

从结构修饰到新药上市：CDK 抑制剂的系统回顾

CDK 是一类丝氨酸/苏氨酸激酶，在细胞周期调节及细胞转录过程中发挥关键作用。CDK 活性的失调与肿瘤的发生发展密切相关，以 CDK 为靶点设计抗肿瘤药物是一大研究热点。早期开发的 CDK 抑制剂为泛 CDK 抑制剂，通过天然产物靶标确证或先导化合物优化等方式发现。本文总结了泛 CDK 抑制剂的设计策略、构效关系和治疗应用。

简介

周期蛋白依赖性激酶(cyclin-dependent kinases, CDKs)的失控表达与某些癌症直接相关，因为它可以激活独立于典型性细胞外刺激的细胞扩增或促进检查点旁路。CDK 抑制剂在糖尿病、肾脏疾病、神经退行性疾病、传染性疾病和癌症等的治疗中具有巨大的潜力。四种靶向 CDK4/6 的 CDK 抑制剂已在全球上市。曲拉西利(Trilaciclib)被批准用于治疗骨髓抑制，而帕博西尼(Palbociclib)、瑞博西尼(ribociclib)和阿贝西利(abemaciclib)用于治疗激素受体阳性(HR+)/人表皮生长因子受体 2 阴性(HER2-)型的乳腺癌。其他的许多 CDK 抑制剂也在临床试验中表现出癌症治疗的潜力。本文综述了 CDK、细胞周期蛋白和癌症之间的关系以及广谱 CDK 抑制剂的母核和分子结构的多样性，旨在为开发新型 CDK 抑制剂提供参考。

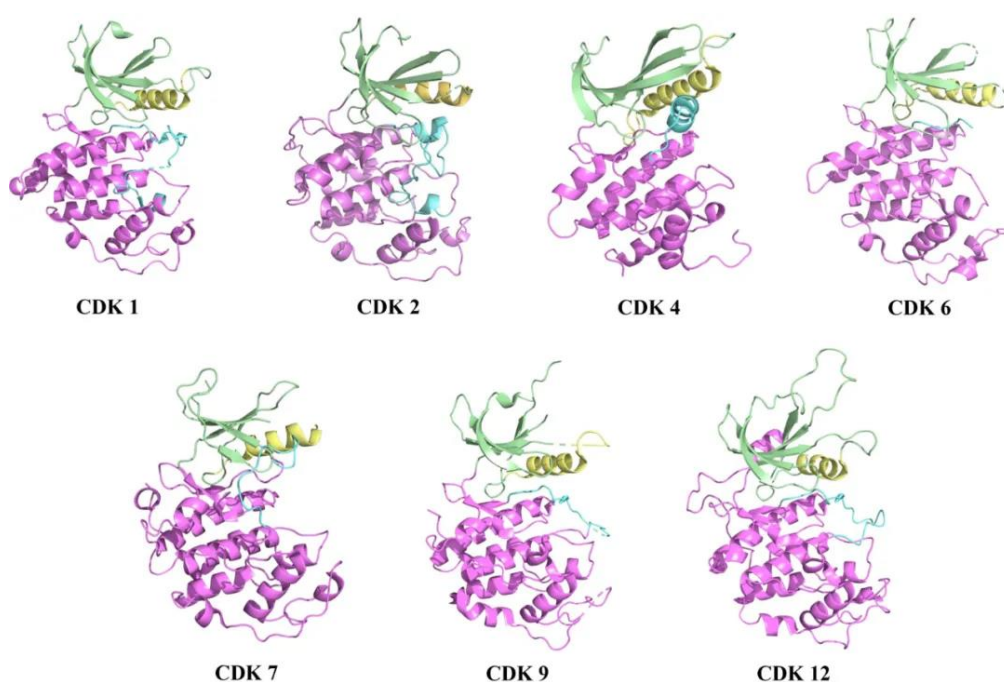
CDK 家族和结构

人类基因组编码 20 多种 CDK，分为两个亚家族：细胞周期相关 CDK(CDK1-7 和 14-18)和转录相关 CDK(CDK7-13、19 和 20)。不同的 CDK 与不同的细胞周期蛋白相互作用以调节细胞周期的多个阶段或执行其他功能。CDK1 是有丝分裂激酶，CDK2、CDK4 和 CDK6 调节细胞周期进程。CDK5 调节神经细胞的功能和发育。CDK7 与转录和细胞周期的调控有关。CDK8 和 CDK9 控制 RNA 聚合酶 II(RNA Pol II)依赖的转录起始和延长，CDK11 参与 mRNA 剪接。此外，CDK3、CDK10 和 CDK12 至 CDK20 在基因转录、DNA 损伤修复、细胞死亡、细胞分化、代谢过程、神经分化、发育和免疫反应中也发挥作用。

表：CDK 在细胞周期和转录中的作用表：

name	cyclins	main functions
CDK1	cyclins A and B	cell cycle - S phase cell cycle - G2/M phase
CDK2	cyclins A and E	cell cycle - G1/S transition cell cycle - S phase
CDK3	cyclins C and E	cell cycle - S phase
CDK4	cyclin D	cell cycle - G1 phase cell cycle - G1/S transition
CDK5	p35	cell cycle regulation apoptosis
CDK6	cyclin D	cell cycle - G1 phase cell cycle - G1/S transition
CDK7	cyclin H	cell cycle - G2/M transition transcription
CDK8	cyclin C	transcription
CDK9	cyclins K and T	transcription
CDK10	cyclin M	transcription
CDK11	cyclin L	transcription
CDK12	cyclins K and L	transcription cell cycle and splicing
CDK13	cyclins K and L	transcription cell cycle and splicing
CDK14	cyclins D and Y	cell cycle regulation cancer cell proliferation
CDK15	–	ATP binding
CDK16	cyclin Y	regulation of neurite outgrowth vesicle trafficking cancer cell proliferation
CDK17	–	expressed in the brain
CDK18	cyclins A and E	regulation of actin reorganization regulation of genome integrity
CDK19	cyclin C	transcription cell cycle regulation
CDK20	–	cell cycle regulation

CDK 是由细胞周期相关的催化激酶亚基和调节亚基组成的异二聚体复合物。每个 CDK 都包含一个由 300 个氨基酸组成的蛋白激酶“催化核心”，而不是通过 N 端或 C 端延伸。CDK 与丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶、酪氨酸蛋白激酶和磷脂激酶(如 PI3K 激酶)共享相同的折叠：该折叠分为主要由 β -折叠组成的 N-末端结构域和主要由 α -螺旋组成的 C-末端结构域(CTD)。肽底物通常结合在 CTD 上，因为这两个结构域与三磷酸腺苷(ATP)结合。核苷酸和肽底物的结合依赖于称为 T 环的氨基酸构象(人 CDK2 中的残基 145-172)。迄今为止发现的 CDK 在其 DNA 序列中具有 40%以上的同源性。在特定关键区域(例如激活域和 N 端区域)CDK 有一些细微结构差异，这些不同保证了特定细胞周期蛋白和相应底物之间的结合。CDK 包含三个重要的功能域。第一个功能域包含 ATP 结合位点，构成酶的活性部分；第二个功能域是细胞周期蛋白调节亚基的结合位点；第三个功能域包含磷酸结合位点 P13^{SUC1}，它抑制激酶活性并阻止细胞进入或结束 M 期。各种 CDK 在细胞周期的特定点被激活，并通过底物的磷酸化驱动细胞周期的完成。



图：不同亚型 CDK 的结构(N 端和 C 端分别为绿色和粉色)

由于不同亚型 CDK 的 ATP 结合口袋非常保守，因此发现 ATP 竞争性和高选择性 CDK 抑制剂面临重大挑战。CDKs 结构解剖和拓扑分析技术的发展逐渐揭示了不同亚家族成员 ATP 结合口袋之间的细微差异，有助于开发新型高选择性的 CDK 抑制剂。

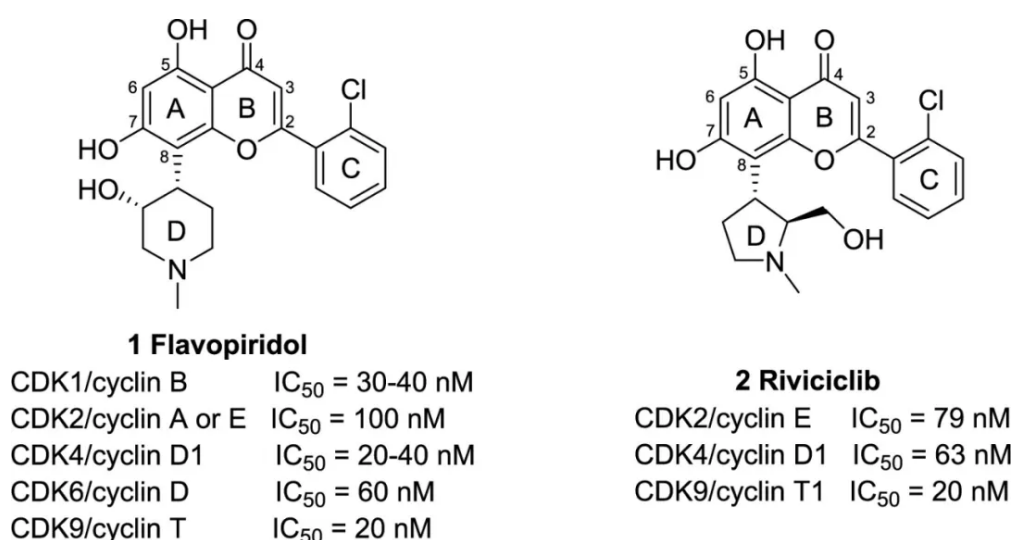
处于上市和临床阶段的泛 CDK 抑制剂

在过去的 20 年中，CDK 抑制剂在癌症中的临床获益越来越受到关注，CDK 抑制剂经历了三代的发展。第一代主要为泛 CDK 抑制剂，由于治疗窗狭窄，许多泛 CDK 抑制剂的临床试验已被终止。研究人员已经意识到选择性 CDK 抑制剂的开发至关重要，已经出现了许多第二代和第三代抑制剂。第二代 CDK 抑制剂旨在通过与 ATP 结合口袋的竞争性结合来提高其靶向特定 CDK 的选择性。这种类型的抑制剂对 CDKs 表现出特异性活性，但选择性不是很高。第三代 CDK 抑制剂主要对特定的 CDK 具有高选择性，其副作用明显低于前两代 CDK 抑制

剂。

1) 黄酮生物碱类

黄酮生物碱是一类重要的具有潜在药用价值的代表性天然产物，在癌症化疗中表现出有效性。具有黄酮生物碱母核的 CDK 抑制剂以 flavopiridol(L868275, **1**)和 riviciclib(P276-00, **2**)为代表。化合物 **1** 通过显著阻断 G1/S 和 G2/M 期的细胞周期进程，在体外显示出对多种 CDK 的有效抑制作用。化合物 **1** 与 CDK2 的共晶结构显示，化合物 **1** 结合在 ATP 口袋，色烯酮环朝向空腔底部，与 Cys106 形成重要的双齿氢键。氯苯部分朝向溶剂，占据了 CDK2-ATP 复合物中 ATP 未占据的区域。具体而言，苯环与异亮氨酸侧链形成疏水作用，氯原子与 CDK2 的活性位点产生有利的相互作用。

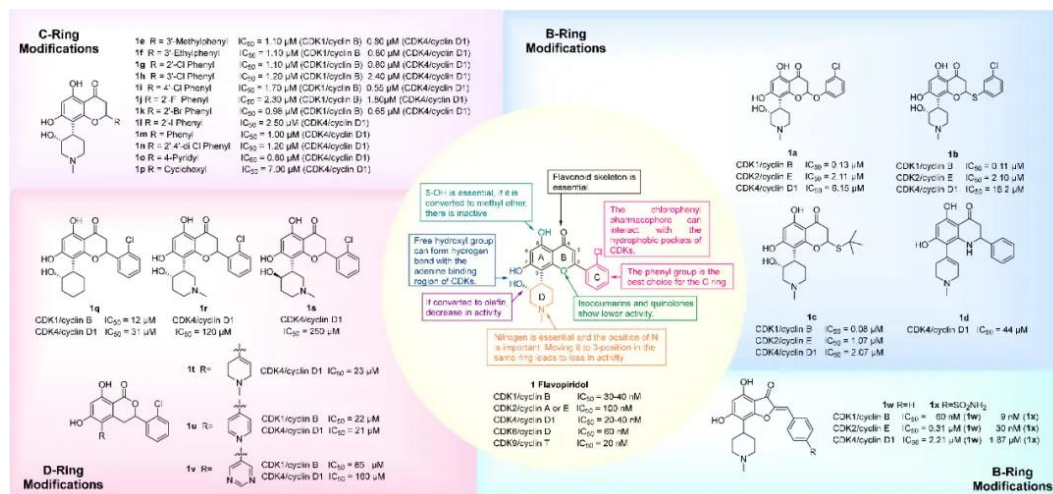


图：化合物 1 和 2 的化学结构及 CDK 抑制活性

在一项 II 期临床试验中，化合物 **1** 与阿糖胞苷和米托蒽醌的联合使用在 75% 的急性髓细胞白血病(AML, NCT00407966)患者中产生完全响应。然而，化合物 **1** 在几种癌症患者中的 II 期临床试验结果显示剂量限制毒性(DLT)，如严重腹泻、心肌梗塞和肺栓塞。这些不良反应限制了化合物 **1** 在临床治疗中的使用。尽管如此，化合物 **1** 在血液癌中表现出临床有效性，获得孤儿药资格，用于治疗慢性淋巴细胞白血病(CLL)。化合物 **2** 是 **1** 的 D 环的修饰衍生物，目前正在进行 I/II 期临床试验，用于治疗晚期难治性肿瘤(NCT00407498)、多发性骨髓瘤(MM, NCT00882063)和复发性或难治性套细胞淋巴瘤(MCL, NCT00843050)等。

化合物 **1** 的结构修饰包括 B 环修饰、C 环修饰、D 环修饰等。在 B 环的苯环上引入卤素或氨基时，邻氯苯衍生物(即化合物 **1**)活性最高。C-2 被乙基或丙基取代时，烷烃和 CDK2 之间的相互作用减弱。当色酮母核通过 S 或 O 原子与烷烃或芳环相连时，CDK1 上 S 和 O 原子上连接疏水基团的抑制活性高于亲水基团，这表明芳香环不是必需的。当黄酮母核中 1 位的氧原子被其等排硫原子取代，C 环的苯环被氢、氨基或羟基取代时，对 CDK2 的亲合力与 **1** 持平。D 环的构效关系研究表明，羟基和黄酮母核的构型对哌啶环的活性很重要，顺式结构最佳。哌啶环上的氮原子对 CDK 的抑制活性至关重要。哌啶环被环己烷取代或哌啶环与

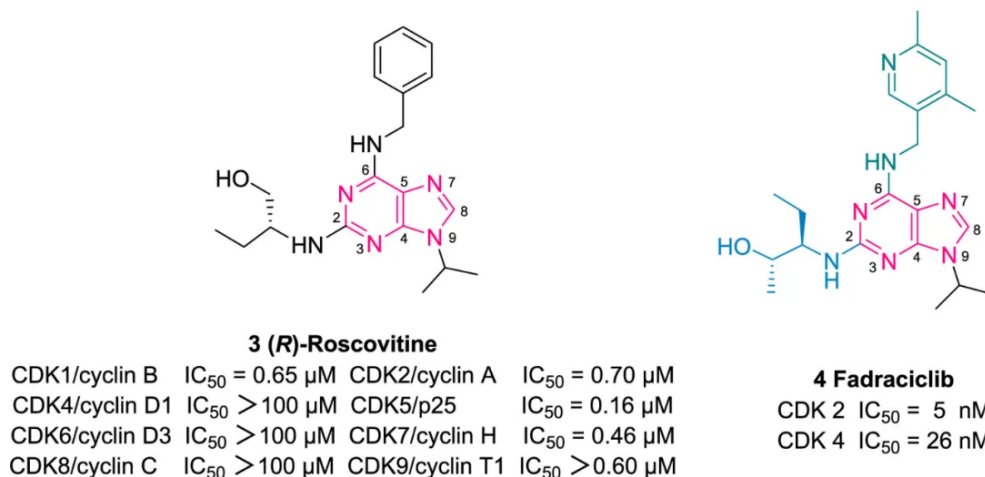
黄酮的 8 号位相连，大大降低甚至消除了活性。此外，研究表明，色酮母核通过模仿辅酶 ATP 结构中的嘌呤起作用。将化合物 1 结构中的 5-羟基色酮母核替换为 4-羟基苯并咪唑结构，提高了对 CDK1 的选择性。



图：化合物 1 的修饰和构效关系

2) 嘌呤类似物

Seliciclib(**CYC202**, (*R*)-roscovitine, **3**)是一种 2,6,9-三取代的嘌呤 CDK 抑制剂，可在 G2/M 期终止细胞分裂，抑制肿瘤细胞生长。化合物 **3** 有一个手性中心，其 *R* 构型比 *S* 构型活性略高。化合物 **3** 可以抑制 CDK1、2、5、7、8 和 9，并对其他激酶表现出选择性。化合物 **3** 与 ATP 结合口袋结合，其嘌呤环占据 CDK 的腺嘌呤结合口袋。苄基指向 ATP 结合口袋的外侧，并占据 ATP 复合物中未被 ATP 占据的区域。化合物 **3** 因其对 CDK 的良好抑制作用和较低的副作用已进入临床研究。



图：化合物 3 和 4 的结构及 CDK 抑制活性

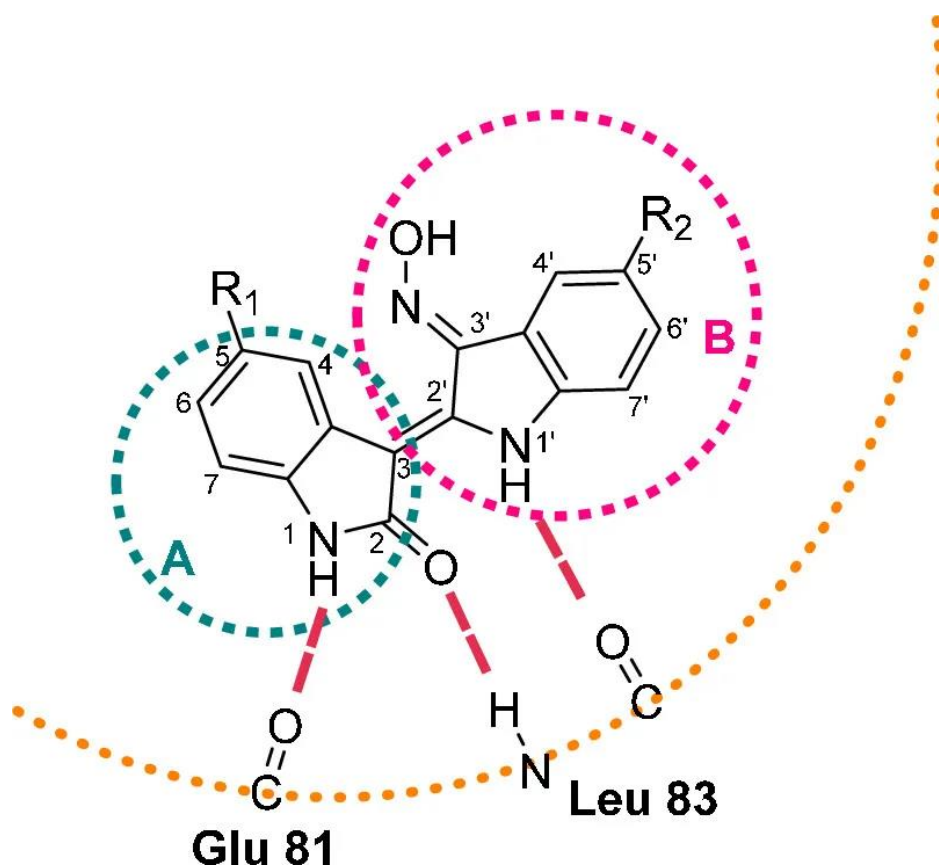
然而，与其他临床 CDK 抑制剂相比，**3** 的活性相对较低，且在体内容易代谢成活性较低的副产物，半衰期较短。主要代谢物的 C-2 位被氧化成羧基，对 CDK2/cyclin E 的 IC₅₀ 值为 1.3

μM ，活性降低 5 倍。因此，研究人员对 **3** 进行结构修饰，旨在减弱体内羟基的氧化速率，提高代谢稳定性，延长半衰期。结构修饰主要集中在嘌呤环的 2、6、9 位，总的来说，C-2 位的微小改动和嘌呤支架的替换都导致活性丧失。在 N-9 处引入的所有较大的取代基，消除了激动剂活性或在一定程度上降低了化合物的溶解度。而在 C-6 处引入不同的取代基可以改变嘌呤 CDK 抑制剂的活性和选择性。

在 C-2 羟基的 α 位引入取代基并在 C-6 引入二甲基吡啶以提高分子的水溶性，得到第二代氨基嘌呤 CDK 抑制剂 fadraciclib(**CYC065**, **4**)。4 可以选择性地作用于 CDK2 和 9。在一项正在进行的临床研究中，化合物 **4** 用于晚期实体瘤患者的治疗，在 5 名 cyclin E-、MCL-1-或 Myc-扩增的晚期癌症患者中观察到肿瘤缩小和疾病趋于稳定。化合物 **4** 目前处于 I 期临床研究，用于晚期实体瘤的治疗(NCT02552953)，联合 venetoclax 用于复发或难治性 CLL(NCT03739554)的治疗和复发难治性 AML 患者或骨髓增生异常综合征(MDS, NCT04017546)的治疗。

3) 靛红类

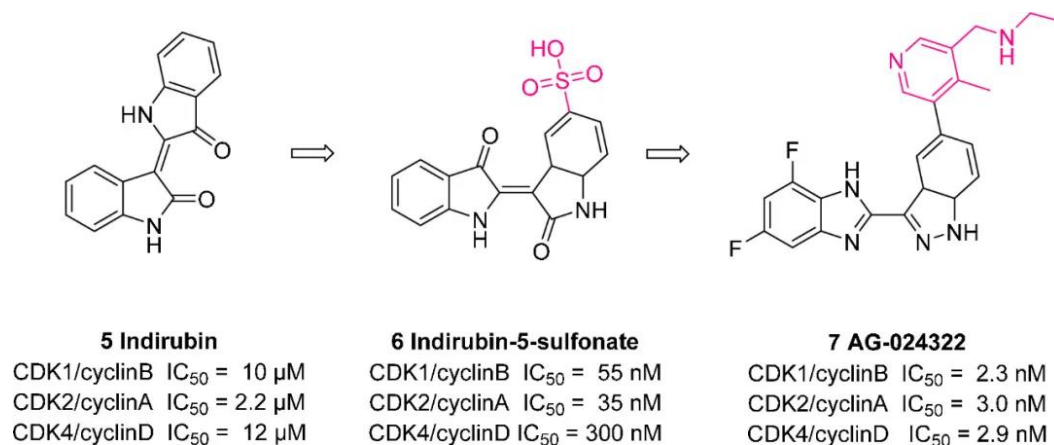
靛红类 CDK 抑制剂以吲哚啉酮为母体结构，整个分子环系为平面共轭结构。A 环和 B 环的共轭结构有助于嵌入 ATP 结合结构域。环系结构上的取代基和连接的杂原子可以通过氢键与 ATP 结合域中的某些氨基酸相互作用，进一步提高抑制活性。



图：靛红类抑制剂的基本结构和 CDK2 和靛红之间形成氢键

研究表明，靛红(**5**)对 CDK1、CDK4，尤其是 CDK2 有显著的抑制作用。化合物 **5** 的主链与 CDK2 的铰链区互补，因此很容易嵌入到 ATP 结合口袋中，与氨基酸残基 Glu81 和 Leu83 的

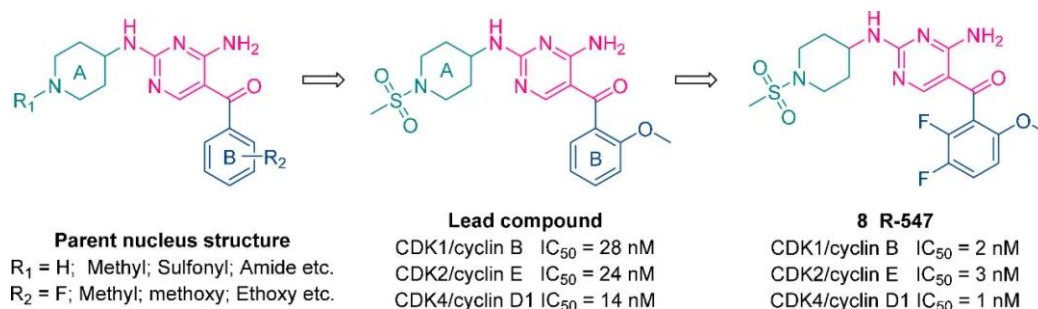
羰基和酰胺基团形成稳定的氢键相互作用。在化合物 5 的 C-5 处引入磺酸基团得到化合物 6，它对 CDK1 的抑制活性显著增强($IC_{50}=35\text{nM}$)，因为它还在磷酸结合区与 Lys33 产生氢键相互作用。进一步改造产生临床候选药物 AG-024322(7)，化合物 7 对 CDK1、2 和 4 的抑制作用显著增强， IC_{50} 值分别为 2.3、3.0 和 2.9 nM。但化合物 7 的 I 期临床试验结果显示，该化合物在治疗晚期恶性肿瘤方面与市售药物相比并无明显优势，且有部分不良反应发生，导致临床试验终止(NCT00147485)。



图：化合物 5-7 的结构和 CDK 抑制活性

4) 嘧啶类似物

在 2,4-二氨基-5-酮嘧啶母核的 C-2 上引入 4-哌啶基，C-5 上引入 2-甲氧基苯甲酰基，开发出一系列新的 CDK 抑制剂。对与母核相连的 A 环和 B 环进行结构修饰，研究表明 A 环上引入 1-甲磺酰基是最佳的，而 B 环 C-2 位的 2-甲氧基是优选基团。随后，进一步探索了 B 环上的其他取代基。发现 B 环上引入 5,6-二氟-2-甲氧基取代活性进一步提高，代表性化合物为 R547(8)。药代动力学评估表明，化合物 8 具有良好的口服生物利用度，并且发现以 100mg/kg 的口服剂量给药时的半衰期为 2.8 小时。基于临床前研究的结果，化合物 8 进入 I 期临床试验(NCT00400296)。



图：2,4-二氨基-5-酮嘧啶中环 A 上的 R1 和环 B 上的 R2 的优化

从高通量筛选中得到的先导化合物 ZK304709(9)是一种多靶点 CDK 和血管内皮生长因子受体(VEGFR)抑制剂，具有良好的临床前特征。然而，化合物 9 的 I 期临床试验由于剂量限制

的吸收和患者间的高变异性而失败, 这归因于体内碳酸酐酶对苯环对位的磺胺基团代谢的脱靶效应。为解决脱靶活性, 引入了亚磺胺基团, 最终发现了纳摩尔级的泛 CDK 抑制剂 roniciclib(**BAY1000394**, **10**)。化合物 **10** 的 I 期临床试验, 包括药物-药物相互作用(DDI)研究(NCT02457351)、质量平衡研究(NCT02390154)以及化合物 **10** 对晚期恶性肿瘤受试者的临床研究(NCT01335256、NCT01188252 和 NCT02047890)已完成。但由于拜耳终止了化合物 **10** 的开发, 因此没有进行后续的临床研究。

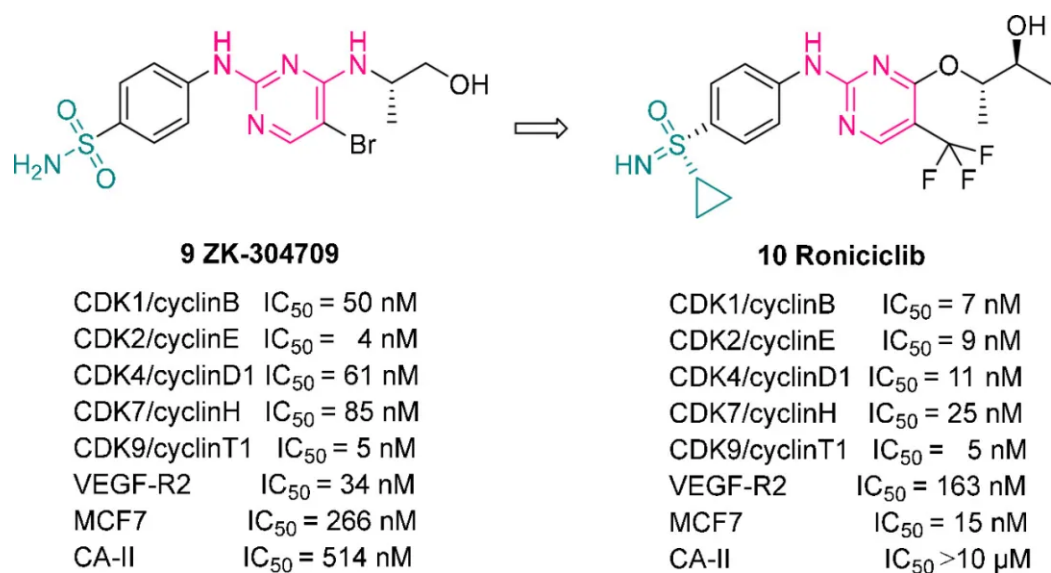
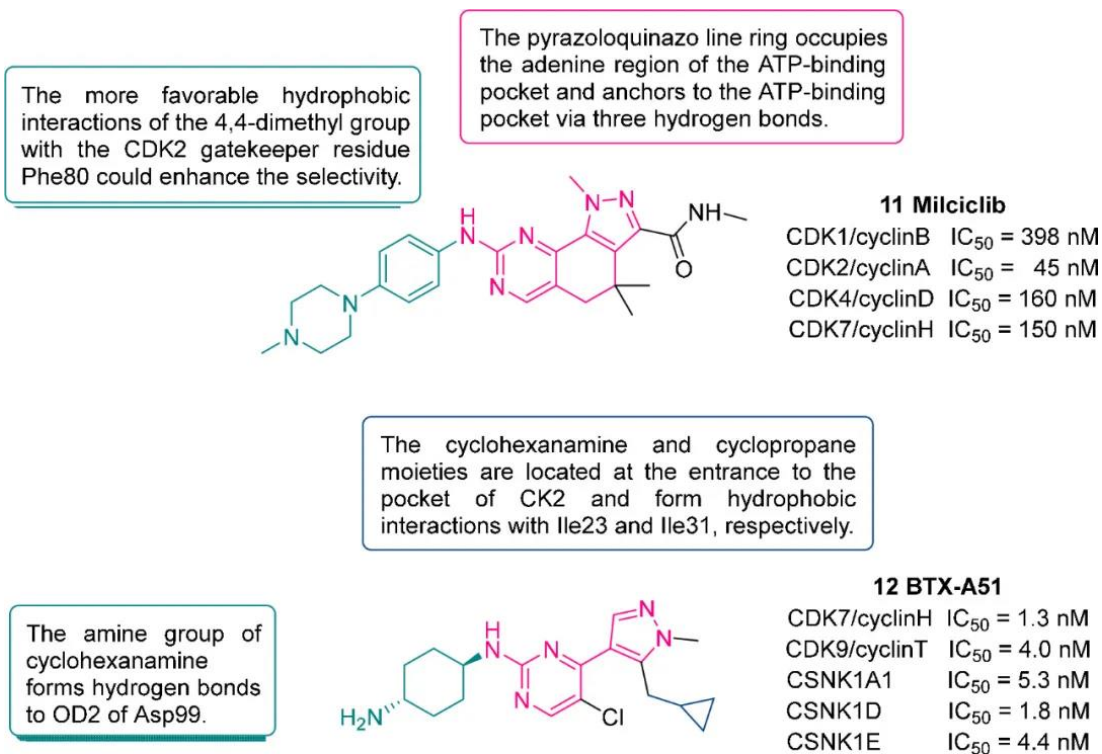


图: ZK304709(9)和 roniciclib(10)的结构和抑制活性

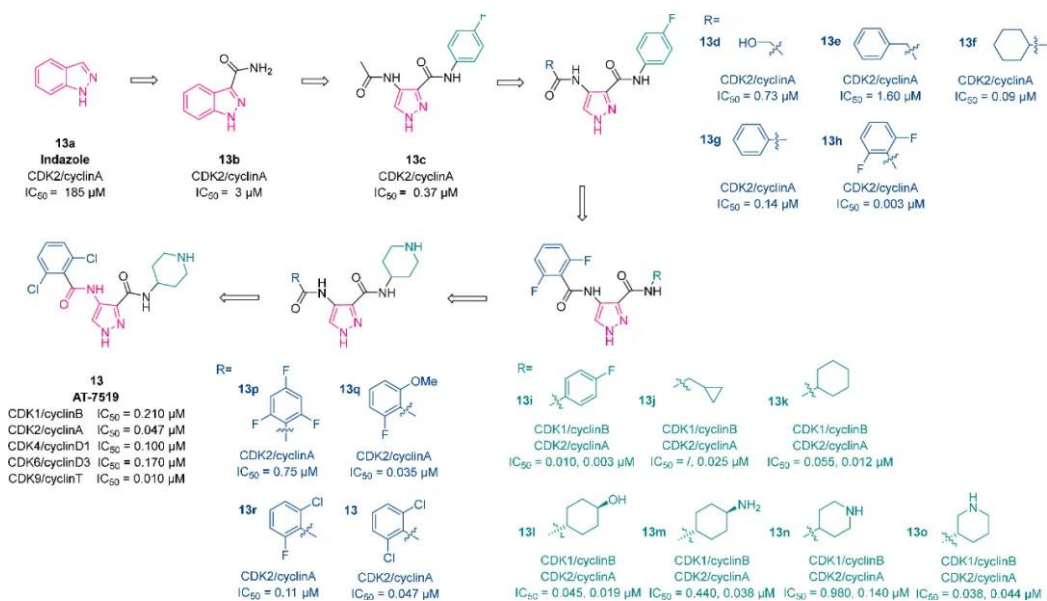
5) 吡唑类似物

吡唑环可以有效地模拟 ATP 中的腺苷, 并与 ATP 结合口袋中的铰链区形成氢键。Milciclib(**PHA-848125**, **11**)是多种 CDK、原肌球蛋白受体激酶和 Src 家族激酶的抑制剂。化合物 **11** 的吡唑并噻唑啉环占据 ATP 结合口袋的腺嘌呤区域, 而苯基部分指向溶剂可及区域。在一项 I/II 期乳腺癌试验(NCT01011439)中, 化合物 **11** 有效提高了总生存率并达到了主要和次要终点。具有吡唑嘧啶母核的化合物 **BTX-A51**(**12**)是一种多激酶抑制剂, 它似乎会阻碍特定的白血病干细胞靶标(CK1- α)和增强子靶标(CDK7/9), 从而阻止必需癌基因的转录。一项正在进行的 I 期研究正在评估化合物 **12** 在复发性或难治性 AML 患者和高危 MDS 患者中的安全性、药代动力学和耐受性(NCT04243785)。



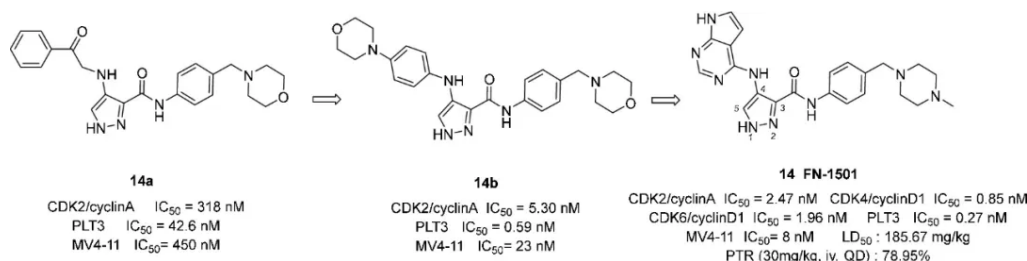
图：milciclib(11)和 BTX-A51(12)的构效关系

另一类吡唑-3-甲酰胺衍生物也表现出优异的 CDK 抑制活性。吡唑-3-甲酰胺衍生物中的 N 原子可用作氢键供体和受体，可以与 CDK 的 ATP 结合口袋的铰链区结合。5 位取代基与构成狭窄结合裂隙侧面的侧链形成额外的疏水相互作用。**AT7519(13)**和 **FN-1501(14)**是已进入临床试验的代表性化合物。**13** 的设计和合成基于先导化合物 **13a-c**。化合物 **13c** 和 CDK 的复合物表明，乙酰氨基羰基的氧与激酶的 Asp145 形成氢键，乙酰氨基和苯胺羰基形成分子内氢键，使得整个分子适合激酶的狭窄催化口袋。在继续优化 **13c** 的同时，甲基被取代，抑制活性提高(**13f**)。苯环的引入使得几个氨基酸的位置发生移动，允许芳香环嵌入并产生疏水相互作用。在配合物中，苯环与酰胺的夹角为 51°。这种构象不是最优的，因为苯环和酰胺在不同的平面上，能量更高。用邻二氟取代的苯环取代苯环导致活性增加 45 倍(**13h**)。化合物 **13h** 在分子水平上表现出有效的抑制活性、适当的血浆消除率和良好的药代动力学特性，但它对 HCT 结肠癌细胞的抑制活性中等(IC₅₀=1.4μM)，可能是由于分子内氢键的存在导致细胞通透性差。这种高亲脂性也降低了细胞活性。使用环丙烷替代苯环，增加了激酶活性，但细胞活性较差(**13j**)。当用环己烷替代时，细胞活性达到纳摩尔水平，但细胞清除率过高(**13k**)。哌啶取代物 **13o** 的激酶和细胞活性较高，细胞清除率适中。进一步优化得到的化合物 **13** 正处于治疗 MM、套细胞淋巴瘤和 CLL 的临床研究中，并在治疗 MYCN 依赖性神经母细胞瘤方面显示出良好的药效。在一项治疗难治性实体瘤的 I 期临床试验中，28 名患者中有 4 名病情趋向稳定，但由于剂量限制毒性而停止治疗(NCT02503709)。



图：AT7519(13)的设计策略、化学结构和 CDK 抑制活性

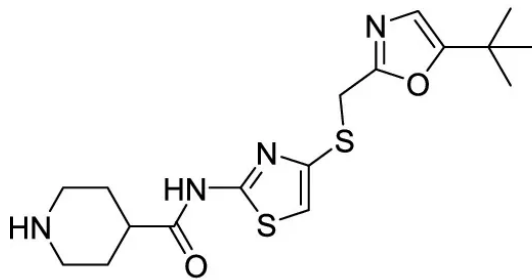
化合物 **14** 的母核为 1*H*-吡唑-3-甲酰胺，其疏水性苯环与 3-甲酰胺相连。在吡唑的 4 位，苯甲酰基形成一个环，从而形成苯并嘧啶结构。此外，亲水片段被引入溶剂可及区。小鼠急性毒性研究表明，**14**(LD₅₀=186mg/kg)比 **13**(32mg/kg)更安全。体内生物学评价显示，**14** 的活性优于 AML 一线药物阿糖胞苷。化合物 **14** 目前正在 I 期临床试验中进行研究，用于治疗白血病和实体瘤(NCT03690154)并于 2019 年获得 FDA 的孤儿药资格认定，用于治疗 AML。



图：FN-1501(14)的设计策略、化学结构和 CDK 抑制活性

6) 其他类似物

除上述临床候选药物外，吡啶类似物、噻唑类似物和吡唑并嘧啶类似物对各种 CDKs 也具有抑制作用。**SNS-032(15)**具有噻唑母核，是一种有效的、选择性的 CDK2、7 和 9 抑制剂。化合物 **15** 和 CDK2 的共晶结构分析表明，噻唑的氮原子和酰胺上的氢质子与蛋白质的 Leu83 残基形成两个氢键，咪唑环与蛋白质之间没有形成氢键。侧链哌啶环延伸出 ATP 结合口袋中的裂缝。在化合物 **15** 治疗 CLL 患者的 I 期剂量递增研究(NCT00446342)中，以 75mg/m² 的总剂量注射化合物 **15** 降低了 RNA Pol II CTD 中 Ser5 和 Ser2 的磷酸化，这表明 CDK7 和 CDK9 受到抑制。

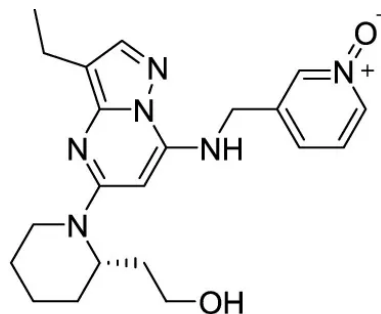


15 SNS-032

CDK2/cyclinE $IC_{50} = 38$ nM

CDK7/cyclinH $IC_{50} = 62$ nM

CDK9/cyclinT $IC_{50} = 4$ nM



16 Dinaciclib

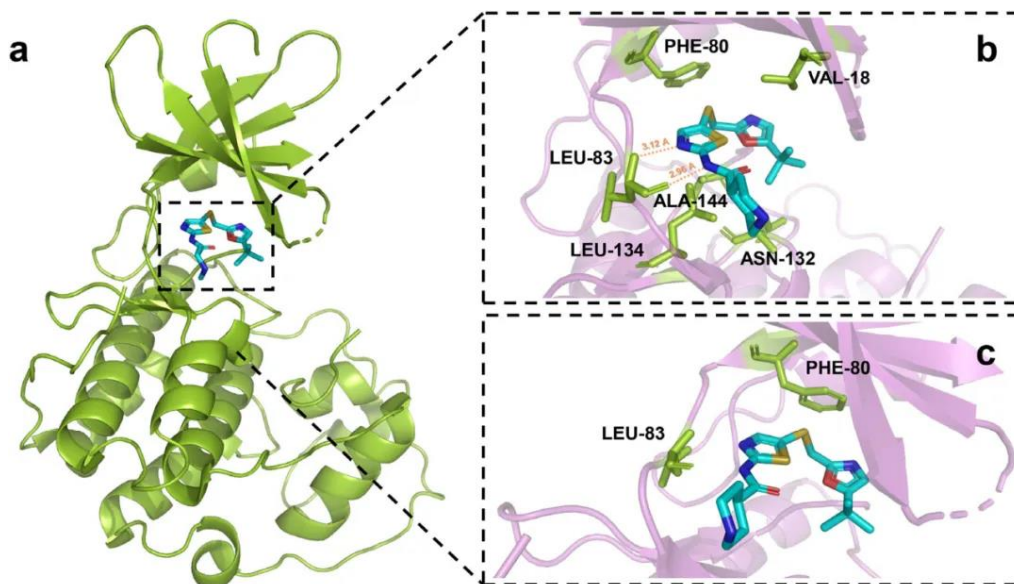
CDK1/cyclinB $IC_{50} = 3$ nM

CDK2/cyclinE $IC_{50} = 1$ nM

CDK5/p35 $IC_{50} = 1$ nM

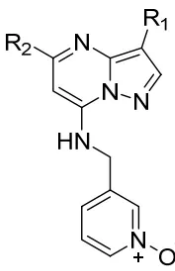


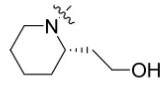
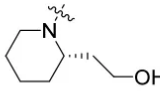
CDK9/cyclinT $IC_{50} = 4$ nM

图：SNS-032(15)和 dinaciclib(16)的化学结构和 CDK 抑制活性



图：CDK2-SNS-032 复合物的晶体结构

研究人员利用生物等排体策略合成吡唑并嘧啶衍生物，在这些衍生物中，dinaciclib(SCH-727965, 16)表现出最高的活性。化合物 16 的开发以 16a 为先导化合物，对关键位置 3 和 5 进行了修饰。用一系列含氮脂肪族杂环取代 5 位芳环显著提高了活性(16c)。先导化合物的 C-3 位是溴原子，不利于成药性，用短脂肪链取代，特别是用乙基取代后，活性提高(16)。16 的 2-(2-哌啶基)乙醇部分具有高活性，并与 CDK9 蛋白的核糖口袋形成非共价相互作用。

	Compound	R ₁	R ₂	IC ₅₀ /nM (CDK2/cyclin E)
	16a	Br		30
16b	Br		18	
16c	Br		1	
16	CH ₂ CH ₃		1	

表：化合物 16a-c 的设计策略、化学结构和 CDK 抑制活性

在一项化合物 **16** 联合表柔比星治疗转移性三阴性乳腺癌(TNBC)患者的 I 期剂量扩展研究中，该组合毒性较大，不是这些患者的最佳治疗选择(NCT01624441)。化合物 **16** 用于治疗 IV 期黑色素瘤患者的 II 期试验正在进行(NCT00937937)。此外，venetoclax 和 **16** 用于治疗复发或难治性 AML 患者(I 期, NCT03484520)，veliparib 和 dinaciclib 用于治疗晚期实体瘤患者(I 期, NCT01434316)，**16** 和 pembrolizumab 用于治疗晚期乳腺癌患者(I 期, NCT01676753)的临床试验也在进一步开展中。

NUV-422(17)是一种有效的 CDK2、4 和 6 抑制剂，IC₅₀ 值分别为 7、2 和 1nM。**17** 的结构尚未公开。临床前研究表明，**17** 表现出良好的血脑屏障通透性。化合物 **17** 已获得 FDA 孤儿药资格，用于治疗恶性胶质瘤患者，此外，已获得快速通道认可，用于治疗高度恶性胶质瘤(HGG)患者。目前正在进行三项临床试验：一项治疗成人复发或难治性 HGG 和实体瘤的 I/II 期临床研究(NCT04541225)，一项联合氟维司群治疗 HR+晚期乳腺癌(aBC, NCT05191004)的 I/II 期临床研究，一项联合恩杂鲁胺治疗转移性去势抵抗性前列腺癌(mCRPC, NCT05191017)的 I/II 期临床研究。

总结

本文将泛 CDK 抑制剂按照母核不同分为黄酮生物碱类，嘌呤类，吡唑并嘧啶类，嘧啶类，吡唑类等。虽然在泛 CDK 抑制剂的开发上取得了一系列进展，但很少有泛 CDK 抑制剂获得批准，主要是因为它们缺乏针对 CDK 的特异性，治疗窗窄，常常伴随着严重的毒性和副作用。因此，寻找高选择性的 CDK 抑制剂可能是 CDK 抑制剂类抗肿瘤药物研发的主要发展方向。

参考文献

[1]Zhenfeng Shi, Lei Tian, Taotao Qiang, et al. From Structure Modification to Drug Launch: A Systematic Review of the Ongoing Development of Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors for Multiple Cancer Therapy. *J. Med. Chem.* **2022**, 65, 9, 6390-6418.