

## ·综述·

# II型 p21 激活激酶在肿瘤中的调节作用及其抑制剂研究进展

牟杰<sup>a,b</sup>, 李龙宝<sup>a</sup>, 孟思寒<sup>b</sup>, 裴冬生<sup>c</sup>(徐州医科大学, a.药学院, b.江苏省新药研究与临床药学重点实验室, c.病理学教研室, 江苏徐州 221004)

**摘要:** p21 激活激酶(p21-activated kinases, PAKs)是小 GTP 酶 Rho 家族的成员 Rac 和 Cdc42 的下游靶蛋白, 参与调节细胞骨架重构和细胞运动等多种生物功能。PAKs 家族分为 I 型 PAKs(PAK1~3)和II型 PAKs(PAK4~6), 其中II型 PAKs 在多种肿瘤中高表达, 并与肿瘤的发生和预后密切相关。II型 PAKs 对肿瘤的增殖、凋亡、侵袭和转移起到重要的调控作用, 成为有研发前途的抗肿瘤靶点。本文从II型 PAKs 在肿瘤领域的研究进展及其抑制剂在肿瘤中的作用进行综述, 期望为开发选择性 II 型 PAKs 抑制剂提供参考。

**关键词:** II 型 p21 激活激酶; 肿瘤; 抑制剂; 亚型选择性

中图分类号: R966 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2021)20-2608-08

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.20.024

引用本文: 牟杰, 李龙宝, 孟思寒, 等. II 型 p21 激活激酶在肿瘤中的调节作用及其抑制剂研究进展[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(20): 2608-2615.

## Research Progress of Regulatory Role of Group II p21-Activated Kinases in Cancer and the Development of the Inhibitors

MOU Jie<sup>a,b</sup>, LI Longbao<sup>a,b</sup>, MENG Sihan<sup>b</sup>, PEI Dongsheng<sup>c</sup>(Xuzhou Medical University, a.School of Pharmacy, b.Jiangsu Key Laboratory of New Drug and Clinical Pharmacy, c.Department of Pathology, Xuzhou 221004, China)

**ABSTRACT:** p21-activated kinases(PAKs) are important downstream effector molecules of the small G protein RHO family Rac and Cdc42 which involved in regulating various biological functions such as cytoskeletal remodeling and cell movement. The human PAKs family can be divided into two types: type I PAKs(PAK1-3) and type II PAKs(PAK4-6), in which type II PAKs are highly expressed in various tumors and are closely related to the occurrence and prognosis of tumors. Type II PAKs play the vital role in the regulation of tumor proliferation, apoptosis, invasion and metastasis, and become a promising anti-tumor target. Herein, the research progress of type II PAKs in oncology and the roles of their inhibitors in cancer were reviewed, expecting to develop selective type II PAKs inhibitors.

**KEYWORDS:** group II p21-activated kinase; tumor; inhibitor; subtype selectivity

在肿瘤的发生发展过程中, 细胞信号传导通路蛋白磷酸化和去磷酸化之间的平衡起着重要作用。p21 活化激酶(p21-activated kinase, PAK)是一组在进化程度上保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 是小 GTP 酶 Rho 家族的成员 Rac 和 Cdc42 的下游靶蛋白, 在人类疾病中起到非常重要的促进作用。II型 PAKs(PAK4~6)是 PAK 家族中与人类肿瘤关系最密切的成员, 在乳腺癌、卵巢癌等多种肿瘤细胞中高表达, 且与肿瘤细胞的增殖和侵袭转移呈正相关<sup>[1]</sup>。最新研究发现抑制 I 型 PAKs(PAK1~3)的激酶活性会引起急性心血管毒性<sup>[2]</sup>, 因此开发选

择性II型 PAKs 抑制剂治疗肿瘤更加重要。本文从 II型 PAKs 的结构、与肿瘤的关系及已报道的II型 PAKs 抑制剂的研究进展进行简要综述。

### 1 II型 PAKs 与肿瘤

#### 1.1 II型 PAKs 的结构

II型 PAKs 结构高度相似, 都包括 N-末端 p21-GTP 酶结合结构域(protein binding domain, PBD)和高度保守的 C-末端激酶结构域。II型 PAKs 与 GTP-Rac 或 GTP-Cdc42 的结合不会提高其激酶活性, 但能调节其定位以及与其他蛋白质的相互作用。II型 PAKs 在其 N-末端区域内具有自身抑制假

基金项目: 国家自然科学基金项目(81872080, 81572349); 江苏省自然科学基金项目(BK20181148); 徐州市推动科技创新项目(KC20245); 江苏省研究生科研创新计划(KYCX20\_2510); 江苏省高等学校大学生实践创新训练计划(201910313073Y, 201910313098H)

作者简介: 牟杰, 女, 博士, 副教授 Tel: (0516)83262137 E-mail: mou.jie@126.com

底物结构域，在没有任何 GTP 酶的情况下抑制其激酶活性<sup>[3]</sup>。此外，II型 PAKs 的激酶结构域的序列同源性虽然高达 79%~95%<sup>[4]</sup>，但各自又存在明显的结构差异，其中 PAK4 含有一个鸟嘌呤核苷酸交换因子结合位点，而在 PAK5 和 PAK6 中不存在此结构；PAK5 含有自抑制域(auto-inhibition domain, AID)，而在 II型 PAK 其他成员不存在此结构<sup>[5]</sup>。

## 1.2 II型 PAKs 调控肿瘤的分子机制

II型 PAKs 在肿瘤细胞增殖、凋亡、迁移、黏附和侵袭中发挥了重要作用。II型 PAKs 蛋白过表达、基因扩增和过度激活促进了许多肿瘤的发生发展。研究表明 II型 PAKs 是连接肿瘤信号通路的枢纽分子<sup>[6-7]</sup>，见图 1。

Ras 致癌基因(主要是 K-Ras)普遍存在于胰腺癌<sup>[8]</sup>、结肠直肠癌<sup>[9]</sup>和非小细胞肺癌<sup>[10]</sup>肿瘤细胞中，Ras 可通过其下游 Rac 和 Cdc42 激活 PAKs 的功能。敲除 PAK4 基因可抑制携带突变 K-Ras 的 HCT116 结肠癌细胞增殖，这种抑制作用独立于 Raf/MEK/ERK 或 PI3K/AKT 信号通路<sup>[6]</sup>。此外，使用定点诱变获得的组成型活性 PAK4-S445N 突变体，在激酶亚结构域 VIb 内的催化环中的氨基酸 445 处引入了丝氨酸至天冬酰胺突变，该残基的突变可以稳定催化环，突变体的过表达与 Ras 一样会促进永生化成纤维细胞的贴壁生长，这是癌变的重要标志<sup>[11]</sup>。PAK4 与 PI3K 的 p85 $\alpha$  亚基结合后被激活，从而介导肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)诱导的下游细胞骨架和细胞黏附变化<sup>[12]</sup>。这种相互作用也可以解释 HGF 刺激的胰腺癌细胞侵袭<sup>[13]</sup>。Wnt 途径的异常激活是许多肿瘤的标志，如结直肠癌和肝细胞癌等。PAK4 可以通过多种机制调节 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路<sup>[14]</sup>。PAK4 磷酸化  $\beta$ -catenin 可抑制  $\beta$ -连

环蛋白泛素化，随后阻止蛋白酶体在细胞质中的降解<sup>[15]</sup>。PAK4 也参与  $\beta$ -catenin<sup>[16]</sup>的核转运。HGF 激活的 PAK4 磷酸化 LIM 激酶 1(LIMK1)<sup>[17]</sup>，LIMK1 使迁移细胞中的 Cofilin 磷酸化失活，从而降低 Cofilin 解聚 F-肌动蛋白的能力<sup>[18]</sup>。PAK4-LIMK1 途径不仅有助于胰腺癌的转移，对前列腺癌<sup>[18]</sup>、前列腺癌<sup>[19]</sup>、胃癌<sup>[20]</sup>和大肠癌<sup>[21]</sup>等肿瘤细胞的迁移和转移都是必不可少的。

PAK5 被称为是一种多效性激酶<sup>[22]</sup>。研究发现 PAK5 可以磷酸化 NF- $\kappa$ B 的 p65 亚基，促进 p65 的核转位，进而上调细胞周期素 CyclinD1 的表达，促进乳腺癌细胞在体内外的增殖<sup>[23]</sup>。PAK5 磷酸化 BAD 引起肿瘤细胞抗凋亡<sup>[24]</sup>。PAK5 可以通过磷酸化下游蛋白引起肿瘤细胞迁移和侵袭，如 PAK5 磷酸化 E47 抑制结肠癌转移；磷酸化 p120-catenin-Ser288 复合物引起细胞骨架重组，促进肿瘤细胞迁移和侵袭<sup>[25]</sup>；磷酸化 SATB1 促进宫颈癌细胞的迁移和侵袭<sup>[26]</sup>。PAK5 磷酸化 GATA-1 抑制乳腺癌细胞上皮间质转化；下调 PAK5 基因的表达可以抑制乳腺癌和脑胶质瘤细胞的迁移和侵袭<sup>[3]</sup>。PAK5 可以促进大肠癌细胞增殖、侵袭和迁移<sup>[27]</sup>。本课题组在肿瘤耐药研究中发现 PAK5 可以抑制顺铂诱导的肝癌细胞的凋亡，显示出 PAK5 对顺铂的药物抗性<sup>[28]</sup>。因为 15% 的黑色素瘤包含 PAK5 错义突变，所以 PAK5 被确立为人黑素瘤中最常改变的 PAK 家族成员。PAK5-S364L 和 PAK5-D421N 突变可以增强黑色素瘤细胞中 PKA 和 MAPK 信号传导的能力，将激酶活性导向有丝分裂途径<sup>[29]</sup>。此外，结肠直肠癌发现 PAK5-E144K 突变，肺腺癌、结肠腺癌和子宫内膜样瘤中发现 PAK5-S364L 突变，肺腺癌中发现 PAK5-D421N 突变<sup>[29]</sup>。

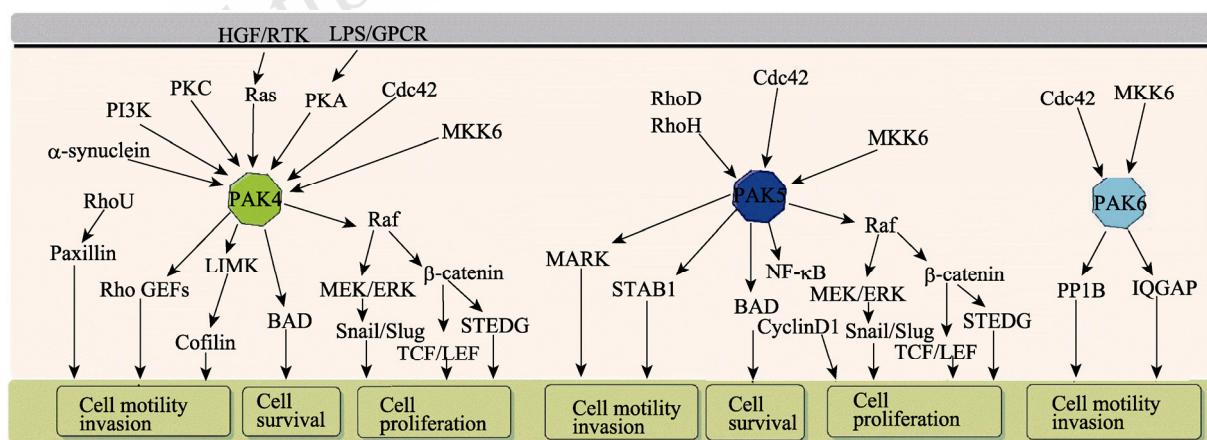


图 1 II型 PAKs 与肿瘤相关的信号通路

Fig. 1 Group II PAKs signaling pathways in cancer

PAK6 最初被克隆为雄激素受体(androgen receptor, AR)伴侣,与一系列涉及肿瘤进展的细胞过程相关。PAK6 可以结合支架蛋白 IQGAP(细胞骨架动力学调节剂)和蛋白磷酸酶 1B(一种潜在的细胞运动调节剂)参与肿瘤细胞的迁移和侵袭过程。Liu 等<sup>[30]</sup>的研究表明, MicroRNA-328 直接靶向 PAK6, 通过 microRNA-23a-PAK6-LIMK1 通路促进前列腺癌的转移<sup>[31]</sup>。相比较 PAK4 和 PAK5, PAK6 的研究相对较少, 迫切需要研究疾病产生过程中 PAK6 被调节的机制<sup>[7]</sup>。

## 2 II型 PAKs 抑制剂的开发及在肿瘤中的应用

根据激酶抑制剂的作用方式, 将II型 PAKs 抑制剂按照I型 ATP 竞争性抑制剂、I 1/2 型 ATP 竞争性抑制剂和非 ATP 竞争性抑制剂进行综述。

### 2.1 I型 ATP 竞争性抑制剂

**2.1.1 吡咯并吡唑型** 通过高通量筛选和基于 PAK4 蛋白结构的药物设计(structure-based drug design, SBDD)得到吡咯并吡唑类化合物 **1**, 在大鼠体内具有中等的口服生物利用度( $52 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ )和较高的体内清除率( $69 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ )。2 年后, Pfizer 公司研发出具有同样母核结构的 PAK4 抑制剂 PF-3758309(**2**, PAK4~6,  $IC_{50}$  约  $20 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 但因生物利用度差(~1%)和胃肠道等不良反应止步于针对晚期和转移性实体瘤治疗的 I 期临床试验<sup>[32]</sup>。化合物 **1** 和 **2** 的结构式见图 2。PF-3758309 与 PAK4 分子对接结果显示, 吡唑环上 1 位 NH、2 位 N 原子以及环外的 NH 与铰链区氨基酸残基形成“氢键供体—氢键受体—氢键供体”的结合模式, 见图 3。

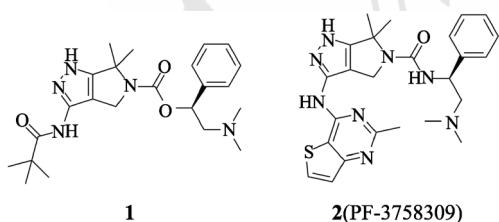


图 2 化合物 **1** 和 **2** 的结构式

Fig. 2 Structure of compound **1** and **2**

**2.1.2 吲哚-2-酮型** 含有吲哚咔唑结构片段的星形孢菌素(**3**, staurosporine, 十字孢碱)对多种激酶具有较高的抑制活性(PAK1  $IC_{50}=0.6 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , PAK4  $IC_{50}=0.6 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )<sup>[33]</sup>。星形孢菌素与 PAK4 的晶体复合物(PDB: 5VED)显示其甲氨基和 DFG 区的 Asp444 形成盐桥相互作用增强了与 PAK4 的

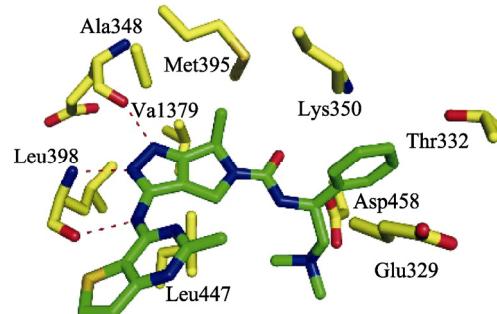


图 3 PF-3758309 与 PAK4(PDB: 2X4Z)的结合模式  
Fig. 3 Binding of PF-3758309 in the active site of PAK4

结合作用<sup>[34]</sup>。

舒尼替尼(Sunitinib, **4**)是一种口服小分子酪氨酸激酶抑制剂, 具有很强的抗血管生成和抗肿瘤活性, 但因肾毒性限制了其临床应用<sup>[35]</sup>。通过临床药师对治疗的干预, 可以克服舒尼替尼因药物代谢具有的肝损伤, 为实现舒尼替尼的个体化药物治疗提供了思路<sup>[36]</sup>, 也可以通过群体药动学研究调整给药方案<sup>[37]</sup>。舒尼替尼是 PAKs 激酶的弱抑制剂, 但对 II 型 PAKs 有一定选择性( $K_i$   $500\sim7000 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )。Guo 等<sup>[38]</sup>通过对比舒尼替尼、PF3758309 分别与 PAK4 的共结晶结构, 发现保留舒尼替尼中与 PAK4 铰链区作用的吲哚-2-酮结构, 去除舒尼替尼溶剂暴露区的二乙氨基乙酰胺基, 在吲哚-2-酮的 C5 位引入羟乙基酰胺基, 可以增强化合物与 PAK4 的 P-loop 区相互作用, 得到的化合物对 PAK4 酶活比舒尼替尼强 20 倍(化合物 **5~8**,  $IC_{50}=22, 16, 27, 25 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )。化合物 **3~8** 结构见图 4, 舒尼替尼与 PAK6(PDB:4KS8)的结合模式见图 5。利用分子对接, 在羟乙基酰胺基上插入疏水的苯基, 得到结构优化的化合物, 对 A549 和 HCT116 细胞的增殖抑制活性达纳摩尔级别。在激酶组谱筛选时, 代表性化合物 **8** 对 PAK4、BRAF、受体酪氨酸激酶(PDGFR $\alpha$ 、PDGFR $\beta$ 、FLT3、CSF1R、VEGFR1-2、FGFR1、RET)和非受体酪氨酸激酶 SRC 家族(SRC、YES 和 FYN)以及细胞周期和丝裂原活化蛋白激酶(CDK2、MAPK3)

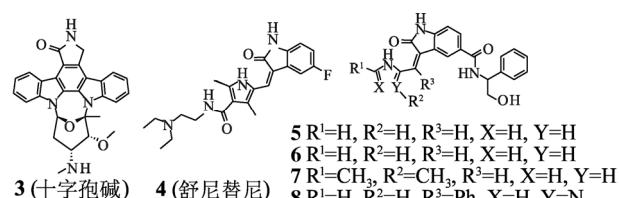


图 4 化合物 **3~8**

Fig. 4 Structure of compound **3~8**

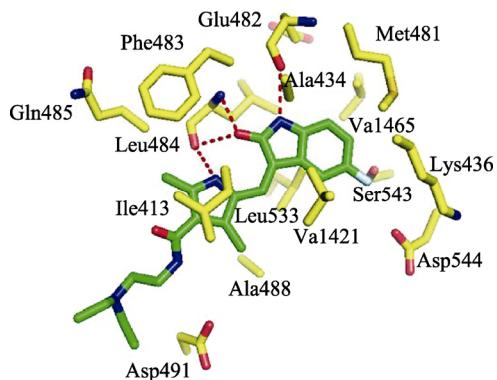


图 5 舒尼替尼与 PAK6(PDB:4KS8)的结合模式  
Fig. 5 Binding of Sunitinib in the active site of PAK6 (PDB:4KS8)

的抑制率>80%，但对 KIT 或 IGF1R 几乎没有影响<sup>[39]</sup>。化合物 8 的发现为基于 PAK4 的多靶点抑制剂的研究提供了参考。

**2.1.3 氨基喹唑啉型** RYU 等<sup>[40]</sup>通过高通量筛选的方法获得 1,3,5-三嗪化合物 KY04031(9, PAK4  $IC_{50}=790 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )，通过解析其与 PAK4 晶体复合物结构(PDB:4NJD)发现：三嗪结构模拟了 ATP 的核糖结构，取代的吲哚和苯并咪唑结构与 PAK4 铰链区相互作用，吲哚的氮原子与 Leu398 和 Gly401 形成氢键，苯并咪唑的碳原子与 Glu396 和 Gly401 形成氢键相互作用。KY-04031 对 PAK4 的抑制作用呈剂量依赖性关系，但比 PF3758309 抑制率低 10 倍。Hao 等<sup>[41]</sup>以 4-氨基喹唑啉和 2-氨基喹唑啉 2 种双环骨架替代 KY-04031 中 1,3,5-三嗪母核单环结构，得到化合物 11(PAK4  $IC_{50}=93 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )和 13(PAK4  $IC_{50}=33 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。化合物 12 对 PAK4 的抑制率比化合物 10 高 8.7 倍(10,  $IC_{50}=3516 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ；12, PAK4  $IC_{50}=406 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )，显示 2-氨基喹唑啉结构的抑制率更高。此外，喹唑啉母核的 C6 位被卤原子取代时活性保留，氯原子取代时(化合物 13)活性最高；C6 位被氯原子取代时，抑制活性明显降低<sup>[41]</sup>。化合物 9~13 结构见图 6, KY04031 与 PAK4(PDB:4NJD) 的结合模式见图 7。

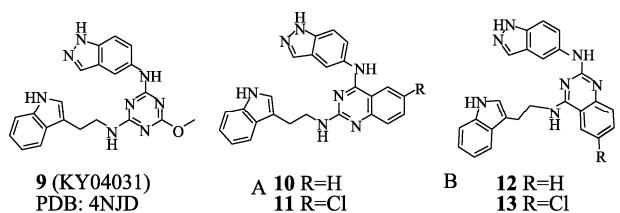


图 6 化合物 9~13 的结构式  
Fig. 6 Structure of compound 9-13

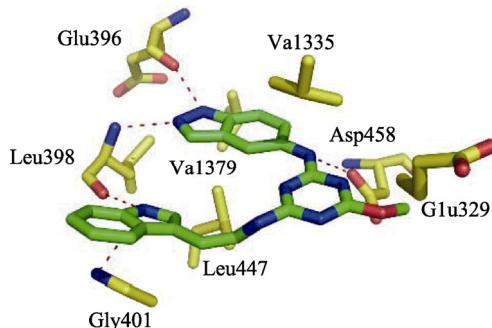


图 7 KY04031 与 PAK4(PDB:4NJD)的结合模式  
Fig. 7 Combination mode of KY04031 and PAK4 (PDB:4NJD)

**2.1.4 氨基吡唑型** 氨基吡唑骨架是常见的抗肿瘤化合物药效团，多用于 Hsp90 抑制剂<sup>[42]</sup>和 CDK5 抑制剂<sup>[43]</sup>。Pfizer 公司通过高通量筛选得到氨基吡唑骨架的化合物 14 对 PAK4 有较强的抑制作用( $K_i$  为  $4 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )，6-氨基-3-氮杂二环[3.1.0]片段被认为是抑制剂的增效基团<sup>[44]</sup>。Hao 等<sup>[45]</sup>报道的氨基吡唑类化合物 18 对 PAK4 有选择性抑制作用( PAK4  $K_i=9 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ，PAK1  $K_i=3112 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。在研发过程中，首先通过虚拟筛选选择了具有喹唑啉骨架的化合物 15(LCH-7749944, PAK4  $IC_{50}=14.9 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , PAK1  $IC_{50}=48.4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )作为先导化合物，结构修饰中发现：在化合物 15 的 C4 位引入氨基吡唑结构得到的化合物 16 对 PAK4 有显著的选择性抑制作用。接下来根据 PAK1 和 PAK4 的 DFG 区 Asp 指向的不同，将化合物 16 的 C2 位取代氨基改造为取代胺酰基后，得到化合物 17。在化合物 17 的氨基吡唑结构上连接环丙基时，得化合物 18。化合物 18 对 PAK4 的抑制率是对 PAK1 的 346 倍，对 PAK5 也有较强的抑制作用。化合物 18 喹唑环上的氮原子是细胞色素 P450 的不稳定代谢位点。这个仲胺结构使化合物 18 显碱性( $pK_a=7.93$ )，意味着生理条件下 80% 的化合物 18 被离子化，导致细胞膜透过率较低。因此，需要在哌嗪基末端氮原子上连接封端基团来掩蔽末端氮上的正电荷。连接乙二酸酯结构，得到的化合物 19 在体内经羧酸酯酶的作用，释放母体化合物 18，同时释放二氧化碳。与化合物 18 相比，化合物 19 的生物利用度提高了 4 倍，半衰期延长了 5.2 倍，并在 HCT-116 和 B16F10 小鼠模型中获得了较好的抗肿瘤效果<sup>[46]</sup>。化合物 14~19 结构见图 8，结合模式见图 9。

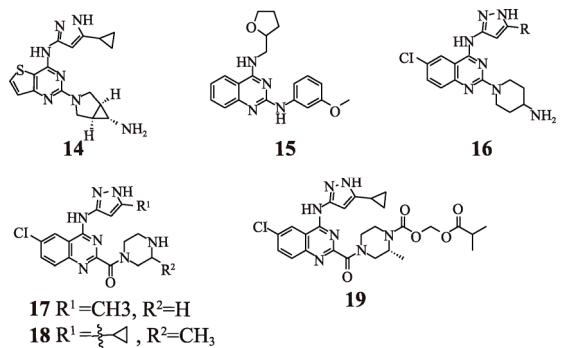


图 8 化合物 14~19 的结构式

Fig. 8 Structure of compound 14~19

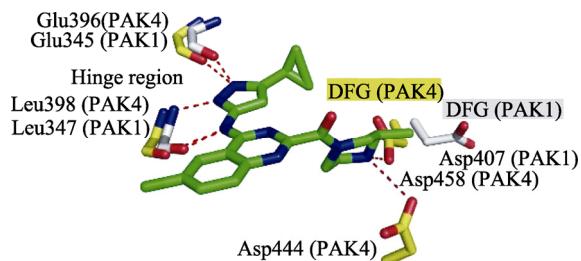


图 9 化合物 18 与 PAK4(PDB: 5XVG)、PAK1(PDB: 4O0R) 的氢键结合模式

Fig. 9 Hydrogen bonding of compound 18 in the active site of PAK4(PDB: 5XVG) and PAK1(PDB: 4O0R)

**2.1.5 四氢异喹啉型** Song 等<sup>[47]</sup>利用高通量筛选获得先导化合物 **20**(PAK4  $IC_{50}=29.8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )和 **21**(PAK4  $IC_{50}=28.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )，但这些化合物的异苯并呋喃酮母核为内酯结构易发生水解，将其替换为菲环后得到的化合物 **22**(PAK4  $IC_{50}=8.84 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )，稳定性和活性均有所提高。分子对接结果显示，菲环结构的刚性平面嵌入到 PAK4 蛋白 ATP 结合区的大口袋，增加了对激酶活性的抑制作用；A 环上的二甲氨基或亚二甲氨基取代基，活性相当；B 环 C2 位有羟基(供氢体)时活性减弱，C1 位有异丙氨基或甲氨基时，酶活抑制作用最佳。在化合物 **22** 上引入含氢键供体的侧链，得到化合物 **23**(PAK4  $IC_{50}=420 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。异喹啉和氢键供体末端之间的连接以 6 个碳原子最佳，缩短侧链导致抑制活性的丧失。研究结果表明末端胺基是抑制酶活的必需结构，去除胺基导致活性下降 6 倍<sup>[48]</sup>。化合物 **20~23** 结构式见图 10。

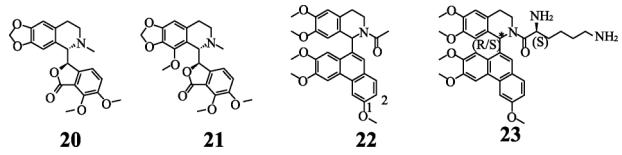


图 10 化合物 20~23 的结构式

Fig. 10 Structure of compound 20~23

**2.1.6 吡啶并[2,3-*d*]嘧啶-7-酮型** 具有 2-氨基吡啶并[2,3-*d*]嘧啶-7-酮母核结构的化合物 **24** 是由 Afraxis 公司通过高通量筛选得到的 PAKs 抑制剂(FRAX019, PAK4  $IC_{50}=580 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , PAK1  $IC_{50}=483 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )<sup>[49]</sup>。改造 FRAX019 结构可提高对 PAK1 的选择性抑制作用。例如在 FRAX019 的 C6 位引入氯代芳环杂环片段得到化合物 **25**(PAK1  $IC_{50}=7.7 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。化合物 **25** 与 PAK1 的 Met344 和 Arg299 形成疏水相互作用，但不与 PAK4 蛋白的守门残基 Met395 和 Lys350 结合，因此降低了对 PAK4 抑制作用<sup>[50]</sup>。化合物 **24~25** 结构式见图 11。

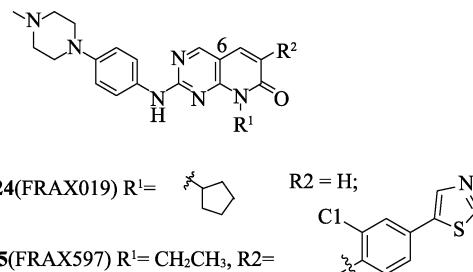


图 11 化合物 24 和 25 的结构式

Fig. 11 Structure of compound 24 and 25

**2.1.7 嘻唑并[4,5-*d*]嘧啶型** Li 等<sup>[51]</sup>通过基于结构的虚拟筛选在 ZINC 数据库中筛选到先导化合物 **26**(ZINC28569592 PAK4  $IC_{50}=18.42 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )作为 PAK4 抑制剂，见图 12。在噻唑并[4,5-*d*]嘧啶环的 C7 位连接柔性的烷氨基结构得到化合物 **27**(PAK4  $IC_{50}=42.13 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )，**28**(PAK4  $IC_{50}=89.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )和 **29**(PAK4  $IC_{50}=32.03 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )，但它们对 PAK4 的抑制作用相比较先导化合物减弱。随后又通过增加亲水性基团的体积引入环胺结构，得到化合物 **30**(PAK4  $IC_{50}=34.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )，**31**(PAK4  $IC_{50}=70.63 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )和 **32**(PAK4  $IC_{50}=15.12 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。虽然这些化合物对 PAK4 的抑制率有所升高，但仍不如先导化合物 **26**，说明 C7 位可能并不是最佳的改造位置。

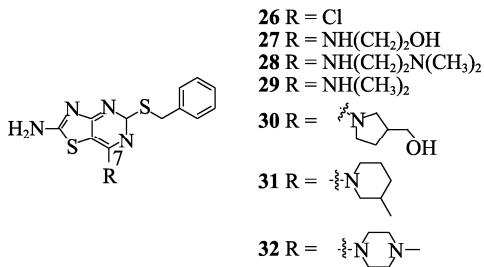


图 12 化合物 26~32 的结构式

Fig. 12 Structure of compound 26~32

**2.1.8 6-羟基-3-苯基嘧啶-4(3H)-酮型** Song 等<sup>[52]</sup>基于 PAK4 蛋白结构对来自 SPECS、Maybridge、Sigma-Aldrich 和 NCI 数据库的 750 000 个化合物进行了高通量筛选, 获得了 52 个具有 PAK 中等抑制活性的化合物。其中化合物 **33**(SPU-106, PAK4  $IC_{50}=21.36 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )对 PAK1 和 PAK4 具有选择性抑制活性, 结构式见图 13。通过生物素-抗生素蛋白系统标记化合物 **33**, 发现该化合物与 PAK4 的 C 端激酶域结合, 分子对接结果显示 SPU-106 的羰基与 PAK4 铰链区中的保守残基 Leu398 形成氢键, 而不能和 PAK1 的铰链区形成任何相互作用。

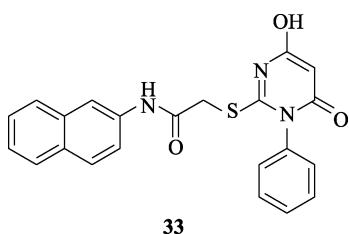


图 13 化合物 **33** 的结构式

Fig. 13 Structure of compound **33**

## 2.2 I 1/2 型 ATP 竞争性抑制剂

Staben 等<sup>[4,53]</sup>通过基于 PAK4 蛋白结构的合理药物设计方法获得了含有苯并咪唑母核结构的化合物 **34**(PAK4  $K_i=500 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , PAK1  $K_i=1\,530 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 结构式见图 14。在化合物 **34** 的炔基侧链上引入环己基得到具有 PAK4 选择性的化合物 **35**(PAK4  $K_i=68 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , PAK1  $K_i>4\,500 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 结构生物学发现炔丙醇结构越过守门残基(Met395), 伸向 PAK4 的后部疏水口袋可能是该型化合物对 PAK4 高选择性抑制活性的原因, 见图 15。在化合物 **34** 苯并咪唑 C2 位引入烷氨基得到的化合物 **36**(GEN-2861, PAK4  $K_i=3.3 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , PAK1  $K_i=2\,900 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 细胞通透性和溶解度均有所提高。在  $0.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  浓度下的 222 激酶组谱筛中, 化合物 **36** 仅对 PAK4、PAK5、PAK6 和 EphB1 激酶有抑制作用, 抑制率 $>60\%$ 。

## 2.3 非 ATP 竞争性抑制剂

目前对II型 PAKs 的非 ATP 竞争性抑制剂研究甚少, 仅有 PAK4 的非 ATP 竞争性抑制剂进入临床研究。化合物 **37**(KPT9274, 见图 16)是一种口服有效的 PAK4 和 NAMPT(nicotinamide phosphoribosyl transferase)双靶点抑制剂, 临床试验

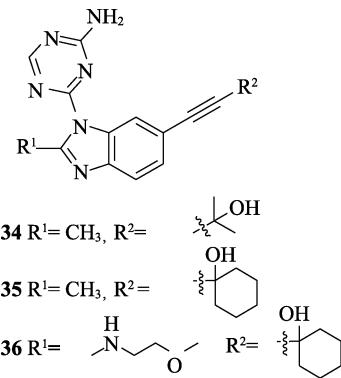


图 14 化合物 **34~36** 的结构式

Fig. 14 Structure of compound **34~36**

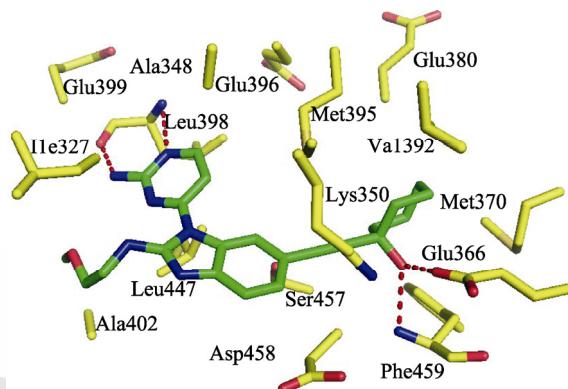


图 15 化合物 **36** 与 PAK4(PDB:400V)的结合模式

Fig. 15 Binding of compound **36** in the active site of PAK4

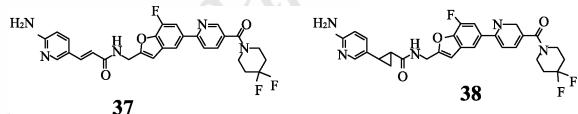


图 16 化合物 **37** 和 **38** 的结构式

Fig. 16 Structure of compound **37** and **38**

用于治疗晚期实体恶性肿瘤或非霍奇金淋巴瘤<sup>[54]</sup>。在肾癌细胞系中使用 KPT-9274 可干扰 PAK4 和 NAD 生物合成途径, 导致细胞周期 G2/M 期阻滞、诱导细胞凋亡、细胞侵袭和迁移能力减弱。分子机制研究表明 KPT-9274 对 PAK4 的抑制可减弱核定位  $\beta$ -catenin、Wnt/ $\beta$ -catenin 信号靶标 cyclin D1 和 c-Myc 的活性<sup>[54]</sup>, KPT9274 还可以逆转 PD1 耐药, 对改善肿瘤的免疫治疗策略提供了参考<sup>[55]</sup>。Baloglu 等<sup>[56]</sup>专利中提到的代表性化合物 **38** 具有泛 PAK 和 NAMPT 抑制作用。从结构优化上看, KPT-9274 的丙烯酰胺结被环丙基甲酰胺结构替代, 消除了潜在的迈克尔受体的反应性能, 大环刚性结构也使化合物的构象更加稳定。

## 3 结语

II型 PAKs 与肿瘤的发生发展密切相关, 随着

舒尼替尼、PF-3758309、KPT-9274 等泛II型 PAKs 抑制剂进入临床研究，II型 PAKs 有望成为抗肿瘤的重要靶点。近期研究发现 PAK4 和 PAK5 的基因突变体与特定肿瘤的发生机制有关，因此开发亚型选择性的II型 PAKs 抑制剂引起广泛关注。解析蛋白晶体结构发现：PAK4 的激酶区有  $\beta$ 5-整合素受体结合区，PAK6 存在雄激素受体结合位点，而 PAK5 的活性完全由激酶区的 ATP 催化域决定，这些结构上的差异，使发现新的亚型选择性 PAKs 抑制剂成为可能，有望发现新型肿瘤治疗药物。

## REFERENCES

- [1] RANE C K, MINDEN A. P21 activated kinase signaling in cancer[J]. *Semin Cancer Biol*, 2019(54): 40-49.
- [2] RUDOLPH J, MURRAY L J, NDUBAKU C O, et al. Chemically diverse group I p21-activated kinase(PAK) inhibitors impart acute cardiovascular toxicity with a narrow therapeutic window[J]. *J Med Chem*, 2016, 59(11): 5520-5541.
- [3] KUMAR R, SANAWAR R, LI X D, et al. Structure, biochemistry, and biology of PAK kinases[J]. *Gene*, 2017(605): 20-31.
- [4] RUDOLPH J, CRAWFORD J J, HOEFLICH K P, et al. Inhibitors of p21-activated kinases(PAKs)[J]. *J Med Chem*, 2015, 58(1): 111-129.
- [5] 郑娣, 孙新, 关鑫刚. P21 活化激酶家族的研究进展[J]. 当代医学, 2017, 23(13): 176-179.
- [6] WON S Y, PARK J J, SHIN E Y, et al. PAK4 signaling in health and disease: Defining the PAK4-CREB axis[J]. *Exp Mol Med*, 2019, 51(2): 1-9.
- [7] GONG C C, LI T T, PEI D S. PAK6: A potential anti-cancer target[J]. *Braz J Pharm Sci*, 2020(56). Doi: 10.1590/s2175-97902019000318315.
- [8] BUSCAIL L, BOURNET B, CORDELLIER P. Role of oncogenic KRAS in the diagnosis, prognosis and treatment of pancreatic cancer[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2020, 17(3): 153-168.
- [9] YOSHINO T, PORTNOY D C, OBERMANNOVÁ R, et al. Biomarker analysis beyond angiogenesis: RAS/RAF mutation status, tumour sidedness, and second-line ramucirumab efficacy in patients with metastatic colorectal carcinoma from RAISE-a global phase III study[J]. *Ann Oncol*, 2019, 30(1): 124-131.
- [10] SCHEFFLER M, IHLE M A, HEIN R, et al. K-ras mutation subtypes in NSCLC and associated co-occurring mutations in other oncogenic pathways[J]. *J Thorac Oncol*, 2019, 14(4): 606-616.
- [11] LIU Y, XIAO H, TIAN Y, et al. The pak4 protein kinase plays a key role in cell survival and tumorigenesis in athymic mice[J]. *Mol Cancer Res*, 2008, 6(7): 1215-1224.
- [12] KING H, THILLAI K, WHALE A, et al. PAK4 interacts with p85 alpha: Implications for pancreatic cancer cell migration[J]. *Sci Rep*, 2017(7): 42575.
- [13] YEO D, HE H, BALDWIN G S, et al. The role of p21-activated kinases in pancreatic cancer[J]. *Pancreas*, 2015, 44(3): 363-369.
- [14] VERSHININ Z, FELDMAN M, CHEN A, et al. PAK4 methylation by SETD6 promotes the activation of the wnt/ $\beta$ -catenin pathway[J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(13): 6786-6795.
- [15] RAMOS-ÁLVAREZ I, LEE L, JENSEN R T. Group II p21-activated kinase, PAK4, is needed for activation of focal adhesion kinases, MAPK, GSK3, and  $\beta$ -catenin in rat pancreatic acinar cells[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2020, 318(3): G490-G503.
- [16] LI Y, SHAO Y, TONG Y, et al. Nucleo-cytoplasmic shuttling of PAK4 modulates  $\beta$ -catenin intracellular translocation and signaling[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1823(2): 465-475.
- [17] DAN C, KELLY A, BERNARD O, et al. Cytoskeletal changes regulated by the PAK4 serine/threonine kinase are mediated by LIM kinase 1 and cofilin[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(34): 32115-32121.
- [18] LI Z F, YAO Y D, ZHAO Y Y, et al. Effects of PAK4/LIMK1/Cofilin-1 signaling pathway on proliferation, invasion, and migration of human osteosarcoma cells[J]. *J Clin Lab Anal*, 2020, 34(9): e23362.
- [19] ZHANG X, FANG J, CHEN S, et al. Nonconserved miR-608 suppresses prostate cancer progression through RAC2/PAK4/LIMK1 and BCL2L1/caspase-3 pathways by targeting the 3'-UTRs of RAC2/BCL2L1 and the coding region of PAK4[J]. *Cancer Med*, 2019, 8(12): 5716-5734.
- [20] ZHANG H Y, ZHANG J, HAO C Z, et al. LC-0882 targets PAK4 and inhibits PAK4-related signaling pathways to suppress the proliferation and invasion of gastric cancer cells[J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9(6): 2736-2747.
- [21] SHENG N, TAN G, YOU W, et al. MiR-145 inhibits human colorectal cancer cell migration and invasion via PAK4-dependent pathway[J]. *Cancer Med*, 2017, 6(6): 1331-1340.
- [22] WEN Y Y, WANG X X, PEI D S, et al. p21-Activated kinase 5: A pleiotropic kinase[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2013, 23(24): 6636-6639.
- [23] HE R, LIU P, XIE X, et al. circGFRA1 and GFRA1 act as ceRNAs in triple negative breast cancer by regulating miR-34a[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2017, 36(1): 145.
- [24] LI Y K, ZOU J, YE D M, et al. Human p21-activated kinase 5 (PAK5) expression and potential mechanisms in relevant cancers: Basic and clinical perspectives for molecular cancer therapeutics[J]. *Life Sci*, 2020(241): 117113.
- [25] WONG L E, REYNOLDS A B, DISSANAYAKA N T, et al. p120-catenin is a binding partner and substrate for Group B Pak kinases[J]. *J Cell Biochem*, 2010, 110(5): 1244-1254.
- [26] HUO F C, PAN Y J, LI T T, et al. PAK5 promotes the migration and invasion of cervical cancer cells by phosphorylating SATB1[J]. *Cell Death Differ*, 2019, 26(6): 994-1006.
- [27] HUANG S, ZHU Y, WANG C, et al. PAK5 facilitates the proliferation, invasion and migration in colorectal cancer cells[J]. *Cancer Med*, 2020, 9(13): 4777-4790.
- [28] ZHANG D G, ZHANG J, MAO L L, et al. p21-Activated kinase 5 affects cisplatin-induced apoptosis and proliferation in

- hepatocellular carcinoma cells[J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(5): 3685-3691.
- [29] LAPAK K M, VROOM D C, GARG A A, et al. Melanoma-associated mutants within the serine-rich domain of PAK5 direct kinase activity to mitogenic pathways[J]. *Oncotarget*, 2018, 9(39): 25386-25401.
- [30] LIU C, ZHANG L, HUANG Y, et al. MicroRNA-328 directly targets p21-activated protein kinase 6 inhibiting prostate cancer proliferation and enhancing docetaxel sensitivity[J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(5): 7389-7395.
- [31] CAI S, CHEN R, LI X, et al. Downregulation of microRNA-23a suppresses prostate cancer metastasis by targeting the PAK6-LIMK1 signaling pathway[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(6): 3904-3917.
- [32] LI Z, LI X, XU L, et al. Inhibition of neuroblastoma proliferation by PF-3758309, a small-molecule inhibitor that targets p21-activated kinase 4[J]. *Oncol Rep*, 2017, 38(5): 2705-2716.
- [33] ZHANG J, CORDSHAGEN A, MEDINA I, et al. Staurosporine and NEM mainly impair WNK-SPAK/OSR1 mediated phosphorylation of KCC<sub>2</sub> and NKCC<sub>1</sub>[J]. *PLoS One*, 2020, 15(5): e0232967.
- [34] ZHANG E Y, HA B H, BOGGON T J. PAK4 crystal structures suggest unusual kinase conformational movements [J]. *Biochim et Biophys Acta BBA - Proteins Proteom*, 2018, 1866(2): 356-365.
- [35] XIAO J, WANG J, YUAN L, et al. Study on the mechanism and intervention strategy of sunitinib induced nephrotoxicity[J]. *Eur J Pharmacol*, 2019(864): 172709.
- [36] ZHENG B, ZHANG M L, FENG P P, et al. Pharmaceutical care of drug-induced liver injury in a patient taking sunitinib[J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学)*, 2019, 36(22): 2839-2842.
- [37] XU G Q, ZHANG Y W, KONG S S, et al. Advances of population pharmacokinetics in tyrosine kinase inhibitors[J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学)*, 2020, 37(15): 1899-1906.
- [38] GUO J, ZHU M Y, WU T X, et al. Discovery of indolin-2-one derivatives as potent PAK4 inhibitors: Structure-activity relationship analysis, biological evaluation and molecular docking study[J]. *Bioorg Med Chem*, 2017, 25(13): 3500-3511.
- [39] GUO J, ZHAO F, YIN W, et al. Design, synthesis, structure-activity relationships study and X-ray crystallography of 3-substituted-indolin-2-one-5-carboxamide derivatives as PAK4 inhibitors[J]. *Eur J Med Chem*, 2018(155): 197-209.
- [40] RYU B J, KIM S, MIN B, et al. Discovery and the structural basis of a novel p21-activated kinase 4 inhibitor[J]. *Cancer Lett*, 2014, 349(1): 45-50.
- [41] HAO C Z, HUANG W X, LI X D, et al. Development of 2, 4-diaminoquinazoline derivatives as potent PAK4 inhibitors by the core refinement strategy[J]. *Eur J Med Chem*, 2017(131): 1-13.
- [42] HUANG D S, LEBLANC E V, SHEKHAR-GUTURJA T, et al. Design and synthesis of fungal-selective resorcylate aminopyrazole Hsp90 inhibitors[J]. *J Med Chem*, 2020, 63(5): 2139-2180.
- [43] KOUR S, RANA S, CONTRERAS J I, et al. CDK5 inhibitor downregulates mcl-1 and sensitizes pancreatic cancer cell lines to navitoclax[J]. *Mol Pharmacol*, 2019, 96(4): 419-429.
- [44] CRAWFORD J J, LEE W, ALIAGAS I, et al. Structure-guided design of group I selective p21-activated kinase inhibitors[J]. *J Med Chem*, 2015, 58(12): 5121-5136.
- [45] HAO C, ZHAO F, SONG H, et al. Structure-based design of 6-chloro-4-aminoquinazoline-2-carboxamide derivatives as potent and selective p21-activated kinase 4(PAK4) inhibitors [J]. *J Med Chem*, 2018, 61(1): 265-285.
- [46] GUO J, WANG T, WU T, et al. Synthesis, bioconversion, pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation of N-isopropyl-oxy-carbonyloxymethyl prodrugs of CZh-226, a potent and selective PAK4 inhibitor[J]. *Eur J Med Chem*, 2020(186): 111878.
- [47] SONG S, LI X D, GUO J, et al. Design, synthesis and biological evaluation of 1-phenanthryl-tetrahydroisoquinoline derivatives as novel p21-activated kinase 4(PAK4) inhibitors [J]. *Org Biomol Chem*, 2015, 13(12): 3803-3818.
- [48] HAO C, LI X, SONG S, et al. Advances in the 1-phenanthryl-tetrahydroisoquinoline series of PAK4 inhibitors: Potent agents restrain tumor cell growth and invasion[J]. *Org Biomol Chem*, 2016, 14(32): 7676-7690.
- [49] RUDOLPH J, CRAWFORD J J, HOEFLICH K P, et al. p21-activated kinase inhibitors[J]. *Enzymes*, 2013(34 Pt. B): 157-180.
- [50] RUDOLPH J, ALIAGAS I, CRAWFORD J J, et al. Leveraging the pre-DFG residue thr-406 to obtain high kinase selectivity in an aminopyrazole-type PAK1 inhibitor series[J]. *ACS Med Chem Lett*, 2015, 6(6): 711-715.
- [51] LI R, WANG H, WANG J, et al. PB-10, a thiazolo[4, 5-d] pyrimidine derivative, targets p21-activated kinase 4 in human colorectal cancer cells[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2020, 30(2): 126807.
- [52] SONG P L, WANG G, SU Y, et al. Strategy and validation of a structure-based method for the discovery of selective inhibitors of PAK isoforms and the evaluation of their anti-cancer activity[J]. *Bioorg Chem*, 2019(91): 103168.
- [53] STABEN S T, FENG J A, LYLE K, et al. Back pocket flexibility provides group II p21-activated kinase (PAK) selectivity for type I<sub>1</sub> /2 kinase inhibitors[J]. *J Med Chem*, 2014, 57(3): 1033-1045.
- [54] CORDOVER E, WEI J, PATEL C, et al. KPT-9274, an inhibitor of PAK4 and NAMPT, leads to downregulation of mTORC2 in triple negative breast cancer cells[J]. *Chem Res Toxicol*, 2020, 33(2): 482-491.
- [55] ABRIL-RODRIGUEZ G, TORREJON D Y, LIU W, et al. PAK4 inhibition improves PD-1 blockade immunotherapy[J]. *Nat Cancer*, 2020, 1(1): 46-58.
- [56] BALOGLU E, SHACHAM S, SENAPEDIS W. Cyclopropylderivatives and their use as kinase inhibitors: WO2017/031204 A1[P]. 2017-02-23.

收稿日期：2020-06-08  
(本文责编：沈倩)