应，这可能是因为它们缺乏一条或多条额外的平行通路，在未转化细胞中，这些通路在缺乏 Chk1 的情况下确保复制检查点反应。因此，抑制 Chk1 和羟基脲可增强对肿瘤细胞的杀伤作用，但不会增强对未转化细胞的杀伤作用[7]。所有这些都表明靶向 ATR 对某些肿瘤尤其有毒，特别是对高 RS 水平的肿瘤，并促使 ATR 抑制剂的开发。ATR 抑制剂对表达蛋白酶促进癌基因(如细胞周期蛋白 E)的细胞具有毒害作用，特别是在 p53 缺乏的情况下。新兴的生物标记物有望提高对 ATR 抑制剂单一疗法的敏感性，ATM 丢失和 p53 途径生物标记物已得到最广泛的研究。

2.1. ATM 丢失

ATM 和 ATR 的通路显著重叠，癌症中 ATM 丢失的频率因肿瘤类型而异。ATM 缺失已被证明在多

种血液肿瘤和实体瘤体内对 ATR 抑制剂具有敏感性[7] [8], 包括: ATM 缺陷型慢性淋巴细胞性白血病(chronic lymphocytic leukemia, CLL)、套细胞淋巴瘤、非小细胞肺癌(nonsmall-cell lung cancer, NSCLC)、胃癌和胰腺癌,这些研究支持路径相互依赖理论,即在因 ATM 路径功能失调而产生的未解决 DSB 中,抑制 ATR 会导致有丝分裂出错和肿瘤细胞死亡增加。尽管确定 ATM 突变状态的最佳方法(如免疫组织化学与下一代测序技术)仍存在争议,依然有多项临床试验,纳入 ATM 缺陷肿瘤患者。

2.2. p53 突变

活化的 ATM 对 p53 的磷酸化是实现 G1 细胞周期检查点的关键,在 DNA 复制之前修复 DNA 损伤[9]。如前所述,在肿瘤特异性 p53 失活的情况下,假设癌细胞将更依赖于 ATR 依赖的细胞内 S 和 G2/M 细胞周期检查点,因此也对 ATR 抑制更敏感。然而,与野生型(WT) p53 相比,缺陷型 p53 细胞中的 ATR 抑制导致泛核 γ H2AX 染色增加,并且发现使用 AZD6738 的类似单剂治疗对缺陷型 p53 CLL 细胞系具有选择性毒性[10]。在一种莫氏综合征中, p53 基因敲除会增加 RS 水平,并以 SL 方式加速衰老。p53 缺失作为 ATR 抑制剂介导的化疗敏感性指标,在 14 个癌细胞系中,5 个野生型 p53 细胞系中有 4 个对 VE-821 联合顺铂的反应最弱,其中 2 个细胞系中的 p53 基因敲除增强了对联合治疗的敏感性[11]。p53 在使用 ATR 抑制剂作为放射增敏剂方面的作用结果上相互矛盾, AZD6738 作为放射增敏剂独立于 p53 状态,在另一项研究中,其对 p53 缺陷细胞系的放射敏感性大于野生型 p53 细胞[12]。

在同基因匹配的细胞系或小细胞系组中单独检测一个基因可能不会产生结论性的结果,因为癌细胞通常会有几个分子变化,这些变化可能相互混淆,或者基因需要共存以获得药物敏感性的特异性表型,例如,与 G1 检查点控制和 RS 丢失相关的其他缺陷; G1 期细胞周期蛋白及其 CDK 相关的过度表达也可能导致对 ATR 的敏感性[11] [12] [13],而不仅仅是 p53 状态,此外,如突变 Ras 和依赖端粒替代性延长的肿瘤等都促使依赖 ATR 的其他致癌机制在临床上得到了相应数据研究。

高表达致癌基因诱导细胞信号失调,干扰细胞周期;抑制 ATR 通路可以导致细胞毒性;低氧肿瘤细胞可能会造成 RS,导致其对 ATR 抑制作用更敏感;ATM 缺陷,对 ATR 抑制剂更为敏感,这促使对于 ATR 在肿瘤领域的研究[14],总的来说,这些研究为 ATR-Chk1 途径抑制剂与 DNA 损伤化疗的联合使用提供了支持。

3. 在研的 ATR 抑制剂药物

由于 ATR 的体积过大、对单链 DNA-双链 DNA 连接束(一种不稳定结构)的依赖、对激活所需的共激活蛋白比如 RPA 的依赖以及晶体结构的缺乏,导致难以对其建立体外高通量筛选并且阻碍了基于结构的药物设计[15],进而使得在全球范围内,ATR 的药物开发计划落后于 PARP 和 ATR 本身的下游靶点 CHK1 等 DDR 蛋白。

天然产物咖啡因和五味子乙素是最先发现的抑制 ATR 的分子,对 ATR 的 IC_{50} 分别为 1.1 mM 和 7.7 μ M [16],对 ATR 的抑制作用较弱且非特异性。其他的 ATR 抑制剂在作为其他靶点的抑制剂时,首次开发对于 ATR 的抑制时才得以被发现。例如, NU6027 最初是作为 CDK2 抑制剂开发的,但后来发现,当它使乳腺癌和卵巢癌细胞系对顺铂敏感时,可抑制 ATR (ATRIC $_{50}$ = 6.7 μ M) [17]。最新的进入临床试验的 ATR 抑制剂的临床候选药物——M1774、M4344 等的研发进展如表 1 所示。

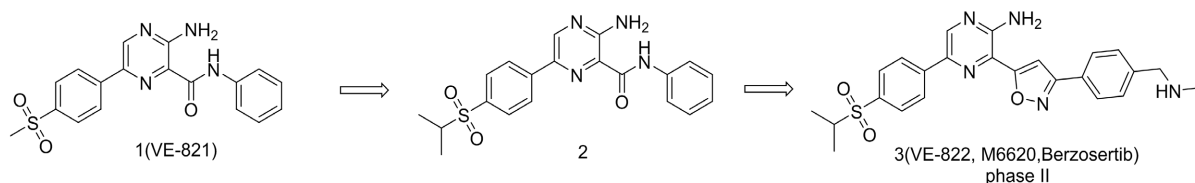
据现有 ATR 抑制剂的结构特点可以将抑制剂可分为吡嗪类、嘧啶类、吡啶类以及其他类。

3.1. 吡嗪类

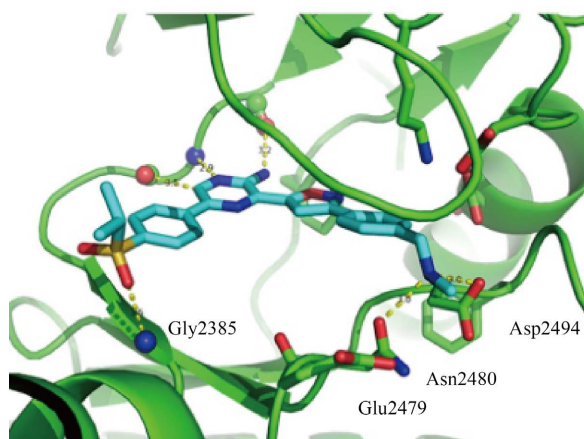
Vertex Pharmaceuticals 开发了一系列基于吡嗪环结构的高活性且选择性的 ATR 抑制剂,包括化合物 1 (VE-821), 化合物 3 (VE-822, M6620, VX-970, Berzosertib)等(如图 2)。早期高用量筛选得到了化合物

Table 1. Research progress of ATR inhibitors**表 1.** ATR 抑制剂的研究进展

产品名称	研发公司	适应症	临床阶段	临床试验编号
M-1774	德国默克(Merk KGaA)	转移性脑瘤	I 期	NCT04170153
ATRN-119	Atrin Pharmaceuticals	转移癌	II 期	NCT04905914
RP-3500	Repare Therapertica	癌症	II 期	NCT04497116
ART-0380	Artios Pharma	转移性癌症	II 期	NCT04657068
Ceralasertib	Samsung, Medical Center	免疫治疗	II 期	NCT03740893

**Figure 2.** VE-822 reconstruction process**图 2.** VE-822 的改造过程

1 (ATRIC₅₀ = 26 nM), 并且发现其对相关的 PIKK、ATM 和 DNA-PKcs 具有选择性[18]。Ronald 等人[19]在早期的工作中, 通过用异丙基磺取代甲基磺, ATR 抑制效力提高了 3 倍, 得到化合物 2。后寻找苯胺部分的最佳替代物, 通过将化合物 2 中苯胺的五元和六元杂芳香取代物对接到 ATR 同源模型中显示, 仲苯胺取代的异恶唑环将很好地占据 ATP 结合位点, 并模拟原始苯胺的形状和平面性质, 便得到化合物 3, 从而进一步提高了 ATR 亲和力、选择性、水溶性和细胞分析中的活性[20]。化合物 3 与 ATR 的活性位点对接中(图 3 所示), 氢键与铰链、独特的残基 Gly2385、Asn2480 和 Asp2494 结合, 它们是保守的镁结合位点和盐桥的一部分。苯环周围的极性残基显示为棒状, 异恶唑的苯环在 ATR 的 P 环下方靠近带负电荷的区域深入延伸。化合物 3 对相关激酶和无关蛋白质(如 hErg 和 P450 酶)的选择性保持 > 100 倍, 并且具有适合静脉给药的 PK 特性, 是 2012 年第一个进入临床试验的 ATR 抑制剂。化合物 3 单药治疗耐受性良好, 剂量限制性毒性和药物相关的 3~4 级不良事件发生率均不超过 480 mg/m², 其单药治疗反应与对于 ATR 抑制剂敏感的潜在的预测性生物标记物一致, 临床上前后成对活检证实了其靶向抑制, 即通过 pCHK1 减少至少 73% 来证实它的靶向性[21]。

**Figure 3.** VE-822 docking with ATR active site [13]**图 3.** VE-822 与 ATR 的活性位点对接[13]

3.2. 嘧啶类

已经报道的嘧啶类的 ATR 抑制剂主要是化合物 4 (NU6027), 化合物 5 (AZ20), 化合物 6 (AZD-6738, Ceralasertib) 和化合物 7 (VX-803, M4344) (如图 4)。起初作为细胞周期蛋白依赖性激酶 2 (Cyclin-Dependent Kinase2, CDK2) 抑制剂的 NU2058 能使细胞对顺铂的细胞毒性高度敏感, 但与 CDK2 抑制剂无关, 而类似的化合物 4 也具有类似的作用[22]。这些观察结果, 加上已知的 ATR 敲除对顺铂的敏感性, 促进了研究者对于化合物 4 是否抑制 ATR 的研究。Peasland 等人[21]测定了化合物 4 对细胞 ATR 和 CDK2 的抑制作用、对 DNA 损伤诱导的细胞周期阻滞的调节、对 HR 的修复以及对不同 p53 状态的细胞中细胞毒性物质的增强程度, 并探讨了当 DNA 单链断裂受损时化合物 4 的合成致死性。化合物 4 是一种低微摩尔数的 ATR 抑制剂, 对 ATR 的 IC_{50} 为 6.7 $\mu\text{mol/L}$ 。化合物 4 在完整细胞中是比 CDK2 更有效的 ATR 抑制剂, 并且不抑制细胞 DNA-PK 或 ATM, 还可减弱 G2/M 期阻滞, 抑制 HR 功能, 与 PARP 抑制联合使用可导致 SL, 是一种用于进一步药物开发的新型先导化合物, 也是研究 ATR 的极好工具化合物[23]。

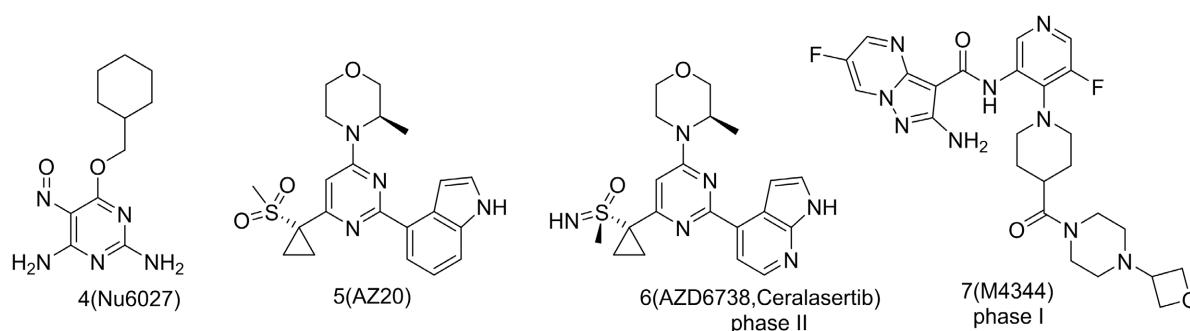


Figure 4. Pyrimidineinhibitors for ATR

图 4. 嘧啶类的 ATR 抑制剂

后来 Foote [24]等人开发了化合物 5, 化合物 5 对 ATR 具有选择性, IC_{50} 为 0.05 $\mu\text{mol/L}$, 但化合物 5 是 CYP3A4 的时间依赖性抑制剂, 水溶性低。CYP3A4 的抑制, 特别是基于机制的抑制, 是临床药物之间相互作用所关注的问题, 并且其低溶解度限制了最大可吸收剂量。这些化合物不良特性增加了临床开发失败的风险, 因此化合物 5 不被认为是临床研究的合适候选物。消除 CYP3A4 的时间依赖性并实现高水溶性, 同时保持高 ATR 效力、优异的选择性以及化合物 5 所显示的良好药代动力学特性, 是下一步优化阶段的关键药物化学设计目标[25]。为了消除抑制 CYP3A4 引起的药物之间相互作用使此类药物和许多可能的辅助药物的联合给药复杂化的不良活性, 相关的亚砷胺吗啉嘧啶类似物化合物 6 成功进入临床试验。化合物 6 的亚砷亚胺的 R 立体化学最初是从亚砷前体的立体化学中推断出来的, 亚砷亚胺的亚胺化构型在 AZD6738 中得以保留, 后来从 X 射线结构中得到证实[25], 在 6 的结构中通过引入亚砷肟从而消除了甲砷的中心对称填充特性。化合物 6 对 ATR 具有高度特异性(ATR IC_{50} = 74 nM), 是一种更加适合于口服生物利用的 ATR 抑制剂。化合物 6 抑制 ATR 对下游 Chk1 的磷酸化, 促使 DNA 损伤累积的增加, 从而促使肿瘤细胞的凋亡, 目前已经推进到 II 期临床试验中, 无论是单一疗法还是联合化疗药物, 都开展了多项临床试验[26]。

Vertex 最初开发的另一种具有良好口服生物利用度的 ATR 抑制剂 7 获得了默克公司的类似许可, 是一种有效且高选择性的 ATR 抑制剂(ATR IC_{50} = 8 nM), 化合物 7 通过诱导细胞突变和 DNA 损伤杀死癌细胞, 复制应激和神经内分泌基因表达特征与化合物 7 治疗反应显著相关, 可作为 7 的预测性生物标记物, 目前正在进行 I 期临床试验单一疗法研究和与卡铂、吉西他滨和顺铂等联合研究, 探究不同给药方

案的安全性和耐受性[27]。

3.3. 稠合吡啶类

稠合吡啶类的 ATR 抑制剂主要包括化合物 12 (BAY-973), 化合物 13 (BAY-1895344, Elimusertib), 化合物 14 (RP-3500)等。工具化合物 AZ20 (如图 5)在同源模型中揭示了与 ATR 在 ATP 结合口袋的两个主要相互作用: 一个氢键通过铰链区与吗啉氧形成, 另一个额外的氢键通过与咪唑 NH 结合形成。基于这些建模研究的总体结果, Lücking 等人[28]将喹啉衍生物 9 作为一种新的 ATR 抑制剂进行开发, 然其富含电子的吡咯部分可能导致潜在 DMPK 问题, 因此合成了相应的吡啶喹啉类似物 10, 吡啶喹啉类似物 10 在体外对 ATR 的抑制活性非常低($IC_{50} = 5050 \text{ nM}$), 在此之前, 由于 10 的合成较难, 在 10 的制备完成之前, 喹啉类似物 11 更易合成出来, 即在喹啉核的 7 位添加氮旨在简化支架上所需 2, 4, 8 区域化学的合成。化合物 11 在体外显示出很好的 ATR 抑制活性($IC_{50} = 125 \text{ nM}$), 后通过结构修饰进一步提高激酶活性得到化合物 12 ($IC_{50} = 59 \text{ nM}$), 但是化合物 12 对结构相关 PIKK-mTOR 的低选择性被认为是一个潜在的毒性问题, 因此提高对 mTOR 的选择性是一个继续优化的重要参数。后续开发了化合物 13, 其 8 位五元芳香取代基的两个氮原子的存在和位置对于提高 ATR 抑制活性至关重要, 在一次彻底的临床前评估中, 化合物 13 显示了最佳的体外和体内临床前总体特征, 并最终被选为临床候选化合物。在体外的生物化学 ($IC_{50} = 7 \text{ nM}$)和 HT-29 细胞的细胞机制($IC_{50} = 36 \text{ nM}$)中证明了其对 ATR 的有效的抑制作用。化合物 13 对 mTOR 表现出良好的选择性(IC_{50} 值之比 mTOR/ATR = 61), 在体外也表现出对各种癌细胞系的非常有效的抗增殖活性, 例如 CRC 细胞系 HT-29 ($IC_{50} = 160 \text{ nM}$)和 LoVo ($IC_{50} = 71 \text{ nM}$)以及 B 细胞淋巴瘤细胞系 SU-DHL-8 ($IC_{50} = 9 \text{ nM}$)。

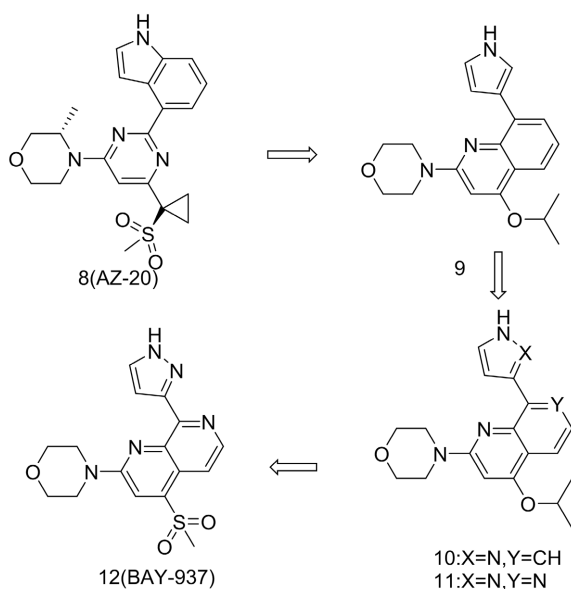


Figure 5. BAY-937 reconstruction process

图 5. BAY-937 的改造过程

化合物 13 (如图 6)是一种口服 ATR 抑制剂, 已进入 II 期临床试验, 可能为单一疗法中某些 DDR 缺陷的癌症的治疗提供新的治疗选择, 并与 DNA 损伤 - 诱导或 DNA 修复通过提高疗效而损害癌症治疗相结合。1 mmol/L 的化合物 13 仅对 456 种激酶中的 6 种表现出活性, 是一种选择性的低纳摩尔 ATR 激酶活性抑制剂, 它能有效抑制具有 DDR 缺陷(包括 ATM 畸变)的不同来源的广谱人类肿瘤细胞系的增殖[29]。

与 ATR 抑制剂 AZD6738 和 M6620 相比, 化合物 13 显示出优越性, 它的高效性和选择性使其作为单一疗法在具有 DDR 缺陷的多种肿瘤类型中具有更强的抗肿瘤活性。化合物 13 的血浆暴露明显高于肿瘤细胞的抗增殖浓度水平。相比之下, AZD6738 和 M6620 的血浆暴露没有超过肿瘤细胞中抗增殖活性所需的浓度, 这与它们在单一疗法中的弱活体抗肿瘤疗效相呼应[30]。化合物 13 在不同肿瘤组织学的 DDR 缺陷的癌症中表现出强大的单一治疗功效, 并且与 DNA 损伤 - 诱导或 DNA 修复 - 折衷疗法相结合具有协同活性。化合物 13 目前正在被应用于晚期实体瘤和淋巴瘤患者进行临床研究, 在多种具有不同肿瘤适应症的异种移植模型中具有强大的活体抗肿瘤功效, 携带 DNA 修复缺陷, 从而验证了肿瘤固有 DNA 修复缺陷和 ATR 阻断的 SL 概念, 但仍然需要进行进一步的临床研究, 以了解哪些 DDR 缺陷对 ATR 抑制敏感性的影响最大。

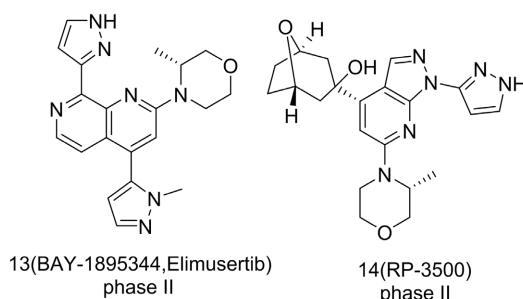


Figure 6. Fused pyridine ATR inhibitors
图 6. 稠合吡啶类的 ATR 抑制剂

化合物 14 对 ATR 的 IC_{50} 为 0.9 nM, 其 I/II 期研究于 2020 年 7 月开始, 预计将于 2022 年 7 月完成, 正在评估安全性在癌症患者中单独或与 talazoparib 联合给药的耐受性、药效学、抗肿瘤活性和最大耐受剂量[31]。

3.4. 其他类

以前研究发现咖啡因(15, caffeine)、五味子乙素(16, Schisandrin B)、渥曼青霉素(17, Wortmannin)等(如图 7)也能抑制 ATR。Caffeine 虽然可以通过干扰 DNA 损伤诱导的细胞周期阻滞和破坏 DNA 损伤应答机制从而促进肿瘤细胞死亡, 但它同时也会抑制 ATM, 因此对 ATR 选择性较差, 并且高浓度的剂量也会对正常细胞和组织产生毒性作用[32]。早期也研究发现五味子中化学成分 Schisandrin B 对 ATR 具有抑制作用, 其 IC_{50} 为 7.3 $\mu\text{mol/L}$, 但选择性较差[31]。Schisandrin B 能够干扰紫外线诱导的 S 期, 增加人肺癌细胞对紫外线辐射的敏感性。Wortmannin 是弱选择性的 ATR 抑制剂, 实验发现其对 ATR 的 IC_{50} 为 1.8 $\mu\text{mol/L}$, 而对人肺腺癌细胞 A549 的 $IC_{50} \geq 10 \mu\text{mol/L}$ 。此外, Wortmannin 能增强 IR 对肿瘤的敏感性, 但其毒性大且稳定性差[33]。

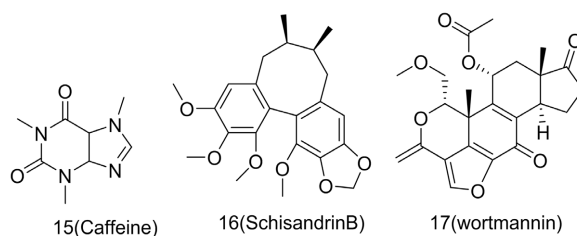


Figure 7. Other ATR like inhibitors
图 7. 其他类 ATR 抑制剂

4. ATR 抑制剂联合治疗策略

目前有八种 ATR 抑制剂正在临床试验中进行评估。虽然单一疗法研究试图利用肿瘤的特殊分子脆弱性,但大多数 ATR 抑制剂临床试验现在都是联合研究。这与大量临床前研究一致,这些研究支持使用 ATR 抑制剂作为 DNA 损伤化疗或放疗、其他 DDR 抑制剂和免疫检查点抑制剂的增敏剂。这种方法的主要目的是在 RS 水平升高的情况下抑制 ATR,从而抑制癌细胞修复受损 DNA 的能力。

4.1. ATR 抑制剂联合铂化疗

以铂为基础的化疗是许多实体瘤治疗方案的首选。人们普遍认为,铂类药物通过形成体积庞大的铂-DNA 加合物(链内和链间交联)发挥细胞毒性作用,从而扭曲 DNA 的化学结构,导致复制分叉停滞和抑制正常 DNA 复制[34]。因此,将 ATR 抑制剂与铂类药物相结合,以增强铂类化疗对癌细胞的 DNA 损伤作用。事实上,使用激酶非活性 ATR 或早期 ATR 咖啡因和 NU6027 的一些早期 ATR 研究表明顺铂具有高度的敏感性[35]。M6620 已与基于铂的化疗联合应用于多种肿瘤类型。例如,在大量非小细胞肺癌细胞系中观察到顺铂体外协同组合,在突变型 p53 细胞中具有更高的敏感性。当在 PDX 肺癌模型中进行体内试验时,发现在先前仅使用顺铂或 ATR 单一疗法无反应时,顺铂和 M6620 的组合可诱导肿瘤消退。M6620 与顺铂和卡铂联合应用于食管癌治疗以及 M6620 和奥沙利铂联合应用于结直肠癌研究,也证明了可以使用 ATR 抑制剂作为 Pt 化疗的增敏剂[36]。这种组合是很有前景的,因为除了通过形成交联 DNA 加合物直接破坏 DNA 外,奥沙利铂还可以诱导免疫原性细胞死亡。Combes 等人[37]能够证明 M6620 与奥沙利铂的组合在六种不同的结直肠细胞系和同基因小鼠模型中具有协同作用。ATR 抑制也增强了奥沙利铂在体外和体内的免疫原性作用,与单独使用奥沙利铂治疗的小鼠相比,联合使用奥沙利铂治疗的小鼠的 CD8 阳性 T 细胞数量增加。AZD6738 在非小细胞肺癌、胃癌和头颈部鳞状细胞癌临床前与顺铂联合使用,AZD6738 与顺铂联合使用可抑制 75% 的肿瘤生长,联合用药的两组小鼠对肿瘤生长的抑制作用也与单独使用 AZD6738 或顺铂的小鼠有显著差异[37] [38]。与 ATM 异种移植组相比,ATM 缺陷异种移植小鼠接受的 AZD6738 剂量为 AZD6738 剂量的一半(25 mg/kg 与 50 mg/kg,在 14 天为一个周期的第 1~14 天口服,在第 1 天和第 8 天腹腔内给予 3 mg/kg 顺铂)这足以使 6 只小鼠中的 3 只在联合治疗结束后维持肿瘤消退,这需要进一步评估在生物标记物定义的亚组中是否可以使用低剂量的 ATR 抑制剂而不影响疗效。由于剂量依赖性毒性,在 IGROV-1 卵巢癌小鼠模型中,为了维持耐受性,必须将 BAY1895344 的剂量减少至相当于最大耐受单药治疗剂量的 7% 或 14%。

4.2. ATR 抑制剂联合抗代谢药物

ATR 抑制剂还与靶向核糖核苷酸还原酶的抗代谢物化疗药物联合使用,目的是增加 RS。在一组 35 个肺癌细胞系中,与 M6620 共同作用导致近 80% 的受试细胞系吉西他滨敏感性发生 3 倍的 IC₅₀ 偏移。只有 M6620 与顺铂联合使用更有效,近 90% 的细胞系组实现了 IC₅₀ 的降低。除肺癌外,吉西他滨还用于胰腺癌的治疗,Wallez 等人[38]将 AZD6738 与吉西他滨联合使用,在混合的小鼠和人类胰腺癌细胞系中,吉西他滨剂量低至 5 或 10 nmol/L 足以使 RS 增加到对 AZD6738 敏感所需阈值以上,这包括对 AZD6738 单一疗法相对耐药的细胞系。进一步的体外研究确定了 AZD6738 和吉西他滨联合治疗抑制肿瘤细胞生长的最佳调度策略为:同时治疗 16 小时,然后继续使用 AZD6738 至少 3 天。在胰腺癌小鼠模型中采用了类似的治疗时间,与单用吉西他滨相比,联合用药可使肿瘤消退,从而延长生存期,毒性也可接受。在急性髓系白血病的治疗中,也研究了 ATR 抑制剂和抗代谢化疗的联合应用,VE-821 治疗通过 S 期细胞周期阻滞和增加复制叉停滞,增强了羟基脲和吉西他滨诱导的生长抑制[39]。在联合治疗的体外原发性急性髓系白血病样本和急性髓系白血病 L 原位小鼠模型中,反应增强也很明显。

4.3. ATR 抑制剂联合拓扑异构酶抑制剂

喜树碱、伊立替康和拓扑替康通过防止与复制叉相冲突的 DNA 单链断裂的释放, 广泛发挥其抗癌作用[40]。采用 RNAi 筛选方法, 将 ATR 确定为与拓扑异构酶 1 抑制剂结合的关键候选物, 发现 M6620 与喜树碱在结直肠癌细胞系中起协同作用, 并使结直肠癌小鼠模型对伊立替康的作用敏感。虽然单剂剂量为 60 mg/kg 的 ATR 抑制剂对肿瘤生长没有影响, 单剂剂量为 40 mg/kg 的伊立替康仅实现 6% 的生长消退, 但当 ATR 抑制剂与 20 mg/kg 伊立替康联合使用时, 肿瘤消退率达到 55%。与伊立替康单药治疗相比, 联合治疗组在体重减轻方面也没有毒性报道[41], 与单药治疗相比, 联合用药的药效可能有助于减缓肿瘤的生长, 这需要进一步的临床研究推进。

4.4. ATR 抑制剂联合放射疗法

使用 ATR 利用电离辐射引起的 RS 和 DNA 损伤增加是 DDR 领域的另一个有希望的策略。支持将 ATR 抑制剂用作肿瘤选择性放射增敏剂的示例包括在胰腺癌中使用 VE-821、在食管癌中使用 M6620、在三阴性乳腺癌中使用 M6620 以及在结直肠癌中使用 BAY1895344。重要的是, VE-821 也被证明在一系列缺氧条件下使癌细胞对放疗敏感, 肿瘤内的难以治疗的缺氧区域通常具有抗辐射性。此外, Dillon 等人[42]对 AZD6738 对一组癌细胞系、3D 肿瘤球体和 HCT116 p53 的放射增敏效应进行了详细的机理研究, 包括消除辐射诱导的 G2 细胞周期阻滞、降低 HRR 和产生无着丝粒微核, 表明基因组的不稳定性增加。已有一些数据支持放疗可以产生例如通过增加新抗原等有益的免疫介导抗肿瘤反应的理论。ATR 抑制剂和放疗联合治疗可以增强肿瘤微环境的免疫调节作用, 这可能是一个越来越有前景的领域, 需要进一步的机理研究来更好地理解如何利用这些效应, 以最大限度地提高肿瘤选择性治疗反应。

4.5. ATR 抑制剂联合 PARP 抑制剂

PARP 抑制剂阻断 SSB 修复, 导致 RS、复制叉折叠和 ATR 激活。因此, 将这两种 DDR 关键成分的抑制剂结合起来的原理是, PARP 抑制剂诱导的 RS 需要 ATR 信号发送到细胞周期检查点以修复损伤。最早的 ATR 抑制剂之一 NU6027 被发现至少部分通过抑制 HRR 使 BRCA 野生型 MCF7 乳腺癌细胞对 PARP 抑制剂鲁卡帕利敏感[43]。尽管研究之间的机制并不总是一致, 但在许多癌症类型中, ATR 抑制剂和 PARP 抑制剂之间存在协同作用。ATR 抑制作为克服 PARP 抑制剂耐药性的一种手段也有了研究。Murai 等人[44]表明, 可以通过与 VE-821 的联合治疗克服对通过 SLFn11 的失活(通常通过其在复制叉阻断中的作用形成 RS 反应的一部分)介导的他拉唑帕利和奥拉帕利的耐药性。VE-821 治疗能够使 PARP 抑制剂耐药的 BRCA1 缺陷细胞对奥拉帕利治疗重新敏感, 这些细胞已恢复 HRR 功能。目前, ATR 激酶抑制剂与 PARP 抑制剂联合进一步的临床研究已扩展到多个 II 期试验, 包括三阴性乳腺癌、卵巢癌和小细胞肺癌的研究中。

4.6. ATR 抑制剂联合免疫检查点抑制剂

将 ATR 抑制剂与免疫检查点抑制剂相结合是临床试验中的另一种治疗策略。临床前研究探索了 DDR 增加肿瘤突变压力从而产生新抗原的作用, 以提高对免疫检查点抑制的敏感性, 复制相关 DNA 损伤产生的胞浆 DNA 可能激活干扰素基因环 GMP-AMP 合酶刺激因子途径, 触发先天性免疫反应从而进一步提高联合使用时对免疫检查点抑制的敏感性[45]。在小鼠结直肠癌模型中 M6620 与抗 PD-L1 的抗体阿维鲁单抗和铂类化疗的三重组合评估中, 与化疗/阿维鲁单抗治疗组相比, 三联体组合具有良好的耐受性, 可增强肿瘤生长控制, 增加肿瘤消退, 提高总生存率[46]。值得注意的是, 那些被发现对三联疗法有完全反应的小鼠随后对第二次肿瘤接种不耐受。

5. 结语

ATR 通路作为 DNA 损伤应答机制中的一种,对于肿瘤的存活起着重要作用抑制,ATR 可以诱导 ATR 通路依赖型恶性肿瘤细胞的死亡,是一种开发低毒且高效靶向抗肿瘤药物的理想靶标。目前已发现多种类型 ATR 抑制剂,按化合物结构可分为吡嗪类、嘧啶类、吡啶并环类、其他类等,其中有八个化合物已进入临床试验。正在进行临床评估的 ATR 抑制剂作为单一疗法和联合疗法——不仅与 DNA 损伤化疗和放疗,还包括其他 DNA 修复抑制剂和免疫检查点抑制剂。然而,将 ATR 抑制剂纳入癌症治疗标准还有很长的路要走。两大悬而未决的问题是确定和选择最合适的单一治疗患者组,以及协调适当的剂量,这需要临床试验上进一步的探索。目前,这一领域已取得了显著的成效,竞争程度尤为显著,我们将期待有更多的 ATR 抑制剂进入临床并成功上市造福人类。

参考文献

- [1] Qiu, Z., Oleinick, N.L. and Zhang, J. (2018) ATR/CHK1 Inhibitors and Cancer Therapy. *Radiotherapy & Oncology*, **126**, 450-464. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2017.09.043>
- [2] Jackson, S.P. and Bartek, J. (2009) The DNA-Damage Response in Human Biology and Disease. *Nature*, **461**, 1071-1078. <https://doi.org/10.1038/nature08467>
- [3] Marchal, A. and Zou, L. (2013) DNA Damage Sensing by the ATM and ATR Kinase. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, **5**, Article ID: a012716. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012716>
- [4] Shiotani, B. and Zou, L. (2009) ATR Signaling at a Glance. *Journal of Cell Science*, **122**, 301-304. <https://doi.org/10.1242/jcs.035105>
- [5] Enriquez-Rios, V., Dumitrache, L.C., Downing, S.M., et al. (2017) DNA-PKcs, ATM, and ATR Interplay Maintains Genome Integrity during Neurogenesis. *Journal of Neuroscience*, **37**, 893-905. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4213-15.2016>
- [6] Foote, K.M., Lau, A. and Nissink, J.W. (2015) Drugging ATR: Progress in the Development of Specific Inhibitors for the Treatment of Cancer. *Future Medicinal Chemistry*, **7**, 873-891. <https://doi.org/10.4155/fmc.15.33>
- [7] Weber, A.M. and Ryan, A.J. (2015) ATM and ATR as Therapeutic Targets in Cancer. *Pharmacology & Therapeutics*, **149**, 124-138. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.12.001>
- [8] Murga, M., Bunting, S., Montana, M.F., et al. (2009) A Mouse Model of ATR-Seckel Shows Embryonic Replicative Stress and Accelerated Aging. *Nature Genetics*, **41**, 891-898. <https://doi.org/10.1038/ng.420>
- [9] Dillon, M.T., Barker, H.E., Pedersen, M., et al. (2017) Radiosensitization by the ATR Inhibitor AZD6738 through Generation of Acentric Micronuclei. *Molecular Cancer Therapeutics*, **16**, 25-34. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-16-0239>
- [10] Reaper, P.M., Griffiths, M.R., Long, J.M., et al. (2011) Selective Killing of ATM- or p53-Deficient Cancer Cells through Inhibition of ATR. *Nature Chemical Biology*, **7**, 428-430. <https://doi.org/10.1038/nchembio.573>
- [11] Middleton, F.K., Pollard, J.R. and Curtin, N.J. (2018) The Impact of p53 Dysfunction in ATR Inhibitor Cytotoxicity and Chemo- and Radiosensitisation. *Cancers*, **10**, Article No. 275. <https://doi.org/10.3390/cancers10080275>
- [12] Barsanti, P.A., Pan, Y., Lu, Y., et al. (2015) Structure-Based Drug Design of Novel, Potent, and Selective Azabenzimidazoles (ABI) as ATR Inhibitors. *ACS Medicinal Chemistry Letter*, **6**, 42-46. <https://doi.org/10.1021/ml500352s>
- [13] Kwok, M., Davies, N., Agathangelou, A., et al. (2016) ATR Inhibition Induces Synthetic Lethality and Overcomes Chemoresistance in TP53 or ATM-Defective Chronic Lymphocytic Leukemia Cells. *Blood*, **127**, 582-595. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-05-644872>
- [14] Peasland, A., Wang, L.Z., Rowling, E., et al. (2011) Identification and Evaluation of a Potent Novel ATR Inhibitor, NU6027, in Breast and Ovarian Cancer Cell Lines. *British Journal of Cancer*, **105**, 372-381. <https://doi.org/10.1038/bjc.2011.243>
- [15] Fokas, E., Prevo, R., Pollard, J.R., et al. (2012) Targeting ATR *In Vivo* Using the Novel Inhibitor VE-822 Results in Selective Sensitization of Pancreatic Tumors to Radiation. *Cell Death & Diseases*, **3**, Article No. e441. <https://doi.org/10.1038/cddis.2012.181>
- [16] Ramachandran, S.A., Jadhavar, P.S., Singh, M.P., et al. (2017) Discovery of Pyrazolopyrimidine Derivatives as Novel Inhibitors of Ataxia Telangiectasia and Rad3 Related Protein (ATR). *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **27**, 750-754. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.01.045>

- [17] Charrier, J.D., Durrant, S.J., Golec, J.M., *et al.* (2011) Discovery of Potent and Selective Inhibitors of Ataxia Telangiectasia Mutated and Rad3 Related (ATR) Protein Kinase as Potential Anticancer Agents. *Journal of Medicinal Chemistry*, **54**, 2320-2330. <https://doi.org/10.1021/jm101488z>
- [18] Petermann, E. and Caldecott, K.W. (2006) Evidence That the ATR/Chk1 Pathway Maintains Normal Replication Fork Progression during Unperturbed S Phase. *Cell Cycle*, **5**, 2203-2209.
- [19] Knegtel, R., Charrier, J.D., Durrant, S., Davis, C., O'Donnell, M., Storck, P., MacCormick, S., *et al.* (2019) Rational Design of 5-(4-(Isopropylsulfonyl)phenyl)-3-(3-(4-((methylamino)methyl)phenyl)isoxazol-5-yl)pyrazin-2-amine (VX-970, M6620): Optimization of Intra- and Intermolecular Polar Interactions of a New Ataxia Telangiectasia Mutated and Rad3-Related (ATR) Kinase Inhibitor. *Journal of Medicinal Chemistry*, **62**, 5547-5561. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b00426>
- [20] Karanika, S., Karantanos, T., Li, L., *et al.* (2015) DNA Damage Response and Prostate Cancer: Defects Regulation and Therapeutic Implications. *Oncogene*, **34**, 2815-2822. <https://doi.org/10.1038/onc.2014.238>
- [21] Cossar, L., Schache, A., Risk, J., *et al.* (2017) Modulating the DNA Damage Response to Improve Treatment Response in Cervical Cancer. *Clinical Oncology*, **29**, 626-634. <https://doi.org/10.1016/j.clon.2017.03.002>
- [22] Foote, K.M., Blades, K., Cronin, A., Fillery S, Guichard, S.S., Hassall, L., Hickson, I., *et al.* (2013) Discovery of 4-{4-[(3R)-3-Methylmorpholin-4-yl]-6-[1-(methylsulfonyl) cyclopropyl] pyrimidin-2-yl}-1H-indole (AZ20): A Potent and Selective Inhibitor of ATR Protein Kinase with Monotherapy *in vivo* Antitumor Activity. *Journal of Medicinal Chemistry*, **56**, 2125-2138. <https://doi.org/10.1021/jm301859s>
- [23] Sangster-Guity, N., Conrad, B.H., Papadopoulos, N., *et al.* (2011) ATR Mediates Cisplatin Resistance in a *p53* Genotype-Specific Manner. *Oncogene*, **30**, 2526-2533. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.624>
- [24] Chen, T., Middleton, F.K., Falcon, S., *et al.* (2015) Development of Pharmacodynamic Biomarkers for ATR Inhibitors. *Molecular Oncology*, **9**, 463-472. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2014.09.012>
- [25] Chen, H., Lisby, M. and Symington, L.S. (2013) RPA Coordinates DNA End Resection and Prevents Formation of DNA Hairpins. *Molecular Cell*, **50**, 589-600. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.04.032>
- [26] Liu, Q., Kirubakaran, S., Hur, W., *et al.* (2012) Kinome-Wide Selectivity Profiling of ATP-Competitive Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Inhibitors and Characterization of Their Binding Kinetics. *Journal of Biological Chemistry*, **287**, 9742-9752. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.304485>
- [27] Liu, Q., Xu, C., Kirubakaran, S., *et al.* (2013) Characterization of Torin2, an ATP-Competitive Inhibitor of mTOR, ATM, and ATR. *Cancer Research*, **73**, 2574-2586. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-1702>
- [28] Toledo, L.I., Murga, M., Fernandez-Capetillo, O. (2011) Targeting ATR and Chk1 Kinases for Cancer Treatment: A New Model for New (and Old) Drugs. *Molecular Oncology*, **5**, 368-373. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2011.07.002>
- [29] Foote, K.M., Nissink, J.W.M., Mcguire, T., *et al.* (2018) Discovery and Characterization of AZD6738, a Potent Inhibitor of Ataxia Telangiectasia Mutated and Rad3 Related (ATR) Kinase with Application as an Anticancer Agent. *Journal of Medicinal Chemistry*, **61**, 9889-9907. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b01187>
- [30] Do, K. and Chen, A.P. (2013) Molecular Pathways: Targeting PARP in Cancer Treatment. *Clinical Cancer Research*, **19**, 977-984.
- [31] Gaudio, E., Tarantelli, C., Spriano, F., *et al.* (2019) Abstract 274: The ATR inhibitor BAY 1895344 Shows Strong Preclinical Activity in Lymphomas and Appears Associated with Specific Gene Expression Signatures. *Cancer Research*, **79**, 2740. <https://doi.org/10.1158/1538-7445.AM2019-274>
- [32] Cepeda, V., Fuertes, M.A., Castilla, J., *et al.* (2006) Poly(ADP-Ribose)Polymerase-1(PARP-1) Inhibitors in Cancer Chemotherapy. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*, **1**, 39-53.
- [33] Sarkaria, J.N., Busby, E.C., Tibbetts, R.S., *et al.* (1999) Inhibition of ATM and ATR Kinase Activities by the Radiosensitizing Agent, Caffeine. *Cancer Research*, **59**, 4375-4382.
- [34] Nishida, H., Tatewaki, N., Nakajima, Y., *et al.* (2009) Inhibition of ATR Protein Kinase Activity by Schisandrin B in DNA Damage Response. *Nucleic Acids Research*, **37**, 5678-5689. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp593>
- [35] Peasland, A., Wang, L.Z., Rowling, E., *et al.* (2011) Identification and Evaluation of a Potent Novel ATR Inhibitor, NU6027, in Breast and Ovarian Cancer Cell Lines. *British Journal of Cancer*, **105**, 372-381.
- [36] Barsanti, P.A., Aversa, R.J., Jin, X., *et al.* (2015) Structure-Based Drug Design of Novel Potent and Selective Tetrahydropyrazolo [1,5-*a*]pyrazines as ATR Inhibitors. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, **6**, 37-41. <https://doi.org/10.1021/ml500353p>
- [37] Combes, E., Andrade, A.F., Tosi, D., *et al.* (2019) Inhibition of Ataxia-Telangiectasia Mutated and RAD3-Related (ATR) Overcomes Oxaliplatin Resistance and Promotes Antitumor Immunity in Colorectal Cancer. *Cancer Research*, **79**, 2933-2946. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-2807>
- [38] Bradbury, A., Hall, S., Curtin, N., *et al.* (2020) Targeting ATR as Cancer Therapy: A New Era for Synthetic Lethality

- and Synergistic Combinations? *Pharmacology & Therapeutics*, **207**, Article ID: 107450. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2019.107450>
- [39] Wallez, Y., Dunlop, C.R., Johnson, T.I., *et al.* (2018) The ATR Inhibitor AZD6738 Synergizes with Gemcitabine *in Vitro* and *in Vivo* to Induce Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Regression. *Molecular Cancer Therapeutics*, **17**, 1670-1682. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-18-0010>
- [40] Lecona, E. and Fernandez-Capetillo, O. (2018) Targeting ATR in Cancer. *Nature Reviews Cancer*, **18**, 586-595. <https://doi.org/10.1038/s41568-018-0034-3>
- [41] Vendetti, F.P., Leibowitz, B.J., Barnes, J., *et al.* (2017) Pharmacologic ATM But Not ATR Kinase Inhibition Abrogates p21-Dependent G1 Arrest and Promotes Gastrointestinal Syndrome after Total Body Irradiation. *Scientific Reports*, **7**, Article No. 41892. <https://doi.org/10.1038/srep41892>
- [42] Sarkaria, J.N., Tibbetts, R.S., Busby, E.C., *et al.* (1998) Inhibition of Phosphoinositide 3-Kinase Related Kinases by the Radio Sensitizing Agent Wortmannin. *Cancer Research*, **58**, 4375-4382.
- [43] Grara, X., Luca, A.D., Sang, N., *et al.* (1994) PITALRE, a Nuclear CDC2-Related Protein Kinase That Phosphorylates the Retinoblastoma Protein *in Vitro*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **91**, 3834-3838. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.9.3834>
- [44] Couch, F.B., Bansbach, C.E., Driscoll, R., *et al.* (2013) ATR Phosphorylates SMARCAL1 to Prevent Replication Fork Collapse. *Genes & Development*, **27**, 1610-1623. <https://doi.org/10.1101/gad.214080.113>
- [45] Pleschke, J.M., Kleczkowska, H.E., Strohm, M., *et al.* (2000) Poly(ADP-Ribose) Binds to Specific Domains in DNA Damage Checkpoint Proteins. *Journal of Biological Chemistry*, **275**, 40974-40980.
- [46] Deng, S.K., Yin, Y., Petes, T.D., *et al.* (2015) Mre11-Sae2 and RPA Collaborate to Prevent Palindromic Gene Amplification. *Molecular Cell*, **60**, 500-508. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.09.027>