

细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂

罗蕴,胡永洲(浙江大学药学院药物研究所,杭州 310006)

摘要:目的 系统介绍细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK)抑制剂的抗肿瘤作用。方法 对近几年国外有关 CDK 抑制剂的发现、构效研究及临床试验等文献进行检索和综述。结果 olomoucine, roscovitine 等三取代嘌呤类化合物, flavopiridol 及 butyrolactone 三类化合物具有明显的 CDK 抑制活性,对多种人类肿瘤均有疗效,且不良反应小。结论 细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK)抑制剂有望成为新一代抗肿瘤药。

关键词:细胞周期;细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK)抑制剂;肿瘤治疗 olomoucine; roscovitine; flavopiridol; butyrolactone

中图分类号:R917.796;R979.1 文献标识码:A 文章编号:1007-7693(2003)05-0360-04

Cyclin dependent kinase inhibitor: novel approaches for cancer therapy

LUO Yun, HU Yongzhou (College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, 310006, China)

ABSTRACT:OBJECTIVE To systematically introduce the anticancer function of cyclin dependent kinase inhibitor. **METHOD** Consulting the literature both in domestic and foreign, the development and action mechanism study of CDKs inhibitors were reviewed. **RESULTS** There are three classes of CDK inhibitors that show strong specificity for CDKs: purine-based compound olomoucine and its analogues, flavopiridol and butyrolactone. **CONCLUSION** The rapid development of CDK inhibitors must be just around the corner.

KEY WORDS:cell cycle; cyclin dependent kinase(CDK) inhibitor; cancer therapy; olomoucine; roscovitine; flavopiridol; butyrolactone

肿瘤是一种多基因相关疾病,细胞周期关卡是新型抗癌药物的潜在靶点。细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK)抑制剂可有效阻止癌细胞周期进程从而抑制肿瘤细胞增生,对提高抗癌药物的疗效和寻找新的抗肿瘤物质具有重要意义。

细胞周期蛋白(cyclin)和细胞周期蛋白依赖性激酶(cyclin dependent kinase, CDK)均属细胞周期调节正控蛋白。细胞周期蛋白^[1-7]有种属特异性与组织特异性。不同来源的细胞周期蛋白在结构上差异很大,但都含有1个约100个氨基酸的同源序列,称为细胞周期蛋白盒(cyclin box)。靠此结构域与CDK结合形成活性复合物(cyclin-CDK)。细胞周期蛋白和CDK分别作为此活性复合物的催化亚基和调节亚基,对细胞周期的启动及各时相的转换进行关键性调控。

CDK类型按数字命名,包括CDK2至CDK7。CDK类均属于丝氨酸和苏氨酸激酶。CDKs含有一个由300个氨基酸组成的核,其中40%以上的结构域被称为PSTAIRE区。此区与细胞周期蛋白盒之间互相结合,形成活性复合物^[8-9]。细胞周期蛋白D能与CDK2, CDK4, CDK5, CDK6结合,所形成的活性复合物是G₀/G₁期转换与G₁早期所需。细胞周期蛋白E可与CDK2, CDK3结合,为G₁/S期DNA合成与M期有丝分裂的活化复合物。

基于CDKs在调控肿瘤细胞的增殖与死亡中所起的关键作用,通过抑制CDKs治疗肿瘤的策略已在动物模型中体

现出它的价值。CDKs抑制剂主要有两种,一种是生物抑制剂,均为低分子量蛋白质,由不同结构基因所表达。目前共发现七种,根据结构功能的差异分为两大类:一类称双重变异家族,包括p21, p27, p57;另一类叫锚蛋白家族,包括p15, p16, p18, p19。如注射腺病毒表达的p21重组蛋白能显著抑制p53缺失肿瘤的生长^[28]。另一种是CDKs化学抑制剂。近几年来,由于对晶体结构的了解允许人们进行分子模拟研究,设计开发高效、选择性CDKs化学抑制剂的研究取得了突破性进展,可以说这类化合物每天都有新的成员在增加。本实验将着重介绍CDKs化学抑制剂。

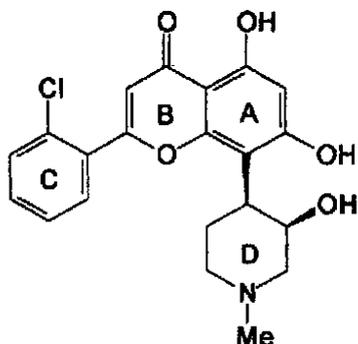
我们可把已发现的CDKs化学抑制剂^[22,23]分为六类: olomoucine, roscovitine 等三取代嘌呤类抑制剂; flavopiridol; butyrolactone; staurosporine, UCN-01 等喹啉唑啉类抑制剂; suramin; 9-hydroxyellipticine。它们都是通过与ATP竞争结合激酶的ATP结合位点而起作用的,属丝/苏氨酸蛋白激酶抑制剂。研究发现 staurosporine, UCN-01, suramin 对CDKs的选择性并不高,而9-hydroxyellipticine对CDK2的抑制活性还不明确,这里不作详细介绍。由于目前只有Flavopiridol进入临床试验,所以下面详细介绍此化合物,并着重介绍几类新发现的高效、选择性CDKs抑制剂^[19]。

1 Flavopiridol

CDKs的成功发现和克隆促使人们去设计新的CDK活

性调节物。在 NIH 大规模抗癌物筛选中, flavopiridol 脱颖而出, 成为一种新型低毒性的研究药物。flavopiridol 是由一种源于植物 (CDYISOXYLUM BINECTARIFERUM) 的黄酮类化合物经结构修饰得到的。目前正处于一期和二期癌症临床试验^[30]。

Flavopiridol



1.1 作用机制

利用 DNA 芯片发现癌症药物 flavopiridol 杀死癌症细胞的方式的研究显示, flavopiridol 广泛地抑制了信使 RNA (mRNA) 分子, 最终导致某种蛋白质生产的停止。关键在于正常细胞和癌细胞之间的差异, 传递指导癌细胞无控制生长的信息的 RNA 分子是短命的, 因此癌细胞必须依赖于不断地合成 mRNA 来增殖。flavopiridol 的存在抑制了 mRNA 的合成, 癌症细胞转化信息就不能传递给核糖体。而正常细胞的 mRNA 寿命较长, 即使 flavopiridol 抑制了新的 mRNA 的合成仍能保持正常的细胞周期进程。

1.2 药效学

临床前肿瘤移植模型试验表明 flavopiridol 可抑制结肠直肠癌细胞和前列腺癌细胞的生长, 并对白血病/淋巴瘤有明显活性。同时发现此化合物能在 G₁/S 和 G₂/M 期明显阻滞细胞周期进程, 经证明 flavopiridol 对 CDK1, 2, 4 和 7 具有高效选择性抑制活性。其 IC₅₀ 值分别为: CDK1 IC₅₀ 0.03 mmol/L; CDK2 IC₅₀ 0.17 mmol/L; CDK4 IC₅₀ 0.1 mmol/L; PKA IC₅₀ 960 mmol/L; PKC IC₅₀ 14 mmol/L; EGFR IC₅₀ 22 mmol/L。

1.3 药动学

I 期临床试验对 76 例患者每两周连续注射 flavopiridol 72h 进行监测。测得抑制 CDK 的有效血浆浓度为 300 ~ 500 nmol/L。剂量限制毒性 (DLT) 为分泌型腹泻, 最大耐受剂量 (MTD) 为 50 mg/(m²·d) × 3。为了解此毒性的起因, 人们做了以上皮细胞为模型的体外试验, 发现所用剂量的 flavopiridol 会导致氯化物分泌。针对这一研究结果人们设计了腹泻预防疗法, 运用该法使最大耐受剂量 (MTD) 提高到 78 mg/(m²·d) × 3。更高的剂量则会引起可逆性血压降低及高烧、疲劳、局部肿瘤疼痛等炎症综合症。

1.4 临床应用

flavopiridol 可使肿瘤萎缩, 尤其是对 non-Hodgkin's 淋巴瘤、肾癌、前列腺癌患者效果更为明显, 在某些情况下持续效果达 6 个月。如其中一例顽固性肾脏肿瘤萎缩体积大于 50%。在此项试验过程中有 5 人接受 flavopiridol 注射长达 1 年以上,

1 人接受注射时间超过 2 年。该试验结果与临床前研究发现 flavopiridol 可使肿瘤生长停滞的现象一致。flavopiridol 是第一个经临床试验证实的 CDK 抑制剂, 这些有利的结果将对用新的 CDK 调节分子治疗癌症的发展起促进作用^[31]。

1.5 flavopiridol 衍生物生物活性研究

为寻找选择性更高更有效的 CDKs 抑制剂, 人们对 flavopiridol 进行结构改造, 发现有以下构效关系。

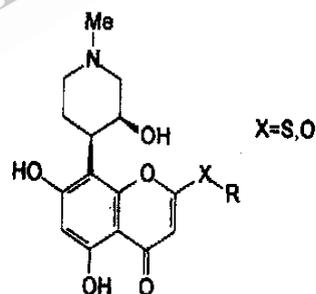
1.5.1 D 环 羟基和哌啶环的顺式结构非常重要, 其反式异构体对 CDK4/cyclinD 和 CDK1/cyclinB 的活性下降 1 000 多倍。哌啶环上的羟基被消除或被氧化成酮基活性下降 4 ~ 6 倍。用六元碳环代替哌啶环活性几乎丧失, 可见 N 原子对于 CDK 抑制活性的重要性。N 原子的位置也非常关键。

X 晶体衍射表明带羟基的哌啶环占据 CDK2 的磷酸键位, 并且 N 原子与 Asp145 相互作用, 羟基与 Lys33 相互作用。以上构效关系表明 N 与 Asp145 的作用非常关键, 羟基与 Lys33 的作用则不那么关键^[32]。

1.5.2 C 环 可用其他卤素原子代替氯原子, 但 2 位氯取代活性最高。用杂环如吡啶取代芳香 C 环, 活性没有明显变化。用六元碳环取代则活性降低。

1.5.3 母核 对黄酮母核的改造所得结果如下: 5 位和 7 位羟基对活性非常重要。C 环去氯衍生物与 CDK2 的 X 共晶体衍射表明: 5 位羟基及黄酮羰基可分别与腺嘌呤的 E81 及 E83 形成氢键。

1.5.4 Thio-, Oxoflavopiridols Flavopiridol 可广泛有效抑制 CDKs 的活性, 而 Thio-, Oxoflavopiridols 则对 CDK1 有较高的抑制作用, 并且对 CDKs 的选择性较高, 如 Thioflavopiridols 对 CDK2 的活性高于 CDK4 20 倍; Oxoflavopiridols 对 CDK2 的活性高于 CDK4 50 ~ 150 倍。



大致上说, S, O 上连接疏水基团时对 CDK1 的选择性要高于连接亲水基团时, 而芳环不是必要基团。

flavopiridol 和 Thioflavopiridols 与 CDK2 的 X 共晶体衍射图揭示了抑制作用的分子基础。为了揭示 Thioflavopiridols 对 CDK1 的选择性高于 flavopiridol 的原因, 人们比较分析了 CDK1, 2, 4 的序列, 发现它们在 ATP 结合位点的残基并没有多大差别, 因此可知其选择性是源自于分子间的相互作用。将 Flavopiridol 和 Thioflavopiridols 与 CDK 的共晶模型进行比较分析, 发现是后者的氯苯环区域引起差异, 这可能有助于解释其选择性。Thioflavopiridols 与 CDK1 中 Ile10 (一种存在与 CDK1, 2, 4 的残基) 的相互作用要大于 CDK2 和 CDK4。将 Thioflavopiridol-CDK2 与 flavopiridol-CDK2 的中心

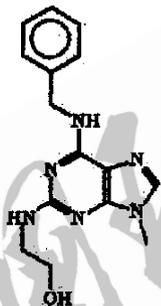
原子重叠发现后者 Ile10 的侧链只能轻微扭动。与 flavopiridols 相比, Thioflavopiridols 中与 S 相连的氯苯基离 Ile10 较远, 而离 Lys89 较近, 并且 Lys89 侧链烃基在其氯苯基的范德华力范围之内, Lys89 的 N 原子还能与芳环形成特有的氨基-芳香基团作用。在 flavopiridols-CDK2 结构中发现 Lys89 处于不同位置, 并且靠近 Gln85 (Lys89 的 N 与 Gln85 的 O 相距 0.359 nm)。虽然 Lys89 本身的顺序没有改变, 但它附近的残基顺序改变不仅使该区域的亲水性增加还影响到构象, 使 Lys89 向 Thioflavopiridols 的氯苯环偏转^[29]。

进一步比较 Thioflavopiridols 与 flavopiridols 所得数据表明 CDK1 选择性的抑制剂有独特的抗肿瘤谱且不良反应较小。这类高选择性的 flavopiridols 衍生物将进入临床前评估。

2 三取代嘌呤类抑制剂^[20, 21]

第一个作为 Cdc2 (即 CDK1) 抑制剂被发现化合物是 6-di methyl aminopurine (DMAP; $IC_{50} = 120 \mu\text{mol/L}$), 当时它是作为嘌呤霉素类似物用以阻断海胆胚胎的有丝分裂而不抑制蛋白质合成。后来人们对它的结构进行改造, 发现异戊基腺嘌呤的 Cdc2 抑制活性更高 ($IC_{50} = 7 \mu\text{mol/L}$), 且对 CDKs 有选择性, 从而导致了 Olomoucine 的发现。

2.1 Olomoucine (2-(2-hydroxyethylamino)-6-benzylamino-9-methylpurine)

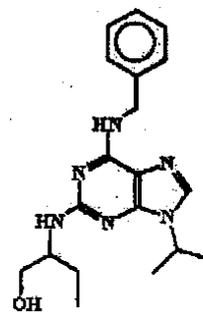


35 种激酶试验发现 Olomoucine 只抑制 Cdc2, Cdk2, Cdk5 ($IC_{50}: 7 \mu\text{mol/L}$) 及 MAP 激酶 ($IC_{50}: 30 \mu\text{mol/L}$), 对 Cdk6 抑制活性很小, 对 Cdk4 则无活性。将 Olomoucine 和 Cdk2, 异戊基腺嘌呤和 Cdk2 两个共晶结构进行比较发现: 虽然两者都与 CDK 的 ATP 结合位点结合, 但腺嘌呤每条侧链的定位都与腺嘌呤 ATP 完全不同, 而 Olomoucine 的嘌呤部分与 Leu83 之间形成两个氢键; N8 的酸性 H 与 Glu81 只相距 3.0 Å, 非常适于形成氢键; Lys89 与 Olomoucine 的苯基形成特有的氨基-芳香基团作用; Gln31 与 Olomoucine 侧链的羟基形成氢键。这有利于解释 Olomoucine 对 CDKs 的选择性^[33, 34]。

Olomoucine 可抑制细胞分裂的 G_1 期、 G_2 /M 过渡期 (有丝分裂早期/中期); 加速分裂中期/后期过渡期; 当 DNA 损伤时可促使细胞凋亡。

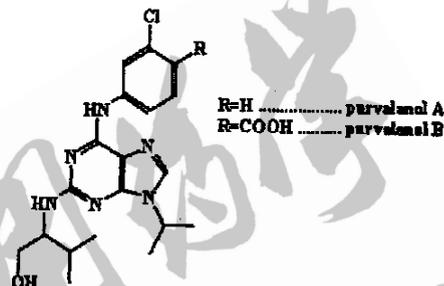
2.2 Roscovitine (2-(1-D, L-hydroxy methylpropylamino)-6-benzylamino-9-isopropyl Purine)

Roscovitine 对 Cdk2 抑制活性是 Olomoucine 的 17 倍 (CDK2 $IC_{50}: 0.45 \mu\text{mol/L}$), Cdk5 ($IC_{50}: 0.2 \mu\text{mol/L}$)。Roscovitine 与 Cdk2 的共晶结构与 Olomoucine-CDK2 共晶十分相似, 主要区别在于与 Phe80 的作用。

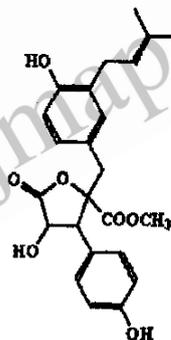


2.3 其他

最近发现的三取代嘌呤类抑制剂中 Purvalanol B 的 Cdk2/cyclinA 活性是 Olomoucine 的 1 000 倍 (CDK2 $IC_{50} 6 \text{ nmol/L}$), 但其酸性降低了膜通透性。Purvalanol A 虽然活性较弱 ($IC_{50} \text{ Cdk2/cyclin A} = 70 \text{ Nm}$), 但膜通透性很好。



3 Butyrolactone



Butyrolactone 是一种来源于植物 *Aspergillus terreus* var. *africanus* 的低分子量 CDK 抑制剂。它对 Cdc2 和 Cdk2 有较高选择性, 而对 Cdk4, 有丝分裂活化蛋白激酶, 蛋白激酶 C, cAMP 依赖性激酶 I 和 cAMP 依赖性激酶 II, 酪蛋白激酶以及表皮生长因子受体酪氨酸激酶均无活性。它还可以阻止细胞核中组蛋白磷酸化。基于 Butyrolactone 的高选择性, 人们将它作为研究 cdc2 和 CDK2 的功能的有用工具。

实验证明它能阻止人类 pcl4 癌细胞的增生。多耐药人类 WI-38 细胞对它也相当敏感, 因为它能阻止视网膜母细胞瘤蛋白 (pRb) 和组蛋白磷酸化, 阻碍 WI-38 细胞周期中 G_2 /M 转化。Butyrolactone 对多种肿瘤细胞的体外抑制作用已被人们证实。

4 展望

CDKs 抑制剂对于人类癌症的治疗具有相当可观的前景。目前, flavopiridol 已进入临床试验, 其他几类抑制剂尚处于体外试验阶段。虽然人们已发现了许多有用的 CDKs 抑制剂, 但特异性高的还只占少数, 寻找特异的 CDKs 抑制剂

将至关重要。同时还需注意,蛋白激酶抑制剂在体外和完整细胞内的作用可能有所不同,其抑制常数可受细胞内大量因素的影响。无论如何,以细胞周期关卡为靶点的肿瘤治疗新时代即将到来。

参考文献

- [1] Morgan DO. Principles of CDK regulation[J]. Nature, 1995, 374:131 .
- [2] Sherr CJ. Mammalian G1 cyclin[J]. Cell, 1993, 73:1059 .
- [3] Quelle DE, Ashmun RA, Shurtleff SA, *et al.* Over expression of mouse D-type cyclins accelerates G₁ phase in rodent fibroblasts [J]. Genes Develop, 1993, 7:1559 .
- [4] Ohtsubo M, Theodoras AM, Schumacher J, *et al.* Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G₁-to-S phase transition [J]. Mol Cell Biol, 1995, 15:2612 .
- [5] Feng XH, Filvaroff EH, Derynck R. Transforming growth factor- β (TGF β) induced down-regulation of cyclin expression requires a function TGF β receptor complex[J]. J Biol Chem, 1995, 270:24237 .
- [6] Coleman TR, Dunphy WG. Cdc 2 regulatory factors[J]. Curr Opin Cell Biol, 1994, 6:877 .
- [7] Solomon MJ, Harper JW, Shurtleworth J. CAK, the p34cdc2 activation kinase, contains a protein identical or closely related to p40 MO15[J]. EMBO J, 1993, 12:3133 .
- [8] Lee E. Cyclin dependent kinase regulation[J]. Curr Opin Cell Biol, 1995, 7:773 .
- [9] Shankland SJ. Cell circle control and renal disease[J]. Kidney Int, 1997, 52:294 .
- [10] la Thangue NB. DP and E2F proteins. Components of a heterodimeric transcription factor implicated in cell cycle control[J]. Curr Opin Cell Biol, 1994, 6:433 .
- [11] Chen IT, Akamatsu M, Smith ML, *et al.* Characterization of p21 Cipl/ Waf1 peptide domains required for cyclin E/ CDK2 and PCNA interaction[J]. Oncogene, 1996, 12:595 .
- [12] Li R, Wana S, Hannon GJ, *et al.* Differential effects by the p21 CDK inhibitor on PCNA-dependent DNA replication and repair [J]. Nature, 1994, 6:443 .
- [13] Coats S, Flanagan WM, Nourse J, *et al.* Equipment of p27 Kipl for restriction point control of the fibroblast cell cycle[J]. Science, 1996, 272:877 .
- [14] Hengst L, Reed SI. Translational control of p27 accumulation during the cell cycle[J]. Science, 1996, 271:1861 .
- [15] Matsuoka S, Edwards MC, Bai C, *et al.* P57 kip 2, a structurally distinct member of the p21 Cipl CDK inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene[J]. Genes Develop, 1995, 9:650 .
- [16] Cordon-Cardo C. Mutation of cell cycle regulators. Biological and clinical implications for human neoplasia[J]. Am J Pathol, 1995, 147:515 .
- [17] Hirai H, Roussel MF, Kati JY, *et al.* Novel INK4 proteins, P19 and P18 are specific inhibitors of the cyclin D dependent kinase CDK6[J]. Mol Cell Biol, 1995, 12:503 .
- [18] Sherr CJ, Roberts JM. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases[J]. Genes Develop, 1995, 9:1149 .
- [19] Michelle D Garrett, Ali Fattaey. CDK inhibition and cancer therapy[J]. Current Opinion in Genetics & Development, 1999, 9:104 .
- [20] Knockaert M, Gray N, *et al.* Intracellular targets of cyclin-dependent kinase inhibitors: identification by affinity chromatography using immobilised inhibitors[J]. Chemistry & Biology, 2000, 7:411 .
- [21] ong-Tae Chang, Nathanael S Gray, *et al.* Synthesis and application of functionally diverse 2,6,9-trisubstituted purine libraries as CDK inhibitors[J]. Chemistry & Biology, 1999, 6:361 .
- [22] John K Buolamwini. Novel anticancer drug discovery[J]. Current Opinion in Chemical Biology, 1999, 3:500 .
- [23] Edward Asausville, Daniel Zaharevitz, *et al.* Cyclin-Dependent kinases: initial approaches to exploit a novel therapeutic target [J]. Pharmacol Ther, 1999, 82(2-3):285 .
- [24] 方芳,刘景生. 蛋白激酶抑制剂[J]. 基础医学与临床, 1996, 16(2):23 .
- [25] 邵光荣,甄永苏. 以细胞周期关卡为靶点的肿瘤治疗[J]. 浙江肿瘤, 2000, 6(3):131 .
- [26] 李月彬,查锡良. 细胞周期蛋白依赖的蛋白激酶抑制剂与肿瘤[J]. 生命的化学, 1997, 17(4):8 .
- [27] 齐晖,戴勇. 细胞周期调节蛋白与肾脏疾病[J]. 国外医学 泌尿系统分册, 1998, 18(4):147 .
- [28] Eastham JA, Hall SJ, Sehgal I, *et al.* *In vivo* gene therapy with p53 or p21 adenovirus for prostate cancer[J]. Cancer Res, 1995, 55:5151 .
- [29] Kyoung SK, John SS, *et al.* Thio- and oxo-flavopiridols, cyclin-dependent kinase 1-selective inhibitors: synthesis and Biological Effects[J]. J Med Chem, 2000, 43, 4126 .
- [30] Krishna KM, Marja Dubay, *et al.* Structure-Activity Relationship Studies of Flavopiridol Analogues[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2000, 10:10037 .
- [31] Nikos GO, Joachim BS, *et al.* Flavopiridol Inhibits Glycogen Phosphorylase by Binding at the Inhibitor Site[J]. Biol Chem, 2000, 257:44,34566 .
- [32] Alexandre Gross, David RB, *et al.* A Stereocontrolled approach to substituted piperidones and piperidines: fflavopiridol D ring analogs[J]. Tetrahedron Lett, 2001, 42:1631 .
- [33] Michel L, Odile L, *et al.* Synthesis of C2 Alkynylated Purines, A New Family of Potent Inhibitors of Cyclin-Dependent kinases [J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letter, 1998, 8:793 .
- [34] Christine EA, Thomas boyle F, *et al.* Identification of Novel Purine and Pyrimidine Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors with Distinct Molecular Interactions and Tumor Cell Growth Inhibition Profiles[J]. J Med Chem, 2000, 43:2797 .

收稿日期:2002-02-26