

# INHIBITORY CYKLIN-DEPENDENTNÍCH KINAS

VLADIMÍR KRYŠTOF a MIROSLAV STRNAD

Laboratoř růstových regulátorů, Univerzita Palackého a Ústav experimentální botaniky, Akademie věd České republiky, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc, e-mail: krystof@aix.upol.cz

Došlo dne 1.VIII.2000

Klíčová slova: cyklin-dependentní kinasa, inhibitor, buněčný cyklus, antimitotický účinek

## Obsah

1. Úvod
2. Regulace buněčného cyklu a CDK
3. Chemické inhibitory CDK
  - 3.1. Butyrolakton
  - 3.2. Flavonoidy
  - 3.3. Trisubstituované puriny
  - 3.4. Paullony
  - 3.5. Indigoidní látky
  - 3.6. Ostatní způsoby blokování aktivity CDK
4. Závěr

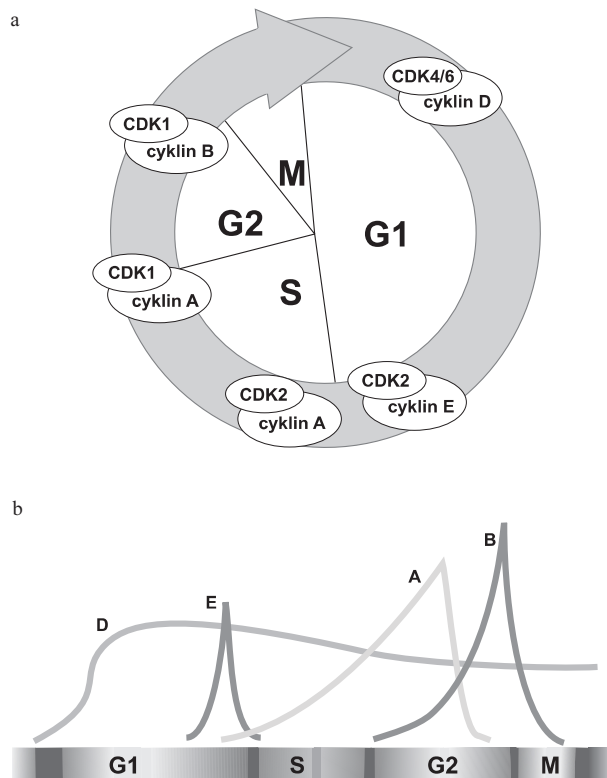
## 1. Úvod

Fosforylace proteinů představuje jeden z nejčastěji využívaných regulačních mechanismů, kterými buňka disponuje. Docela malá změna hmotnosti proteinu vede k radikálním změnám konformace, jež mají za následek aktivaci nebo deaktivaci enzymů, receptorů, regulačních proteinů apod. Na fosforylaci je založeno také řízení buněčného cyklu, v němž hlavní slovo mají cyklin-dependentní kinasy (CDK). Díky svým častým poruchám v řadě nádorů se staly slibným cílem vývoje specifických inhibitorů. Prakticky zároveň s objevem přirozených proteinových inhibitorů regulujících aktivitu cyklin-dependentních kinas (CKI) v buňkách započalo hledání inhibitorů chemických. Na počátku této éry byl nalezen i purinový derivát olomoucín, rychle následován dalšími inhibitory. Od té doby jejich počet několikanásobně vzrostl. Je to zcela přirozené, uvědomíme-li si úzkou souvislost genetických změn cyklin-dependentních kinas a jejich regulátorů se vznikem nádorů, přímou interakci s onkogeny a nádorovými supresory a jejich stěžejní funkci v řízení buněčného cyklu. Tyto souvislosti evidentně vybízí k vývoji nové generace chemoterapeutik odvozených od inhibitorů CDK, které blokují progresi buněčného cyklu, indukují apoptózu a vykazují silné protinádorové účinky nejen na buněčných liniích, ale též *in vivo*.

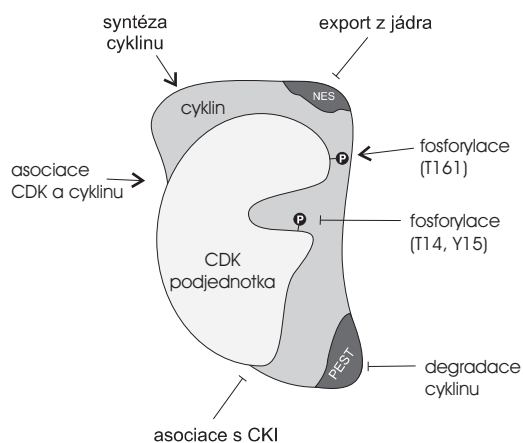
## 2. Regulace buněčného cyklu a CDK

Buněčný cyklus, sled dějů zajišťující duplikaci DNA mateřské buňky a její rozdělení mezi buňky dceřinné, řídí ve všech eukaryontních organismech enzymy ze skupiny CDK. Objev cyklin-dependentních kinas před více než deseti lety započal novou éru nahlížení na kontrolu buněčné proliferace i na proliferaci samotnou. Spouštění jednotlivých fází bylo shledáno závislým na aktivitě CDK, což umožnilo vytvořit první jednoduchý model kontroly buněčného cyklu<sup>1</sup> (obr. 1). Holoenzym CDK se skládá z proteinu s katalytickou funkcí (proteinkinasa) a pozitivního regulátoru (cyklin). Asociace cyklinu s CDK podjednotkou dává vzniknout aktivnímu komplexu, řídícímu určitou fázi cyklu. Odtud také pochází název cyklinu, jenž odráží jeho přechodnou přítomnost v buňce. Kompletní CDK pak katalyzují přenos fosfátové skupiny z ATP na serinový nebo threoninový zbytek v polypeptidovém řetězci určité sekvence. Aktivita CDK kriticky závisí na vazbě s cyklinem, přičemž některé CDK mohou poutat více typů cyklinů a fosforylovat různé substráty. Těmi bývají transkripční faktory, proteiny cytoskeletu, proteiny biosyntézy purinů a jaderné membrány aj.

Regulace aktivity CDK se však neomezuje pouze na asociaci a disociaci komplexu CDK a expresi cyklinu. Zahrnuje



Obr. 1. Aktivita cyklin-dependentních kinas během buněčného cyklu (a) a fluktuace koncentrace cyklinů regulujících aktivitu CDK (b)



Obr. 2. **Způsoby regulace aktivity CDK:** ↓ značí aktivaci, ⊥ inhibici aktivity, NES – sekvence pro export z jádra, PEST – sekvence proteolýzy cyklinu

také aktivující fosforylaci threoninového zbytku<sup>2</sup> (odkrytí aktivního místa), deaktivující fosforylaci threoninu a tyrosinu přímo ve vazebném místě pro ATP<sup>3</sup> (bránění vstupu ATP do vazebného místa), vazbu přirozeného proteinového inhibitoru<sup>4</sup>, degradaci cyklinu po označení ubiquitinem<sup>5</sup>, intracelulární translokaci<sup>6</sup> a asociaci se subcelulárními strukturami (obr. 2).

Úkol buněčného cyklu spočívá ve vytvoření přesné kopie DNA a následném rozdělení buňky do dvou. Precizní průběh cyklu regulují cyclin-dependentní kinasy. Pokud zpětnovazebné kontrolní mechanismy zjistí poškození DNA, zablokují aktivitu CDK prostřednictvím přirozených inhibitorů a buněčný cyklus se zastaví (např. radiční záření indukuje expresi nádorového supresoru p53, který zároveň funguje jako transkripční faktor přirozeného CKI p21<sup>Cip1/Waf1</sup>). V následující pauze dochází k opravám, tak aby do dalších generací vstupoval genetický materiál pokud možno totožný. Poruchy těchto kontrolních a řídicích mechanismů vedou k maligní transformaci tkání; do další generace vstupují již buňky s mutovanou DNA, které se množí bez regulace. Mutace vedoucí k nekontrolovanému dělení buněk byly prokázány v genech cyclin- dependentních kinas<sup>7</sup>, cyklinů<sup>8</sup>, aktivujících fosfatase cdc25 (cit.<sup>9</sup>), nádorových supresorů pRb a p53 (cit.<sup>10,11</sup>)

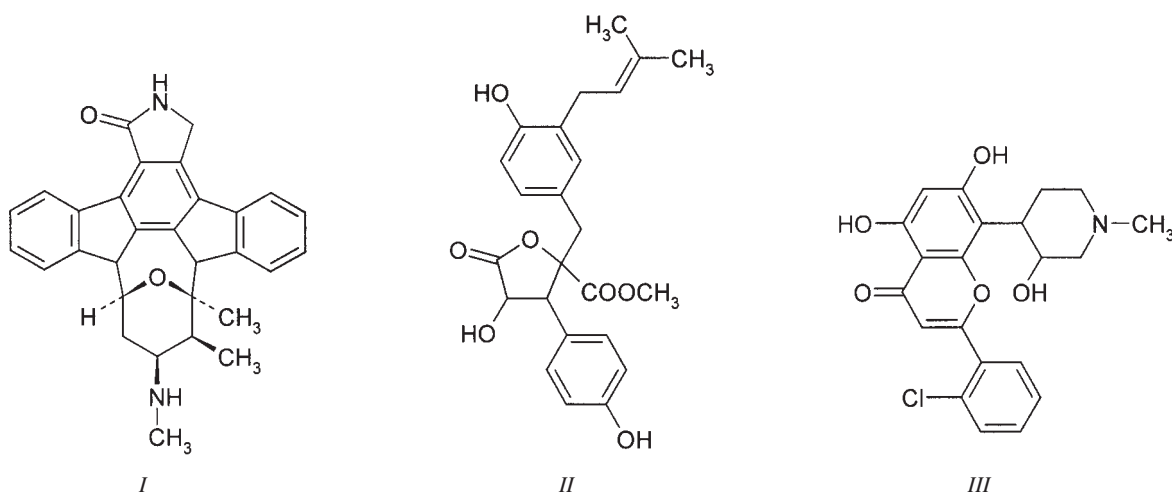
a přirozených inhibitorů cyclin-dependentních kinas (např. p16<sup>INK4a</sup>, cit.<sup>12</sup>).

### 3. Chemické inhibitory CDK

Chemické inhibitory CDK mohou působit řadou rozdílných mechanismů. Teoreticky lze připravit malé molekuly, které kompetují s ATP o vazebné místo, interagují s fosforylovaným zbytkem threoninu v T-kličece, ovlivňují vznik a disociaci komplexu CDK / cyklin nebo vazbu nízkomolekulárních proteinových podjednotek, blokují funkci aktivující fosfatasy cdc25, narušují intracelulární lokalizaci CDK, mimikují přirozené proteinové inhibitory nebo vyvolávají proteolýzu cyklinů<sup>13</sup>. Zatím jsou k dispozici pouze látky ovlivňující vazbu ATP (kompetitivní i nekompetitivní inhibitory) a inhibitory cdc25.

Pokud je odhalena nová látka s inhibičním účinkem, studuje se nejprve molekulární mechanismus jejího efektu klasickou enzymologickou analýzou a dále také rentgenostrukturní analýzou společného krystalu CDK a inhibitoru. Odhalená struktura kokystalu umožňuje efektivnější a cílenější navrhování derivátů lépe zapadajících do aktivního místa a pevněji interagujících s proteinem na více místech. Mimo ATP byly získány a analyzovány kokrystaly CDK2 s celou řadou kompetitivních inhibitorů<sup>14–19</sup>. Všechny doposud popsané látky jsou lokalizovány ve vazebném místě pro ATP, které tímto prokazuje svou schopnost pojmout i značně odlišné molekuly. Další krystalografické práce již rozebírají vazebné aspekty v ternárních komplexech CDK-cyklin-ATP a CDK-cyklin-CKI (cit.<sup>20</sup>). Výsledky jasně prokazují změnu konformace aktivního místa CDK po navázání cyklinu, které je tedy nutno také uvažovat. Efektivním nástrojem pro syntézu nových derivátů se nepochybně stává i počítačové modelování interakcí inhibitoru a CDK (cit.<sup>21,22</sup>).

Hledání chemických inhibitorů CDK začalo prakticky těsně po objevu přirozených CKI a objasnění úlohy, kterou v regulaci buněčného cyklu zastávají. Záhy byly známy nespecifické inhibitory jako je 6-dimethylaminopurin<sup>23</sup>, 6-( $\Delta^2$ -isopentenyl)aminopurin<sup>23</sup>, staurosporin (*I*) a 7-hydroxystaurosporin<sup>23</sup> (produkty plísni rodu *Streptomyces*), nebo suramin<sup>24</sup> – přirozený glykosaminoglykan používaný jako antihelmintikum, antiprozoikum a později též jako inhibitor topoisome-



rasy II a cytotatikum. Nízkou selektivitou vůči enzymům skupiny kinasy je charakteristický též další inhibitor topoisomerasy II, 9-hydroxyellipticin<sup>25</sup>, derivát alkaloidu z rostlin rodu *Ochrosia*. Jejich použití při studiu buněčného cyklu silně omezuje právě nízká selektivita, avšak není vyloučeno, že se některý z nich posléze stane výchozím členem nové skupiny s užším spektrem účinku. Ěru specifických inhibitorů CDK započal objev butyrolaktonu a olomoucínu. Od této doby byla identifikována řada dalších skupin látek s vysokou specifitou pro kinasy homologní s CDK1. Popis jednotlivých skupin je uveden níže a jejich inhibiční účinky na CDK shrnuje tab. I. Všimněte si, že se mezi nimi nevyskytuje specifický inhibitor CDK4.

Tabulka I

Inhibice cyklin-dependentních kinas různými sloučeninami. Hodnota IC<sub>50</sub> představuje 50 % inhibici enzymu

	Sloučenina	IC <sub>50</sub> /μM		
		CDK1	CDK2	CDK4
I	Staurosporin	0,003	0,007	>1000
II	Butyrolakton-I	0,6	1,5	>1000
III	Flavopiridol	0,3	0,4	0,4
IV	epigalokatechin galát	>10	>10	0,3
	6-Benzylaminopurin	200	–	–
V	Olomoucín	7	7	>1000
VI	Roskovitín	0,65	0,7	>100
VII	Purvalanol A	0,004	0,035	0,85
VIII	Kenpaullon	0,4	0,7	>100
IX	Alsterpaullon	0,035	–	>100
X	Indirubin	10	2,2	12
XI	Indirubin-5-sulfonová kyselina	0,055	0,035	0,3
	6-(2,3-Dichlorfenylamino)-7-chlor-5,8-chinolindion	–	5	>50
	5-Fenylamino-2-methyl-4,7-dioxobenzothiazol	–	6	>200

### 3.1. Butyrolakton

Butyrolakton-I (II) byl izolován z plísně *Aspergillus* při screeningu produktů kultur různých mikroorganismů<sup>26</sup>. Fun-

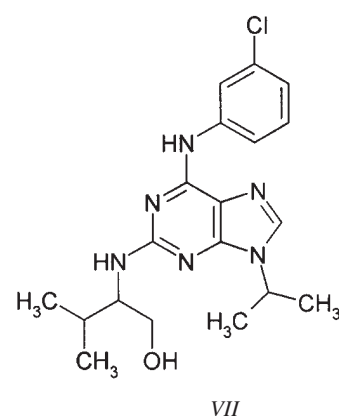
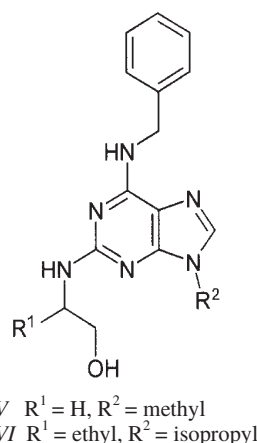
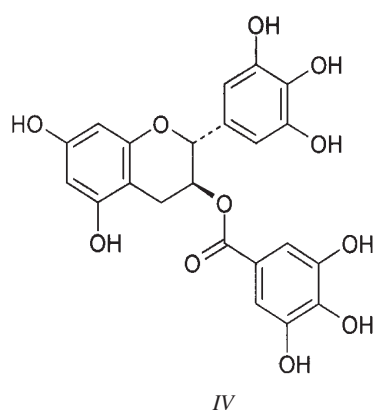
guje jako kompetitivní inhibitor CDK1 vzhledem k ATP, ostatní kinasy včetně CDK4 neblokuje. Jeho efekt byl potvrzen i na buněčných systémech<sup>27</sup>, které blokuje na rozhraní G1/S i G2/M. Prozatím nebyla jeho molekula nijak modifikována, čímž se stává atraktivním prototypem celé skupiny inhibitorů.

### 3.2. Flavonoidy

Flavonové látky jsou již delší dobu známy jako inhibitory různých kinas a mnoho z nich také způsobuje změny v buněčném cyklu a růstu. Nejúčinnějšími inhibitory CDK z této skupiny jsou flavopiridol (III) a deschlorflavopiridol<sup>28</sup>, odvozené od látek nalezených v indické rostlině *Disoxylum bincetiferum*. Jedná se o sloučeniny strukturně příbuzné flavonům quercetinu a genisteinu, které ale mají asi 250× slabší inhibiční účinek na CDK. Flavopiridol nejvýrazněji blokuje CDK1; později byl zjištěn obdobný vliv na CDK2 a také na CDK4. Funguje jako kompetitivní inhibitor vzhledem k ATP, což následně potvrdila rentgenostrukturní analýza kokryystalu CDK2 s deschlorflavopiridolem<sup>15</sup>. Benzopyranový skelet zaujímá podobné místo jako purin ATP a piperidinový zbytek se nachází v místě, kam se za normálních podmínek váže α-fosfát ATP. Fenyl, podobně jako je tomu u purinových inhibitorů, interaguje mimo aktivní místo. Pro srovnání byla vyřešena také krystalová struktura CDK2 s dalším flavonem myrrecetinem, který je proti flavopiridolu asi 500× slabším inhibitorem, ale reprezentuje podobnou strukturu. Do aktivního místa se váže obráceně, tedy velmi podobně jako purinové deriváty.

Cytotoxické účinky flavopiridolu byly úspěšně testovány na mnoha nádorových liniích a je nutné podotknout, že se stal prvním chemickým inhibitorem CDK, zařazeným do klinických zkoušek, i když dnes už ne jediným. Pro své nežádoucí vedlejší účinky však byly klinické studie zastaveny.

Pozoruhodná je také další flavonová sloučenina, obsažená v zeleném čaji, epigalokatechin galát (IV). CDK4 blokuje v submikromolární koncentraci a na aktivitu ostatních kinas včetně CDK1 a CDK2 má vliv mnohem menší<sup>29</sup>. V buněčné kultuře vystavené působení epigalokatechin galátu vzrostla hladina p53 a následně *de novo* exprimovaných přírodních inhibitorů rodin KIP/CIP (cit.<sup>30</sup>). Testován byl také na nádorech transplantovaných myším a vedl k jejich rapidnímu zmenšení a remisi<sup>31</sup>.



### 3.3. Trisubstituované puriny

Jako slabé a málo specifické inhibitory kinas byly známy různé deriváty purinu (viz výše). Prvním purinovým derivátem specificky inhibujícím CDK1 a CDK2 se stal olomoucín (V, cit.<sup>32</sup>). Jedná se o látku strukturně odvozenou od rostlinných hormonů cytokininů, původně syntetizovanou jako inhibitor rostlinných glukosyltransferas<sup>33</sup>. Její schopnost blokovat funkci CDK1 byla objevena při testování dlouhé řady různě substituovaných purinů. Mezi všemi testovanými látkami vykazovaly nejvyšší účinnost zejména C2, C6, N9-trisubstituované puriny.

Kinetická analýza prokázala, že inhibice CDK1 olomoucínem je kompetitivní vzhledem k ATP a nekompetitivní vůči histonu, který je při testech používán jako substrát. Brzy to potvrdila i rentgenová analýza kokryystalu CDK2 s olomoucínem<sup>14</sup>. Purinový skelet sice vstupuje přímo do vazebného místa pro ATP, ale vzhledem k purinové části ATP zaujímá obrácenou polohu: C2 substituent obsazuje místo zachycující ribosu ATP a 6-benzylaminoskupina zůstává podobně jako u flavopiridolu mimo vazebné místo. Studium kokryystalů také vysvětlilo specifitu purinových inhibitorů, přestože vazebné místo pro ATP zůstává v řadě kinas různých skupin značně konzervativní. Právě 6-benzylaminoskupina interaguje s oblastmi, které do styku s ATP vůbec nepřicházejí, a jejich aminokyselinové zbytky jsou charakteristické pouze pro cyklin-dependentní kinasy.

Díky pozornosti, kterou purinové inhibitory záhy po svém objevu přitáhly, se stal olomoucín výchozím členem pro detailnější studium struktury a aktivity purinů blokujičích buněčný cyklus. Brzy byly obměnami jeho struktury získány účinnější sloučeniny, např. bohemín a roskovitín (VI, cit.<sup>16</sup>), CVT-313 (cit.<sup>34</sup>), a další, strukturou i aktivitou velmi podobné<sup>35–38</sup>. Mezi nejsilnější patří derivát pojmenovaný purvalanol A (VII), který je 1000× účinnějším inhibitorem CDK než olomoucín<sup>18</sup>. Také u této látky byla analyzována krystalová struktura kokryystalu s CDK2 enzymem.

Ačkoliv jsou purinové inhibitory účinné a specifické *in vivo* i *in vitro* testech, je nepravděpodobné, že jejich jediným cílem v buňce budou CDK. Purinové látky jsou v přírodě bohatě zastoupeny a řada enzymů je využívá jako kofaktory a substráty. Jejich možnému využití v chemoterapii to ale nijak nepřekáží.

### 3.4. Paullony

Během srovnávací studie účinku flavopiridolu s několika desítkami tisíc látek na lidských nádorových liniích v National Cancer Institute (USA) byla objevena další účinná a specifická skupina inhibitorů CDK – paullony<sup>22</sup>. Jedná se o deriváty 7,12-dihydroindolo[3,2-*d*][1]-benzazepinu a mezi nimi nejefektivnější 9-bromderivát (kenpaullon, VIII). Jako ostatní specifické inhibitory CDK funguje i kenpaullon kompetitivně a vykazuje antiproliferační aktivitu. Přes značně odlišnou strukturu kenpaullonu ve srovnání s ostatními CKI potvrzuje molekulární modelování vstup do vazebného místa pro ATP (cit.<sup>23</sup>). Zároveň naznačuje možné substituce za účelem pevnější interakce. Následující studium vztahů mezi strukturou a aktivitou vedlo k přípravě inhibitoru 10× účinnějšího, alsterpaullonu (IX), jehož antimitotický účinek rovněž vzrostl o jeden řád<sup>39</sup>.

### 3.5. Indigoidní látky

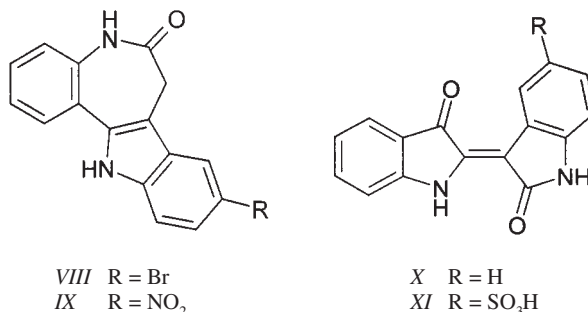
Při analýze účinku aktivních látek z rostlin používaných tradiční čínskou medicínou byla v předloňském roce objevena nová skupina CDK inhibitorů, indirubiny (X, cit.<sup>19</sup>). Extrakty rostlin obsahující indigoidní sloučeniny vykazují prokazatelnou protinádorovou aktivitu. V 80. letech podrobili indirubin *in vivo* experimentům a klinickým zkouškám, při nichž zjistili nízkou toxicitu, malé vedlejší účinky a 26 % remisi u různých typů leukemií. Nové syntetické indirubiny kompetitivně inhibují CDK1 a CDK2, asi o řád hůře pak i CDK4. Zastavují proliferaci velkého počtu buněčných linií, které zůstávají zablokovány těsně před mitózou.

Dvě ze skupiny indigoidních látek byly pro potvrzení mechanismu účinku podrobeny krystalografické analýze, konkrétně 5-chlorindirubin a indirubin-5-sulfonová kyselina (XI). Z kokryystalů s CDK2 je zřejmá značná komplementarita tvaru molekuly indirubinu a vnitřního povrchu vazebného místa pro ATP. Ve srovnání s ATP či staurosporinem však oba deriváty vykazují silnější vazbu k CDK2, a to díky interakcím v místech, kam se váže N9-isopropylový zbytek roskovitinu.

### 3.6. Ostatní způsoby blokování aktivity CDK

Způsobů, jak ovlivnit aktivitu cyklin-dependentních kinas, je celá řada, jak již bylo uvedeno výše. Kromě uvedených kompetitorů s ATP stojí za zmínku rozhodně i peptidové inhibitory. Taktika jejich přípravy zahrnuje 1) mapování sekvencí přirozených proteinových inhibitorů a 2) syntézu fragmentů s vazebnou (a inhibiční) aktivitou pro CDK. Bylo vyzkoušeno i testování systematicky nebo náhodně syntetizovaných polypeptidů, ale prozatím úspěšnější ve svých pokusech byly týmy soustředující se na mapování aktivních míst přirozených inhibitorů CDK p16<sup>INK4</sup> (cit.<sup>40</sup>) a p21<sup>WAF1</sup> (cit.<sup>41</sup>). Tato místa pak redukovali na malé fragmenty, odpovědné za inhibici CDK4, které posléze úspěšně otestovali na buněčných kulturách.

Zablokování kinasy CDK4 považují buněční biologové v současnosti za jeden z neefektivnějších způsobů zastavení buněčného cyklu, neboť tento enzym fosforyluje aktivuje transkripci genů spouštějících replikaci DNA na počátku buněčného cyklu (v G1 fázi). Ačkoliv se celá řada vědeckých týmů snaží identifikovat skupinu látek, které by snadnými modifikacemi položily základ specifickým inhibitorům CDK4, jsou prozatím málo úspěšné. Snad první skupinou se stanou nedávno objevené 6-arylamo-7-halo-5,8-chinolindiony nebo podobné 5-arylamo-2-methyl-4,7-dioxobenzothiazoly<sup>42</sup>.



Mezi další studované cesty patří také vývoj inhibitorů aktivačních fosfatů cdc25 (cit.<sup>43,44</sup>). Jedním z nejdůležitějších prostředků regulujících aktivitu CDK je fosforylace a defosforylace T14 a Y15 CDK podjednotky. Fosforylace na zmíněných místech je sice pro funkci CDK nezbytná, neboť přítomnost fosfátových skupin blokuje vazbu ATP do aktivního místa, ovšem zvýšená aktivita fosfatasy cdc25 může aktivovat CDK v nesprávném místě a v nesprávný čas. Řada experimentů potvrdila zvýšenou aktivitu cdc25 v několika typech nádorů. To jen podpořilo domněnku, že nesprávná aktivace CDK přispívá ke vzniku nádorů. Cdc25 se tak nabízí jako další možný prostředek žádoucího ovlivnění aktivity CDK a cíl potenciálních syntetických inhibitorů. Velkým kladem inhibitorů fosfatů je jejich nezávislost na intracelulární hladině ATP, která obecně značně snižuje účinnost syntetických CKI *in vivo*. Vyplývá z toho efektivnější účinnost v buňce, která bude bližší inhibiční hodnotě  $IC_{50}$  pro enzym. Několik inhibitorů cdc25 je již popsáno a otestováno na nádorových liniích (benzochinoidní sloučeniny dnacin A1 a B1, terpen  $\gamma$ -hydroxybutenolid). Zatím ale není jasné, zda jejich účinek na buněčný cyklus může být připsán na vrub přímé inhibici cdc25.

Molekulárně-biologický přístup blokování CDK zastupuje technologie protisměrných nukleotidů. Představuje oblast, do níž jsou vkládány v současnosti asi největší naděje. Přitom je spojena s obrovskými potížemi, týkající se zejména doručení protisměrných nukleotidů do živých buněk. Buňkám jsou předkládány syntetické oligonukleotidy DNA, nesoucí sekvenci komplementární k určitému úseku mRNA. Tato molekula hybridizuje s odpovídajícím úsekem na DNA a brání tak transkripci, nebo s úsekem na RNA a inhibuje translaci. Nejedná se tedy o klasickou enzymovou inhibici jako u ostatních uváděných látek, ale o ovlivnění aktivity CDK na úrovni transkripcie a translace<sup>45,46</sup>.

#### 4. Závěr

Poruchy mechanismů řídicích buněčný cyklus a zejména ty, které způsobují nádorová onemocnění, stimulovaly prudký vzestup zájmu o inhibitory CDK jako o novou generaci protinádorových látek. Jejich důležitými vlastnostmi přitom musejí být nízká toxicita, schopnost pronikat biologickými membránami a také relativní stabilita v organismu. S nízkou toxicitou vůči nemutovaným buňkám úzce souvisí specifita účinku CKI. Situaci rovněž komplikuje vysoký stupeň konzervativnosti vazebního místa pro ATP, které je společné obrovské skupině proteinkinás. Relativní nesnáze pomáhá překonávat nemalou měrou krystalografická analýza a stále častěji i nesrovnatelně levnější molekulární modelování. Nový typ skutečně účinných protinádorových látek založených na blokování buněčného cyklu skrze aktivitu CDK je proto otázkou velmi blízké budoucnosti.

Velmi zajímavým aspektem účinku CKI je indukce apoptózy (programové buněčné smrti). Ačkoli reverzibilně blokují buněčný cyklus, jsou některé CKI schopny apoptózu indukovat, a to v závislosti na typu buněčné linie. Zejména schopnost specifické indukce apoptózy nádorových buněk může být důležitým kritériem potenciálního využití v chemoterapii. Dodejme však, že potenciální využití CKI v medicíně může směřovat také do dalších oblastí, které nějakým způsobem souvisejí s poruchami proliferace, jako např. kardiovas-

kulární onemocnění (aterosklerosa, angiogenese), dermatologie (psoriasis), nefrologie (glomerulonefritida), neurologie (Alzheimerova choroba, ischemie), parazitologie (prvoci, plísňe) a virové infekce. Z pohledu buněčné biologie a biochemie mohou chemické CKI jako velice specifické nástroje přispět k lepšímu porozumění mechanismu buněčného cyklu, což může v budoucnu vést opět k odhalení mnohem efektivnějších způsobů terapie.

Na studiu struktury a aktivity zde uváděných skupin látek a na dalším zefektivnění inhibičních vlastností a specifity CKI se do značné míry již podílejí i nadnárodní farmaceutické společnosti. Proces vývoje zcela nové generace léčiva na bázi inhibitorů CDK bude v každém případě zahrnovat několik fází zkoušení, trvat více než 10 let a spolyká stovky miliónů dolarů. Ani po 6 letech intenzivních studií nebyl totiž žádný z výše uvedených inhibitorů CDK zaveden do klinického zkoušení. Nejdále jsou z tohoto pohledu purinové deriváty a flavopiridol. Dosavadní výsledky preklinických testů s purinovými deriváty vypadají nadějně a tak se můžeme pouze těšit na klinické zkoušení, které detailněji prokáže nejen hlavní, ale i vedlejší účinky těchto látek. Preklinické testy prozatím prokázaly širokospektrální účinky na řadu nádorů s minimálními účinky vedlejšími.

#### LITERATURA

- Maller J. L., Gautier J., Langan T. A., Lohka M. J., Shenoy S., Shalloway D., Nurse P.: *J. Cell Sci. Suppl.* 12, 53 (1989).
- Fesquet D., Labbe J. C., Derancourt J., Capony J. P., Galas S., Girard F., Lorca T., Shuttleworth J., Doree M., Cavadore J. C.: *EMBO J.* 12, 3111 (1993).
- Müller P. R., Coleman T. R., Kumagai A., Dunphy W. G.: *Science* 270, 86 (1995).
- Pines J.: *Trends Biochem. Sci.* 19, 143 (1994).
- Pagano M.: *FASEB J.* 11, 1067 (1997).
- Pines J.: *Nature* 397, 104 (1999).
- Bullrich F., MacLachlan T. K., Sang N., Druck T., Veronese M. L., Allen S. L., Chiorazzi N., Koff A., Heubner K., Croce C. M.: *Cancer Res.* 55, 1199 (1995).
- Hall M., Peters G.: *Adv. Cancer Res.* 68, 67 (1996).
- Galaktionov K., Lee A. K., Eckstein J., Draetta G., Meckler J., Loda M., Beach D.: *Science* 269, 1575 (1995).
- Herwig S., Strauss M.: *Eur. J. Biochem.* 246, 581 (1997).
- Ko J. L., Prives C.: *Genes Dev.* 10, 1054 (1996).
- Gemma A., Takenoshita S., Hagiwara K., Okamoto A., Spillare E. A., McMemamin M. G., Hussain S. P., Forrester K., Zariwala M., Xiong Y., Harris C. C.: *Int. J. Cancer* 68, 605 (1996).
- Meijer L.: *Trends Cell Biol.* 6, 393 (1996).
- Schulze-Gahmen U., Brandsen J., Jones H. D., Morgan D. O., Meijer L., Vesely J., Kim S. H.: *Proteins* 22, 378 (1995).
- Azevedo W. F., Müller-Dieckmann H. J., Schulze-Gahmen U., Worland P. J., Sausville E., Kim S. H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 2735 (1996).
- De Azevedo W. F., Leclerc S., Meijer L., Havlíček L., Strnad M., Kim S. H.: *Eur. J. Biochem.* 243, 518 (1997).
- Toledo L. M., Lydon L. B.: *Structure* 5, 1551 (1997).
- Gray N. S., Wodicka L., Thunnissen A. M., Norman T.

- C., Kwon S., Espinoza F. H., Morgan D. O., Barnes G., LeClerc S., Meijer L., Kim S. H., Lockhart D. J., Schultz P. G.: *Science* 281, 533 (1998).
19. Hoessel R., Leclerc S., Endicott J.A., Nobel M. E. M., Lawrie A., Tunnah P., Leost M., Damiens E., Marie D., Marko D., Niederberg E., Tang W., Eisenbrand G., Meijer L.: *Nature Cell Biol.* 1, 60 (1999).
  20. Jeffrey P. D., Russo A. A., Polyak K., Gibbs E., Hurwitz J., Massague J., Pavlitch N. P.: *Nature* 376, 313 (1995).
  21. Otyepka M., Kryštof V., Havlíček L., Sieglarová V., Strnad M., Koča J.: *J. Med. Chem.* 43, 2506 (2000).
  22. Zaharevitz D. W., Gussio R., Leost M., Senderowicz A. M., Lahusen T., Kunick C., Meijer L., Sausville E. A.: *Cancer Res.* 59, 2566 (1999).
  23. Riallet V., Meijer L.: *Anticancer Res.* 11, 1581 (1991).
  24. Bojanowski K., Nishio K., Fukuda M., Larsen A. K., Saijo N.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 203, 1574 (1994).
  25. Ohashi M., Sukigawa E., Nakanishi N.: *Jpn. J. Cancer Res.* 96, 819 (1995).
  26. Kitagawa M., Okabe T., Ogino H., Matsumoto H., Suzuki-Tahakasi I., Kokubo T., Higashi H., Saitoh S., Taya Y., Yasuda H., Ohba Y., Nishimura S., Tanaka N., Okuyama A.: *Oncogene* 8, 2425 (1993).
  27. Someya A., Tanaka N., Okuyama A.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 198, 536 (1994).
  28. Losiewicz M. D., Carlson B. A., Kaur G. K., Sausville E. A., Worland P. J.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 201, 589 (1994).
  29. Schächtele C., Totzke F., Marmé D.: *Cell. Mol. Biol. Lett.* 3, 332 (1998).
  30. Liang Y. C., Lin-Shiau S. Y., Chen C. F., Lin J. K.: *J. Cell Biochem.* 75, 1 (1999).
  31. Jankum J., Keck R. W., Skrzypczak-Jankum E., Swiercz R.: *Cancer Res.* 57, 559 (1997).
  32. Veselý J., Havlíček L., Strnad M., Blow J. J., Donella-Deana A., Pinna L., Letham D. S., Kato J., Detivaud L., Leclerc S., Meijer L.: *Eur. J. Biochem.* 224, 771 (1994).
  33. Parker C. W., Entsch B., Letham D. S.: *Phytochemistry* 25, 303 (1986).
  34. Brooks E. E., Gray N. S., Joly A., Kerwar S. S., Lum R., Mackman R. L., Norman T. C., Rosete J., Rowe M., Schow S. R., Schultz P. G., Wang X., Wick M. M., Shiffman D.: *J. Biol. Chem.* 14, 29207 (1997).
  35. Schow R. S., Mackman R. L., Blum C. L., Brooks E., Horsma A. G., Joly A., Kerwar S. S., Lee G., Shiffman D., Nelson M. G., Wang X., Wick M. M., Zhang X., Lum R. T.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 7, 2697 (1997).
  36. Chang Y. T., Gray N. S., Rosania G. R., Sutherland D. P., Kwon S., Norman T. C., Sarohia R., Leost M., Meijer L., Schultz P. G.: *Chem. Biol.* 6, 361 (1999).
  37. Imbach P., Capraro H. G., Furet P., Mett H., Meyer T., Zimmermann J.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9, 91 (1999).
  38. Oh C. H., Lee S. C., Lee K. S., Woo E. R., Hong C. Y., Yang B. S., Baek D. J., Cho J. H.: *Arch. Pharm. (Weinheim)* 6, 187 (1999).
  39. Schultz C., Link A., Leost M., Zaharevitz D. W., Gussio R., Sausville E. A., Meijer L., Kunick C.: *J. Med. Chem.* 15, 2909 (1999).
  40. Fähræus R., Paramio P. M., Ball K., Laín S., Lane D. P.: *Curr. Biol.* 6, 84 (1996).
  41. Ball K. L., Lain S., Fähræus R., Smythe C., Lane D. P.: *Curr. Biol.* 7, 71 (1997).
  42. Ryu C. K., Kang H.Y., Yi Y. J., Lee C. O.: *Arch. Pharm. Res.* 1, 42 (2000).
  43. Horiguchi T., Nishi K., Hakoda S., Tanida S., Nagata A., Okayama H.: *Biochem. Pharmacol.* 48, 2139 (1994).
  44. Gunasekera S. P., McCarthy P. J., Kelly-Borges M., Lobkovsky E., Clardy J.: *J. Am. Chem. Soc.* 118, 8759 (1996).
  45. Flanagan W. M., Su L. L., Wagner R. W.: *Nature Biotechnol.* 14, 1139 (1996).
  46. Minshull J., Blow J. J., Hunt T.: *Cell* 56, 947 (1989).
- V. Kryštof and M. Strnad** (*Laboratory of Growth Regulators, Palacký University and Institute of Experimental Botany, Academy of Sciences of the Czech Republic, Olomouc*): **Inhibitors of Cyclin-dependent Kinases**
- Disorders in regulation mechanisms of the cell cycle cause uncontrolled division of cells, which is the nature of neoplastic diseases. Cyclin-dependent kinases (CDK), enzymes of the serine-threonine protein kinase group, belong to main regulators of cell division in all eukaryotic organisms. Their indispensability in regulation of the cell cycle and, in particular, their frequent deregulation in tumours led to active search for chemical inhibitors of CDK. Butyrolactone, flavopiridol, purines of the olomoucine type, paullones, indirubins and others inhibit the CDK, block the cell cycle in the G1/S and G2/M transitions and show interesting anticancer effects. In the article, chemical properties, the mechanism of action and biological activity of the inhibitors are described.