

· 综述 ·

抗肿瘤新靶点 CDK9 及其抑制剂的研究进展

陈 明, 谢周令, 李听寒, 韦志辉, 赵 璐, 李志裕*

(中国药科大学药学院, 南京 210009)

摘要 细胞周期蛋白依赖性激酶 9(CDK9)是细胞周期蛋白依赖性激酶家族中的一员。与其他 CDKs 不同,CDK9 主要在转录延伸的调控中发挥作用,而不影响细胞周期过程。目前已有多种 CDK9 抑制剂进入了临床研究。本文介绍了 CDK9 的结构特征和作用机制,比较了 CDK9 与其他 CDKs 的蛋白结构差异,综述了 CDK9 非选择性抑制剂和选择性抑制剂的构效关系及研究进展。

关键词 CDK9; 转录调控; CDK9 抑制剂; 抗肿瘤; 靶点; 构效关系; 进展

中图分类号 R914.5 **文献标志码** A **文章编号** 1000–5048(2017)02–0233–09

doi:10.11665/j.issn.1000–5048.20170216

引用本文 陈明, 谢周令, 李听寒, 等. 抗肿瘤新靶点 CDK9 及其抑制剂的研究进展[J]. 中国药科大学学报, 2017, 48(2):233–241.
Cite this article as: CHEN Ming, XIE Zhouling, LI Tinghan, et al. Advances in research on a novel antitumor target CDK9 and its inhibitors[J]. J. China Pharm Univ., 2017, 48(2):233–241.

Advances in research on a novel antitumor target CDK9 and its inhibitors

CHEN Ming, XIE Zhouling, LI Tinghan, WEI Zhihui, ZHAO Lu, LI Zhiyu*

School of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract The cyclin-dependent protein kinase 9 (CDK9) is a member of the family of cyclin-dependent protein kinases. Different from other CDKs, CDK9 mainly works on the transcription regulation and has no affects on the cell cycle progress. There are many kinds of CDK9 inhibitors in the clinical research. The detailed structure and action mechanism of CDK9, its difference of protein structure from other CDKs, several selective or nonselective CDK9 inhibitors, as well as their structure-activity relationship (SAR) are discussed in this paper.

Key words CDK9; transcriptional regulation; CDK9 inhibitors; antitumor targets; SAR; advances

细胞周期依赖蛋白激酶(CDKs)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起着关键的作用。人类 CDK 家族有 13 个结构类似的不同亚型^[1–2]。这些 CDKs 可以被 10 个左右的细胞周期蛋白(CyclinD1)激活,发挥不同的生物学功能(表 1)。根据作用机制不同,CDKs 一般分为细胞周期性 CDK 和转录性 CDK。其中,CDK1 ~ CDK6 控制细胞周期过程,CDK7 ~ CDK9 调节转录过程。目前通过阻滞细胞周期诱导细胞凋亡和分化已成为抗肿瘤的重要方法,已有多种细胞周期

性 CDKs 小分子抑制剂进入临床使用,但最新研究表明,高度的功能冗余和补偿机制导致特异性作用于个别调控细胞周期的 CDKs 已不能成为有效的抗肿瘤方法。CDK7 ~ CDK9 调控转录过程,涉及调控 RNA 的转录^[3],其中 CDK7 又具有 CDK 活化激酶的作用,活化调控细胞周期 CDKs,从而对细胞周期产生影响,CDK9 则不会对细胞周期的调控产生影响^[4],CDK9 对转录过程的这种特异性调控,使它成为 CDK 家族中最具潜力的抗肿瘤靶点之一。

1 CDK9 的结构

CDK9-42由372个氨基酸组成,相对分子质量42 kD,CDK9结构的分析表明,它属于 $\alpha+\beta$ 折叠的结构,包括N-末端和C-末端激酶叶,以及一个短小的C-末端延伸区。N-末端和C-末端激酶叶之间

的裂缝即为ATP结合位点,并且具有高度保守性^[14],ATP分子的腺嘌呤环通过疏水作用结合于ATP口袋的疏水空腔中,腺嘌呤环上的氨基和氮原子分与ATP口袋铰链区Asp104、Cys106形成氢键作用,而磷酸基团主要与ATP结合口袋Asp167、Lys48、Lys151等形成离子键或氢键作用(图1)。

表1 细胞周期依赖蛋白激酶(CDKs)的Cyclin伴侣及其生物学功能

| 类型 | 亚型 | 细胞周期蛋白伴侣 | 功能 | 参考文献 |
|-----------|------|------------------|-------------------------------|---------|
| 细胞周期性 CDK | CDK1 | Cyclin A,B | 调节G ₂ 期和M期 | [5–6] |
| | CDK2 | Cyclin A,E | 调节S期,促进细胞凋亡 | [5–6] |
| | CDK3 | – | 调节细胞周期 | [7] |
| | CDK4 | Cyclin D | 调节G ₁ 期 | [8] |
| | CDK5 | P35,Cyclin D,E,G | 促进细胞凋亡,调节神经元 | [9] |
| | CDK6 | Cyclin D | 调节G ₁ 期 | [10] |
| 转录性 CDK | CDK7 | Cyclin H | 参与转录起始 | – |
| | CDK8 | Cyclin C | 转录中介复合物,调节 β -catenin蛋白 | [11–12] |
| | CDK9 | Cyclin T,K | 参与转录延伸 | [13] |

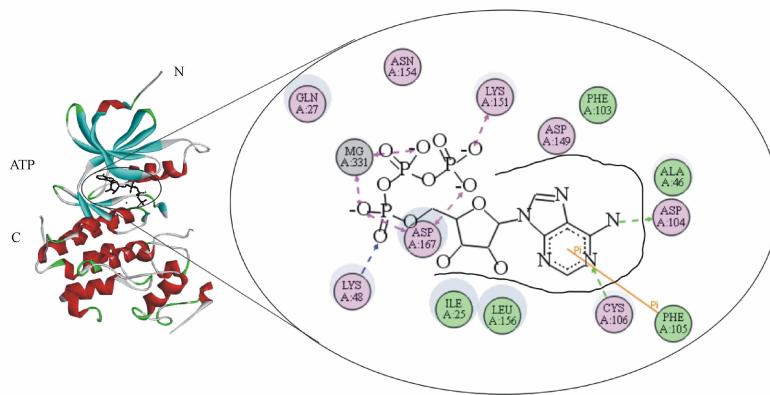


图1 ATP与CDK9/cyclinT结合模型及ATP与结合位点的相互作用(PDB:3BLQ)

2 CDK9 的功能及作用机制

CDK9是正性转录延长因子P-TEFb中的催化亚基,当负性转录延长因子(NELF、N-TEFs)参与细胞转录的负性调节,使转录被抑制在起始复合物的位置时,P-TEFb被招募至NELF和N-TEFs抑制转录延长的体系中,催化RNA PolyII大亚基C端磷酸化,同时催化N-TEFs的SPT5亚基和NELF的RD亚基磷酸化,致使负性转录延长因子从转录复合物上脱离,从而使转录得以继续^[15](图2)。因此,通过抑制CDK9来阻断P-TEFb对RNA PolyII C末端区域的磷酸化,使得转录被抑制,细胞内mRNA及半衰期短的蛋白的水平快速下降^[16],从而可以导致肿瘤细胞的凋亡。

3 CDK9与其他CDKs的蛋白结构差异分析

目前CDK1,CDK2,CDK4~9,CDK12,CDK13的晶体结构已被报道,为CDKs抑制剂的设计提供了可靠依据。文献报道^[17–18],在CDKs的ATP结合口袋中,铰链区是高度保守的区域,也是最重要的结合位点,但与抑制剂的结合缺乏特异性;而CDKs中C端与N端间的链接区的氨基酸序列具有较大的差异性,如CDK2中的序列为EFL-HQDLKK,CDK7中的序列为DFMETDLEV,CDK9中的序列为DFCEHDLAD,这些差异的存在为设计特异性CDKs抑制剂提供了有利条件。进一步研究发现,相比细胞周期性CDKs(CDK1、CDK2、CDK4),转录性CDKs(CDK7、CDK9)蛋白结构中

与选择性抑制有关的残基均相对较小,将 CDK9 与 CDK2 的 ATP 结合区域的空腔结构进行比较后发现,在配体进入空腔的“入口”处,CDK2 的相关残

基 Lys89 形成了比 CDK9 的相关残基 Gly112 更大的空间阻碍,并且形成静电阻碍,这种特异性序列差异可能是设计 CDK9 抑制剂的关键^[19]。

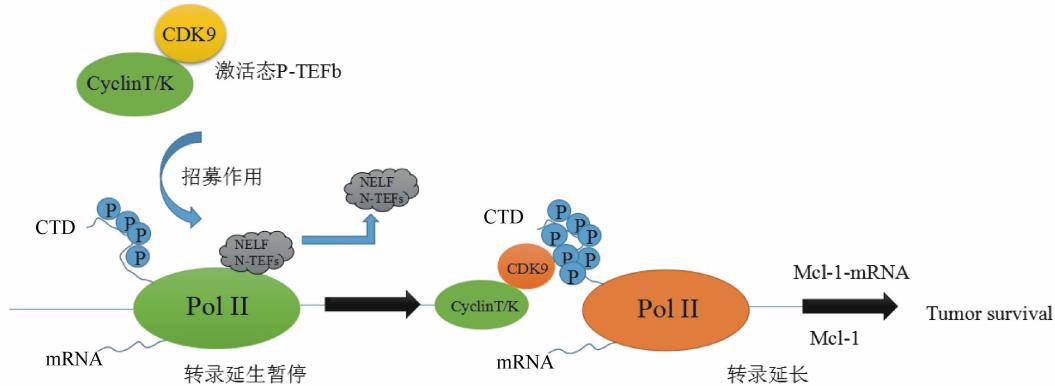


图2 CDK9 的功能机制示意图

另外,CDK9 相比其他 CDKs 拥有更大的构象柔性,比如,flavopiridol 与 CDK9/cyclinT 结合时^[20],可以下调蛋白结构中富含甘氨酸环的位置

以适应配体的结合(图3),CDK9 的这种可伸展性使得其结合区域可以容纳更大的配体结构。

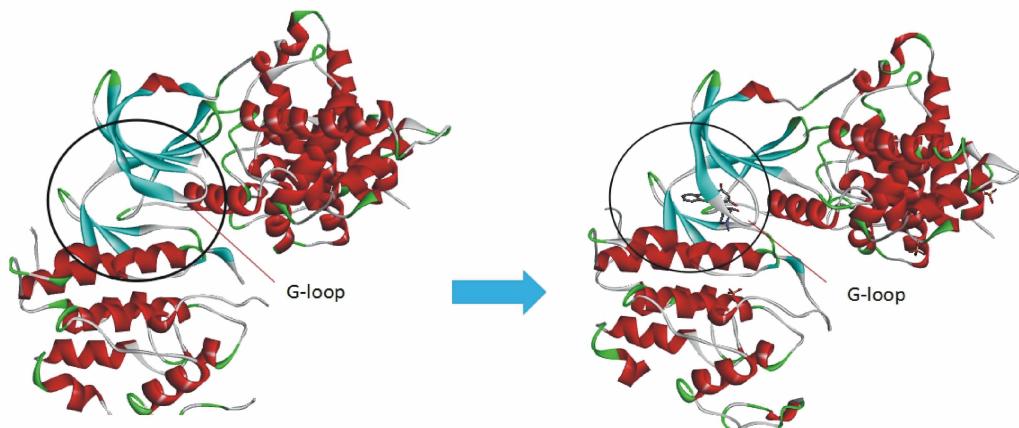


图3 CDK9/cyclinT 晶体复合物(3BLH)、CDK9/cyclinT 与 flavopiridol 结合的晶体复合物(3BLR)

4 CDK9 抑制剂的研究进展

4.1 非选择性 CDK9 抑制剂

CDK9 是治疗肿瘤的有效靶点,目前已多个 CDK9 抑制剂进入了临床研究,其中多为非选择性抑制剂,代表药物有 flavopiridol、P276-00、roscovinine、SCH-727965、AT7519 和 R547(图4)。

4.1.1 Flavopiridol 赛诺菲-安万特公司研发的 flavopiridol 是第 1 个进入临床的非选择性 CDKs 抑制剂,对 CDK1、2、4、6、7 和 9 均有较好的抑制活性,特别是对 CDK9 的抑制活性较高,其 IC₅₀ 为 6 nmol/L。

在 CDK9 与 flavopiridol 的共晶复合物结构中共发现 3 个重要的氢键作用:8 位哌啶环上-OH、5 位-OH 以及 4 位羰基分别与 Lys33、Asp89 和 Cys91 形成氢键作用,氯取代苯环则伸出 CDK9 的 ATP 结合口袋,部分暴露于溶剂中。

临床Ⅱ期试验研究表明^[21],flavopiridol 对于淋巴瘤、多发性骨髓瘤和原生质细胞增生瘤等有良好的抑制作用,但是由于其药代动力学特性较差,且苯环上的氯取代基会产生严重的分泌性腹泻、中性白细胞减少以及发热等不良反应,从而限制了其在临床上的应用。

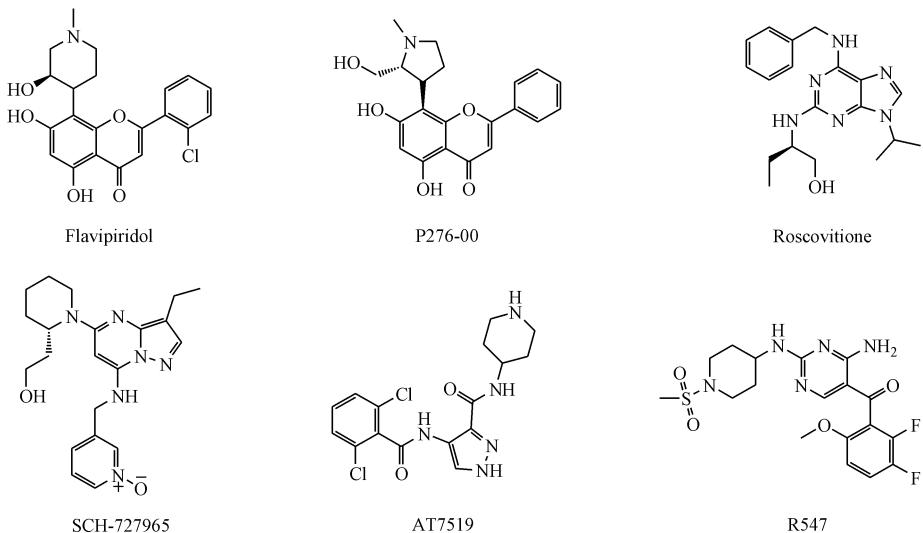


图4 非选择性CDK9抑制剂

4.1.2 P276-00 2010年,赛诺菲-安万特公司停止了对flavipiridol的进一步研发,进而开发了其类似物P276-00,其对CDK9的 IC_{50} 是20 nmol/L。研究表明^[22],在P276-00给药的多发性骨髓瘤细胞株中,Mcl-1蛋白水平明显降低,PARP发生裂解,肿瘤细胞凋亡。但是在一项P276-00的套细胞淋巴瘤(MCL)Ⅱ期临床试验中^[23],单用P276-00治疗MCL患者并没有达到预期的效果,13位患者对P276-00表现出良好的耐受性,但是无一人对P276-00表现出客观应答,显示了在治疗MCL病患中,P276-00可以尝试与其他抗肿瘤药物联合用药。

4.1.3 Roscovitine Roscovitine是具有嘌呤结构的非选择性CDKs抑制剂,对CDK1(IC_{50} =2.69 μmol/L)、CDK2(IC_{50} =0.1 μmol/L)、CDK4(IC_{50} =14 μmol/L)、CDK7(IC_{50} =0.49 μmol/L)和CDK9(IC_{50} =0.8 μmol/L)均有抑制活性,目前正处于治疗非小细胞肺癌和鼻咽癌等其他晚期实体瘤的Ⅱ期临床试验^[24]。

临床试验结果表明,roscovitine具有低血钾症、皮疹和疲劳的不良反应,且在同顺铂、吉西他滨等联合使用治疗非小细胞肺癌(NSCLC)的Ⅰ期临床试验中出现了相似的不良反应。Roscovitine目前正进行多项Ⅱ期临床试验:单独给药治疗白血病,与吉西他滨、顺铂以及多西他赛合用治疗NSCLC以及同卡培他滨合用治疗乳腺癌^[25]。

4.1.4 SCH727965 SCH727965是非选择性的CDKs抑制剂,对CDK1、CDK2、CDK5、CDK9的 IC_{50}

分别是3,1,1和4 nmol/L。在与卡培他滨对比治疗晚期乳腺癌的Ⅱ期临床试验中^[26],SCH727965并没有表现出比卡培他滨更好的疗效。在非小细胞肺癌的Ⅱ期临床试验中^[27],50 mg/m²的剂量没有达到治疗活性,而同表柔比星联用治疗三阴乳腺癌的临床试验也没有得到理想的结果。

4.1.5 AT7519 AT7519是ATP竞争性抑制剂,可以抑制CDK1(IC_{50} =0.21 μmol/L)、CDK2(IC_{50} =0.047 μmol/L)、CDK4(IC_{50} =0.1 μmol/L)、CDK5(IC_{50} =0.13 μmol/L)、CDK6(IC_{50} =0.17 μmol/L)和CDK9(IC_{50} ≤0.01 μmol/L),而对其他的CDKs(如CDK3和CDK7)的抑制活性较弱。

与其他CDKs抑制剂不同的是,AT7519不仅能够通过调节RNAPII片段的磷酸化来调节细胞凋亡过程,而且能作用于GSK3β通道^[28]。在NCIC的一项有关AT7519的Ⅰ期临床试验^[29]中,参与的34名患者中有32名接受了不同剂量的AT7519静脉注射给药;在Ⅱ期临床中,使用AT7519的剂量为27 mg/m²,结果表明具有良好的安全性和耐受性,主要的不良反应是剂量依赖的黏膜炎、发热性中性粒细胞减少、皮疹、疲劳和低血钾等。构效关系研究显示,该类抑制剂结构中的酰胺哌啶部分的酰胺NH和吡唑环的NH部分与铰链区残基形成氢键作用,都是其对CDK9活性的重要因素。

4.1.6 R547 R547对CDK1、CDK2、CDK4、CDK7、CDK9都有很好的抑制活性。体外研究显示,

R547 能够抑制多种肿瘤细胞,在一项 R547 治疗晚期实体瘤的临床试验中^[30],耐受剂量达到了 155 mg/m^2 ,主要的不良反应(恶心、呕吐、头疼和短暂低血压)都可以通过其他药物进行有效控制。

R547 结构中二氨基嘧啶环与 CDK9 的铰链区形成重要的氢键(图 5);哌啶环主要通过疏水作用结合,哌啶环上的磺酰胺基则通过直接的或由水介导的氢键与受体中氨基酸残基相互作用;二氟取代苯环与嘧啶环平面成一定夹角进入疏水空腔,使配体牢牢结合在 ATP 口袋。

4.2 选择性 CDK9 抑制剂

近年来,已有多种 CDK9 高选择性抑制剂被报道,代表化合物有 DRB、CAN508、FIT-039、LDC000067

等(图 6),目前这些化合物大多处于临床前研究。

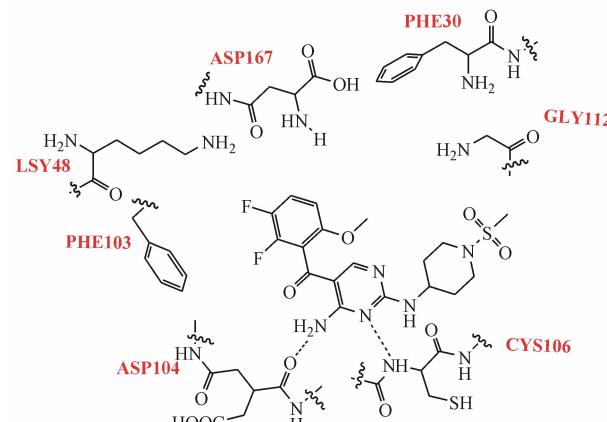


图 5 R547 与 CDK9 的结合模型

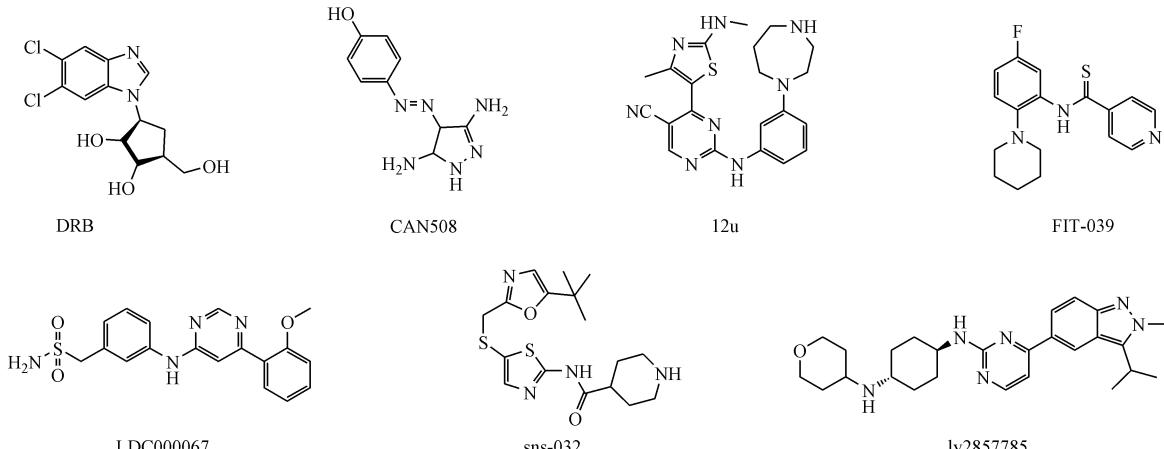


图 6 选择性 CDK9 抑制剂

4.2.1 DRB DRB 是 CDK9 选择性抑制剂,其对 CDK9 的 IC_{50} 为 0.34 nmol/L ,相比对其他的 CDKs 的抑制活性高两个以上数量级(如 CDK1 的 $\text{IC}_{50} = 17 \mu\text{mol/L}$),虽然 DRB 不具有成药性,但能选择性作用于 CDK9,使其成为研究 CDK9 抑制剂的重要工具药。构效关系表明,DRB 能竞争性地结合到 CDK9/cyclin T1 复合物的 ATP 的结合位点

上,其中苯并咪唑占据 ATP 结合位点的疏水口袋,两个氯原子则分别与铰链区 Asp104 和 Cyc106 的氧原子结合形成卤键,而卤键正是 DRB 选择性与 CDK9 结合的关键因素^[31]。研究显示,DRB 在 CDK9 和 CDK2 中结合模式不同(图 7),这可以为 CDK9 选择性抑制剂的研究提供一个思路。

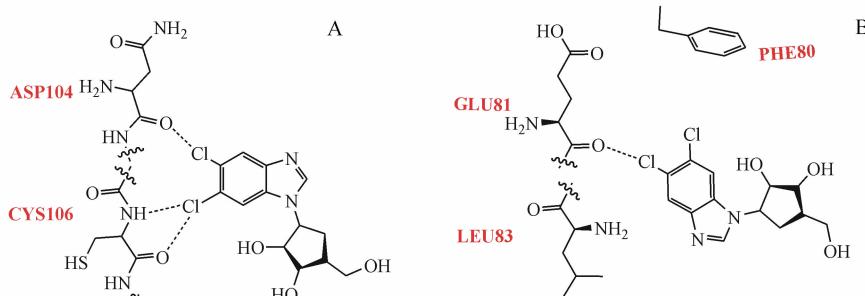


图 7 DRB 与 CDK9(A)、CDK2(B)的结合模型

4.2.2 CAN-508 CAN-508 是选择性 CDK9 抑制剂,研究表明^[32],CAN-508 能够降低内皮细胞中 RNAPII 末端碳链 2 位丝氨酸的磷酸化,进而抑制 RNA 的合成。同时还发现 CAN-508 在多个肿瘤细胞系中能降低血管内皮生长因子的表达。到目前为止,CAN-508 ($IC_{50} = 0.74 \mu\text{mol/L}$) 和 EX-EL-8647 ($IC_{50} = 0.029 \mu\text{mol/L}$) 是选择性最高的 CDK9 抑制剂^[33],是 CDKs 抑制剂活性的 100 倍以上。

不同于其他 CDK 抑制剂,化合物 CAN-508 与

CDK9 之间仅形成一个氢键,即酚羟基与 CDK9 的 Asp167 之间形成氢键作用(图 8),4-苯偶氮基则通过疏水作用以及范德华力作用于 ATP 口袋中,构效关系表明,4-苯偶氮基可能是其对 CDK9 具有选择性的主要原因。另外,研究发现,去除酚羟基能增强对 CDK9 的选择性,原因是 CDK9 的 α 螺旋拥有一定的柔性,即 CDK9/cyclinT 中的 α 螺旋能够改变位置,产生一个小的疏水空腔,能够更好的容纳抑制剂,因此这也是设计 CDK9 选择性抑制剂的一个重要思路^[34]。

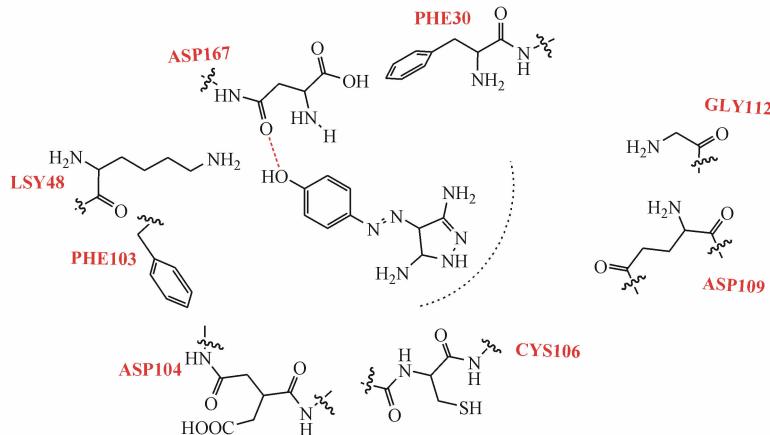


图 8 CAN-508 与 CDK9 结合模型(PDB:3TNH)

4.2.3 12u 研究人员选择 2-苯氨基-4-噻唑嘧啶作为母环进行修饰,得到了一系列活性较好的化合物,其中化合物 12u 对 CDK9 ($IC_{50} = 14 \text{ nmol/L}$) 的抑制活性是 CDK2 ($IC_{50} = 1196 \text{ nmol/L}$) 的 85 倍,且能够以浓度依赖性的方式诱导细胞凋亡^[35]。在体外抗肿瘤活性测试中,研究者发现 12u 对原发性慢性淋巴细胞性白血病细胞有良好的抑制活性,其体内与其他研究仍在进行。

此类化合物的构效关系显示,噻唑环的氮原子 Cys106 的氨基形成氢键(图 9),C-2 位的-NH 则与 Cys106 的羰基形成氢键,5 位氨基能够进入疏水区与 Phe103 形成 $p-\pi$ 相互作用,同时通过水分子介导与周围氨基酸残基 Asp145 及 Glu51 产生氢键作用,噻唑环 2 位甲氨基能够同 Asp167 形成氢键,苯胺部分通过范德华力与 Ile25 相互作用。据报道,其中苯胺连接的高哌嗪环处于 ATP 口袋的入口区,具有较大的空间位阻,在 CDK2 中与入口处 Lys89(CDK9 处为 Gly112)产生不利的空间及静电作用,不能使其很好地进入空腔中,而 CDK9 入口

区空间位阻小,不影响配体进入 ATP 口袋,因此化合物 12u 表现出对 CDK9 的选择性^[36]。

已报道的 CDK9 抑制剂中,化合物 12u 是抑制活性和选择性都表现最优异的化合物之一,4-噻唑嘧啶结构已经成为了转录性 CDKs (CDK7 和 CDK9) 抑制剂研究的热点,为寻找有效且具有选择性的转录性 CDK 抑制剂提供了方向。

4.2.4 FIT-039 据报道, FIT-039 能够特异性地抑制 CDK9 ($IC_{50} = 5.8 \mu\text{mol/L}$),而对其他 CDKs 则没有抑制活性,主要用于治疗疱疹病毒 ($IC_{50} = 0.69 \mu\text{mol/L}$)^[37]。构效关系表明, FIT-039 能竞争性结合到 ATP 口袋,其中氟原子和吡啶环上的 N 分别与 CDK9 铰链区的 LYS48 和 CYS106 形成氢键作用。

4.2.5 LD000067 LD000067 是全新的 CDK9 抑制剂^[38],对 CDK9 的 ($IC_{50} = 0.044 \mu\text{mol/L}$) 抑制活性,分别是 CDK2,CDK1,CDK4,CDK6,CDK7 抑制活性的 55 倍、125 倍、210 倍、>227 倍和 >227 倍。研究表明,LD000067 能够在分子细胞水平产生

CDK9 的抑制效果,嘧啶环与 CDK9 的铰链区形成两个重要的氢键;哌啶环主要通过疏水作用结合,

哌啶环上的磺酰胺基与 Lys89、Asp86 以及 His84 则通过直接的或由水介导的氢键存在相互作用。

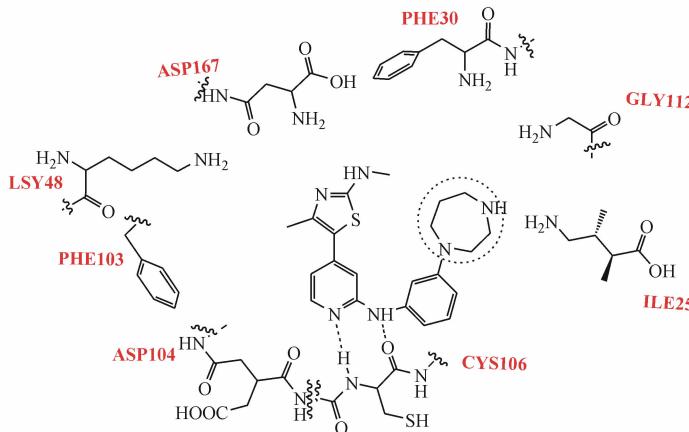


图9 12u 在 CDK9 中的作用模型和结合方式(PDB:4BCG)

4.2.6 LY2857785 LY2857785 是选择性的 CDK9 抑制剂 ($IC_{50} = 0.011 \mu\text{mol/L}$)^[39], 研究表明, LY2857785 对多种肿瘤细胞有抑制作用, 尤其在白血病细胞中, 包括正常白血病细胞、急性骨髓白血病细胞和慢性白血病细胞, 能够降低 RNAPII 的磷酸化水平, 降低 Mcl-1 蛋白的水平, 从而诱导肿瘤细胞的凋亡。

4.2.7 sns-032 sns-032 是一个新型的高效 CDK 选择性抑制剂, 能够选择性地抑制 CDK2 ($IC_{50} = 38 \text{ nmol/L}$)、CDK7 ($IC_{50} = 62 \text{ nmol/L}$) 和 CDK9 ($IC_{50} = 4 \text{ nmol/L}$)。研究表明, sns-032 能够同时抑制 RNAPII 2 位和 5 位丝氨酸的磷酸化, 进而减少细胞中抗凋亡蛋白 Mcl-1 和 XIAP 的水平, 影响 RNA 的转录调节。同 flavopiridol 和 roscovitine 相比, sns-032 对 RNA 合成的抑制活性分别是它们的 10~20 倍和 400~700 倍^[40]。在用 sns-032 治疗慢性淋巴细胞白血病患者和多重骨髓瘤患者的临床试验中^[41], 慢性淋巴细胞白血病患者对 sns-032 的耐受剂量是 75 mg/m^2 , 主要的不良反应是骨髓抑制, 其中 1 例慢性淋巴细胞白血病患者肿瘤指标降低了 50%; 在治疗多重骨髓瘤患者的试验中, 有 2 例患者的病情趋于稳定, 没有发现骨髓抑制的不良反应, 且在 75 mg/m^2 剂量下仍没有达到最大耐受程度, 但 sns-032 在临床试验中对晚期淋巴癌和骨髓癌患者的疗效并不显著。

构效关系表明, sns-032 分子经折叠成 U 型结构进入 ATP 结合位点, 而其与铰链区的关键氢键

是由噻唑环上氮原子和环外酰胺氮原子分别于 Leu83 的酰胺部分形成的。

5 CDK9 抑制剂构效关系分析

综合上述, CDK9 抑制剂及其与 CDK9 的结合模型分析, 可发现选择性 CDK9 抑制剂与 CDK9 的结合模式和非选择性 CDK9 抑制剂基本一致:

(1) 抑制剂主要与 CDK9 铰链区的主要氨基酸残基 Cys106、Asp104 羧基形成氢键作用, 因此氢键的形成对活性具有重要影响。

(2) 小分子结构中疏水性基团占据 CDK9 铰链区两侧的疏水区域, 疏水基团的位置、大小、强弱对化合物活性具有一定影响。

(3) 小分子与 CDK9 的“gate keeper”区中 Asp167、Phe30 形成氢键结合, 是增强与蛋白结合的重要部分。

提高 CDK9 选择性的方式却有多种, 主要包括:(1)CDK9 的 ATP 结合口袋中的疏水区域的良好空间伸展性, 使其可容纳更大的配体结构, 如引入较大的疏水基团, 可以提高 CDK9 选择性。(2)空腔“入口”较小的空间阻碍和非静电阻碍, 该区域引入能形成更好静电作用及立体作用的基团, 可以提高选择性。(3)铰链区与配体的卤键作用可能是提高 CDK9 的选择性的途径。

另外, 生物学研究表明^[42], CDK9 抑制剂主要是通过抑制 RNA 转录、下调 CDK9 调控的相关蛋白水平而实现其诱导肿瘤细胞凋亡, 发挥抗肿瘤作

用;非选择性 CDK9 抑制剂往往也能抑制其他亚型 CDKs 和其他激酶,因此可能会引起显著的脱靶毒性,临床表现出不同的不良反应,这可能成为限制非选择性 CDK9 小分子抑制剂应用的重要因素。

6 结语

CDK9 是治疗肿瘤的有效靶点之一,目前已有大量非选择性 CDK9 抑制剂进入了临床研究。但非选择性 CDK9 抑制剂针对未经过基因筛选的患者很难展现较高的治疗窗口,高剂量会引起不良反应,低剂量则药效差,同时,非选择性的 CDK9 抑制剂会对正常细胞表现一系列可能的不良反应。为了提高化合物的选择性,研究人员尝试多种方法研究开发了一系列化合物,其特异性得到了进一步的提高,相信在不久的将来特异性 CDK9 抑制剂的研究将会成为这类肿瘤药物开发的热点。

参考文献

- [1] Wang S, Fischer PM. Cyclin-dependent kinase 9: a key transcriptional regulator and potential drug target in oncology, virology and cardiology [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2008, **29**(6):302-313.
- [2] Heathcote DA, Patel H, Kroll SH, et al. A novel pyrazolo[1,5-a] pyrimidine is a potent inhibitor of cyclin-dependent protein kinases 1, 2, and 9, which demonstrates antitumor effects in human tumor xenografts following oral administration [J]. *J Med Chem*, 2010, **53**(24):8508-8522.
- [3] Węsińska-Gądecka J, Chamrád I, Kryštof V. Novel potent pharmacological cyclin-dependent kinase inhibitors [J]. *Future Med Chem*, 2009, **1**(9):1561-1581.
- [4] Kryštof V, Chamrád I, Jordá R, et al. Pharmacological targeting of CDK9 in cardiac hypertrophy [J]. *Med Res Rev*, 2010, **30**(4):646-666.
- [5] Chen YJ, Dominguez-Brauer C, Wang Z, et al. A conserved phosphorylation site within the forkhead domain of FoxM1B is required for its activation by cyclin-CDK1 [J]. *J Biol Chem*, 2009, **284**(44):30695-30707.
- [6] Marais A, Ji Z, Child ES, et al. Cell cycle-dependent regulation of the forkhead transcription factor FOXK2 by CDK-cyclin complexes [J]. *J Biol Chem*, 2010, **285**(46):35728-35739.
- [7] Tomashevski A, Webster DR, Grammas P, et al. Cyclin-C-dependent cell-cycle entry is required for activation of non-homologous end joining DNA repair in postmitotic neurons [J]. *Cell Death Differ*, 2010, **17**(7):1189-1198.
- [8] Aggarwal P, Vaites LP, Kim JK, et al. Nuclear cyclin D1/CDK4 kinase regulates CUL4 expression and triggers neoplastic growth via activation of the PRMT5 methyltransferase [J]. *Cancer Cell*, 2010, **18**(4):329-340.
- [9] Lavoie G, St-Pierre Y. Phosphorylation of human DNMT1: implication of cyclin-dependent kinases [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, **409**(2):187-192.
- [10] Tudhope SJ, Wang CC, Petrie JL, et al. A novel mechanism for regulating hepatic glycogen synthesis involving serotonin and cyclin-dependent kinase-5 [J]. *Diabetes*, 2012, **61**(1):49-60.
- [11] Firestein R, Bass AJ, Kim SY, et al. CDK8 is a colorectal cancer oncogene that regulates beta-catenin activity [J]. *Nature*, 2008, **455**(7212):547-551.
- [12] Zhao X, Feng D, Wang Q, et al. Regulation of lipogenesis by cyclin-dependent kinase 8-mediated control of SREBP-1 [J]. *J Clin Invest*, 2012, **122**(7):2417-2427.
- [13] Yu DS, Zhao R, Hsu EL, et al. Cyclin-dependent kinase 9-cyclin K functions in the replication stress response [J]. *EMBO Rep*, 2010, **11**(11):876-882.
- [14] Kryštof V, Baumli S, Fürst R. Perspective of cyclin-dependent kinase 9 (CDK9) as a drug target [J]. *Curr Pharm Des*, 2012, **18**(20):2883-2890.
- [15] Stellrecht CM, Chen LS. Transcription inhibition as a therapeutic target for cancer [J]. *Cancers*, 2011, **3**(4):4170-4190.
- [16] MacCallum DE, Melville J, Frame S, et al. Seliciclib (CYC202, R-roscovitine) induces cell death in multiple myeloma cells by inhibition of RNA polymerase II-dependent transcription and down-regulation of Mcl-1 [J]. *Cancer Res*, 2005, **65**(12):5399-5407.
- [17] Echalier 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**(6):1251-1256.
- [18] Echalier A, Endicott JA, Noble ME. Recent developments in cyclin-dependent kinase biochemical and structural studies [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, **1804**(3):511-519.
- [19] Nowicki MW, Walkinshaw MD. CDK9 inhibitors push cancer cells over the edge [J]. *Chem Biol*, 2010, **17**(10):1047-1048.
- [20] Baumli S, Lolli G, Lowe ED, et al. The structure of P-TEFb (CDK9/cyclin T1), its complex with flavopiridol and regulation by phosphorylation [J]. *EMBO J*, 2008, **27**(13):1907-1918.
- [21] Ahn YM, Vogeti L, Liu CJ, et al. Design, synthesis, and antiproliferative and CDK2-cyclin A inhibitory activity of novel flavopiridol analogues [J]. *Bioorg Med Chem*, 2007, **15**(2):702-713.
- [22] Manohar SM, Rathos MJ, Sonawane V, et al. Cyclin-dependent kinase inhibitor, P276-00 induces apoptosis in multiple myeloma cells by inhibition of Cdk9-T1 and RNA polymerase II-dependent transcription [J]. *Leuk Res*, 2011, **35**(6):821-830.
- [23] Cassaday RD, Goy A, Advani S, et al. A phase II, single-arm, open-label, multicenter study to evaluate the efficacy and safety of P276-00, a cyclin-dependent kinase inhibitor, in patients with relapsed or refractory mantle cell lymphoma [J]. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*, 2015, **15**(7):392-397.

- [24] Houzé S, Hoang NT, Lozach O, et al. Several human cyclin-dependent kinase inhibitors, structurally related to roscovitine, are new anti-malarial agents [J]. *Molecules*, 2014, **19**(9):15237–15257.
- [25] Benson C, White J, De Bono J, et al. A phase I trial of the selective oral cyclin-dependent kinase inhibitor seliciclib (CYC202; R-roscovitine), administered twice daily for 7 days every 21 days [J]. *Br J Cancer*, 2007, **96**(1):29–37.
- [26] Mita MM, Joy AA, Mita A, et al. Randomized phase II trial of the cyclin-dependent kinase inhibitor dinaciclib (MK-7965) versus capecitabine in patients with advanced breast cancer [J]. *Clin Breast Cancer*, 2014, **14**(3):169–176.
- [27] Mitri Z, Karakas C, Wei C, et al. A phase 1 study with dose expansion of the CDK inhibitor dinaciclib (SCH 727965) in combination with epirubicin in patients with metastatic triple negative breast cancer [J]. *Invest New Drugs*, 2015, **33**(4):890–894.
- [28] Santo L, Vallet S, Hidemitsu 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**(16):2325–2336.
- [29] Chen EX, Hotte S, Hirte H, et al. A phase I study of cyclin-dependent kinase inhibitor, AT7519, in patients with advanced cancer: NCIC Clinical Trials Group IND 177 [J]. *British J Cancer*, 2014, **111**(12):2262–2267.
- [30] Diab S, Eckhardt S, Tan A, et al. A phase I study of R547, a novel, selective inhibitor of cell cycle and transcriptional cyclin dependent kinases (CDKs) [J]. *J Clin Oncol*, 2007, **25**(Suppl):3528.
- [31] Baumli S, Endicott JA, Johnson LN. Halogen bonds form the basis for selective P-TEFb inhibition by DRB [J]. *Chem Biol*, 2010, **17**(9):931–936.
- [32] Kryštof V, Rárová L, Liebl J, et al. The selective P-TEFb inhibitor CAN508 targets angiogenesis [J]. *Eur J Med Chem*, 2011, **46**(9):4289–4294.
- [33] Kryštof V, Chamrád I, Jordá R, et al. Pharmacological targeting of CDK9 in cardiac hypertrophy [J]. *Med Res Rev*, 2010, **30**(4):646–666.
- [34] Baumli S, Hole AJ, Noble ME, et al. The CDK9 C-helix exhibits conformational plasticity that may explain the selectivity of CAN508 [J]. *ACS Chem Biol*, 2012, **7**(5):811–816.
- [35] Shao H, Shi S, Huang S, et al. Substituted 4-(thiazol-5-yl)-2-(phenylamino) pyrimidines are highly active CDK9 inhibitors: synthesis, X-ray crystal structures, structure-activity relationship, and anticancer activities [J]. *J Med Chem*, 2013, **56**(3):640–659.
- [36] Hole AJ, Baumli S, Shao H, et al. Comparative structural and functional studies of 4-(thiazol-5-yl)-2-(phenylamino) pyrimidine-5-carbonitrile CDK9 inhibitors suggest the basis for isotype selectivity [J]. *J Med Chem*, 2013, **56**(3):660–670.
- [37] Yamamoto M, Onogi H, Kii I, et al. CDK9 inhibitor FIT-039 prevents replication of multiple DNA viruses [J]. *J Clin Invest*, 2014, **124**(8):3479–3488.
- [38] Albert TK, Rigault C, Eickhoff J, et al. Characterization of molecular and cellular functions of the cyclin-dependent kinase CDK9 using a novel specific inhibitor [J]. *Br J Pharmacol*, 2014, **171**(1):55–68.
- [39] Yin T, Lallena MJ, Kreklau EL, et al. A novel CDK9 inhibitor shows potent antitumor efficacy in preclinical hematologic tumor models [J]. *Mol Cancer Ther*, 2014, **13**(6):1442–1456.
- [40] Chen R, Wierda WG, Chubb S, et al. Mechanism of action of SNS-032, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, in chronic lymphocytic leukemia [J]. *Blood*, 2009, **113**(19):4637–4645.
- [41] Tong WG, Chen R, Plunkett W, et al. Phase I and pharmacologic study of SNS-032, a potent and selective Cdk2, 7, and 9 inhibitor, in patients with advanced chronic lymphocytic leukemia and multiple myeloma [J]. *J Clin Oncol*, 2010, **28**(18):3015–3022.
- [42] Węsińska-Gądecka J, Chamrud I, Kryštof V. Novel potent pharmacological cyclin-dependent kinase inhibitors [J]. *Fut Med Chem*, 2009, **1**(9):1561–1581.