



激酶别构调节剂的研究进展

胡雨彤^{①②}, 舒晓宏^②, 张健^{①*}

① 上海交通大学医学院, 细胞分化与凋亡教育部重点实验室, 上海 200025

② 大连医科大学药学院, 大连 116044

*通讯作者, E-mail: jian.zhang@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2015-05-11; 接受日期: 2015-06-08; 网络版发表日期: 2015-08-25

doi: 10.1360/N032015-00067

摘要 蛋白激酶(protein kinases), 即蛋白质磷酸化酶(protein phosphokinases), 是一类重要的催化蛋白质磷酸化反应的酶。蛋白激酶活性异常是导致肿瘤发生、生长和转移的重要原因之一。因此, 以蛋白激酶作为抗癌靶点, 研发新型抗肿瘤药物, 已经成为药物研发领域中最重要研究方向之一, 蛋白激酶调节剂也成为颇具潜力的抗肿瘤候选药物。目前已有一个蛋白激酶小分子别构调节剂作为癌症的靶向治疗药物获美国食品药品监督管理局批准上市。与以往的 ATP 竞争性调节剂相比, 蛋白激酶别构抑制剂因选择性好、安全性高、动力学缓慢, 而且临床副作用少, 已成为现今蛋白激酶抑制剂研发的主要方向。鉴于蛋白激酶别构调节剂在癌症治疗领域展现出的潜在的价值, 本文将对蛋白激酶别构调节剂的研究进展进行综述。

关键词

蛋白激酶
别构抑制剂
别构作用机制

1 引言

癌症是最常见的恶性肿瘤, 肿瘤细胞的主要特征是难以抑制的过度增殖。时至今日, 癌症仍然是危害人类健康最严重的疾病之一, 其发病率和死亡率极高^[1]。目前, 癌症的治疗方法主要有物理方法(放疗, 如 X-射线等)以及化学治疗方法(化疗, 如顺氯氨铂 DDP、环磷酰胺和 5-氟尿嘧啶等)。这些治疗方法通常是通过引起癌细胞中 DNA 的损伤和染色体结构的改变而导致癌细胞的死亡。由于其作用靶点是细胞中的 DNA, 在癌细胞和正常细胞中没有本质区别, 因此这些传统抗癌药物虽然有效却缺乏选择性, 它们虽然可以在一定程度上杀伤癌细胞, 抑制其增长繁殖, 同时也不可避免地对正常细胞产生不可逆的破坏性副作用, 严重影响机体健康, 从而限制了药物的应用。因此, 目前亟待寻找低毒、高效、高选择性的新型抗癌药物, 从而为癌症治疗领域打开新局面。

正常细胞周期调节失控、细胞信号转导通路异常所导致的恶性增殖是所有癌细胞最本质的特征, 最终表现为蛋白激酶活性的异常上调^[2,3]。蛋白激酶(protein kinases), 即蛋白质磷酸化酶(protein phosphokinases), 是一类重要的催化蛋白质磷酸化反应的酶。人类基因组内共含有 518 个蛋白激酶基因, 占人类基因总数约 2%。蛋白质的磷酸化决定蛋白质的构象和活性, 影响细胞内讯息的传递过程, 以对外界刺激做出适当反应, 因此蛋白激酶在细胞生命过程中起着至关重要的作用, 是人体内最主要的激酶家族之一。其主要功能是把三磷酸腺苷(ATP)上的 γ -磷酸基团转移到底物蛋白质特定的氨基酸残基上, 使底物蛋白磷酸化, 从而改变底物蛋白的空间构象, 参与并激活一系列复杂的细胞信号转导通路, 进而调控细胞代谢、生长、分化、增殖等多种细胞生命过程, 使其发挥出特定的生物学功能, 在真核细胞的生命活动中至关重要^[4]。蛋白激酶活性异常是导致肿瘤发

生、生长和转移的重要原因之一. 因此, 以蛋白激酶作为抗癌靶点, 研发新型抗肿瘤药物, 已经成为药物研发领域最重要的研究方向之一^[5,6], 蛋白激酶调节剂也成为颇具潜力的抗肿瘤候选药物.

别构效应, 是指某种不直接涉及蛋白质活性的物质, 通过与蛋白质活性位点以外的其他位点(别构位点)相结合, 从而引起蛋白质分子的构象变化并导致蛋白质活性改变的现象. 别构效应作为蛋白质不同口袋之间进行通信的一种基本策略, 是一种有效且普遍存在的功能活性调控机制. 传统蛋白激酶药物(靶向于正性结合位点)基本上都具有典型的相似性化学骨架, 而基于不同构象的别构位点, 蛋白激酶别构抑制剂则呈现出化学结构的多样性, 更适合新药的研发. 目前已有 1 个蛋白激酶小分子别构调节剂作为癌症的靶向治疗药物上市^[7]. 与以往的 ATP 竞争性调节剂相比, 蛋白激酶别构调节剂因普适性好、安全性高、动力学缓慢^[8], 而且临床副作用少, 而成为当今蛋白激酶调节剂研发的主要方向^[9].

鉴于蛋白激酶别构调节剂在癌症治疗领域展现出的潜在而深远的价值, 本文将对蛋白激酶别构调节剂的研究进展进行综述.

2 蛋白激酶的分类及其与别构调节剂的作用机制

蛋白激酶调节人体诸多生物学过程, 包括细胞分裂、增殖和凋亡^[10,11]. 一旦活化环上的特定氨基酸残基(丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸)被磷酸化, 蛋白激酶随即转化为活化状态^[12-14]. 尽管蛋白激酶的一级氨基酸序列极具多样性, 但其激酶催化核心结构域的总体结构却高度相似, 此结构域包含较小的氨基末端和较大的羧基末端, ATP 结合位点位于其间的深凹处. 该结构特征对于设计并开发靶向作用于保守的 ATP 结合位点的蛋白激酶调节剂是巨大的挑战^[15-17]. 然而, 充分利用靶向作用于远离 ATP 结合位点的别构调节剂, 可特异性稳定蛋白激酶的非活化构象, 实现蛋白激酶中具有相似构象的各亚型间的高选择性, 同时可避免脱靶效应. 因此, 蛋白激酶别构调节剂的开发受到了越来越多的关注. 目前, 蛋白数据库(PDB)中已收集了若干个蛋白激酶与其别构抑制剂的共晶(图 1). 根据已知的晶体结构, 下文将具体讨论蛋白激酶领域中别构药物的作用机制.

2.1 Akt1

Akt1 是丝氨酸/苏氨酸 AGC 蛋白激酶家族中的一个亚型. 其氨基末端的 PH 区域包含约 100 个氨基酸及 3,4,5-三磷酸肌醇(PIP3)结合区域, 它能调节蛋白质-蛋白质和蛋白质-脂质的相互作用. PIP3 是由 3-磷酸肌醇激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)活化而产生的类脂^[18]. Akt1 在非活化状态下, PH 区域通过极性相互作用与中心激酶催化域紧密联系, 从而阻止 ATP 结合到激酶活性位点. 此时的构象称为“PH-in”构象. 活化的 PIP3 与 Akt 和磷脂酰肌醇依赖性蛋白激酶 1 (phosphatidylinositol-dependent kinase 1, PDK1)结合, 诱导无活性的 Akt 和 PDK1 从细胞质转移到细胞膜, 使 PDK1 获得催化活性, 催化自身 Ser124 和 Thr450 的磷酸化; 同时 Akt 的构象发生改变, 暴露出 Thr308 和 Ser473 磷酸化位点, PDK1 催化 Akt 的 Thr308 位点发生磷酸化, mTORC2 (mammalian target of rapamycin complex 2)则催化其 Ser473 位点发生磷酸化, 从而激活 Akt. Thr308 和 Ser473 的磷酸化是 Akt 激活的必要条件^[19-22]. 当 Akt1 处于活化状态时, PH 区域则呈现出开放的“PH-out”构象, 此时 ATP 及激酶底物可结合到活性位点, Akt1 可发挥其激酶活性. 最近, 已有研究组解析出了全长的 Akt1 与它的两个别构抑制剂(VIII (PDB code: 3O96)和 12j (PDB code: 4EJN))的共晶^[23,24], 如图 1 所示. 从晶体结构中明显看出, 两个别构抑制剂均结合在 PH 区域和中心激酶催化域的相互作用界面上, 作用位点距活性位点有超过 10 Å 的距离(图 1). 别构抑制剂结合到 PH 区域和中心激酶催化域的相互作用界面上可以将 Akt1 锁定在失活、闭合的构象中, 此时 Akt1 的磷脂结合位点被中心激酶催化域阻断, 这反过来也抑制了 Akt1 的膜定位. 综上所述, 我们对 Akt1 的结构和功能有了更加深入的了解, 同时也将为设计高选择性的 Akt1 别构抑制剂来治疗癌症相关疾病提供新的机遇.

2.2 PDK1

3-磷酸肌醇依赖性蛋白激酶 1 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1, PDK1)是蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB/AKT)的上游激酶, 是丝/苏氨酸 AGC 蛋白激酶家族的成员. PDK1 通过与 3,4,5-三磷酸肌醇(PIP3)作用激活相邻的 AKT 分子. 同时, PDK1 被称为 AGC 激酶的掌管者(master), 能够激活

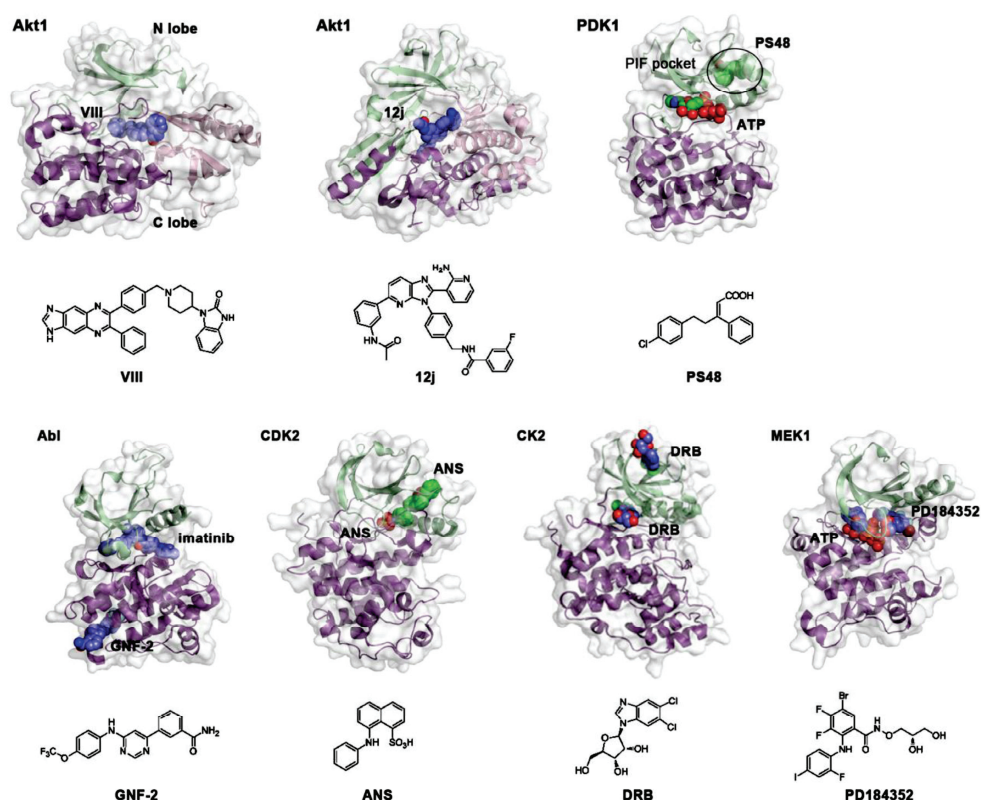


图1 别构调节剂与蛋白激酶的结合模式

包含 AKT 在内的一系列 AGC 激酶家族成员. PDK1 磷酸化这些激酶的保守区域 T-loop 区, 使它们充分激活, 从而调节细胞代谢、生长、扩散、生存和抗凋亡等诸多生理过程.

PDK1 是由 556 个氨基酸组成的单体, 具有氨基端激酶结构域(PIF, 70~359 aa)和羧基端 PH 结构域(459~550 aa), PIF 可以与羧基端底物的疏水基序(HMs)结合^[25]. 一旦 PIF 被占据, PDK1 的激酶活性则显著增强. Hindie 等^[26]筛选了一系列化合物, 这些化合物均直接作用于 PIF 域, 并由此发现了一个低分子量的别构激动剂 PS48 (图 1), 其半数活性浓度 AC_{50} 值为 $8 \mu\text{mol/L}$. 该研究组进一步解析了 PS48 与 PDK1 的共晶结构, 分辨率为 $1.9 \text{ \AA}$ (PDB code: 3HRF). 由 PKD1-PS48 复合物的晶体结构可以看出, 别构激动剂 PS48 结合在 PIF 域, 位于 αC 螺旋, αB 螺旋和 $\beta 4$ 及 $\beta 5$ 小叶之间(图 1). 通过对 PS48 所诱导的 PDK1 的构象变化进行大量分析, 结果表明, PS48 诱导 PIF 域构象以及 ATP 结合位点和活化环发生显著的别构构象变化, 从而稳定 PDK1 激活所必需的构象.

2.3 Abl

酪氨酸激酶属于蛋白激酶家族的成员, 按结构可将其分为受体酪氨酸蛋白激酶(receptor PTKs)和非受体酪氨酸蛋白激酶(non-receptor PTKs). 受体型酪氨酸激酶包括血小板生长因子受体(platelet-derived growth factor receptor, PDGFR)、表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)、成纤维细胞生长因子受体(fibroblast growth factor receptor, FGFR)等成员; 非受体型酪氨酸激酶包括 Abl 激酶、Src 激酶、C-端 Src 激酶等成员, 此类酪氨酸激酶一般没有细胞外结构, 它们通常与细胞膜偶联或存在于胞质中, 在肿瘤组织中非受体型酪氨酸激酶常被激活, 再激活下游的信号转导途径, 促进细胞的增殖、分化并抵抗细胞凋亡, 进而激发肿瘤发生和发展^[27~29].

Abl 活性失调导致慢性髓细胞白血病(chronic myelogenous leukemia, CML)的恶性表型^[30], 其原因是由于形成了活性异常的 Bcr/Abl 融合蛋白, 该融合蛋白可有效破坏 Abl 的自抑制构象, 因此导致 Abl 的活性异常亢进^[31]. Abl 包含两个 Src 同源结构域(SH3

和 SH2) 和 1 个激酶结构域(tyrosine kinase, TK). 紧接着激酶区有 3 个脯氨酸富集区, 能够优先结合含有 SH3 结构域的蛋白质^[32]. TK 对 Abl 催化活性的自抑制现象发挥关键作用. 目前市场上靶向作用于 ATP 结合位点的小分子 Bcr/Abl 酪氨酸激酶抑制剂, 用于 CML 的治疗, 包括 imatinib (STI-571/Gleevec)、nilotinib (AMN-107/Tasiga) 和 dasatinib (Sprycel). 其中 Gleevec 是 2001 年上市的首个小分子 Bcr/Abl 酪氨酸激酶抑制剂. 然而, 肿瘤细胞中高表达的 Abl 存在一个 T334I 突变, 由此产生的抗药性导致一种激酶抑制剂只对患同种疾病的部分患者有效, 并导致癌症晚期患者出现疾病复发现象^[33]. 化学生物学研究表明, 一系列非 ATP 竞争性抑制剂 *N*-苯基嘧啶胺, 可特异性抑制 Bcr/Abl 转染的细胞系并显著克服 T334I 相关的耐药性^[34]. 最有效的别构抑制剂 GNF-2 与 Abl 共晶的 X-射线晶体结构显示, GNF-2 选择性地作用于激酶 C 端的肉豆蔻酰位点上(PDB code: 3K5V)^[35], 此位点远离 ATP 结合位点(图 1). GNF-2 选择性地结合到激酶 C 端的肉豆蔻酰位点上, 使得 SH3 和 SH2 结构域被限制于激酶结构域, 因此 Abl 变为它的非活化状态. 这些研究成果表明, Abl 别构抑制剂对于战胜耐药性问题具有开发潜力.

2.4 CDK2

丝/苏氨酸特异性细胞周期蛋白依赖性激酶(CDKs)是细胞周期调节的核心, CDKs 与细胞周期蛋白(cyclins)、细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子(CKIs)等组成细胞周期调控网络系统. CDKs 活性异常与肿瘤的发生、发展密切相关^[34]. CDKs 的活性调节是细胞周期调控的核心, 它与相应的 cyclin 结合是调控细胞周期进程的必要条件. 目前的研究仍然倾向于研制靶向 CDKs ATP 结合位点的小分子抑制剂, 但是由于激酶种类繁多, 且 ATP 催化中心残基高度保守, 因此虽然已有有效的候选药物进入临床研究阶段, 但选择性较差. Betzi 等^[36]针对 CDK2 和 cyclin 的相互作用界面筛选潜在的结合位点, 并由此发现了一个新型别构抑制剂 8-苯胺基-1-萘磺酸酯(ANS). 由 CDK2-ANS 复合物的共晶结构(PDB code: 3PXF)可以看出, 两个 ANS 分子并排结合在一个较大的疏水口袋, 这个作用位点从 α C 螺旋上方的天冬氨酸-苯丙氨酸-甘氨酸(DFG)域延伸出来, 远离 ATP 结合位点(图 1). 比较 CDK2 单体和 CDK2-ANS 复合物的晶体结构,

不难看出, ANS 的结合引起了 CDK2 大规模的构象改变, 从而导致 α C 螺旋明显向外移动, 进而破坏 CDK2 与 cyclin A 的结合. ANS 结合位点作为一个新型的别构口袋具有潜在的开发前景, 可以针对此位点设计 CDKs 高选择性别构抑制剂.

2.5 CK2

蛋白激酶(CK2)是真核细胞中普遍存在的高度保守的信使非依赖性丝/苏氨酸蛋白激酶, 功能很多, 对细胞生长、增殖、凋亡及生物调节等均具有很重要的调控作用, 其表达失衡与肿瘤的发生发展密切相关^[37]. CK2 由两类催化亚基(α 和 α')和一类调节亚基(β)构成. CK2 可以以全酶的形式存在, 由两个催化亚基(α 和/或 α')和两个调节亚基 β 形成异源四聚体($\alpha_2\beta_2$ 、 $\alpha'_2\beta_2$ 、 $\alpha\alpha'\beta_2$), 也可以以游离的形式存在^[38]. Raaf 等^[39]曾解析出 CK2 与其抑制剂 5,6-二氯-1- β -D-呋喃核糖基苯并咪唑(DRB)的共晶. 由该共晶结构发现, DRB 不仅结合在 CK2 α 的活性位点, 同时也会结合到 N 端 β 小叶及含有 β 4 和 β 5 小叶的 loop 外表面上的一个疏水口袋(PDB code: 3H30, 图 1), 这个疏水口袋恰好位于通常与 CK2 β 形成相互作用的界面上. 比较 CK2 α 单体和 CK2 α -DRB 复合物的晶体结构, 不难看出 DRB 结合到 CK2 α 的别构位点会引起 N 端 β 小叶以及含有 β 4 和 β 5 小叶的 loop 发生明显的构象变化, 由此导致 CK2 α 与 CK2 β 无法结合. 综上所述, DRB 可作为 CK2 别构抑制剂的先导化合物, 继而开发活性更强的小分子抑制剂来破坏 CK2 α 与 CK2 β 的相互作用.

2.6 MEK1

丝裂原活化蛋白(mitogen-activated protein, MAP)激酶 1 (MEK1)是双特异性酪氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 是开发抑制增殖性疾病的小分子抑制剂的潜在靶标^[40]. 2004 年, Ohren 等^[41]解析出人体 MEK1 与 MgATP 及其抑制剂 PD184352 的三元复合物共晶. 由该共晶结构可以看出, PD184352 结合在 MEK1 的一个别构位点上, 这个别构口袋是由毗邻活性位点的疏水深凹处所形成的(PDB code: 1S9J; 图 1). 对比非磷酸化的 MEK1 和 MEK1-PD184352 复合物的晶体结构, 可以看出, 当 PD184352 这个别构抑制剂与 MEK1 结合时, 会引起激酶结构域的 N 端深凹处发生明显的构象变化, 如 α C 螺旋的摆动, 由此将导致 MEK1 被锁定成“封闭”且无催化活性的状态.

2.7 其他蛋白激酶

除了上述 6 种经典的激酶别构抑制剂, 在其他 81 种蛋白激酶中, 别构调节剂同样发挥着它们的重要作用^[42], 这些靶标包括受体酪氨酸激酶^[43]、胰岛素样生长因子 1 受体^[44]、血管内皮生长因子受体^[45]、AMP 活化的蛋白激酶^[46]、6-磷酸果糖激酶^[47]、葡萄糖激酶^[48]、腺苷激酶^[49]、MAP 激酶^[50]、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 Chk1^[51]、蛋白激酶 C^[52]、cAMP 依赖性蛋白激酶^[53]等。

2.7.1 受体酪氨酸激酶

受体酪氨酸激酶(receptor tyrosine kinase, RTKs)是最大的一类酶联受体, 它既是受体, 又是激酶, 能够同配体结合, 并将靶蛋白的酪氨酸残基磷酸化。2010 年, Büttner 等^[43]成功合成了一系列 5-羟色胺衍生物作为 RTKs 抑制剂, 并验证了这些小分子可通过非 ATP 竞争(别构)机制抑制表皮生长因子受体(EGFR)、胰岛素样生长因子-1 受体(IGF-1R)、血管内皮生长因子-2 受体(VEGFR-2)和血管内皮生长因子-3 受体(VEGFR-3)。然而, 目前还没有解出相应的共晶。

2.7.2 AMP 活化的蛋白激酶

单磷酸腺苷活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)是细胞能量的调节器, 当细胞经历代谢应激反应时, AMPK 被 AMP 激活, 导致脂肪酸氧化的增加以产生更多 ATP; 同时, 抑制 ATP 消耗, 综合效应是帮助细胞度过急性损伤, 暂时保障细胞的存活。2013 年, Xiao 等^[46]解析出人源 AMPK 和小分子激动剂的共晶(991 (PDB code: 4CFE)和 A-769662 (PDB code: 4CFF))。小分子结合在激酶结构域和与 β -

亚基碳水化合物结合模块之间, 稳定二者的相互作用。小分子能通过这种作用方式参与 AMPK 的生理调节。该研究为设计和开发用于治疗代谢紊乱的别构小分子激动剂提供了新思路。

2.7.3 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 Chk1

细胞周期检测点激酶 1 (checkpoint kinase 1, Chk1)是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白质激酶。2008 年, Converso 等^[51]借助高通量筛选并结合生物活性测试发现了 Chk1 激酶的别构抑制剂。随后在接近 ATP 生理浓度下测出了 ATP 的 K_m 值。通过以上策略发现了一系列非 ATP 竞争性硫代唑啉酮类抑制剂。该研究同时解析出了活性最佳的化合物与 Chk1 激酶的共晶(化合物 38 (PDB code: 3F9N)), 共晶结构表明化合物 38 结合在距离 ATP 结合位点约 13 Å 的一个别构口袋处。

3 结论

相对于传统的正位药物, 激酶别构调节剂具有显著优势^[54-60]: (1) 对靶标呈现更高的选择性; (2) 减少不良反应的发生; (3) 低毒性。基于已有的别构激酶和别构调节剂, 目前已经总结出一些激酶别构调节剂的广谱结构特征。这将更有利于别构蛋白的发现以及别构调节剂的设计和开发。此外, 近期报道的在计算领域和生物实验领域开发的各种别构口袋的探测方法, 可用来预测先前未被研究其别构效应的激酶的别构位点。由于别构抑制剂所展现出的优势, 我们相信别构药物将会成为新药研发领域中极具前景的研究方向。

致谢 本工作得到新世纪优秀人才支持计划(NCET-12-0355)、上海市青年科技启明星计划(13QA1402300)、国家自然科学基金(81322046, 81302698, 81473137)资助, 特此一并致谢。

参考文献

- 1 Jimeno A, Hidalgo M. Multitargeted therapy: can promiscuity be praised in an era of political correctness? *Crit Rev Oncol Hematol*, 2006, 59: 150-158
- 2 Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. The protein kinase complement of the human genome. *Science*, 2002, 298: 1912-1934
- 3 Johnson LN, Noble ME, Owen DJ. Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation. *Cell*, 1996, 85: 149-158
- 4 Gill A. Protein kinases in drug discovery and development. *Drug Discov Today*, 2004, 9: 16-17
- 5 Zhang J, Yang PL, Gray NS. Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9: 28-39

- 6 Cohen P. Protein kinases-the major drug targets of the twenty-first century? *Nat Rev Drug Discov*, 2002, 1: 309–315
- 7 Zhang C, Bollag G. Scaffold-based design of kinase inhibitors for cancer therapy. *Curr Opin Genet Dev*, 2010, 20: 79–86
- 8 Pargellis C, Tong L, Churchill L, Cirillo PF, Gilmore T, Graham AG, Grob PM, Hickey ER, Moss N, Pav S, Regan J. Inhibition of p38 MAP kinase by utilizing a novel allosteric binding site. *Nat Struct Biol*, 2002, 9: 268–272
- 9 Yang H, Chen T, Bai X, Pei Y. Allosteric kinase inhibitors: a new paradigm for effective and selective modulation of kinase activities. *J Chin Pharm Sci*, 2012, 21: 531–543
- 10 Narlike-Grassow M, Blanco-Aparicio C, Carnero A. The PIM family of serine/threonine kinases in cancer. *Med Res Rev*, 2014, 34: 136–159
- 11 Meharena HS, Chang P, Keshwani MK, Oruganty K, Nene AK, Kannan N, Taylor SS, Kornev AP. Deciphering the structural basis of eukaryotic protein kinase regulation. *PLoS Biol*, 2013, 11: e1001680
- 12 Lu SY, Jiang YJ, Zou JW, Wu TX. Molecular modeling and molecular dynamics simulation studies of the GSK3 β /ATP/substrate complex: understanding the unique P+4 primed phosphorylation specificity for GSK3 β substrates. *J Chem Inf Model*, 2011, 51: 1025–1036
- 13 Lu SY, Huang ZM, Huang WK, Liu XY, Chen YY, Shi T, Zhang J. How calcium inhibits the magnesium-dependent kinase GSK3 β : a molecular simulation study. *Proteins*, 2013, 81: 740–753
- 14 Lu SY, Jiang YJ, Zou JW, Wu TX. Effect of double mutations K214/A-E215/Q of FRATide on GSK3 β : insights from molecular dynamics simulation and normal mode analysis. *Amino Acids*, 2012, 43: 267–277
- 15 El-Gamal M, Anbar HS, Yoo KH, Oh CH. FMS kinase inhibitors: current status and future prospects. *Med Res Rev*, 2013, 33: 599–636
- 16 Manetti F. LIM kinases are attractive targets with many macromolecular partners and only a few small molecule regulators. *Med Res Rev*, 2012, 32: 968–998
- 17 Lu SY, Jiang YJ, Lv J, Zou JW, Wu TX. Role of bridging water molecules in GSK3 β -inhibitor complexes: insights from QM/MM, MD, and molecular docking studies. *J Comput Chem*, 2011, 32: 1907–1918
- 18 Calleja V, Laguerre M, Parker PJ, Larijani B. Role of a novel PH-kinase domain interface in PKB/Akt regulation: structural mechanism for allosteric inhibition. *PLoS Biol*, 2009, 7: e17
- 19 Yoeli-Lerner M1, Toker A. Akt/PKB signaling in cancer: a function in cell motility and invasion. *Cell Cycle*, 2006, 5: 603–605
- 20 Nakanishi K, Sakamoto M, Yamasaki S, Todo S, Hirohashi S. Akt phosphorylation is a risk factor for early disease recurrence and poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Cancer*, 2005, 103: 307–312
- 21 Jiang BH, Liu LZ. PI3K/PTEN signaling in angiogenesis and tumor genesis. *Adv Cancer Res*, 2009, 102: 19–65
- 22 Morgan TM, Koreckij TD, Corey E. Targeted therapy for advanced prostate cancer: inhibition of the PI3K/Akt/mTOR pathway. *Curr Cancer Drug Targets*, 2009, 9: 237–249
- 23 Wu WI, Voegtli WC, Sturgis HL, Dizon FP, Vigers GP, Brandhuber BJ. Crystal structure of human Akt1 with an allosteric inhibitor reveals a new mode of kinase inhibition. *PLoS One*, 2011, 5: e12913
- 24 Ashwell MA, Lapierre JM, Brassard C, Bresciano K, Bull C, Cornell-Kennon S, Eathiraj S, France DS, Hall T, Hill J, Kelleher E, Khanapurkar S, Kizer D, Koerner S, Link J, Liu Y, Makhija S, Moussa M, Namdev N, Nguyen K, Nicewonger R, Palma R, Szwaya J, Tandon M, Uppalapati U, Vensel D, Volak LP, Volckova E, Westlund N, Wu H, Yang RY, Chan TCK. Discovery and optimization of a series of 3-(3-phenyl-3H-imidazo[4,5-b]pyridine-2-yl)pyridine-2-amines: orally bioavailable, selective, and potent ATP-independent Akt inhibitors. *J Med Chem*, 2012, 55: 5291–5310
- 25 Pearce LR, Komander D, Alessi DR. The nuts and bolts of AGC protein kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010, 11: 9–22
- 26 Hindie V, Stroba A, Zhang H, Lopez-Garcia LA, Idrisova L, Zeuzem S, Hirschberg D, Schaeffer F, Jorgensen TJD, Engel M, Alzari PM, Biondi RM. Structure and allosteric effects of low-molecularweight activators on the protein kinase PDK1. *Nat Chem Biol*, 2009, 5: 758–764
- 27 Summy JM, Gallick GE. Treatment for advanced tumors: SRC reclaims center stage. *Clin Cancer Res*, 2006, 12: 1398–1401
- 28 Schenone S, Manetti F, Botta M. SRC inhibitors and angiogenesis. *Curr Pharm Des*, 2007, 13: 2118–2128
- 29 Huang W, Wang G, Shen Q, Liu X, Lu S, Geng L, Huang Z, Zhang J. ASBench: benchmarking sets for allosteric discovery. *Bioinformatics*. 2015, 31: 2598–2600
- 30 Pluk H, Dorey K, Superti-Furga G. Autoinhibition of c-Abl. *Cell*, 2002, 108: 247–259
- 31 Skora L, Mestan J, Fabbro D, Jahnke W, Grzesiek S. NMR reveals the allosteric opening and closing of Abelson tyrosine kinase by ATP-site and myristoyl pocket inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: E4437–E4445
- 32 Kipreos ET, Wang JY. Cell cycle-regulated binding of c-Abl tyrosine kinase to DNA. *Science*, 1992, 256: 382–385
- 33 O'Hare T, Eide CA, Deininger MWN. Bcr-Abl kinase domain mutations, drug resistance, and the road to a cure for chronic myeloid leukemia. *Blood*, 2007, 110: 2242–2249

- 34 Musgrove EA, Caldon CE, Barraclough J, Stone A, Sutherland RL. Cyclin D as a therapeutic target in cancer. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11: 558–572
- 35 Zhang J, Adrian FJ, Jahnke W, Cowan-Jacob SW, Li AG, Iacob RE, Sim T, Powers J, Dierks C, Sun F, Guo GR, Ding Q, Okram B, Choi Y, Wojciechowski A, Deng X, Liu G, Fendrich G, Strauss A, Vajpai N, Grzesiek S, Tuntland T, Liu Y, Bursulaya B, Azam M, Manley PW, Engen JR, Daley GQ, Warmuth M, Gray NS. Targeting Bcr-Abl by combining allosteric with ATP-binding-site inhibitors. *Nature*, 2010, 463: 501–506
- 36 Betzi S, Alam R, Martin M, Lubbers DJ, Han H, Jakkaraj SR, Georg GI, Schonbrunn E. Discovery of potential allosteric ligand binding site in CDK2. *ACS Chem Biol*, 2011, 6: 492–501
- 37 Cozza G, Pinna LA, Moro S. Kinase CK2 inhibition: an update. *Curr Med Chem*, 2013, 20: 671–693
- 38 Singh NN, Ramji DP. Protein Kinase CK2, an important regulator of the inflammatory response. *J Mol Med*, 2008, 86: 887–897
- 39 Raaf J, Brunstein E, Issinger OG, Niefind K. The CK2 α /CK2 β interface of human protein kinase CK2 harbors a binding pocket for small molecules. *Chem Biol*, 2008, 15: 111–117
- 40 Rusconi P, Caiola E, Broggin M. RAS/RAF/MEK inhibitors in oncology. *Curr Med Chem*, 2012, 19: 1164–1176
- 41 Ohren JF, Chen H, Pavlovsky A, Whitehead C, Zhang E, Kuffa P, Yan C, McMonnell P, Spessard C, Banotai C, Mueller WT, Delaney A, Omer C, Sebolt-Leopold J, Dudley DT, Leung IK, Flamme C, Warmus J, Kaufman M, Barrett S, Tecle H, Hasemann CA. Structures of human MAP kinase kinase 1 (MEK1) and MEK2 describe novel noncompetitive kinase inhibition. *Nat Struct Mol Biol*, 2004, 11: 1192–1197
- 42 Huang Z, Mou L, Shen Q, Lu S, Li C, Liu X, Wang G, Li S, Geng L, Chen G, Zhang J. ASD v2.0: updated content and novel features focusing on allosteric regulation. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(Database issue): D510–D516
- 43 Büttner A, Cottin T, Xu J, Tzaqkaroulaki L, Giannis A. Serotonin derivatives as a new class of non-ATP-competitive receptor tyrosine kinase inhibitors. *Bioorg Med Chem*, 2010, 18: 3387–3402
- 44 Blum G, Gazit A, Levitzki A. Development of new insulin-like growth factor-1 receptor kinase inhibitors using catechol mimics. *J Biol Chem*, 2003, 278: 40442–40454
- 45 Manley PW, Bold G, Bruggen J, Fendrich G, Furet P, Mestan J, Schnell C, Stolz B, Meyer T, Meyhack B, Stark W, Strauss A, Wood J. Advances in the structural biology, design and clinical development of VEGF-R kinase inhibitors for the treatment of angiogenesis. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1697: 17–27
- 46 Xiao B, Sanders MJ, Carmena D, Bright NJ, Haire LF, Underwood E, Patel BP, Heath RB, Walker PA, Hallen S, Giordanetto F, Martin SR, Carling D, Gamblin SJ. Structural basis of AMPK regulation by small molecule activators. *Nat Commun*, 2013, 4: 3017
- 47 Marinho-Carvalho MM, Costa-Mattos PV, Spitz GA, Zancan P, Sola-Penna M. Calmodulin upregulates skeletal muscle 6-phosphofructo-1-kinase reversing the inhibitory effects of allosteric modulators. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1794: 1175–1180
- 48 akahashi K, Hashimoto N, Nakama C, Kamata K, Sasaki K, Yoshimoto R, Ohyama S, Hosaka H, Maruki H, Nagata Y, Eiki J, Nishimura T. The design and optimization of a series of 2-(pyridine-2-yl)-1H-benzimidazole compounds as allosteric glucokinase activators. *Bioorg Med Chem*, 2009, 17: 7042–7051
- 49 Butini S, Gemma S, Brindisi M, Borrelli G, Lossani A, Ponte AM, Torti A, Maga G, Marinelli L, La Pietra V, Fiorini I, Lamponi S, Campiani G, Zisterer DM, Nathwani SM, Sartini S, La Motta C, Da Settimo F, Novellino E, Focher F. Non-nucleoside inhibitors of human adenosine kinase: synthesis, molecular modeling, and biological studies. *J Med Chem*, 2011, 54: 1401–1420
- 50 Montalban AG, Boman E, Chang CD, Ceide SC, Dahl R, Dalesandro D, Delaet NG, Erb E, Ernst JT, Gibbs A, Kahl J, Kessler L, Lundstrom J, Miller S, Nakanishi H, Roberts E, Saiah E, Sullivan R, Wang Z, Larson CJ. The design and synthesis of novel α -ketoamide-based p38 MAP kinase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*, 2008, 18: 1772–1777
- 51 Converso A, Hartingh T, Garbaccio RM, Tasber E, Rickert K, Fraley ME, Yan Y, Kreatsoulas C, Stirdivants S, Drakas B, Walsh ES, Hamilton K, Buser CA, Mao X, Abrams MT, Beck SC, Tao W, Lobell R, Sepp-Lorenzino L, Zugay-Murphy J, Sardana V, Munshi SK, Jezequel-Sur SM, Zuck PD, Hartman GD. Development of thioquinazolinones, allosteric Chk1 kinase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*, 2009, 19: 1240–1244
- 52 Frohner W, Lopez-Garcia LA, Neimanis S, Weber N, Navratil J, Maurer F, Stroba A, Zhang H, Biondi RM, Engel M. 4-Benzimidazolyl-3-phenylbutanoic acids as novel PIF-pocket-targeting allosteric inhibitors of protein kinase PKC ξ . *J Med Chem*, 2011, 54: 6714–6723
- 53 Christian F, Szaszak M, Friedl S, Drewianka S, Lorenz D, Goncalves A, Furkert J, Vargas C, Schmieder P, Gotz F, Zuhlke K, Moutty M, Gottert H, Joshi M, Reif B, Haase H, Morano I, Grossmann S, Klukovits A, Gaspar R, Noack C, Berqmann M, Kass R, Hampel K, Kashin D, Genieser HG, Herberg FW, Willoughby D, Cooper DM, Baillie GS, Houslay MD, von Kries JP, Zimmermann B, Rosenthal W, Klussmann E. Small molecule AKAP-protein kinase A (PKA) interaction disrupts that activate PKA interfere with compartmentalized cAMP signaling

in cardiac myocytes. *J Biol Chem*, 2011, 286: 9079–9096

- 54 Nussinov R, Tsai CJ. The different ways through which specificity works in orthosteric and allosteric drugs. *Curr Pharm Des*, 2012, 18: 1311–1316
- 55 Fang Z, Grutter C, Rauh D. Strategies for the selective regulation of kinases with allosteric modulators: exploring exclusive structural features. *ACS Chem Biol*, 2012, 8: 58–70
- 56 Wootten D, Christopoulos A, Sexton PM. Emerging paradigms in GPCR allostery: implications for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*, 2013, 12: 630–644
- 57 Palmieri L, Rastelli G. α C helix displacement as a general approach for allosteric modulation of protein kinases. *Drug Discov Today*, 2012, 18: 407–414
- 58 Lamba V, Ghosh I. New directions in targeting protein kinases: focusing upon true allosteric and bivalent inhibitors. *Curr Pharm Des*, 2012, 18: 2936–2945
- 59 Taly A, Corring PJ, Guedin D, Lestage P, Changeux JP. Nicotinic receptors: allosteric transitions and therapeutic targets in the nervous system. *Nat Rev Drug Discov*, 2009, 8: 733–750
- 60 Christopoulos A. Allosteric binding sites on cell-surface receptors: novel targets for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*, 2002, 1: 198–210

Progress in allosteric modulators of protein kinases

Yutong Hu^{1,2}, Xiaohong Shu², Jian Zhang^{1*}

1 Key Laboratory of Cell Differentiation and Apoptosis of Chinese Ministry of Education; School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200025, China

2 College of Pharmacy, Dalian Medical University, Dalian 116044, China

*Corresponding author (email: jian.zhang@sjtu.edu.cn)

Abstract: Protein kinases are protein phosphokinases that modify other proteins by chemically adding phosphate groups on their residues (phosphorylation). Aberrant activity of protein kinases usually results in tumor growth and metastasis, and then protein kinases has been one of the most significant research areas in the design and development of novel anticancer drugs. Currently one kinase allosteric drug has been approved by the US Food and Drug Administration. Kinase allosteric drugs possess several distinct advantages over ATP competitive drugs that bind to the same kinases, including higher selectivity, lower toxicity, slow kinetics as well as less side effects. The development of kinase allosteric drugs appears to be a promising new trend in drug discovery. Given the immense advantages of kinase allosteric modulators in cancer therapy, this review focuses on the progress in allosteric modulators of protein kinases.

Keywords: protein kinases, allosteric modulators, allosteric regulatory mechanism