

Polo 样激酶抑制剂在肿瘤治疗中的应用

The Application of Polo-like Kinase Inhibitor for Cancer Therapy

SONG Qi-bin, CHU Yu-xin, WANG Gui-hua

宋启斌, 褚玉新, 王桂华

(武汉大学人民医院肿瘤中心, 湖北 武汉 430060)

摘要: Polo 样激酶(PLK)是一类高度保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,在细胞有丝分裂调控点上发挥重要作用。大约 80%的人类肿瘤都表达高水平的 PLK,PLK 在肿瘤中过度表达而在正常细胞中很少表达的特性使之成为一种很好的抗癌靶点。PLK 抑制剂可以干扰癌细胞有丝分裂的不同阶段,如中心体成熟、纺锤体形成、染色体分离、胞质分裂等,导致有丝分裂停滞,严重干扰细胞周期进程,最终导致癌细胞死亡。当前,有一些 PLK 抑制剂处于临床前研发阶段,有些正处在临床试验阶段。全文着重论述近年来 PLK 抑制剂在肿瘤治疗中的应用。

关键词: Polo 样激酶;有丝分裂;肿瘤;抑制剂

中图分类号: R730.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0242(2013)01-0037-04

Polo 样激酶(polo-like kinase, PLK)是一类高度保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,其 N 端均具有一个高度同源的丝氨酸/苏氨酸激酶结构域, C 端具有调节 PLK 活性及亚细胞动态定位的特征性结构域(polo-box domain, PBD)。PLK 家族成员较多,其在人体内有 4 种亚型,分别是 PLK1、PLK2、PLK3 和 PLK4,它们在细胞周期各个时相的调控中均发挥重要作用。在这 4 个家族成员中,目前对 PLK1 的研究最为透彻^[1]。PLK 蛋白调控细胞周期中很多关键步骤,包括双极纺锤体的形成、染色体分离、后期促进复合物的调控,以及胞质分裂^[2]。以 PLK 为靶点抑制有丝分裂中纺锤体形成,从而阻止癌细胞分裂是一种很有效的抗癌策略。

1 PLK 在肿瘤中的表达

PLK 在肿瘤有丝分裂进程中发挥重要作用,负责调节 G₂ 期向 M 期转变时 CDK/cyclin 复合物的激活、中心体成熟、胞质分离及 DNA 损伤修复等^[3]。PLK1 是 PLK 家族中最具代表性的成员,PLK1 蛋白表达于细胞分裂期,正常情况下,只有在增殖的成体

组织(如脾和睾丸)中才可以检测到^[4]。高水平的 PLK1 是癌细胞增殖的标志,见于很多恶性肿瘤,包括乳腺癌、结肠癌、子宫内膜癌、鼻咽癌、食管癌、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、胃癌、恶性胶质瘤、非霍奇金淋巴瘤、白血病、黑色素瘤^[5]。肿瘤中 PLK1 水平与局部肿瘤的复发密切相关,而且 PLK1 可以作为判断肿瘤预后的标志^[6]。此外,分裂越旺盛,转移风险越高的肿瘤,PLK1 表达水平越高,说明 PLK1 可能在肿瘤侵袭和转移中发挥作用^[4]。

2 靶向 PLK1 的 RNA 干扰技术

利用 RNA 干扰技术(RNAi)使人们更深入地认识到 PLK1 在癌细胞分裂中所发挥的作用,以及 PLK1 抑制剂的分子机制。利用 siRNA 抑制癌细胞中的 PLK1 之后,纺锤体形成受阻,成熟障碍,癌细胞分裂停滞,表现为单极纺锤体上的染色体散在分布,癌细胞大量凋亡^[7]。这种凋亡与 p53 蛋白并不直接相关,而且,相对于野生型细胞而言,p53 缺失的细胞对 PLK1 抑制剂更加敏感^[8]。

通过基因组 RNAi 筛查发现 PLK1 是 Ras 驱动细胞存活的关键因子,这些细胞要经历 Ras 诱导的

收稿日期:2012-08-07;修回日期 2012-09-18

通讯作者:褚玉新,E-mail: 258438514@qq.com

有丝分裂应激,可能对 PLK1 抑制剂高度敏感^[9]。K-ras 突变在非小细胞肺癌中很常见,可以作为 PLK1 抑制剂疗效评估的指标^[10]。利用短发夹 RNA 抑制 PLK1 会减少肺癌 A549 细胞株中癌细胞的生长,抑制 PLK1 在肿瘤中的表达。而且,应用 siRNA 干扰 PLK1 会抑制小鼠肝脏中 A549 细胞的生长,这说明 PLK1 在肺癌肝转移中发挥作用^[11]。这些体内实验的研究结果证实了 PLK1 抑制剂在体外所发挥的抗癌作用,也为 PLK1 作为新靶点的药物研发提供了依据。

3 处于临床前研究的 PLK1 抑制剂

与大多数以蛋白激酶为靶点的抗癌药物相似,当前 PLK1 抑制剂的研发主要是通过竞争性结合 ATP 位点直接抑制 PLK1 的催化活性。最近,科学家通过高通量筛查技术发现了一系列的喹唑啉衍生物,可以竞争性结合 ATP 的核心区域,从而抑制了 PLK1 的激酶活性^[12]。

3.1 GSK461364

GSK461364 是由 Glaxo Smith Kline 公司研发的一种 ATP 竞争性 PLK1 抑制剂,可以与 PLK1 快速形成可逆的复合物,对 PLK1 的抑制力是 PLK2 和 PLK3 的 400 倍。GSK461364 也是一种噻吩苯并咪唑类化合物,在不同浓度下对细胞分裂产生不同的影响,当浓度为 300nmol/L 时可致细胞周期 G₂ 期延迟,10~300 nmol/L 时可致有丝分裂 M 期停滞。体外实验表明,GSK461364 对多达 120 种肿瘤细胞系的增殖有抑制活性,在 83% 以上的受试细胞系中,其 IC₅₀ 小于 50nmol/L。已进行的 I 期临床研究(实体瘤)显示,20% 的受试者产生了反应^[13],后续 II 期临床研究正在进行中。

利用 MDA-MB-231 人乳腺癌细胞系的脑转移变体(231-BR)的小鼠肿瘤模型,实验人员研究了 GSK461364 对预防乳腺癌的脑转移的效果。结果表明,GSK461364 对 231-BR 细胞有较强的抗增殖作用,IC₅₀ 为 5nmol/L;超过 70% 细胞停滞在 G₂-M 期;脑转移抑制率为 60%^[14]。这就提示 PLK1 可能是预防乳腺癌脑转移的靶点。

3.2 LFM-A13

LFM-A13 最早被认为是 Btk (Bruton S tyrosine

kinase) 特异性阻断剂,近来研究发现其可能也是 PLK1 潜在的小分子抑制剂。LFM-A13 作为 PLK1 的小分子化学抑制剂,其在爪蟾的 Plx1(PLK1 的同源基因)的作用位点为 Plx1 丝/苏氨酸激酶结构域的 ATP 结合位点,通过与激酶结构域中 ATP 位点结合而引起 Plx1 构象的改变,抑制 Plx1 激酶的活性,从而引起肿瘤细胞有丝分裂的停滞,形成单极或多极异常纺锤体。LFM-A13 抑制 PLK1 的 IC₅₀ 为 10.3 mmol/L,LFM-A13 最大的优点在于它能够选择性抑制 PLK1 的活性,而对其他含有丝/苏氨酸激酶结构域非 PLK 家族的激酶,如:CDK1、CDK2、CDK3、CHK1、IKK、MAPK1 和 SAPK2a;以及 10 种酪氨酸激酶,如:ABL、BRK、BMX、c-KIT、FYN、IGF1R、PDGFR、JAK2、MET 和 YES 等均不产生抑制作用。与其他 PLK1 的小分子抑制剂不同的是,LFM-A13 主要在乳腺癌细胞中起作用,体内外实验均证明能有效地抑制人类乳腺癌细胞的增殖,与目前临床上使用的抗肿瘤药物,如紫杉醇、吉西他滨等的作用效果相当^[15]。由此可见,LFM-A13 在体内的活性和安全性使得其在临床抗乳腺癌靶向治疗中具有良好的应用前景。

3.3 GW843682X

GW843682X 是一种新型的 ATP 竞争性 PLK 抑制剂,可以选择性抑制 PLK1 和 PLK3 的活性,对大多数肿瘤都有广泛的抑制力。在乳腺癌 NCI-H460 细胞株中,GW843682X 可诱导暂时性的 G₂-M 期停滞,有丝分裂纺锤体缺失,多核细胞形成,最终导致癌细胞凋亡,而正常的二倍体成纤维细胞很少凋亡。

GW843682X 是一种很强的 PLK 抑制剂,其抑制 PLK1 的 IC₅₀ 为 2.2nmol/L,抑制 PLK3 的 IC₅₀ 为 9.1nmol/L。而且,GW843682X 对 PLK 的选择性是 CDK1 和 CDK2 的 100 倍,这样就可以减少脱靶效应。实验证明,耐药的肿瘤细胞,如多药耐药(MDR)阳性的癌细胞对 GW843682X 同样敏感,这提示 GW843682X 并不是 P-糖蛋白外排泵的底物,可以克服肿瘤耐药^[16]。

GW843682X 不仅是一种有效的抗癌药物,而且对于深入研究 PLK1 和 PLK3 的功能也有重要作用。

3.4 BI 2536

BI 2536 是一种二氢蝶啶酮类化合物,通过与 PLK1 的结构域结合,抑制 PLK1 活性,引起肿瘤细

胞有丝分裂的异常,如使细胞停滞于G₂/M期等,进而诱导细胞的凋亡。BI 2536抑制PLK1活性的IC₅₀为0.83 nmol/L,对PLK1的抑制力是其它63种蛋白激酶的10 000倍^[17]。

BI 2536可以抑制32种人类癌细胞株的增殖(EC₅₀=2~25nmol/L)。经BI 2536处理后的细胞都阻滞于G₂-M期,形成单极纺锤体,与siRNA干扰PLK1之后的变化相似。BI 2536 40~50mg/kg,每周2次注射荷瘤小鼠(包括A549和NCI-H460细胞株)之后,Polo-阻滞的癌细胞逐渐增多,随后出现大量凋亡。说明BI 2536能够在体内介导癌细胞有丝分裂停滞和凋亡^[17]。

最近有报道称,与野生型细胞相比,K-ras突变的癌细胞和移植瘤动物对BI2536更加敏感。这些研究结果进一步说明K-ras突变的癌细胞更加依赖于PLK1进行有丝分裂。靶向PLK1的特异性药物BI 2536可能是通过加重癌细胞有丝分裂应激来选择性地杀死K-ras突变细胞,这样对K-ras突变的癌症患者产生良好的疗效^[9]。因此,BI 2536在对PLK1的作用浓度及选择性上都有明显的优势。目前BI 2536已进入治疗癌症的I期临床试验。

3.5 RO3280

RO3280也是一种新型的ATP竞争性PLK1抑制剂,对PLK1有很强的抑制力和良好的选择性,不仅在体外有抗肿瘤活性,而且对异种移植的小鼠肿瘤模型也有强大的抗癌作用。RO3280抑制PLK1的IC₅₀为3nM。细胞实验中发现,RO3280对肺癌H82作用的EC₅₀为6nM。

RO3280是一种强大的选择性PLK1抑制剂,对48种自身的激酶无抑制性,而对PLK1结合力是其他激酶的500多倍。RO3280对众多肿瘤细胞系都有很强的抗增殖活性,包括肺癌、结肠癌、乳腺癌、前列腺癌和皮肤癌。最初检测RO3280的EC₅₀显示与MDR1或MRP1关系不明显,但与p21的表达水平相关。一系列的小鼠异种移植瘤模型中都发现RO3280在体内有抗肿瘤活性,HT-29结直肠癌细胞株最具代表性。如果RO3280按照注射剂量40mg/kg对小鼠每周注射1次,肿瘤平均体积缩小72%,如果注射次数增加,肿瘤可以完全退化^[18]。

3.6 ON 01910

ON 01910是一种非ATP竞争的PLK1小分子

化学抑制剂,能有效抑制肿瘤细胞有丝分裂过程中纺锤体形成,并使染色体不能与纺锤丝正常相连等,引起细胞周期停滞和细胞生长抑制,从而激活细胞的凋亡通路。在体外,对100多种不同人类肿瘤细胞系进行的实验显示,ON 01910具有广泛的抗肿瘤活性,包括对多种耐药细胞系,其IC₅₀为50~250nmol/L^[19]。

在肿瘤细胞系及其异种移植模型中,ON 01910与紫杉醇、奥沙利铂、阿霉素、依立替康等抗癌药联用时,均显示出抗肿瘤协同作用。体外和体内实验均表明,无论单一用药或联合用药,ON 01910都具有抗肿瘤活性^[20]。由于ON 01910对PLK1表现为底物依赖性和ATP非依赖性抑制,因此被认为可能结合于PLK1的ATP结合区以外区域。另一方面,除作用于PLK1外,在浓度较高时,ON 01910亦可抑制PDGF、Abl和Flt-1,而当浓度进一步升高时,还可抑制CDK1、PLK2、Src和Fyn。由于其他激酶并不具有PBD,提示ON 01910可能作用于激酶催化区附近的底物结合位点。

IV期临床研究表明,ON 01910在体内能快速分布,消除半衰期为26h,每周24h静脉滴注的耐受性良好,其剂量限制性毒性表现为疲劳;随着剂量增加,药时曲线下面积(AUC)呈非线性增加;为期3d的连续静脉滴注所致剂量限制性毒性反应包括下肢无力、中性粒细胞减少症和低钠血症^[20]。ON 01910的优点于是非ATP竞争性抑制剂,用药剂量低,毒性小,不会引起正常细胞凋亡,而且与其他抗肿瘤药物具有很好的协同作用。

3.7 Compound 36

Compound 36是一种新型的咪唑并吡啶衍生物,在裸鼠异种移植瘤模型中表现出良好的抗肿瘤活性。Millipore公司对212种激酶做了筛选实验,发现Compound 36对PLK1有高度选择性。在被检测的212种激酶中,当Compound 36的处理浓度为1μM时,超过50%的PLK2和PLK3被抑制,PLK2的IC₅₀为21nM,PLK3的IC₅₀为178nM。以Hela-luc异种移植的荷瘤大鼠为受试对象,研究Compound 36在体内的抗肿瘤活性,大鼠静脉输注Compound 36 48h后,肿瘤生长明显受抑制,以0.45 mpk/h输注,3d后肿瘤缩小38%,而以0.6 mpk/h输注,3d后肿瘤缩小74%。注射Compound 36会诱导轻度可逆

的白细胞减少,但不会导致体重减轻和腹泻等严重的毒性反应^[21]。

总之,PLK1 是调控有丝分裂的关键激酶之一,对癌细胞的增殖有至关重要的作用,利用 RNA 干扰技术和化学合成 PLK1 小分子抑制剂等方法阻断 PLK1 的表达或降低其激酶活性,能够有效抑制肿瘤细胞的增殖,诱导肿瘤细胞凋亡,但对正常细胞没有明显抑制,因此 PLK1 在肿瘤靶向治疗中具有重要的应用前景。很多 PLK1 抑制剂已获得体内外肿瘤细胞及肿瘤嫁接模型实验数据的支持,部分已进入临床试验阶段。从目前的发展趋势来看,PLK1 抑制剂将会在未来肿瘤的治疗中发挥越来越重要作用。

参考文献:

- [1] Lu S, Wu MQ, Yan TT, et al. Advances in the research on PLK1 and its small molecular inhibitors[J]. Progress in Pharmaceutical Sciences, 2010, 34(3):97-104. [卢帅, 吴梦秋, 颜婷婷, 等. Polo 样激酶 1 及其小分子抑制剂的研究进展[J]. 药学进展, 2010, 34(3):97-104.]
- [2] McInnes C, Wyatt MD. PLK1 as an oncology target: current status and future potential[J]. Drug Discov Today, 2011, 16(13-14):619-625.
- [3] Degenhardt Y, Lampkin T. Targeting Polo-like kinase in cancer therapy[J]. Clin Cancer Res, 2010, 16(2):384-389.
- [4] Strebhardt K, Ullrich A. Targeting polo-like kinase 1 for cancer therapy[J]. Nature Review Cancer, 2006, 6(4):321-330.
- [5] Renner AG, Dos Santos C, Recher C, et al. Polo-like kinase 1 is overexpressed in acute myeloid leukemia and its inhibition preferentially targets the proliferation of leukemic cells [J]. Blood, 2009, 114(3):659-662.
- [6] Rödel, Keppner S, Capalbo G, et al. Polo-like kinase 1 as predictive marker and therapeutic target for radiotherapy in rectal cancer [J]. Am J Pathol, 2010, 177(2):918-929.
- [7] Liu X, Erikson RL. Polo-like kinase(Plk)1 depletion induces apoptosis in cancer cells[J]. Proc Natl Acad Sci, 2003, 100(10):5789-5794.
- [8] Sanhaji M, Kreis NN, Zimmer B, et al. p53 is not directly relevant to the response of Polo-like kinase 1 inhibitors[J]. Cell Cycle, 2012, 11(3):543-553.
- [9] Luo J, Emanuele MJ, Li D, et al. A genome-wide RNAi screen identifies multiple synthetic lethal interactions with the Ras oncogene[J]. Cell, 2009, 137(5):835-848.
- [10] Riely GJ, Marks J, Pao W. KRAS mutations in non-small cell lung cancer [J]. Proc Am Thorac Soc, 2009, 6(2):201-205.
- [11] Spankuch B, Matthes Y, Knecht R, et al. Cancer inhibition in nude mice after systemic application of U6 promoter-driven short hairpin RNAs against PLK1 [J]. J Natl Cancer Inst, 2004, 96(11):862-872.
- [12] Beria I, Ballinari D, Bertrand JA, et al. Identification of 4,5-dihydro-1H-pyrazolo[4,3-h]quinazoline derivatives as a new class of orally and selective polo-like kinase 1 inhibitors[J]. J Med Chem, 2010, 53(9): 3532-3551.
- [13] Schöffski P. Polo-like Kinase (PLK) inhibitors in preclinical and early clinical development in oncology [J]. Oncologist, 2009, 14(6):559-570.
- [14] Blagden S, Olmos D, Sharma R, et al. Phase I first-in-human study of the Polo-like kinase-1 selective inhibitor, GSK461364, in patients with advanced solid tumors [J]. J Clin Oncol, 2009, 27(s15): 3536.
- [15] Uckun FM, Dibirdik I, Qazi S, et al. Anti-breast cancer activity of LFM-A13, a potent inhibitor of Polo-like kinase (PLK) [J]. Bioorg Med Chem, 2007, 15(2):800-814.
- [16] Lansing TJ, McConnell RT, Duckett DR, et al. In vitro biological activity of a novel small-molecule inhibitor of polo-like kinase 1 [J]. Mol Cancer Ther, 2007, 6(2):450-459.
- [17] Steegmaier M, Hoffmann M, Baum A, et al. BI 2536, a potent and selective inhibitor of polo-like kinase 1, inhibits tumor growth in vivo [J]. Curr Biol, 2007, 17(4):316-322.
- [18] Chen S, Bartkovitz D, Cai J, et al. Identification of novel, potent and selective inhibitors of Polo-like kinase 1 [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2012, 22(2):1247-1250.
- [19] Chun AW, Cosenza SC, Taft DR, et al. Preclinical pharmacokinetics and in vitro activity of ON 01910.Na, a novel anti-cancer agent[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2009, 65(1):177-186.
- [20] Jineno A, Li J, Messer smith W, et al. Phase I study of ON 01910, a novel modulator of the Polo-like kinase 1 pathway, in adult patients with solid tumors [J]. J Clin Oncol, 2008, 26(34):5504-5510.
- [21] Sato Y, Onozaki Y, Sugimoto T, et al. Imidazopyridine derivatives as potent and selective Polo-like kinase (PLK) inhibitors [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2009, 19(16):4673-4678