

靶向ATP活性位点的CDK5抑制剂研究进展

王丽惠^{1,2}, 杨玉社^{1,2}, 陆征宇^{2*}

(1. 中国科学院大学, 北京 100049; 2. 中国科学院上海药物研究所, 上海 201203)

摘要: 细胞周期蛋白依赖性激酶5 (cyclin-dependent kinase 5, CDK5) 是一种丝氨酸/苏氨酸激酶, 是CDKs家族的非典型成员, 主要被非细胞周期蛋白p35或p39 (及各自的截短产物p25或p29) 激活, 磷酸化下游底物, 调控多种神经和非神经功能。研究表明CDK5的异常活化, 与多种神经退行性疾病、癌症、糖尿病和炎症等疾病的发生发展密切相关。因此, 靶向CDK5已成为多种疾病治疗的重要靶点。然而到目前为止, 尚无选择性CDK5抑制剂处于临床阶段。而泛CDK抑制剂存在临床疗效不佳和因广泛抑制其他激酶而引起的不良反应, 故临床试验进展缓慢。鉴于此, 选择性CDK5抑制剂不论是对阐明CDK5的生物学功能, 还是对探索CDK5抑制剂作为安全有效的临床治疗方案都具有重要意义。本文对CDK5的蛋白结构、生物学功能、与疾病的关系进行简要概述, 重点讨论了靶向ATP活性位点的CDK5抑制剂的结构类型和结合模式, 并对开发选择性CDK5抑制剂的策略进行总结与展望。

关键词: 细胞周期蛋白依赖性激酶5; 生物学功能; ATP竞争性抑制剂; 选择性; 药物设计

中图分类号: R914 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)09-2454-16

Recent progress of CDK5 inhibitors targeting ATP active sites

WANG Li-hui^{1,2}, YANG Yu-she^{1,2}, LU Zheng-yu^{2*}

(1. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 2. Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China)

Abstract: Cyclin-dependent kinase 5 (CDK5), a serine/threonine kinase, is one of the non-typical members of the CDKs family. CDK5 is mainly activated by non-cyclin activators p35 or p39 (as well as their respective fragments p25 and p29) to phosphorylate downstream substrates and regulate numerous neural and non-neural functions. Increasing evidence has confirmed that the overactivation of CDK5/p25 complex is closely related to neurodegenerative diseases, cancers, diabetes and inflammation. Consequently, CDK5 has become an important target in multiple diseases treatment. Nevertheless, to date, no selective CDK5 inhibitors are currently in the clinical stage. On the other hand, pan-CDK inhibitors are limited in clinical trials, due to their poor clinical efficacy and toxic side effects caused by the extensive inhibition of other kinases. In view of this, selective CDK5 inhibitors are of great significance not only for elucidating its exact biological functions, but also exploring the possibility of CDK5 inhibitors as a safe and effective therapy. This paper provides a brief overview of the structure and function of CDK5 protein as well as its relationship with diseases. In addition, the structural types and binding modes of CDK5 inhibitors targeting ATP active sites are also highlighted. Finally, we summarize and prospect the strategies to improve the selectivity of CDK5 inhibitors.

Key words: cyclin-dependent kinase 5; biological function; ATP competitive inhibitor; selectivity; drug design

细胞周期蛋白依赖性激酶5 (cyclin-dependent

kinase 5, CDK5) 编码基因位于7q36染色体上, 属于丝氨酸/苏氨酸激酶, 是CDKs家族的非典型成员^[1], 具有独特的功能调节机制。作为一种脯氨酸导向的激酶, CDK5可磷酸化含(S/T)PX(K/H/R)基序的底物蛋白^[2]。虽然它与CDK2具有很高的序列同源性, 但它不是细

收稿日期: 2024-03-13; 修回日期: 2024-05-15.

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (82304273).

*通讯作者 Tel: 86-21-50806600-3405, E-mail: luzhengyu@simm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-0229

胞周期转换的经典介质。在过去的二十年里, CDK5 被发现在神经元迁移、神经突起生长和突触可塑性等方面具有重要作用^[3]。在非神经系统中, CDK5 也被广泛报道参与细胞异常增殖、凋亡、迁移、免疫系统细胞激活、血管生成等生物学过程^[4]。CDK5 的过度活化已被证明涉及多种神经退行性疾病的发生, 并与癌症、糖尿病、炎症等多种疾病相关, 由此 CDK5 成为了一个具有吸引力的药物靶点^[1]。

靶向 ATP 活性位点是目前抑制 CDK5 激酶活性最常用的策略。然而目前进入早期临床试验的 CDK5 抑制剂仍具有泛 CDK 活性, 其临床研究存在许多挑战, 例如疗效有限、不良反应明显和作用机制不明确。在所有 CDK 家族中, CDK2 与 CDK5 的序列同源率达 60%, 且在 ATP 结合口袋处显示出近 93% 的序列相似性, 仅存在两个氨基酸残基的差异 (CDK2 中为 Leu83 和 His84, CDK5 中为 Cys83 和 Asp84)^[5,6]。因此, 小分子抑制剂在 CDK5 和 CDK2 的 ATP 口袋中, 通常具有相似的结合模式和构效关系。除 CDK2 外, 糖原合成酶激酶 3 β (GSK3 β) 也显示出参与活性调节的相似特征结构元件^[7]。然而, 这些激酶间细微的序列差异, 仍然可能导致 ATP 结合位点的内在灵活性不同, 也为 CDK5 抑制剂选择性的提高提供了可能^[8]。

本综述首先对 CDK5 的结构和生物学功能以及其与多种疾病的关系进行介绍, 并对靶向 ATP 活性位点的 CDK5 抑制剂进行结构分类和结合模式讨论, 旨在从药物化学的角度为靶向 ATP 活性位点的 CDK5 小分

子抑制剂的设计提供思路。

1 CDK5 结构及生物学功能

CDK5 包含 292 个氨基酸, 与其他 CDK 尤其是 CDK2 具有高度序列同源性。它具有常见的双叶结构 (图 1): 包括富含 β 折叠的 N 端 (N-lobe) 和以 α 螺旋为主的 C 端 (C-lobe)^[9]。N 端和 C 端通过一段柔性的铰链 (hinge) 连接, ATP 结合口袋便位于这两个结构域界面形成的裂口。ATP 口袋可分为三个主要区域: 前口袋 (front pocket, FP)、腺嘌呤袋 (adenine pocket, AP) 和后口袋 (back pocket, BP)。在 CDK5 中, 门控开关 (gatekeeper) — Phe80 发挥门控作用, 可阻止药物从前端进入后端。

然而, 与依赖于细胞周期蛋白激活的经典 CDKs 不同, CDK5 主要通过其 PSSALRE 螺旋 (activators binding domain) 和 T-loop 中的 DFG 基序在蛋白表面形成立体结构^[10], 被非细胞周期蛋白 p35 或 p39 及各自的截短形式 p25 或 p29 结合形成复合物后激活。并且这一过程不依赖于激活位点 Ser159 的磷酸化。但也有研究表明, CDK5 仍可以被其他细胞周期蛋白活化, 如 cyclin I (CCNI) 和 cyclin I 样 (CCNI2) 蛋白^[11]。此外, CDK5 的激酶活性和底物特异性在一定程度上仍然受磷酸化调节, 如 Thr14 的磷酸化导致 CDK5 的抑制, 而 Tyr15 和 Ser159 的磷酸化导致 CDK5 的激活增加^[12]。

CDK5 是有丝分裂后神经元中的一个重要激酶, 对中枢神经系统的功能和发育具有重要意义^[13], 多种影响神经元迁移、神经元存活、突触可塑性、影响情绪、记

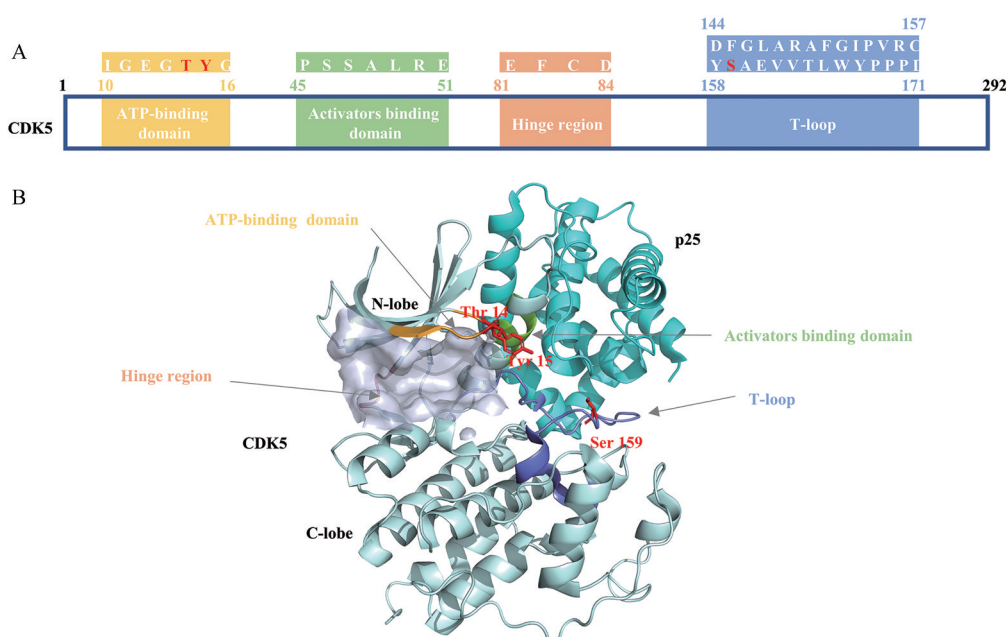


Figure 1 The structure of cyclin-dependent kinase 5 (CDK5). A: Modular domains of human CDK5; B: Schematic diagram of 3D CDK5 structure (PDB 7VDS)

忆和学习的蛋白已被证明是CDK5的底物(表1)^[14-31]。CDK5可通过磷酸化局灶黏附激酶(focal adhesion kinase, FAK)^[14]、双皮层蛋白(doublecortin, DCX)和p27^{kip1}^[15]、踝蛋白(talin)^[16]等调节细胞黏附和细胞迁移,影响大脑皮层神经元正常径向迁移的发育过程。神经调节蛋白受体ErbB2和ErbB3作为CDK5的底物,通过PI3K/Akt激酶信号通路,介导神经元存活^[17]。此外,CDK5介导的B淋巴细胞瘤-2基因(B-cell lymphoma protein 2, Bcl-2)磷酸化也是神经元抗凋亡作用的关键^[18]。但也有相反的研究结果显示,神经元中的DNA损伤通过CDK5磷酸化共济失调毛细血管扩张突变蛋白(ataxia telangiectasia-mutated, ATM),诱导细胞死亡^[19]。CDK5还可磷酸化Wiskott-Aldrich综合征蛋白家族verprolin同源蛋白1(WAVE-1)^[20]、Ephexin-1^[21]、GTPase动力蛋白等^[22],实现对突触的强度和可塑性的调节。盐皮质激素受体(mineralocorticoid receptor, MR)^[23]和糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor, GR)^[24]的转录活性受到CDK5的调控,影响情绪、学习和记忆。除神经系统外,CDK5也是正常淋巴管发育^[25]、血管生成^[26]、肌生成^[27,28]、胰岛素分泌和葡萄糖摄取^[29-31]等过程的调节因子,更多的生理底物仍待进一步发现。

2 CDK5与疾病的发生和进展

CDK5的异常活化已被证明与多种疾病的发生、发展密切相关。在氧化应激条件下,细胞内神经元Ca²⁺

内流,导致钙蛋白酶(calpain)激活,p35被裂解成p25和p10^[32]。p25对泛素介导的降解具有抵抗力,表现出更高的稳定性和更长的半衰期^[32],因此CDK5处于持续过度活化状态(图2)。在神经系统疾病方面,CDK5/p25可通过信号转导和转录激活因子3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)介导的BACE1(编码β分泌酶的基因)的转录调控来增强脑内毒性淀粉样斑块Aβ的产生^[33]。此外,CDK5/p25对Tau蛋白的过度磷酸化,导致细胞内神经原纤维缠结的形成,已被证明与阿尔茨海默病密切相关。CDK5还参与α-突触核蛋白和parkin蛋白的过度磷酸化,从而导致帕金森病中路易小体的产生,导致神经毒性^[34]。在非人灵长类PD模型中,CDK5异常活化可使动力蛋白相关蛋白1(dynamamin-related protein 1, Drp1)的Ser616位磷酸化,从而加速线粒体功能障碍和神经毒性^[35]。在肌萎缩性侧索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)小鼠模型中同样显示p25的积累和CDK5的高活性,以及Tau蛋白和神经丝(NF)的过度磷酸化^[36]。

越来越多的研究也表明CDK5及其激活因子的mRNA或蛋白的异常表达与多种癌症的发生、发展和不良预后有关^[37]。CDK5阴性的肺癌患者具有延长的中位生存期和5年总生存期,因此CDK5被建议作为非小细胞肺癌患者的生物标志物^[38]。在白血病中,CDK5可通过Noxa的磷酸化抑制肿瘤细胞凋亡^[39]。在甲状腺

Table 1 Some CDK5 substrates and biological functions

Biological function	Substrate	Reference
Neuronal migration	FAK Ser ⁷³² , DCX Ser ²⁹⁷ , p27 ^{kip1} Ser ¹⁰ , talin Ser ⁴²⁵	[14-16]
Neuronal survival	ErbB2 Ser ¹¹⁷⁶ , ErbB3 Thr ⁸⁷¹ /Ser ¹¹²⁰ , ATM Ser ⁷⁹⁴ , Bcl-2 Ser ⁷⁰	[17-19]
Synaptic plasticity	WAVE1 Ser ³¹⁰ , ephexin-1 Thr ⁴¹ /Ser ¹³⁹	[20,21]
Emotional changes, memory	GR Ser ²⁰³ /Ser ²¹¹ ; MR Ser ¹²⁸ /Ser ²⁵⁰	[23,24]
Lymphatic vessel development, angiogenesis	Foxc2, Rac1	[25,26]
Myogenesis	Titin, nestin Thr ³¹⁶	[27,28]
Insulin secretion, glucose uptake	β2-Syntrophin Ser ⁷⁵ , phospholipase D (PLD) Ser ¹³⁴ , extended synaptotagmin 1 (E-Syt1) Ser ³¹⁴	[29-31]

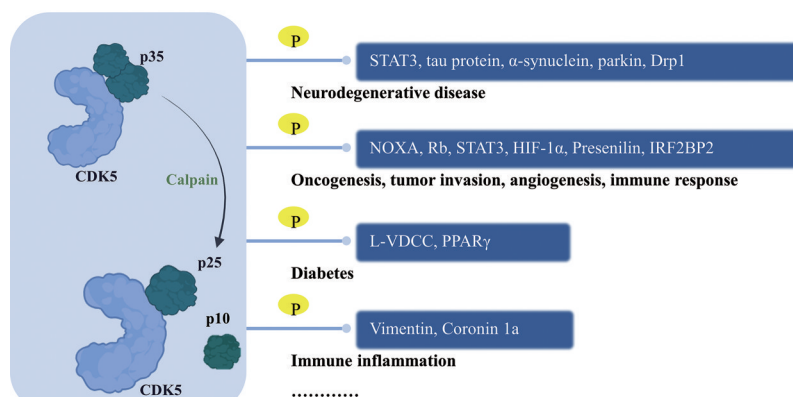


Figure 2 CDK5 pathological functions in human

髓样癌中, CDK5 磷酸化并调节 STAT3 的转录活性, 驱动 G1-S 期的进展和 Rb 磷酸化, 导致细胞增殖增加, 促进肿瘤形成^[40]。此外, CDK5 的表达在结直肠癌、头颈癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、骨髓瘤和膀胱癌中均有显著上调的报道, 表明它在这些肿瘤中的促癌作用^[41]。

CDK5 还是促血管生成的主要调节因子, 通过刺激 Dll4-Notch 信号通路, 并与肿瘤微环境中整合素或缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α) 等协同作用, 导致血管内皮生长因子 (VEGF) 的激活, 启动负责血管生成的信号级联反应。CDK5 还激活早老素 (presenilin), 使得蛋白 Notch1 裂解, 随后激活 Notch 依赖性信号传导以促进血管生成^[42]。抑制 CDK5 的激酶活性从而实现抗血管生成, 已在高度血管化的癌细胞和动物模型中得到证实, 包括黑色素瘤、胶质瘤和肝细胞癌^[42,43]。CDK5 还通过调节 FAK、PP2A、Hippo、Wnt/ β -catenin 等信号通路来促进癌症的发展和扩散^[44]。因此, 通过抑制 CDK5 信号通路来抑制肿瘤转移因子是预防癌症侵袭的一种有吸引力的策略。CDK5 调节免疫检查点程序性细胞死亡配体 1 (PD-L1) 表达的突破性发现, 也为 CDK5 在肿瘤免疫治疗中提供了新的见解。CDK5 沉默导致干扰素调节因子 2 结合蛋白 2 (IRF2BP2) 的磷酸化, 进而增加干扰素调节因子 (IRF2) 的表达, 降低成神经管细胞瘤细胞表面 PD-L1 的表达^[45]。这提示抑制 CDK5 的活性, 可介导 PD-L1 的缺失, 进而激活 CD4⁺ T 细胞促进癌细胞死亡。

阻断 CDK5 功能可解除 L 型电压依赖性钙通道 (L-VDCC) 在 Ser783 位点的抑制性磷酸化, 导致 β 细胞产生钙内流和胰岛素分泌^[46]。另外, Choi 等^[47]研究表明, 在肥胖小鼠中, 细胞因子如 IL-6 或 TNF- α 水平升高, 促进 p35 裂解为 p25, 导致 CDK5 过度活化。这导致脂肪细胞过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ) 在 Ser273 处磷酸化, 参与胰岛素抵抗的发病机制。

CDK5 可以磷酸化 vimentin 的 Ser56 位点, 这种磷酸化在中性粒细胞 GTP 依赖的促炎分子分泌中起重要作用^[48]。在淋巴细胞中, CDK5 在 Thr418 处磷酸化肌动蛋白结合蛋白 coronin 1a, 促进自身免疫性脑脊髓炎模型中肌动蛋白极化和淋巴细胞向趋化因子信号的迁移^[49]。CDK5 的激活还被报道与疼痛信号传导、慢性肾病的发生进展密切相关^[50]。因此, CDK5 成为了上述多种疾病领域内的一个新的和有吸引力的治疗靶点。

3 靶向ATP活性位点的CDK5抑制剂

根据抑制剂-激酶的结合模式 (图 3), ATP 竞争型 CDK5 抑制剂除与 CDK5 铰链区 Cys83 形成特征性氢键外, 一般还包括与前口袋和后口袋相互作用的取代基团, 这两者不仅在活性和理化性质上可能带来优势, 同时也是影响激酶谱选择性的关键部分。

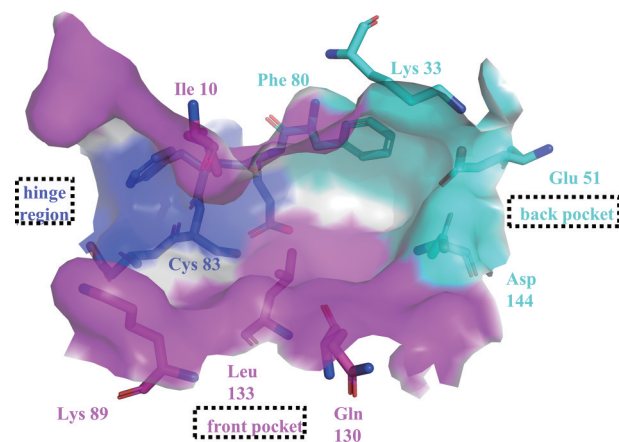


Figure 3 Surface residues of the ATP active sites in CDK5

3.1 嘌呤类及其生物电子等排体 以 2,6,9-三取代嘌呤为结构母核的 olomoucine (1) 和 roscovitine (2) 是最早开发的几个小分子 CDK 抑制剂 (图 4)。Olomoucine 对 CDK5、1、2、9 均表现出相当的抑制活性, 但仅在微摩尔水平。嘌呤 N-9 位的疏水取代基对激酶的结合很重要。其中, 异丙基取代可增大疏水接触, roscovitine 的 CDK 抑制活性显著增加, 但缺乏选择性。Roscovitine 在体内主要经 CYP3A4 和 CYP2B6 将 C-2 侧链上的醇氧化为活性较低的羧酸衍生物, 以及 N 上发生去烷基化, 最终经葡萄糖醛酸化过程清除^[51]。继 roscovitine 之后, 后续 CDK5 抑制剂的主要目的是提高对 CDK 家族的选择性和/或提高整体活性。Oumata 等^[52]在 roscovitine 的苄胺对位用吡啶基取代形成联芳基结构, 得到 (R)-CR8 (3), 抑制 CDK 的效力是 roscovitine 的 2~4 倍, 进一步提高了对 CDK5 的抑制活性, 并在 25 个不同肿瘤细胞系中具有诱导细胞死亡的显著活性^[53]。

晶体结构 (1UNL、3DDP) 显示 (图 5), 2 和 3 的嘌呤环夹在 Ile10 和 Leu133 的侧链之间, 7-位芳香 N 原子及苄基胺与铰链区 Cys83 主链形成二齿氢键, 2-氨基乙醇与 Gln130 的羰基氧及 Asp86 形成氢键, 而乙基则与 Ile10、Val18 和 Phe80 发生疏水相互作用^[54]。CR8 中额外的吡啶环伸向溶剂暴露区, 被包裹在由 Ile10、Phe82 和 Glu8 形成的口袋中。值得注意的是, CR8 的联芳基类似物 (联苯、4-吡啶苯基和 3-吡啶苯基) 的抑制活性明显低于 2-吡啶基苯基化合物 CR8, 这表明化合物的抑制活性可能与最稳定构象的苯基吡啶二面角有关。此外, CR8 近来还被报道具有分子胶性质, 可诱导 CDK12-cyclin K 和 CUL4 接头蛋白 DDB1 之间形成多元复合物, 实现对 cyclin K 的泛素化降解^[55]。DRF53 (4) 在嘌呤母核的 6 位上引入二芳基苯胺同样也是 CDK5 的有效抑制剂, 体外 IC₅₀ 为 0.08 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 还显示出对 CK1 的抑制^[52]。后续基于 CR8, N'gompaza-Diarra

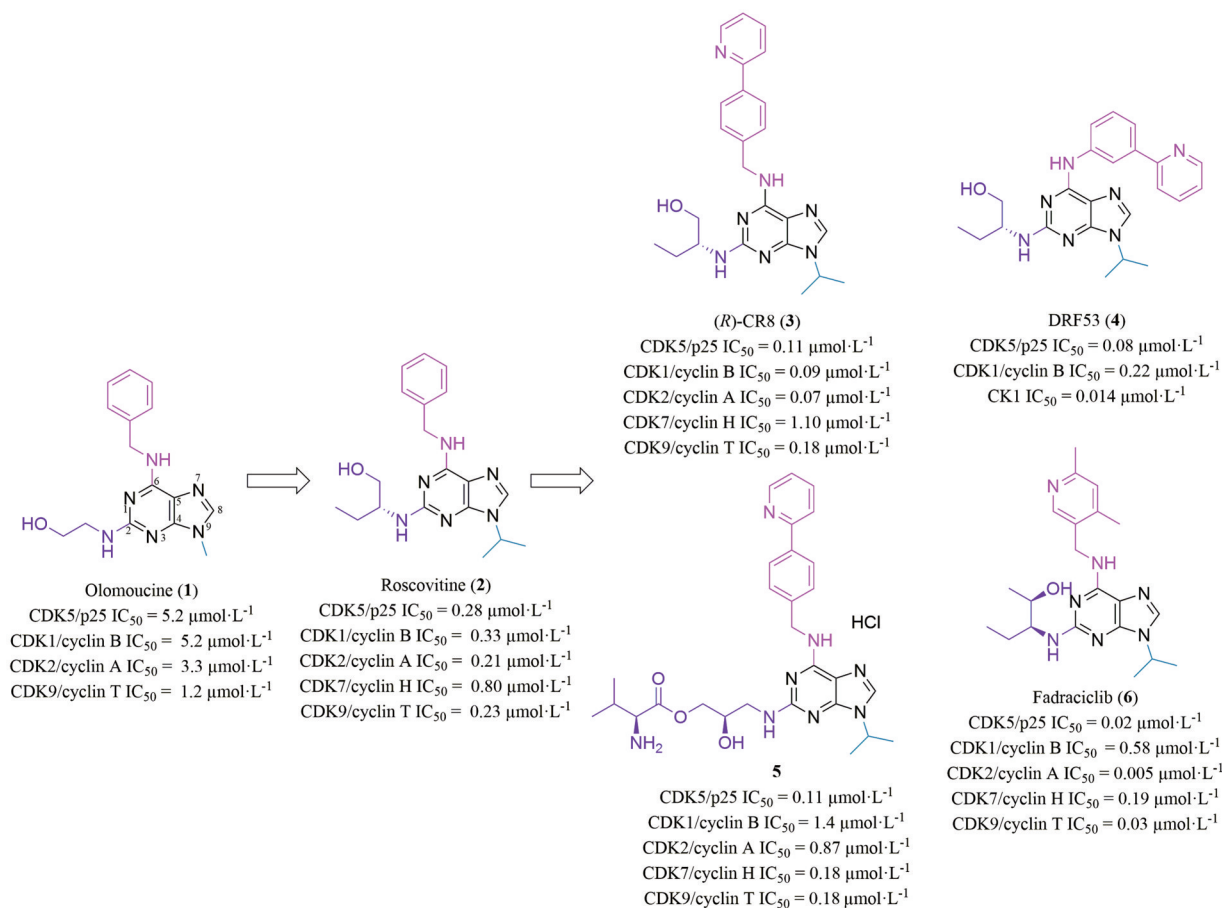


Figure 4 Representative structures of purine compounds 1–6

等^[56]专注于嘌呤骨架C-2位置基团的优化,目的是开发疏水性降低的化合物,从而增加溶解度,提高口服生物利用度。前药缬氨酸酯(5)对CDK5的抑制活性得到保持,同时改善了分子的ADME性质。对roscovitine进一步优化,得到fadraciclib(6),在提高CDK5抑制活

性的同时,对CDK2和CDK9也表现出更高的效力,目前正在开展晚期实体瘤和淋巴瘤患者中的临床I/II期研究(NCT04983810)。

其他嘌呤生物电子等排体,如吡唑并[1,5-*a*]-1,3,5-三嗪(7)^[57]、咪唑并[2,1-*f*]-1,2,4-三嗪(8)^[57]、吡唑并[4,3-*d*]

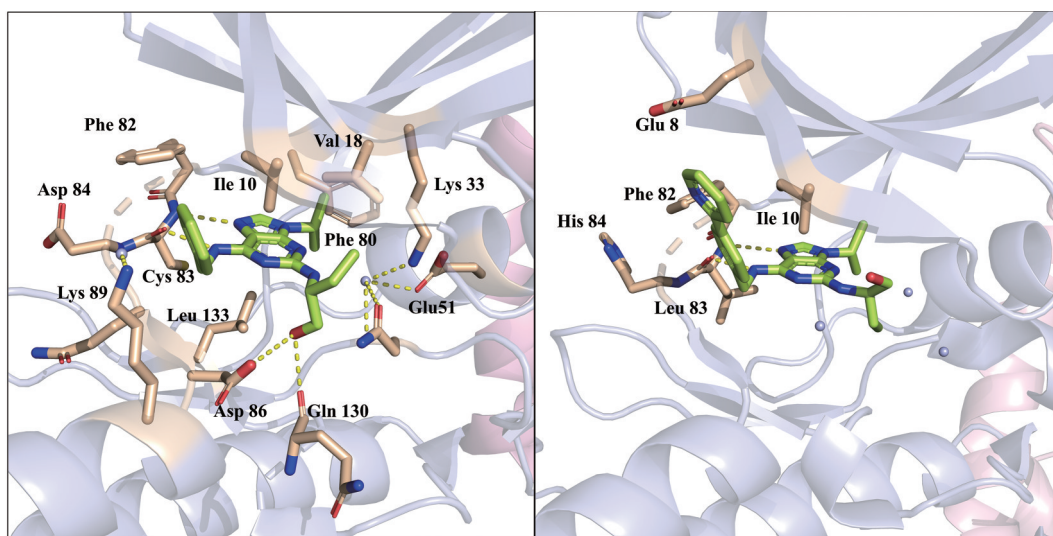


Figure 5 The cocrystal complex of roscovitine with the CDK5 (PDB 1UNL) and the cocrystal complex of (R)-CR8 with the CDK2 (PDB 3DDP)

嘧啶 (**9**, **10**)^[58,59]、吡唑并[1,5-*a*]嘧啶 (**11**)^[60]等也是CDK5抑制剂中被广泛应用的骨架(图6)^[61]。这些结构完美地模仿了嘌呤环的理化性质,同时在体内更稳定。但该类化合物通常仍具有广泛的CDK抑制活性。鉴于roscovitine可通过抑制CDK5来降低内皮细胞的运动,具有抗血管生成的能力^[62],对LGR1406进行了相关活性评价。环己基这样的大体积侧链似乎可以增加抗血管生成的能力,相比roscovitine,LGR1406能更有效地降低HMEC-1内皮细胞增殖、迁移并消除VEGF诱导的血管形成。Dinaciclib (**11**)对CDK5、1、2、9的抑制活性均显著提升($IC_{50} = 1 \sim 4 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$),对CDK4、CDK6和CDK7的活性较低,是目前CDK5研究过程中常用的工具药物。与CDK2的共晶结构(4KD1)显示(图6),dinaciclib保持了对铰链区的氢键作用模式,哌啶环呈椅状构象,2-羟基乙基与保守的Lys33残基以及DFG基序中的Asp145形成氢键网络。吡唑并嘧啶的3-乙基与门控开关Phe80建立疏水和范德华作用。*N*-氧化吡啶环位于前口袋中,部分暴露于溶剂,氧原子与Lys89形成氢键^[63]。Dinaciclib在具有不同遗传背景的不同类型肿瘤细胞中抑制Rb磷酸化,诱导细胞周期阻滞和细胞凋亡,具有显著的抗增殖活性($IC_{50} = 6 \sim 17 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)。尽管药代动力学研究表明,dinaciclib在小鼠体内具有较短的血浆半衰期(0.25 h),但在多种体内异种移植瘤模型中以低于最大耐受剂

量(MTD)的剂量诱导肿瘤消退^[64]。该化合物对CDK家族具有很强的选择性,并且相比此前的CDK抑制剂安全窗更大,因此曾进入多项肿瘤临床试验,但因为存在有效性和耐受性的问题,目前已经全部中止。

上述基于嘌呤及其生物等排体的CDK5抑制剂与ATP结合袋的结合方式基本相似,并且在整个CDK家族中是相当保守的,因此它们远没有达到选择性抑制剂的目标。然而,这类抑制剂的构效关系以及生物学活性研究为后续基于结构的ATP竞争型CDK5抑制剂的设计开发提供了方向。

3.2 氨基嘧啶类及其生物电子等排体 BAY1000394 (**12**)对CDK5显示纳摩尔级的抑制活性,与roscovitine具有相似的手性丙二醇结构,但与CDK2的共晶结构(5IEV)显示,该部分在CDK2中进入活性位点的后口袋中与Lys33和Asp145形成氢键网络。亚砷亚胺作为砷和磺酰胺的电子等排体,与Asp86骨架NH形成氢键,在增强结合力的同时,提高水溶性和口服吸收,并降低了该分子对碳酸酐酶的脱靶毒性^[65]。BAY1000394有效抑制多种人类和小鼠肿瘤细胞系的增殖,与其泛CDK抑制活性一致,其能够在多个检查点(G1、S、G2、M)阻止细胞周期^[66]。但同样由于其选择性差,临床上不良反应较大,临床试验已终止^[67]。Khair等^[68]利用Schrödinger组件开展基于CDK5-roscovitine共晶结构的虚拟筛选,并从110万个药物样分子的ChemBridge

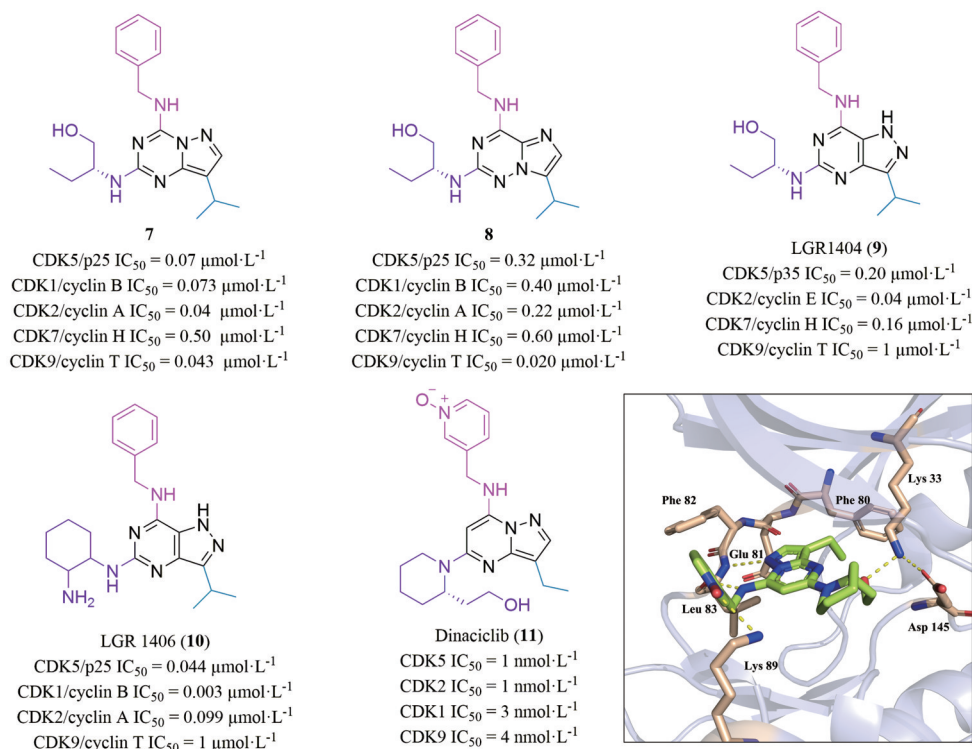


Figure 6 Representative structures of compounds 7–11 based on purine bioisosteres and the cocrystal complex of dinaciclib with the CDK2 (PDB 4KD1)

文库中鉴定得到一系列不同分子骨架的苗头化合物。对选定的 hit 进行药物化学结构优化后得到 CDK5 抑制活性最强的 5,6,7,8-四氢喹啉衍生物 **13** ($K_i = 0.16 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) (图 7)。**13** 对 CDK2/cyclin A 没有选择性, 但对 CDK2/cyclin E、CDK1/cyclin B、CDK7/cyclin H 和 CDK9/cyclin T 具有 5 倍以上选择性。间位取代的磺酰胺基同样处于前口袋区域, 与 CDK5 中 Asp84 骨架羰基形成氢键。Western blot 分析证实 **13** 在 MOLM-13 和 MV4-11 AML 细胞中靶向 CDK5, 诱导细胞凋亡, 表现出显著的抗增殖活性, 有望开发成为新型抗 AML 药物^[68]。类似地, AZD5438 (**14**) 对 CDK 家族表现出广泛的抑制活性, 在体外抑制特异性底物的磷酸化, 对人肺、结直肠、乳腺、前列腺和血液肿瘤等多种癌细胞系具有广谱抗增殖活性 ($\text{IC}_{50} = 0.2 \sim 1.7 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。但同样由于耐受性不佳, AZD5438 在 II 期临床中被终止^[69]。吡啶并喹啉化合物 **15** 在体外对 CDK5、1、2 均有纳摩尔级的抑制活性, 有效抑制 A2780 人卵巢癌细胞的增殖。结合模式与此前结构相似, 但与保守的 Lys33 形成的氢键是由酰胺的羰基氧介导^[70]。

3.3 氨基噻唑类及其生物电子等排体 氨基噻唑类及其生物电子等排体同样以芳胺 N-H 和杂环 N 原子分别与 Cys83 主链的羰基和 N-H 之间形成关键氢键作用。化合物 **16** 虽然对 CDK2 表现出超过 100 倍的选择

性, 但其活性只有亚微摩尔水平^[71] (图 8)。SAR 探索过程中发现, 对噻唑环 5-位进行环丁基修饰, 可提高 CDK5 抑制活性。而噻唑 2 位的适当修饰可同时增强对 CDK5 的抑制活性和选择性, 其中化合物 **17** 对 CDK5/p25 的 IC_{50} 为 $5 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 同时对 CDK2 的选择性超过了 10 倍^[72]。这些类似物与 CDK5 的 ATP 结合域的建模表明, 氨基噻唑 5-位取代基与 Phe80 发生疏水相互作用。脲连接末端芳基伸向前口袋溶剂暴露区, **17** 中异噻唑氮可与 CDK5 裂隙前口袋中的 Lys89 形成氢键相互作用, 虽然该残基在 CDK2 中也是保守的, 但空间距离似乎更远, 不利于和抑制剂形成相互作用。因此这种结合位点附近保守残基构象的细微差异可能是化合物对 CDK5 的活性和选择性更强的重要原因。Rzasa 等^[73] 从无环状脲结构的先导化合物中可能存在分子内氢键的设想出发, 利用构象约束原理, 采用合环策略得到二氢喹啉酮化合物 **18**, 其 CDK5 抑制活性相比先导得到了 12 倍的提升, IC_{50} 为 $16 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 同时对 CDK2 产生较低的选择性。与 CDK5 晶体结构的对接结果显示, 该类化合物不同于前述氨基噻唑类结合模式, 而是通过环脲基团的 -NH 和羰基氧参与铰链区 Cys83 的氢键网络中。此外, 噻唑吡啶延伸穿过门控开关附近疏水区, 与 Lys33-Asp145 盐桥形成氢键, 这对 CDK5 的抑制活性非常重要。

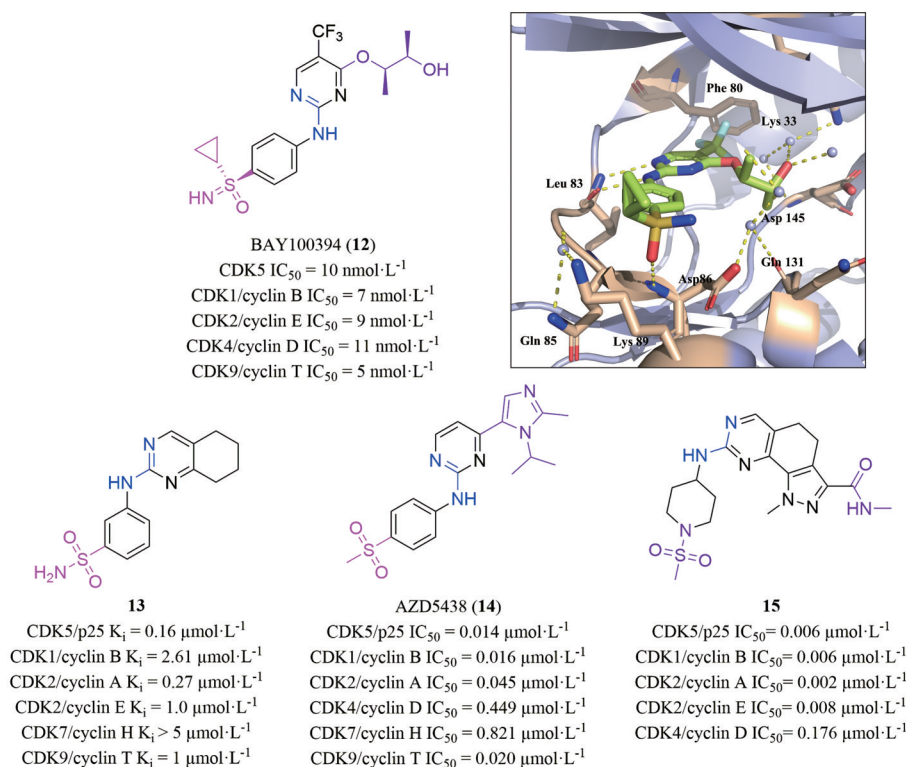


Figure 7 Representative structures of compounds **12–15** based on amino-pyrimidines and its bioisosteres as well as the cocrystal complex of BAY100394 with the CDK2 (PDB 5IEV)

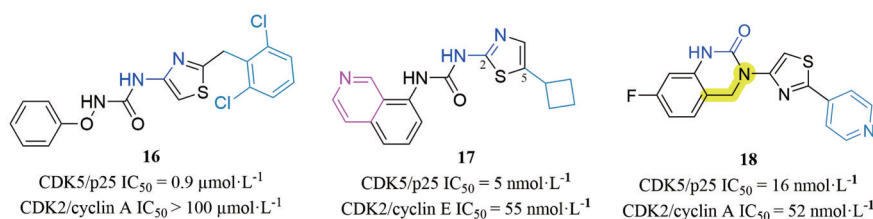


Figure 8 Representative structures of aminothiazole compounds **16–18**

基于CDK5抑制剂对Tau蛋白的Ser396和Ser404的磷酸化抑制,高通量筛选获得了4-氨基噻唑化合物**19**(图9)。与CDK5的共晶结构(3O0G)显示,母核结构同时与Glu81和Cys83形成三个氢键,硝基与Lys33侧链氨基形成第四个氢键,但**19**对CDK5、CDK1和GSK3 β 的抑制活性较弱,仅在微摩尔水平^[74]。类似的4-氨基噻唑化合物**20**是从10万个化合物的商业库中筛选优化得到。相比化合物**19**,**20**在苯胺对位用磺酰胺取代,同时将硝基从间位移动到邻位,大幅提高了对CDK5和CDK2的抑制活性, IC_{50} 分别为1.5和1.8 nmol·L⁻¹。对339个激酶的分析显示**20**对CDK家族具有高选择性,同时对CDK5、2的选择性优于CDK9、1、4和6。与CDK2的共晶结构(3QXP)显示,磺酰胺基团可与前口袋处的Asp86和Lys89建立氢键网络,此外,2-硝基苯基对疏水性的Phe80和Lys33烷基侧链形成不寻常的接近和取向,并表明通过范德华力或 π - π 堆积形成非经典的相互作用,共同作用的结果使得**20**的酶抑制活性显著提升。**20**以浓度依赖性方式显著抑制MDA-MB-468乳腺癌细胞在内的13株肿瘤细胞的增殖, IC_{50}

值在0.27~6.9 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 之间,这与抑制Rb磷酸化和细胞凋亡的发生有关^[75]。

由于2-氨基噻唑具有潜在的代谢介导的毒性,Helal等^[76]设计合成了一类4-氨基咪唑杂环化合物,这类顺式取代环丁基-4-氨基咪唑结构已被确定为有效的CDK5抑制剂。**21**对CDK5的 IC_{50} 为17 nmol·L⁻¹,且对CDK2有18倍的选择性(图10)。其保留了与CDK5较链区域Cys83的氢键作用,同时吡啶酰胺的羰基可接受来自Lys33的氢键,并且该部分在一定程度上改善了该类化合物的透膜性,在保持酶抑制活性的同时提高了细胞活性。但在FV/B小鼠和MDR1A/1B敲除小鼠中证实**21**为P-gp底物,意味着**21**可能不能透过血脑屏障,并且在神经疾病中难以起效^[76]。关于该化合物优先抑制CDK5的一种假设是,在Lys33和Asp144(CDK2中为Asp145)这个灵活的ATP/底物结合区域,两种激酶之间存在细微的氨基酸残基定位差异可被化合物利用^[77]。通过骨架跃迁,进一步获得氨基吡啉母核化合物**22**,具有中等的CDK5抑制活性。对接结果显示三个氮原子与较链区的Glu81和Cys83形成氢键

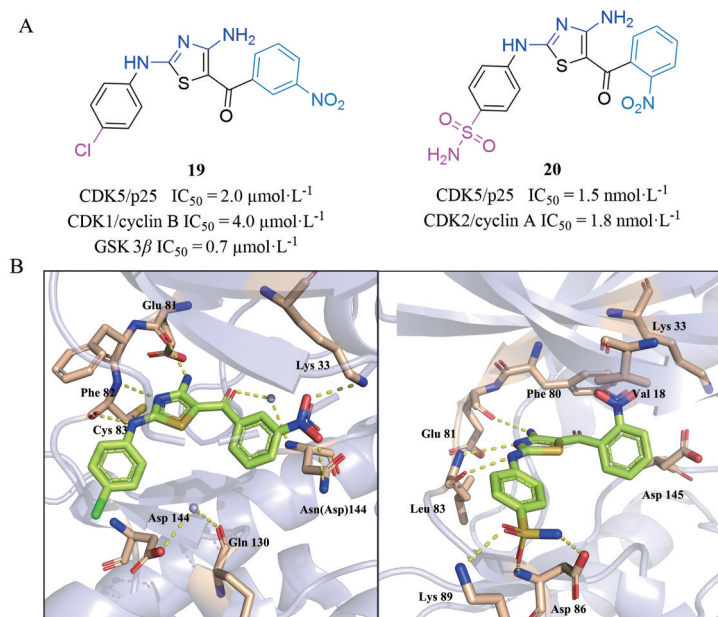


Figure 9 Representative structures of diaminothiazole compounds and the cocrystal complexes; A: The cocrystal complex of **19** with the CDK5 (PDB 3O0G); B: The cocrystal complex of **20** with the CDK2 (PDB 3QXP)

相互作用, 环丁基同样占据狭窄的疏水口袋, 其中的两个甲氧基与前口袋区 Lys89 形成双齿氢键。在小鼠模型中, **22** 能透过血脑屏障进入大脑, 调节抑郁小鼠的神经学行为^[78]。由于在大脑中 CDK2 的水平非常低, 因此脑内活性的主要来源是 CDK5 抑制活性^[79]。通过基于片段的药物设计, Astex 的研发人员^[80,81]发现了另一氨基吡唑衍生物 AT7519 (**23**)。除了 CDK5 和 2 (IC_{50} 分别为 13 和 47 $nmol \cdot L^{-1}$), **23** 还能抑制 CDK1 和 4, 对其他激酶的抑制活性较低。**23** 已被证明对多种人类癌细胞系有效, 目前用于晚期实体瘤 I 期试验中 (NCT02503709)。文献^[82]报道的 CDK1/2“选择性”抑制剂 **24**, 后续研究发现也对 CDK5 同样具有很强的抑制活性。

PHA-793887 (**25**) 在吡咯并吡唑母核上构建了偕二甲基取代, 被证明是 CDK5 和 CDK2 的强抑制剂^[83], 对 CDK 家族其他激酶也有中等强度的抑制活性 (图 10)。另外在所有筛选的其他激酶中, 只有 GSK3 β 被 **25** 抑制。与 CDK2 的共晶结构 (2WPA) 显示, 吡咯并吡唑环占据 ATP 口袋的腺嘌呤区, 通过三个氢键与铰链区结合, 而异丁基则指向前口袋的溶剂可及区。6-位偕二甲基占据了由 Ala31、Val64、Phe80 和 Ala144 形成的小疏水区。羰基和哌啶的氮原子分别位于 Lys33 和 Asp145 侧链的氢键范围内, 并且 *N*-甲基哌啶改善了溶解度。化合物 **25** 在体外多种肿瘤细胞系中显示出有效的抗增殖活性 ($IC_{50} = 0.088 \sim 3.444 \mu mol \cdot L^{-1}$), 并

且在人卵巢 A2780、结肠 HCT-116 和胰腺 BX-PC3 癌异种移植模型中显示出良好的疗效。但 **25** 的 Caco-2 细胞通透性差, 在小鼠中口服生物利用度低 ($F < 1\%$), 需静脉给药。**25** 曾进入临床用于治疗实体瘤, 但目前已经中止。

3.4 1,6-萘啶类 针对选择性 CDK5 抑制剂的开发经常存在“活性”和“选择性”之间的矛盾。部分化合物对 CDK5 表现强抑制活性, 但选择性不高; 相反, 一些化合物对其他 CDKs 家族选择性能达到几十甚至几百倍, 但活性仅在亚微摩尔级别。GFB-12811 (**30**) 是近年来报道的活性和选择性均具有表现优异的 CDK5 抑制剂 (图 11)^[84]。先导化合物 **26** 是活性较强的 CDK5 抑制剂 ($IC_{50} = 16 \text{ nmol} \cdot L^{-1}$), 且在体外对 CDK2 具有 30 倍的选择性。7-氨基萘啶芳香母核是重要的药效团, 和铰链区残基 Cys83 主链之间形成关键的氢键相互作用, 是亲和力的主要来源。醚键与 CDK5 后口袋中 Lys33 和水形成氢键网络体系。Daniels 等^[84]认为可以利用该区域的氨基酸残基灵活性差异, 来提高抑制剂在 CDK 家族成员间的选择性。叔醇 **27** 的活性和选择性明显提高 (CDK5 $IC_{50} = 1 \text{ nmol} \cdot L^{-1}$, 比 CDK2 强 65 倍), 而相应的对映异构体没有活性。随后, 研究人员考察前口袋部分, 以进一步优化对 CDK2 的选择性。左侧苯胺的间位和对位取代基这两个部分都是高选择性化合物所必需的, 化合物 **28** 尽管对 CDK5 的抑制活性略有下降, 但是对包括 CDK2 在内的多个 CDK 选择性大幅提

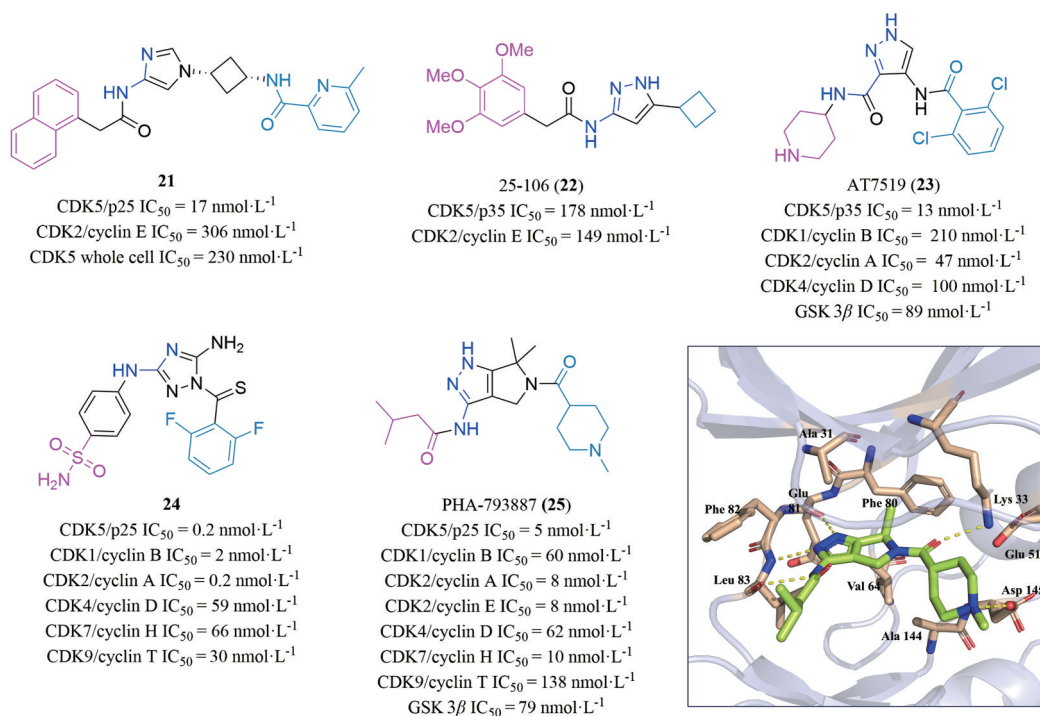


Figure 10 Representative structures of compounds **21**–**25** based on aminothiazole bioisosteres and the cocrystal complex of PHA-793887 with the CDK2 (PDB 2WPA)

高。晶体结构 (7VDS) 表明, **28** 参与了 Lys33-Glu51-水的氢键网络, *N*-甲基吡啶与 Asp144 形成盐桥。为找到一个对所有 CDK 家族成员均具有合适选择性的化合物, 单一激酶的选择性比值不能正确反映和确定具有最广泛选择性的化合物。因此引入了基尼系数 (Gini coefficient) 作为选择性指标^[85], 基尼系数的增加代表总体选择性的增益。随后基于基尼系数继续进行前口袋的探索, 三氟甲基取代吡啶的 **30** 整体上具有优异的活性和选择性, 基尼系数最高, 并在另外 54 个激酶的测试中没有显著抑制活性。NanoBRET 研究证实了 **30** 在细胞内可有效抑制靶标激酶的活化。尽管具有尚可的药代动力学性质, 但是可惜的是该类化合物缺乏后续相应的生物学模型评价。

3.5 其他结构及天然产物来源CDK5抑制剂 Valmerin 家族是一类四氢吡啶异吡啶酮骨架化合物, **31** 是 CDK5/GSK3 β 的双重抑制剂, CDK5 IC₅₀ 为 23 nmol·L⁻¹ (图 12)^[86]。抑制 GSK3 β 可阻断人骨肉瘤细胞增殖并诱导细胞凋亡, 内皮细胞中 CDK5 的抑制可通过促进非生产性血管生成来降低肿瘤生长。**31** 在肝癌细胞系 Huh7、乳腺癌细胞系 MDA-MB-231、结肠癌细胞系 HCT-116、前列腺细胞系 PC3 和肺癌细胞系 NCI-H727 中表现出良好的抗增殖活性^[87]。对接模型显示, 脲连接子与铰链区 Cys83 形成氢键, 并与自身吡啶环形成分子内“假环”。异吡啶酮骨架深入后口袋, 羰基与 Lys33 形成氢键作用。但该类化合物平面性很强, 有可能限制其溶解度。CDK2 抑制剂 GW8510 (**32**) 在再

发现过程中, 被证实对 CDK5 也有很强的抑制活性 (IC₅₀ = 7 nmol·L⁻¹), 除常规的氢键作用, 磺酰胺基团上的吡啶取代基暴露于溶剂暴露区^[82]。Aloisine-A (**33**) 是一种 6-苯基-5*H*-吡咯[2,3-*b*]吡嗪类 CDK 抑制剂骨架。对 26 个激酶的选择性研究表明, **33** 对 CDK5、CDK2、CDK1 和 GSK3 β 具有高度选择性^[88]。

化合物 **34** 通过 HTS 筛选被发现是一种具有中等抑制活性的 CDK5 抑制剂 (图 13)。**34** 与 CDK5 的晶体结构 (4AU8) 显示, 苯并噻唑环上的氮原子通过 1 个水分子与铰链区 Glu81 和 Cys83 主链之间形成氢键作用。磺胺通过氢键与 Asp86 和 Ile10 相互作用, 苯并噻唑环与 Phe80 形成范德华作用。这种通过水分子与铰链区相互作用的模式在其他 ATP 竞争型 CDK5 抑制剂中没有被发现^[89]。

Flavopiridol (**35**) 是一种半合成黄酮衍生物 (图 14), 通过与 ATP 口袋相互作用抑制 CDK5 的活性^[90], 同时可抑制其他 CDKs, 阻止肿瘤细胞增殖并促进凋亡过程^[64]。**35** 在多种实体瘤和肉瘤以及白血病、淋巴瘤和多发性骨髓瘤中显示出抗肿瘤活性, 但由于出现明显的腹泻、乏力、中性粒细胞减少等临床不良反应以及肿瘤溶解综合征导致相关临床试验被提前终止^[91]。Lamellarins 是一类从海洋无脊椎动物中分离的具有生物活性的吡咯生物碱。Yoshida 等^[92] 在 lamellarin N 的全合成过程中, 发现 (*aR*)-lamellarin N (**36**) 对包含 CDK5 在内的多种蛋白激酶表现出抑制作用。Hymenialdisine (**37**) 是从海绵中分离得到的含吡咯并七元内酯

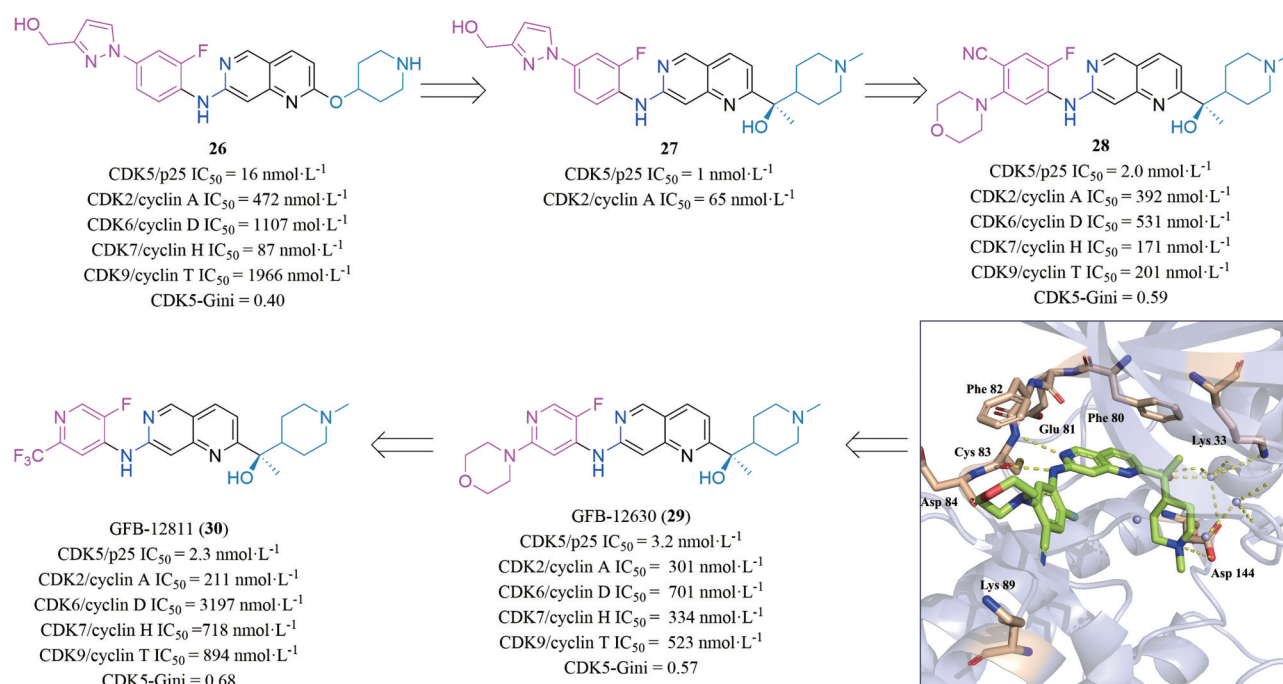


Figure 11 The optimization process from compound **26** to GFB-12811(**30**) and the cocrystal complex of **28** with the CDK5 (PDB 7VDS)

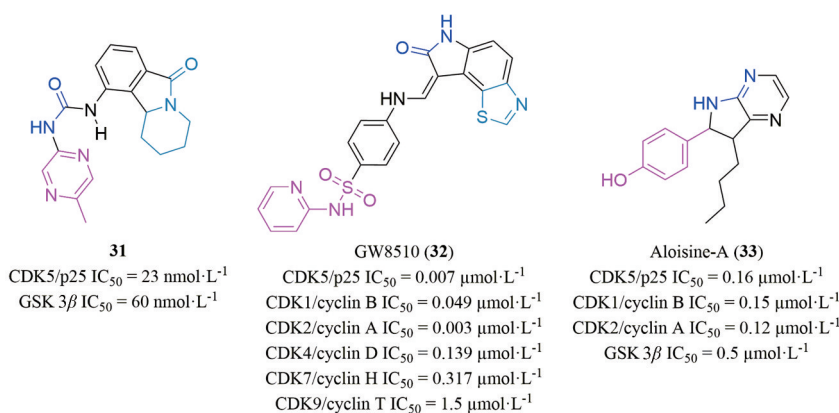


Figure 12 Other representative structures of compounds 31–33

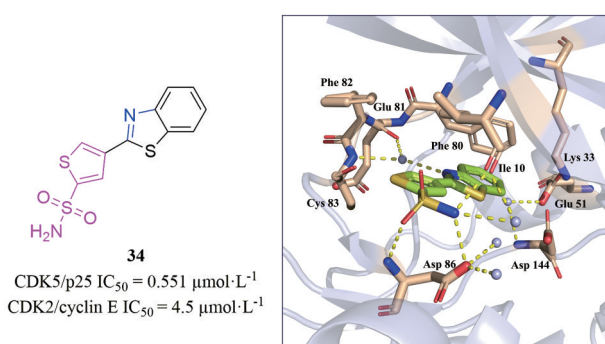


Figure 13 The structure of compound 34 and the co-crystal complex of 34 with the CDK5 (PDB 4AU8)

胺结构的生物碱^[93], 对 CDK5 的 IC_{50} 为 $37 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 具有较强抑制活性。可能的结合模式为吡咯基和氮草酮骨架与 Glu81 和 Cys83 之间形成三齿氢键。另外, 咪唑-4-酮部分和 Asp144 或 Gln130 之间形成氢键相互作用。Indirubin (靛玉红) 是一种双吲哚类化合物, 是抗白血病药物当归龙荟丸的活性成分^[54]。单脲衍生物 38 显著抑制 CDK5 和 GSK3 β 的活性, 并通过抑制 A β 诱导的 SH-SY5Y 细胞中的 Tau 蛋白磷酸化, 延缓 AD 小鼠模型中的动物神经元丢失, 具有良好的神经保护作用^[94]。

由于 CDK5 和 CDK2 的 ATP 结合口袋具有高度相

似性, 因此上述部分 CDK5 抑制剂的结合模式是通过化合物与 CDK2 的共晶结构信息推演。将部分目前已知的 CDK5 抑制剂与 CDK5 的共晶结构进行叠加可知, 这些化合物的一个共同特征是平面取代的杂环系统与 ATP 结合腔高度互补 (图 15), 模拟 ATP 的腺嘌呤骨架, 并且通过 2-氨基吡啶结构片段或其他生物电子等排体与 CDK5 铰链区 Cys83 主链形成双齿氢键, 在部分抑制剂中还会额外形成一个氢键相互作用 (例如前述的 19 和 20)。该区域内的小分子-蛋白相互作用, 也是抑制剂结合的基础。由于较大位阻的门控开关残基 Phe80 的存在, 邻近的疏水区域通常只能容纳小体积的链状或环状烷基片段。在后口袋区域, 抑制剂通常与 Lys33/Glu51 形成直接或由水分子介导的氢键网络。前口袋区主要处于溶剂暴露区附近, 存在一些特征性的极性氨基酸残基, 包括 Asp86、Lys89、Gln130 和 Asp144 等。CDK5 抑制剂通过不同官能团的修饰, 与其中的一个或多个形成有利的氢键或盐桥相互作用, 增强与 CDK5 的结合, 从而提高酶抑制活性。

4 总结与展望

基于 CDK5 的过度活化已经被发现在包括阿尔茨海默症、帕金森症和肌萎缩侧索硬化症等多种神经退

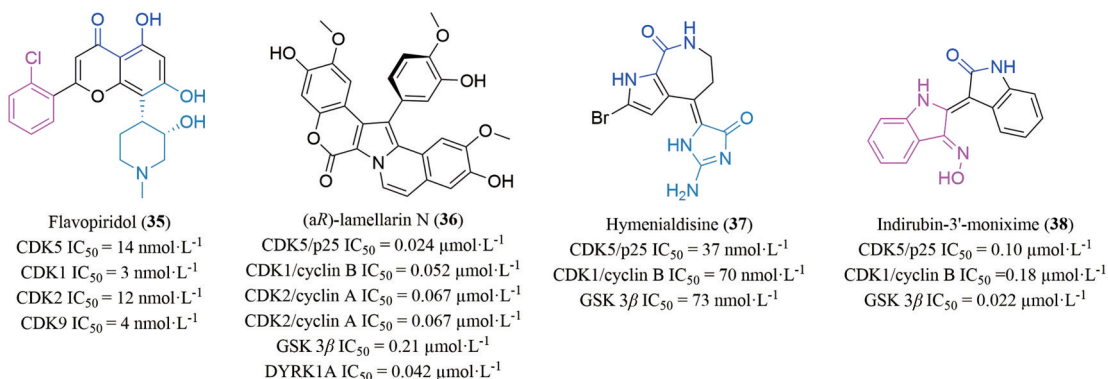


Figure 14 Representative structures of compounds 35–38 from natural products

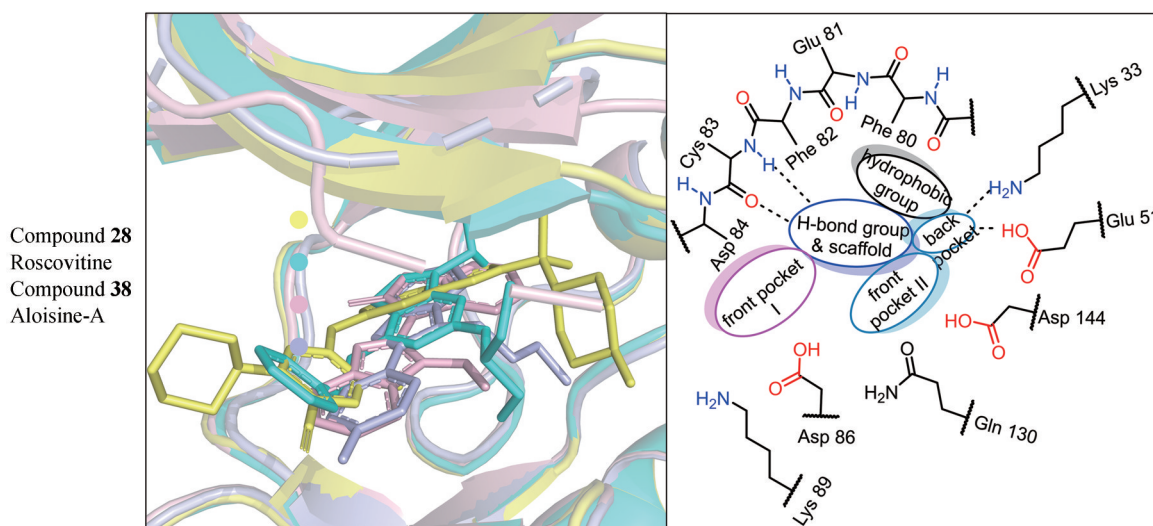


Figure 15 The cocrystal complex of **28**, roscovitine, **38** and alosine-A with the CDK5 (PDB 7VDS, 1UNL, 1UNH, 1UNG) and the pharmacophore elements for CDK5 inhibitors

行性疾病,以及肿瘤、糖尿病、炎症等非神经系统疾病中具有很强的关联性。CDK5成为了一个重要的药物靶点,许多小分子抑制剂已被开发出来。由于绝大部分抑制剂缺乏对CDK5的选择性,因此实际上对这些抑制剂的作用机制缺乏清晰的认识,例如**35**与细胞周期抑制、转录抑制、凋亡、自噬和内质网应激等多种细胞效应相关。尚不清楚哪些CDK在体内实际上被抑制,也不清楚CDK5抑制活性对这些小分子化合物的生物活性的贡献。虽然也有观点认为,广谱而非靶向的CDK抑制更有可能提供治疗益处,但不断的例子表明,泛抑制剂往往面临疗效有限和脱靶毒性大的问题。例如**14**由于在II期研究中缺乏耐受性以及存在人群间存在高变异性而中断。因此,目前在临床研究中仍缺乏有效安全的选择性CDK5靶向抑制剂。

CDK2与CDK5具有高度的同源性,在ATP活性位点仅有两个氨基酸的差异,并且这些氨基酸侧链并不指向ATP结合口袋,从而降低了它们影响底物选择性结合的能力,这也是选择性CDK5抑制剂设计的难点所在。由于CDK2在调节细胞周期中的重要作用,无差别抑制CDK2或者其他CDK家族成员(CDK1、CDK4、CDK9等)可能会导致细胞毒性作用和较差的耐受性,包括腹泻、骨髓抑制、贫血和恶心等不良反应。因此,尤其是在非肿瘤治疗领域,选择性CDK5抑制剂的开发格外重要。

为了增加小分子对CDK5的特异性靶向,一些CDK5功能抑制的替代策略也被探索。由于异常的CDK5活性通常是由活化因子p25积累引起,因此靶向干扰CDK5和p25之间相互作用的蛋白质-蛋白质相

互作用(PPI)抑制剂可能是一种很有前途的策略^[95]。CDK5抑制肽(CIP)源自p35的肽序列154~279 aa,对CDK5/p25具有特异性抑制活性,并可抑制CDK5/p25诱导的Tau蛋白异常磷酸化。从p25的 $\alpha 5$ 螺旋中衍生的一个较小的24个氨基酸(245~277 aa)的衍生肽p5被进一步发现具有更强的活性,可抑制经 $\alpha\beta$ 蛋白处理后神经元的CDK5异常活化、Tau蛋白磷酸化和神经元变性死亡过程^[96]。进一步改良,获得了可穿透血脑屏障的p5,称为TP5,在MPTP/MPP⁺治疗的PD小鼠模型中证明了该肽能够消除多巴胺能神经元的死亡^[97]。2023年麻省理工报道了一种基于T环中12个氨基酸序列(148ARAFGIPVRCYS159)的CDK5i,特异性干扰CDK5/p25复合物并改善CDK5过度活跃的细胞和小鼠模型中的神经退行性表型^[98]。然而由于多肽的药稳定性低,体内半衰期短,需要通过纳米递送系统或细胞穿透肽修饰等手段来绕过这些限制。小分子如苯并咪唑化合物L3^[99]、他莫昔芬^[100]、CPD1^[101]、NSC88915^[102]也可通过破坏CDK5/p25异二聚体的形成,以剂量依赖性方式有效抑制CDK5/p25活性^[102]。考虑到PPI的界面很少有凹槽或口袋,因此上述小分子PPI抑制剂活性都较弱,该类分子尚未有进入临床。

近年来,PROTAC被成功开发应用于核受体、RNA、表观遗传蛋白以及激酶等的降解,极大地拓宽了靶点和临床应用范围。CDK5-PROTAC-TMX-2172三元复合物的形成,可降低细胞内CDK5蛋白水平,同时为选择性CDK5抑制剂提供了新的策略。由于没有选择性CDK5抑制剂可选作激酶靶向弹头,TMX-2172在细胞水平上仍然可同时降解CDK5和CDK2,但对

其他 CDK 家族蛋白水平没有影响^[103]。

事实上, CDK5 的生化 and 结构研究对其分子调控机制和新型抑制剂设计提供了宝贵的信息。靶向 ATP 活性位点的选择性 CDK5 抑制剂的结构特征和结合模式已经在上文进行了较为详细的阐述 (图 15)。通过基于结构的药物设计所开发的新型靶向 ATP 活性位点的 CDK5 抑制剂, 也取得了一定的进展。例如 GFB-12811 能在纳摩尔水平有效抑制 CDK5 的活性, 并且对其他 CDK 激酶间有超过 100 倍的选择性, 有望治疗 CDK5 过度活化引起的相关疾病, 并减少不良反应。这表明在充分探索 ATP 结合腔体积和氨基酸残基可塑性上的差异等因素的前提下, 有机会实现高选择性和高活性 CDK5 抑制剂的开发。

除上述策略外, 另一种提高 CDK5 抑制剂选择性的策略是利用其非活性构象 (DFG-out 构象) 来开发 II 型抑制剂。有研究表明, 当 CDKs 处于非活化状态时, 抑制剂能更有效地区分 CDKs^[104]。在这种情况下, 抑制剂还可能结合到除 ATP 活性位点以外的变构位点, 进一步提高 CDK5 选择性。然而, 具有 DFG-out 构象的 CDK5 的结构尚未确定。因此需要进一步开发虚拟筛选模型, 以便设计这些 II 型抑制剂。

CDK5 最初被认为是一种调节神经元功能的激酶, 但在过去的二十年中, 已经提出了 CDK5 的几种非神经元功能。然而这些结论中的许多都是基于泛 CDK 抑制剂或使用基因手段所得, siRNA 和 shRNA 同样面临一些脱靶和非生理效应。因此, 不管是从药物治疗角度还是 CDK5 的生物学功能研究角度, 寻找具有最佳效力和选择性的 CDK5 抑制剂仍将继续。

作者贡献: 王丽惠负责综述的文献调研与撰写; 陆征宇负责论文的选题与修改; 杨玉社负责论文的指导。

利益冲突: 所有作者均声明没有任何利益冲突。

References

- [1] Pao PC, Tsai LH. Three decades of CDK5 [J]. *J Biomed Sci*, 2021, 28: 79-95.
- [2] Bórquez DA, Olmos C, Alvarez S, et al. Bioinformatic survey for new physiological substrates of cyclin-dependent kinase 5 [J]. *Genomics*, 2013, 101: 221-228.
- [3] Allnutt AB, Waters AK, Kesari S, et al. Physiological and pathological roles of CDK5: potential directions for therapeutic targeting in neurodegenerative disease [J]. *ACS Chem Neurosci*, 2020, 11: 1218-1230.
- [4] Contreras-Vallejos E, Utreras E, Gonzalez-Billault C. Going out of the brain: non-nervous system physiological and pathological functions of CDK5 [J]. *Cell Signal*, 2012, 24: 44-52.
- [5] Zhang B, Tan VBC, Lim KM, et al. The activation and inhibition of cyclin-dependent kinase-5 by phosphorylation [J]. *Biochemistry*, 2007, 46: 10841-10851.
- [6] Zhang B, Tan VBC, Lim KM, et al. Study of the inhibition of cyclin-dependent kinases with roscovitine and indirubin-3'-oxime from molecular dynamics simulations [J]. *J Mol Model*, 2007, 13: 79-89.
- [7] Chow HM, Guo D, Zhou JC, et al. CDK5 activator protein p25 preferentially binds and activates GSK3 β [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111: E4887-E4895.
- [8] Mazanetz MP, Laughton CA, Fischer PM. Investigation of the flexibility of protein kinases implicated in the pathology of Alzheimer's disease [J]. *Molecules*, 2014, 19: 9134-9159.
- [9] Tang WT, Lin CC, Yu QW, et al. Novel medicinal chemistry strategies targeting CDK5 for drug discovery [J]. *J Med Chem*, 2023, 66: 7140-7161.
- [10] Tarricone C, Dhavan R, Peng JM, et al. Structure and regulation of the CDK5-p25^{neck5a} complex [J]. *Mol Cell*, 2001, 8: 657-669.
- [11] Roufayel R, Murshid N. CDK5: key regulator of apoptosis and cell survival [J]. *Biomedicines*, 2019, 7: 88-101.
- [12] Do PA, Lee CH. The role of CDK5 in tumours and tumour microenvironments [J]. *Cancers*, 2021, 13: 101-127.
- [13] Ao C, Li C, Chen J, et al. The role of CDK5 in neurological disorders [J]. *Front Cell Neurosci*, 2022, 16: 414.
- [14] Xie Z, Sanada K, Samuels BA, et al. Serine 732 phosphorylation of FAK by CDK5 is important for microtubule organization, nuclear movement, and neuronal migration [J]. *Cell*, 2003, 114: 469-482.
- [15] Nishimura YV, Shikanai M, Hoshino M, et al. CDK5 and its substrates, Dcx and p27^{kip1}, regulate cytoplasmic dilation formation and nuclear elongation in migrating neurons [J]. *Development*, 2014, 141: 3540-3550.
- [16] Huang C, Rajfur Z, Yousefi N, et al. Talin phosphorylation by CDK5 regulates Smurf1-mediated talin head ubiquitylation and cell migration [J]. *Nat Cell Biol*, 2009, 11: 624-630.
- [17] Li BS, Ma W, Jaffe H, et al. Cyclin-dependent kinase-5 is involved in neuregulin-dependent activation of phosphatidylinositol 3-kinase and Akt activity mediating neuronal survival [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278: 35702-35709.
- [18] Zeldin HC, Ke G, Nancy YI. Cyclin-dependent kinase 5 supports neuronal survival through phosphorylation of Bcl-2 [J]. *J Neurosci*, 2008, 28: 4872-4877.
- [19] Tian B, Yang Q, Mao Z. Phosphorylation of ATM by CDK5 mediates DNA damage signalling and regulates neuronal death [J]. *Nat Cell Biol*, 2009, 11: 211-218.
- [20] Kim Y, Sung JY, Ceglia I, et al. Phosphorylation of WAVE1 regulates actin polymerization and dendritic spine morphology [J]. *Nature*, 2006, 442: 814-817.
- [21] Fu WY, Chen Y, Sahin M, et al. CDK5 regulates EphA4-mediated dendritic spine retraction through an ephexin1-dependent mechanism [J]. *Nat Neurosci*, 2007, 10: 67-76.

- [22] Shah K, Rossie S. Tale of the good and the bad CDK5: remodeling of the actin cytoskeleton in the brain [J]. *Mol Neurobiol*, 2018, 55: 3426-3438.
- [23] Kino T, Jaffe H, Amin ND, et al. Cyclin-dependent kinase 5 modulates the transcriptional activity of the mineralocorticoid receptor and regulates expression of brain-derived neurotrophic factor [J]. *Mol Endocrinol*, 2010, 24: 941-952.
- [24] Kino T, Ichijo T, Amin ND, et al. Cyclin-dependent kinase 5 differentially regulates the transcriptional activity of the glucocorticoid receptor through phosphorylation: clinical implications for the nervous system response to glucocorticoids and stress [J]. *Mol Endocrinol*, 2007, 21: 1552-1568.
- [25] Liebl J, Zhang SW, Moser M, et al. CDK5 controls lymphatic vessel development and function by phosphorylation of Foxc2 [J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 7274-7287.
- [26] Liebl J, Weitensteiner SB, Vereb G, et al. Cyclin-dependent kinase 5 regulates endothelial cell migration and angiogenesis [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285: 35932-35943.
- [27] Fernando P, Sandoz JS, Ding W, et al. Bin1 SRC homology 3 domain acts as a scaffold for myofiber sarcomere assembly [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284: 27674-27686.
- [28] Thonel AD, Ferraris SE, Pallari HM, et al. Protein kinase C ζ regulates CDK5/p25 signaling during myogenesis [J]. *Mol Biol Cell*, 2010, 21: 1423-1434.
- [29] Schubert S, Knoch KP, Ouwendijk J, et al. β 2-Syntrophin is a CDK5 substrate that restrains the motility of insulin secretory granules [J]. *PLoS One*, 2010, 5: e12929.
- [30] Lee HY, Jung H, Jang IH, et al. CDK5 phosphorylates PLD2 to mediate EGF-dependent insulin secretion [J]. *Cell Signal*, 2008, 20: 1787-1794.
- [31] Lalioti V, Muruais G, Dinarina A, et al. The atypical kinase CDK5 is activated by insulin, regulates the association between GLUT4 and E-Syt1, and modulates glucose transport in 3T3-L1 adipocytes [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106: 4249-4253.
- [32] Patrick GN, Zukerberg L, Nikolic M, et al. Conversion of p35 to p25 deregulates CDK5 activity and promotes neurodegeneration [J]. *Nature*, 1999, 402: 615-622.
- [33] Wen Y, Yu WH, Maloney B, et al. Transcriptional regulation of β -secretase by p25/CDK5 leads to enhanced amyloidogenic processing [J]. *Neuron*, 2008, 57: 680-690.
- [34] Rubio De La Torre E, Luzón-Toro B, Forte-Lago I, et al. Combined kinase inhibition modulates parkin inactivation [J]. *Hum Mol Genet*, 2009, 18: 809-823.
- [35] Park J, Seo J, Won J, et al. Abnormal mitochondria in a non-human primate model of MPTP-induced Parkinson's disease: Drp1 and CDK5/p25 signaling [J]. *Exp Neurol*, 2019, 28: 414-424.
- [36] Bk B, Skuntz S, Prochazkova M, et al. Overexpression of the CDK5 inhibitory peptide in motor neurons rescue of amyotrophic lateral sclerosis phenotype in a mouse model [J]. *Hum Mol Genet*, 2019, 28: 3175-3187.
- [37] Pozo K, Bibb JA. The emerging role of CDK5 in cancer [J]. *Trends Cancer*, 2016, 2: 606-618.
- [38] Liu JL, Wang XY, Huang BX, et al. Expression of CDK5/p35 in resected patients with non-small cell lung cancer: relation to prognosis [J]. *Med Oncol*, 2011, 28: 673-678.
- [39] Lowman XH, McDonnell MA, Kosloske A, et al. The pro-apoptotic function of Noxa in human leukemia cells is regulated by the kinase CDK5 and by glucose [J]. *Mol Cell*, 2010, 40: 823-833.
- [40] Pozo K, Castro-Rivera E, Tan C, et al. The role of CDK5 in neuroendocrine thyroid cancer [J]. *Cancer Cell*, 2013, 24: 499-511.
- [41] Peyressatre M, Prével C, Pellerano M, et al. Targeting cyclin-dependent kinases in human cancers: from small molecules to peptide inhibitors [J]. *Cancers*, 2015, 7: 179-237.
- [42] Merk H, Zhang SW, Lehr T, et al. Inhibition of endothelial CDK5 reduces tumor growth by promoting non-productive angiogenesis [J]. *Oncotarget*, 2016, 7: 6088-6104.
- [43] Herzog J, Ehrlich SM, Pfitzer L, et al. Cyclin-dependent kinase 5 stabilizes hypoxia-inducible factor-1 α : a novel approach for inhibiting angiogenesis in hepatocellular carcinoma [J]. *Oncotarget*, 2016, 7: 27108-27121.
- [44] Sharma S, Sicinski P. A kinase of many talents: non-neuronal functions of CDK5 in development and disease [J]. *Open Biol*, 2020, 10: 190287-190300.
- [45] Dorand RD, Nthale J, Myers JT, et al. CDK5 disruption attenuates tumor PD-L1 expression and promotes antitumor immunity [J]. *Science*, 2016, 353: 399-403.
- [46] Wei FY, Nagashima K, Ohshima T, et al. CDK5-dependent regulation of glucose-stimulated insulin secretion [J]. *Nat Med*, 2005, 11: 1104-1108.
- [47] Choi JH, Banks AS, Estall JL, et al. Anti-diabetic drugs inhibit obesity-linked phosphorylation of PPAR γ by CDK5 [J]. *Nature*, 2010, 466: 451-456.
- [48] Lee KY, Liu L, Jin Y, et al. CDK5 mediates vimentin ser56 phosphorylation during GTP-induced secretion by neutrophils [J]. *J Cell Physiol*, 2012, 227: 739-750.
- [49] Pareek TK, Lam E, Zheng X, et al. Cyclin-dependent kinase 5 activity is required for T cell activation and induction of experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. *J Exp Med*, 2010, 207: 2507-2519.
- [50] Liebl J, Fürst R, Vollmar AM, et al. Twice switched at birth: cell cycle-independent roles of the "neuron-specific" cyclin-dependent kinase 5 (CDK5) in non-neuronal cells [J]. *Cell Signal*, 2011, 23: 1698-1707.
- [51] Steven JM, Iain S. Metabolism of the trisubstituted purine cyclin-dependent kinase inhibitor seliciclib (*R*-roscovitine) *in vitro* and *in vivo* [J]. *Drug Metab Dispos*, 2008, 36: 561-570.
- [52] Oumata N, Bettayeb K, Ferandin Y, et al. Roscovitine-derived,

- dual-specificity inhibitors of cyclin-dependent kinases and casein kinases 1 [J]. *J Med Chem*, 2008, 51: 5229-5242.
- [53] Bettayeb K, Oumata N, Echalier A, et al. CR8, a potent and selective, roscovitine-derived inhibitor of cyclin-dependent kinases [J]. *Oncogene*, 2008, 27: 5797-5807.
- [54] Mapelli M, Massimiliano L, Crovace C, et al. Mechanism of CDK5/p25 binding by CDK inhibitors [J]. *J Med Chem*, 2005, 48: 671-679.
- [55] Slabicki M, Kozicka Z, Petzold G, et al. The CDK inhibitor CR8 acts as a molecular glue degrader that depletes cyclin K [J]. *Nature*, 2020, 585: 293-297.
- [56] N'gompaza-Diarra J, Bettayeb K, Gresh N, et al. Synthesis and biological evaluation of selective and potent cyclin-dependent kinase inhibitors [J]. *Eur J Med Chem*, 2012, 56: 210-216.
- [57] Popowycz F, Fournet G, Schneider C, et al. Pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazine as a purine bioisostere: access to potent cyclin-dependent kinase inhibitor (*R*)-roscovitine analogue [J]. *J Med Chem*, 2009, 52: 655-663.
- [58] Jorda R, Havlíček L, Mcnae IW, et al. Pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidine bioisostere of roscovitine: evaluation of a novel selective inhibitor of cyclin-dependent kinases with antiproliferative activity [J]. *J Med Chem*, 2011, 54: 2980-2993.
- [59] Weitensteiner SB, Liebl J, Krystof V, et al. Trisubstituted pyrazolopyrimidines as novel angiogenesis inhibitors [J]. *PLoS One*, 2013, 8: e54607.
- [60] Paruch K, Dwyer MP, Alvarez C, et al. Discovery of dinaciclib (SCH 727965): a potent and selective inhibitor of cyclin-dependent kinases [J]. *ACS Med Chem Lett*, 2010, 1: 204-208.
- [61] Jorda R, Paruch K, Krystof V. Cyclin-dependent kinase inhibitors inspired by roscovitine: purine bioisosteres [J]. *Curr Pharm Des*, 2012, 18: 2974-2980.
- [62] Liebl J, Krystof V, Vereb G, et al. Anti-angiogenic effects of purine inhibitors of cyclin dependent kinases [J]. *Angiogenesis*, 2011, 14: 281-291.
- [63] Martin MP, Olesen SH, Georg GI, et al. Cyclin-dependent kinase inhibitor dinaciclib interacts with the acetyl-lysine recognition site of bromodomains [J]. *ACS Chem Biol*, 2013, 8: 2360-2365.
- [64] Parry D, Guzi T, Shanahan F, et al. Dinaciclib (SCH 727965), a novel and potent cyclin-dependent kinase inhibitor [J]. *Mol Cancer Ther*, 2010, 9: 2344-2353.
- [65] Lücking U. Sulfoximines: a neglected opportunity in medicinal chemistry [J]. *Angew Chem Int Ed*, 2013, 52: 9399-9408.
- [66] Ayaz P, Andres D, Kwiatkowski DA, et al. Conformational adaptation may explain the slow dissociation kinetics of roniciclib (BAY 1000394), a type I CDK inhibitor with kinetic selectivity for CDK2 and CDK9 [J]. *ACS Chem Biol*, 2016, 11: 1710-1719.
- [67] Reck M, Horn L, Novello S, et al. Phase II study of roniciclib in combination with cisplatin/etoposide or carboplatin/rtoposide as first-line therapy in patients with extensive-disease small cell lung cancer [J]. *J Thorac Oncol*, 2019, 14: 701-711.
- [68] Khair NZ, Lenjisa JL, Tadesse S, et al. Discovery of CDK5 inhibitors through structure-guided approach [J]. *ACS Med Chem Lett*, 2019, 10: 786-791.
- [69] Byth KF, Thomas A, Hughes G, et al. AZD5438, a potent oral inhibitor of cyclin-dependent kinases 1, 2, and 9, leads to pharmacodynamic changes and potent antitumor effects in human tumor xenografts [J]. *Mol Cancer Ther*, 2009, 8: 1856-1866.
- [70] Traquandi G, Ciomei M, Ballinari D, et al. Identification of potent pyrazolo [4, 3-*h*] quinazoline-3-carboxamides as multi-cyclin-dependent kinase inhibitors [J]. *J Med Chem*, 2010, 53: 2171-2187.
- [71] Larsen SD, Stachew CF, Clare PM, et al. A catch-and-release strategy for the combinatorial synthesis of 4-acylamino-1, 3-thiazoles as potential CDK5 inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2003, 13: 3491-3495.
- [72] Helal CJ, Sanner MA, Cooper CB, et al. Discovery and SAR of 2-aminothiazole inhibitors of cyclin-dependent kinase 5/p25 as a potential treatment for Alzheimer's disease [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2004, 14: 5521-5525.
- [73] Rzasa RM, Kaller MR, Liu G, et al. Structure-activity relationships of 3,4-dihydro-1*H*-quinazolin-2-one derivatives as potential CDK5 inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem*, 2007, 15: 6574-6595.
- [74] Ahn JS, Radhakrishnan ML, Mapelli M, et al. Defining CDK5 ligand chemical space with small molecule inhibitors of Tau phosphorylation [J]. *Chem Biol*, 2005, 12: 811-823.
- [75] Schonbrunn E, Betzi S, Alam R, et al. Development of highly potent and selective diaminothiazole inhibitors of cyclin-dependent kinases [J]. *J Med Chem*, 2013, 56: 3768-3782.
- [76] Helal CJ, Kang ZJ, Lucas JC, et al. Potent and cellularly active 4-aminoimidazole inhibitors of cyclin-dependent kinase 5/p25 for the treatment of Alzheimer's disease [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2009, 19: 5703-5707.
- [77] Rath SL, Senapati S. Molecular basis of differential selectivity of cyclobutyl-substituted imidazole inhibitors against CDKs: insights for rational drug design [J]. *PLoS One*, 2013, 8: e73836.
- [78] Umfress A, Singh S, Ryan KJ, et al. Systemic administration of a brain permeable CDK5 inhibitor alters neurobehavior [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 863762.
- [79] Bibbb JA, Nishi A, O'callaghan JP, et al. Phosphorylation of protein phosphatase inhibitor-1 by CDK5 [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276: 14490-14497.
- [80] Santo L, Vallet S, Hideshima T, et al. AT7519, a novel small molecule multi-cyclin-dependent kinase inhibitor, induces apoptosis in multiple myeloma *via* GSK-3 β activation and RNA polymerase II inhibition [J]. *Oncogene*, 2010, 29: 2325-2336.
- [81] Wyatt PG, Woodhead AJ, Berdini V, et al. Identification of *N*-(4-piperidinyl)-4-(2,6-dichlorobenzoylamino)-1*H*-pyrazole-3-carboxamide (AT7519), a novel cyclin dependent kinase inhibitor using fragment-based X-ray crystallography and structure based

- drug design [J]. *J Med Chem*, 2008, 51: 4986-4999.
- [82] Jorda R, Hendrychová D, Voller J, et al. How selective are pharmacological inhibitors of cell-cycle-regulating cyclin-dependent kinases? [J]. *J Med Chem*, 2018, 61: 9105-9120.
- [83] Brasca MG, Albanese C, Alzani R, et al. Optimization of 6,6-dimethyl pyrrolo[3,4-*c*]pyrazoles: identification of PHA-793887, a potent CDK inhibitor suitable for intravenous dosing [J]. *Bioorg Med Chem*, 2010, 18: 1844-1853.
- [84] Daniels MH, Malojcic G, Clugston SL, et al. Discovery and optimization of highly selective inhibitors of CDK5 [J]. *J Med Chem*, 2022, 65: 3575-3596.
- [85] Graczyk PP. Gini coefficient: a new way to express selectivity of kinase inhibitors against a family of kinases [J]. *J Med Chem*, 2007, 50: 5773-5779.
- [86] Li XL, Wang XW, Tian ZB, et al. Structural basis of valmerins as dual inhibitors of GSK3 β /CDK5 [J]. *J Mol Model*, 2014, 20: 2407-2417.
- [87] Ouach A, Boulahjar R, Vala C, et al. Novel optimization of valmerins (tetrahydropyrido[1,2-*a*]isoindolones) as potent dual CDK5/GSK3 inhibitors [J]. *Eur J Med Chem*, 2016, 115: 311-325.
- [88] Mettey Y, Gompel M, Thomas V, et al. Aloisines, a new family of CDK/GSK-3 inhibitors. SAR study, crystal structure in complex with CDK2, enzyme selectivity, and cellular effects [J]. *J Med Chem*, 2003, 46: 222-236.
- [89] Malmström J, Viklund J, Slivo C, et al. Synthesis and structure-activity relationship of 4-(1,3-benzothiazol-2-yl)-thiophene-2-sulfonamides as cyclin-dependent kinase 5 (CDK5)/p25 inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2012, 22: 5919-5923.
- [90] Nguyen TB, Lozach O, Surpateanu G, et al. Synthesis, biological evaluation, and molecular modeling of natural and unnatural flavonoidal alkaloids, inhibitors of kinases [J]. *J Med Chem*, 2012, 55: 2811-2819.
- [91] Lin TS, Ruppert AS, Johnson AJ, et al. Phase II study of flavopiridol in relapsed chronic lymphocytic leukemia demonstrating high response rates in genetically high-risk disease [J]. *J Clin Oncol*, 2009, 27: 6012-6018.
- [92] Yoshida K, Itoyama R, Yamahira M, et al. Synthesis, resolution, and biological evaluation of atropisomeric (*aR*)- and (*aS*)-16-methylamellarins N: unique effects of the axial chirality on the selectivity of protein kinases inhibition [J]. *J Med Chem*, 2013, 56: 7289-7301.
- [93] Wan YQ, Hur WY, Cho CY, et al. Synthesis and target identification of hymenialdisine analogs [J]. *Chem Biol*, 2004, 11: 247-259.
- [94] Yang L, Li X, Huang W, et al. Pharmacological properties of indirubin and its derivatives [J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 151: 113112.
- [95] Tian Z, Feng B, Wang XQ, et al. Focusing on cyclin-dependent kinases 5: a potential target for neurological disorders [J]. *Front Mol Neurosci*, 2022, 15: 1030639.
- [96] Zheng YL, Amin ND, Hu YF, et al. A 24-residue peptide (p5), derived from p35, the CDK5 neuronal activator, specifically inhibits CDK5-p25 hyperactivity and Tau hyperphosphorylation [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285: 34202-34212.
- [97] Binukumar BK, Zheng YL, Shukla V, et al. TFP5, a peptide derived from p35, a CDK5 neuronal activator, rescues cortical neurons from glucose toxicity [J]. *J Alzheimers Dis*, 2014, 39: 899-909.
- [98] Pao PC, Seo J, Lee A, et al. A CDK5-derived peptide inhibits CDK5/p25 activity and improves neurodegenerative phenotypes [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2023, 120: e2217864120.
- [99] Jabeur R, Corbel C, Loyer P, et al. Identification of novel compounds inhibiting the kinase activity of the CDK5/p25 complex *via* direct binding to p25 [J]. *Biochemistry*, 2023, 62: 1452-1463.
- [100] Corbel C, Zhang B, Le Parc A, et al. Tamoxifen inhibits CDK5 kinase activity by interacting with p35/p25 and modulates the pattern of Tau phosphorylation [J]. *Chem Biol*, 2015, 22: 472-482.
- [101] Corbel C, Wang Q, Bousserouel H, et al. First BRET-based screening assay performed in budding yeast leads to the discovery of CDK5/p25 interaction inhibitors [J]. *Biotechnol J*, 2011, 6: 860-870.
- [102] Zhang B, Corbel C, Guéritte F, et al. An *in silico* approach for the discovery of CDK5/p25 interaction inhibitors [J]. *Biotechnol J*, 2011, 6: 871-881.
- [103] Teng MX, Jiang J, He ZX, et al. Development of CDK2 and CDK5 dual degrader TMX-2172 [J]. *Angew Chem Int Ed*, 2020, 59: 13865-13870.
- [104] Echalié A, Hole AJ, Lolli G, et al. An inhibitor's-eye view of the ATP-binding site of CDKs in different regulatory states [J]. *ACS Chem Biol*, 2014, 9: 1251-1256.