

Inhibiteurs chimiques des kinases dépendantes des cyclines : recherche et applications thérapeutiques potentielles

**Annie Borgne
Laurent Meijer**

Les protéine-kinases dépendantes des cyclines (CDK) sont responsables du déclenchement et de la coordination harmonieuse des différentes phases du cycle de division cellulaire. Elles interviennent également dans le fonctionnement des cellules nerveuses (CDK5) et dans le contrôle de la transcription (CDK7, CDK8, CDK9). Depuis quelques années, des criblages intensifs ont conduit à l'identification d'une première génération d'inhibiteurs chimiques des CDK. Certains de ces composés ont une sélectivité et une efficacité remarquables. Beaucoup d'entre eux ont été co-cristallisés avec CDK2 et leurs interactions avec la kinase ont été analysées en détail : tous se localisent dans la poche de fixation de l'ATP de l'enzyme et établissent des liaisons hydrogène avec les résidus Leu 83 et Glu 81. Ces inhibiteurs ont des propriétés antimitotiques : ils bloquent la prolifération cellulaire en G1 et, à plus forte dose, en G2/M. De plus, ils facilitent, ou même déclenchent, l'apoptose des cellules en prolifération. En revanche, ils protègent les cellules neuronales de l'apoptose. L'évaluation thérapeutique de ces inhibiteurs est particulièrement avancée en chimiothérapie anticancéreuse. L'apparition prochaine de nouveaux inhibiteurs très sélectifs et puissants laisse espérer leur application efficace dans diverses maladies humaines.

ADRESSES

A. Borgne : étudiante postdoctorale, boursière de l'association pour la recherche sur le cancer. Laboratoire cycle cellulaire de l'Imperial Cancer Research Fund (directeur Paul Nurse).
L. Meijer : directeur de recherche au Cnrs. Station biologique de Roscoff, BP 74, 29682 Roscoff Cedex, France.

Un groupe d'enzymes, les protéine-kinases dépendantes des cyclines (CDK1 à CDK9) a fait l'objet d'un nombre considérable d'études au cours des dernières années* [1-3]. Les CDK sont activées

* Illustrations disponibles sur <http://www.sb-roscoff.fr/CyCell/Diapo/>.

par association à des sous-unités régulatrices, les cyclines (cyclines A-K, T), et inactivées par interaction avec de petites protéines inhibitrices (CKI) (figure 1A). Certaines de ces kinases (CDK1, 2, 3, 4, 6) sont activées transitoirement au cours du cycle de division cellulaire. Elles règlent le déclenchement et la coordination des différentes phases de la

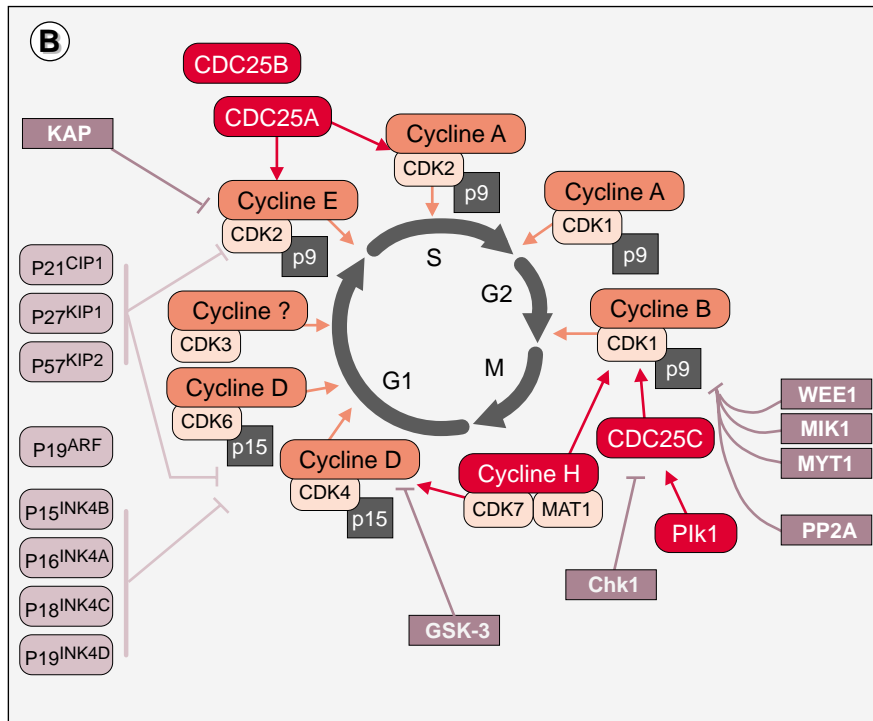
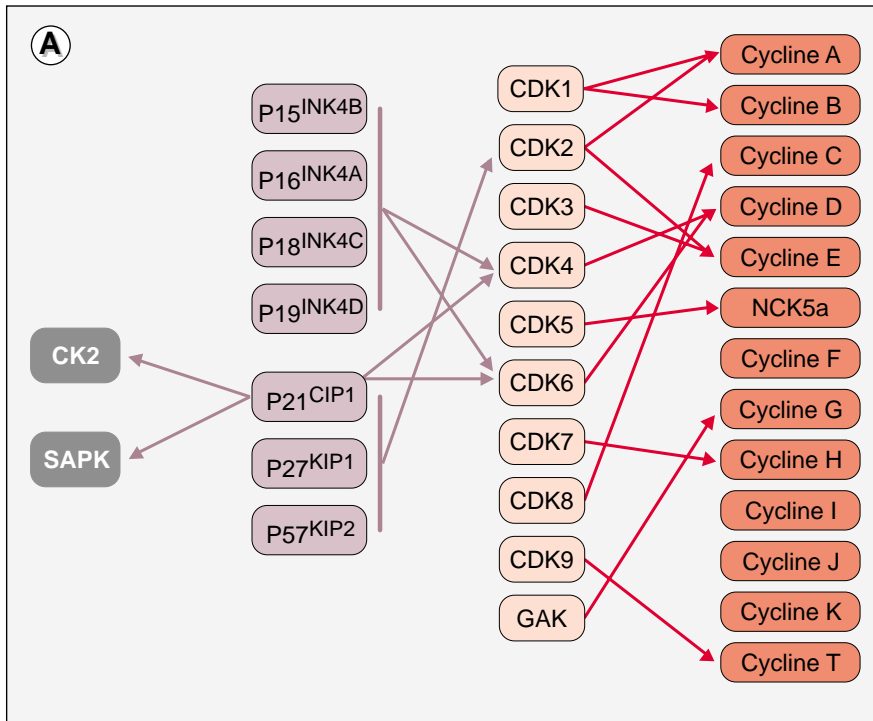


Figure 1. **A. Les CDK et leurs interactions avec les cyclines et les protéines inhibitrices.** Les flèches connectent les protéines qui interagissent les unes avec les autres. En rouge et en rose, éléments activateurs; en bistre, les protéines inhibitrices des CDK ou d'autres kinases (grises). **B. Régulation du cycle de division cellulaire par les CDK.** Les complexes CDK/cyclines (rouges) contrôlent les transitions d'une phase à l'autre du cycle cellulaire. Ces complexes sont eux-mêmes réglés positivement par des kinases ou des phosphatases (différentes teintes de rose) ou négativement, par des protéines agissant de façon stœchiométrique (bistre clair) ou catalytique (bistre foncé).

division par phosphorylation de substrats spécifiques (pRb [protéine du rétinoblastome], histone H1, lamines, etc.) (figure 1B). CDK5 est impliquée dans le fonctionnement des cellules neuronales (phosphorylation des protéines tau, MAP-1B et de sous-unités de neurofilaments) [4]. CDK7, 8 et 9 interviennent dans la régulation de la transcription.

De très nombreuses dérégulations des CDK et de leurs activateurs/inhibiteurs ont été décrites dans les cellules tumorales et dans les tumeurs primaires humaines [5]: surexpression de cyclines D ou E, de cdc25, de CDK4 et CDK6, stabilisation de la cycline A par intégration du virus de l'hépatite B, mutation sur CDK4 la rendant insensible aux CKI, mutations inactivantes ou même délétions de gènes de CKI, hyperméthylation du promoteur d'INK4A conduisant à une expression réduite de p16^{INK4A}, etc. Certaines cyclines se comportent comme des oncogènes, certains inhibiteurs comme des suppresseurs de tumeurs. Les cancers apparaissent donc de plus en plus comme des « maladies de la régulation du cycle cellulaire ». Les CDK constituent ainsi des cibles moléculaires privilégiées dans la recherche d'inhibiteurs sélectifs de la prolifération cellulaire [6, 7]. Les premières molécules identifiées à la suite de criblages intensifs sont évaluées comme agents anticancéreux potentiels, mais pourraient également trouver d'autres applications thérapeutiques.

Inhibiteurs chimiques de CDK

La recherche et l'optimisation d'inhibiteurs de protéine-kinases nécessitent plusieurs étapes: (1) mise au point d'un test de dosage rapide utilisant la kinase purifiée comme cible; (2) criblage de collections de molécules purifiées et identifiées; (3) évaluation de la sélectivité enzymatique des inhibiteurs identifiés par un criblage secondaire sur une sélection de kinases purifiées; (4) détermination du mécanisme moléculaire d'action des inhibiteurs, par enzymologie classique et par co-cristallisation avec l'enzyme cible. Dans le domaine des CDK, la kinase CDK1/cycline B, purifiée à partir d'ovocytes d'étoile de mer par affinité sur p9^{CKS} immobili-

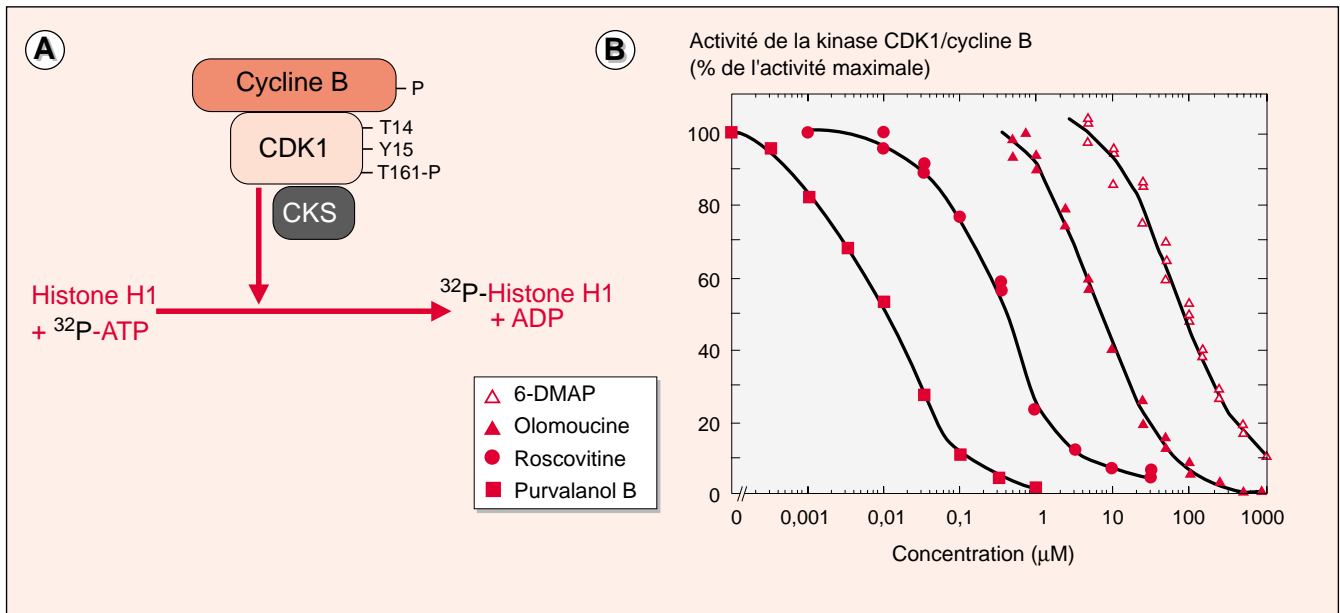


Figure 2. **A. Principe du dosage de l'activité kinase de CDK1/cycline B.** L'enzyme purifiée à partir de cellules en phase M est déphosphorylée sur ses résidus Thr14 et Tyr15, mais est phosphorylée sur son résidu Thr161. La cycline B est phosphorylée. Le dosage de l'activité enzymatique du complexe s'effectue en présence d'histone H1 et d'ATP- γ - ^{32}P . Le phosphate ^{32}P incorporé dans l'histone H1 est proportionnel à l'activité de l'enzyme. L'ajout d'un composé dans cette réaction permet d'estimer sa capacité inhibitrice vis-à-vis de la kinase. **B. Un exemple d'étude structure-activité.** Courbes doses-réponses montrant l'efficacité inhibitrice croissante de dérivés de purines: 6-DMAP (identifiée en 1988 comme inhibiteur de CDK1); olomoucine (1994); roscovitine (1997); purvalanol (1998).

sée, est devenue une préparation classique. Des CDK humaines recombinantes, exprimées en cellules d'insectes ou dans *E. coli*, sont également utilisées [7]. L'activité de la kinase est mesurée par incorporation de ^{32}P -phosphate dans un substrat approprié (histone H1, pRb), après incubation en présence de ^{32}P - γ -ATP et d'inhibiteurs de phosphatases (figure 2A). L'utilisation d'une gamme de concentrations permet d'obtenir une courbe dose-réponse (figure 2B) et de définir la dose inhibant à 50 % (IC₅₀), une caractéristique facilitant la comparaison de l'efficacité de différents inhibiteurs. Les sources de composés testés sont multiples. De grandes collections de produits synthétiques ou naturels (National Cancer Institute, Bethesda, MA, USA; Cancer Research Institute, Tempe, Arizona, USA) fournissent une large variété de composés. La synthèse d'analogues de composés actifs déjà décrits, tels que les purines, permet des études structure-activité détaillées. A l'heure actuelle dix types d'inhibiteurs spécifiques de CDK ont été décrits (figure 3): des purines,

l'olomoucine* [8], la roscovitine* [9, 10], le purvalanol* [11], le CVT-313 [12], la toyocamycine [15], une flavone, le flavopiridol [14], une phénylamino-pyrimidine [15, 16], l'indirubine-3'-monoxime* [17], une famille d'azepinones, les paullones* [18] et une butyrolactone [19]. Les structures de ces molécules diffèrent considérablement les unes des autres. Chacune constitue une « tête de file » à partir de laquelle de nouveaux dérivés sont obtenus par synthèse chimique classique (pour exemple [20]) ou combinatoire (pour exemple [11, 21]). Des produits plus actifs, plus sélectifs ou plus stables dans la cellule sont ainsi mis au point par une étude structure-activité et par modélisation moléculaire fondée sur la structure cristalline des complexes CDK/inhibiteurs. La variété chimique de ces différents inhibiteurs est d'autant plus frappante que tous, sans exception, agissent par inhibition compétitive de la fixation d'ATP. La poche de fixation de l'ATP, localisée entre les petit et grand lobes de la kinase,

* Identifiées à Roscoff comme inhibiteurs de CDK.

semble donc pouvoir accueillir une très grande diversité de molécules inhibitrices.

La sélectivité de certains inhibiteurs est remarquable [6]. Certaines molécules inhibent CDK1, CDK2, CDK5 mais sans effet sur CDK4 et CDK6. Les raisons structurales de cette spécificité ne sont pas connues. Le flavopiridol est aussi efficace sur CDK1 que sur CDK4. En revanche, aucun inhibiteur spécifique de CDK4 et CDK6 n'a été identifié. Un certain nombre d'inhibiteurs peu ou pas du tout sélectifs ont été décrits (6-diméthylaminopurine, isopentenyladénine, 9-hydroxyellipticine, staurosporine, UCN-O1, suramine). Leur intérêt en biologie cellulaire est réduit, mais ce n'est pas forcément le cas en clinique. Par ailleurs, ils peuvent servir de base à la mise au point d'inhibiteurs plus sélectifs.

Interactions inhibiteurs /CDK

La cristallisation d'inhibiteurs avec CDK2 a permis un bond spectaculaire dans notre compréhension des

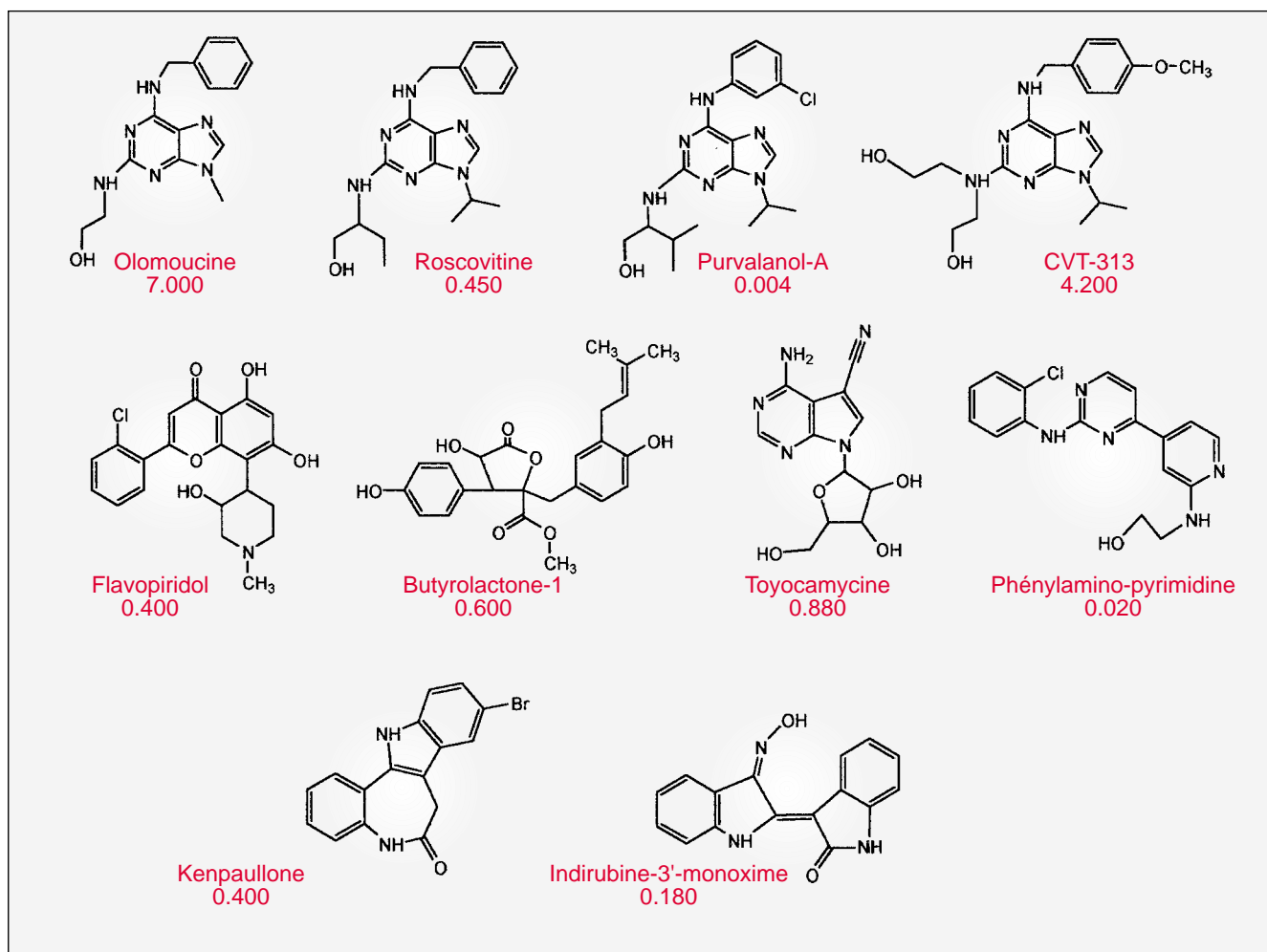


Figure 3. **Structure et activité des inhibiteurs de CDK (IC_{50} vis-à-vis de CDK1/cycline B en μM).** Olomoucine [6], roscovitine [7, 8], purvalanol [9], CVT-313 [10], flavopiridol [12], butyrolactone [17], toyocamycine [11], CGP60474 [13, 14], kenpaullone [16], indirubine-3'-monoxime [15].

mécanismes d'action de ces molécules. Outre l'ATP, sept inhibiteurs ont été co-cristallisés avec CDK2 : l'isopentenyladénine [22], l'olomoucine [22], la roscovitine [9], le purvalanol [11], un dérivé du flavopiridol [23], l'indirubine-3'-monoxime [17] et la staurosporine [24]. L'analyse des données structurales a permis l'identification de plusieurs acides aminés de CDK2, essentiels pour l'interaction enzyme-inhibiteur. Les résidus Ile10, Leu 83 et Leu134 assurent, à eux seuls, près de 40 % de l'ensemble des contacts entre CDK2 et les inhibiteurs (figure 4). Deux ou trois liaisons hydrogène sont constamment retrouvées entre les inhibiteurs et les résidus Leu 83 et Glu 81 de CDK2 (figure 4). La sélectivité des inhibiteurs provient sans

doute d'interactions avec des résidus qui n'offrent aucune liaison avec la molécule d'ATP. Ces acides aminés ne sont pas conservés dans les kinases autres que les CDK. Ces données structurales sont maintenant très largement utilisées pour modéliser de nouveaux inhibiteurs de CDK et pour guider de nouvelles synthèses d'analogues. La détermination de la structure cristalline de CDK4 ou CDK6 est très attendue; elle devrait permettre de comprendre pourquoi beaucoup d'inhibiteurs de CDK2 restent sans effets sur CDK4.

Effets cellulaires des inhibiteurs de CDK

Comprendre ce que fait un inhibiteur de kinase dans une cellule n'est

pas une question simple. La sélectivité *in vivo* reste une question ouverte, même si l'inhibiteur montre une grande sélectivité enzymatique *in vitro*. Par ailleurs, de nombreux facteurs affectent les effets cellulaires d'un inhibiteur : perméabilité de la membrane cellulaire; répartition dans les différents compartiments cellulaires; métabolisme en composés inactifs; compétition avec de fortes concentrations d'ATP intracellulaire; fixation sur d'autres cibles enzymatiques non identifiées et, sans doute, une combinaison de tous ces facteurs. Pour ces raisons, les résultats obtenus avec les inhibiteurs de CDK doivent être interprétés avec précaution. Il est important de montrer que : (1) les substrats de CDK ne sont plus phosphorylés *in vivo*; (2)

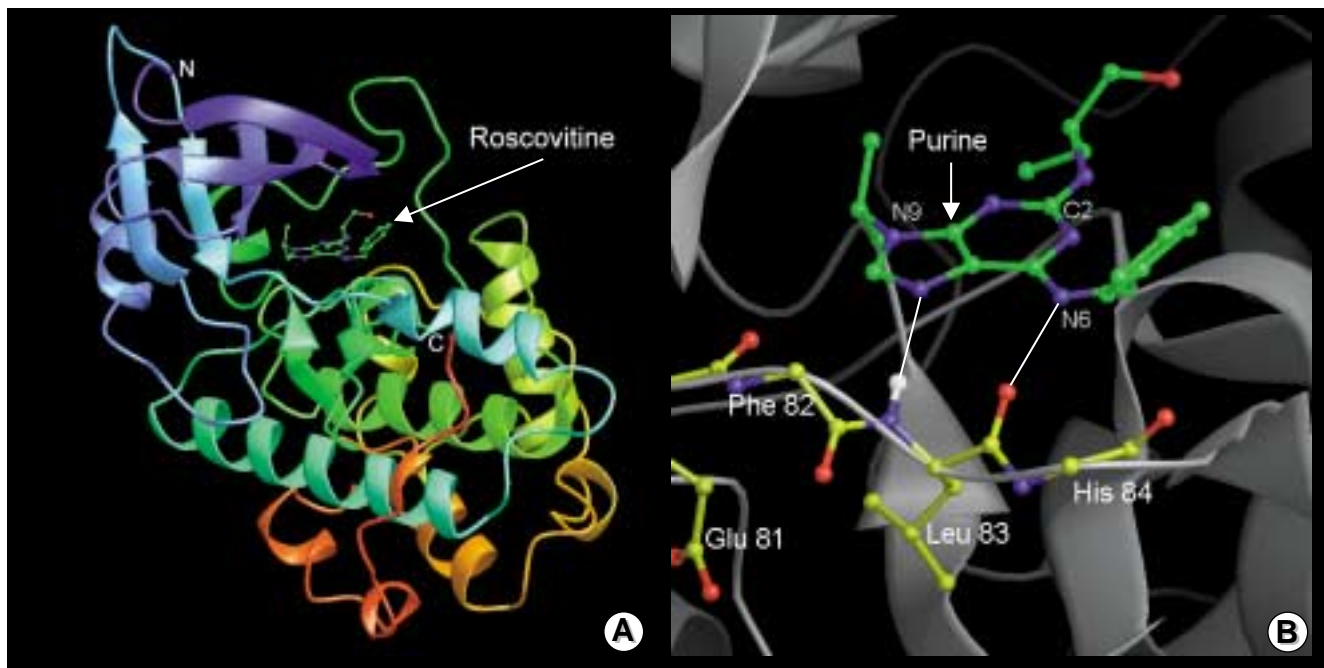


Figure 4. **Interaction moléculaire entre CDK2 et roscovitine.** **A.** Vue générale du complexe. La chaîne peptidique de CDK2 est représentée selon un gradient coloré du bleu (amino-terminal) au rouge (carboxy-terminal). La roscovitine se trouve dans le site de fixation de l'ATP, entre les petits et les grands lobes de la kinase. **B.** Vue rapprochée de la roscovitine et de ses interactions avec CDK2 (représentée en ruban gris, à l'exception des acides aminés 81-83 dont tous les atomes sont représentés). Le noyau purine de la roscovitine et ses atomes C2, N6 et N9 sont indiqués.

des inhibiteurs appartenant à des classes chimiques différentes ont des effets similaires ; (3) l'efficacité observée *in vitro* pour une série d'inhibiteurs est proportionnellement respectée *in vitro*. Dans ces conditions, l'utilisation d'inhibiteurs chimiques complète élégamment, en biologie cellulaire fondamentale, l'utilisation de mutants négatifs de CDK, la surexpression d'inhibiteurs protéiques naturels, la micro-injection d'anticorps inactivants ou d'ARN antisens.

De très nombreuses expériences effectuées sur une gamme étendue de modèles cellulaires confirment que les inhibiteurs de CDK sont des produits antimitotiques (pour revues, voir [7, 25-31]). De façon générale, ils bloquent le cycle cellulaire à la fois en phase G1 et en fin de phase G2-prophase. Ces résultats sont compatibles avec, respectivement, l'inhibition de CDK2 et de CDK1. On observe, associée à ces blocages, l'inhibition des phosphorylations de substrats de CDK2, tels que pRb [19] et de CDK1, tels que histone H1

[29], Sam68, sous-unités γ et δ du facteur d'élongation [10], vimentine [10]. Des inhibiteurs de CDK ont été utilisés pour synchroniser des cellules en prophase.

Le déclenchement de l'apoptose est souvent lié au cycle cellulaire. Les effets des inhibiteurs de CDK sur l'apoptose se répartissent en trois types :

(1) absence d'effet : l'apoptose induite par Myc est insensible aux inhibiteurs de CDK [32] ;

(2) les inhibiteurs de CDK déclenchent l'apoptose ou potentialisent l'apoptose déclenchée par d'autres facteurs : c'est le cas pour la grande majorité des cellules en prolifération (pour exemple [24, 30, 31, 33-37]). Cette induction de l'apoptose est indépendante de p53. L'induction de l'apoptose par le flavopiridol semble indépendante du cycle cellulaire et pourrait provenir d'un effet sur d'autres kinases [27, 38] ;

(3) inhibition de l'apoptose : c'est le cas des cellules neuronales en voie de différenciation. Les composés inhibiteurs de CDK protègent les cellules

neuronales de l'apoptose déclenchée par les facteurs de croissance [39]. L'apoptose des thymocytes requiert une activité CDK2 et est inhibée par la roscovitine [40].

Applications thérapeutiques potentielles des inhibiteurs de CDK

Certaines propriétés des CDK et de leurs inhibiteurs protéiques naturels ont encouragé la recherche d'inhibiteurs chimiques de CDK en vue d'applications antitumorales :

- altérations très fréquentes, dans les tumeurs humaines, des CDK et de leurs régulateurs ;
- liens directs entre oncogènes et supresseurs de tumeurs, d'une part, et CDK et leurs régulateurs, d'autre part ;
- suppression de la prolifération cellulaire par surexpression de p16^{INK4B} ou p21^{cip1}.

Les premiers inhibiteurs chimiques de CDK présentent des propriétés intéressantes qui justifient leur évaluation comme produits anticancé-

reux potentiels et la poursuite de la recherche de nouvelles molécules plus efficaces :

- propriétés antimitotiques avec, pour certains produits, une sélectivité vis-à-vis des cellules transformées par rapport aux cellules normales. Ainsi, le CGP60474 arrête les cellules U2-OS en fin de G1 alors qu'il bloque les mêmes cellules mais tranfectées avec l'antigène T de SV40 en G2 et déclenche l'apoptose [16] ;
- induction de l'apoptose des cellules en division, facilitation de l'apoptose déclenchée par des agents anticancéreux déjà utilisés en clinique (*cis*-platine, mitomycine, etc.) ;
- indépendance de l'effet des inhibiteurs de CDK vis-à-vis de p53 et de pRb ;
- propriétés antitumorales dans des modèles animaux.

Le flavopiridol, la butyrolactone, un dérivé du CGP60474, sont déjà en stade d'expérimentation clinique. De façon générale, la toxicité est relativement faible [41].

L'application clinique des inhibiteurs de CDK est également évaluée dans un certain nombre de cas de proliférations cellulaires non cancéreuses mais pathologiques.

- En néphrologie, la glomérulonéphrite est liée à la prolifération de cellules du glomérule à la suite d'une inflammation. La roscovitine inhibe cette prolifération *in vivo* et permet la restauration des fonctions rénales [42].
- Dans le domaine cardiovasculaire, la prolifération des cellules vasculaires est associée à un certain nombre de maladies (athérosclérose, resténose postangioplastie, angiogénèse au niveau des tumeurs) contre lesquelles des inhibiteurs de CDK pourraient se révéler utiles. Un dérivé de l'olomoucine/roscovitine, le CVT-313, inhibe la prolifération vasculaire de la carotide dénudée de rat *in vivo* [12].
- En parasitologie, les familles d'inhibiteurs de CDK sont à l'heure actuelle criblés sur les principaux parasites unicellulaires humains : *Plasmodium*, trypanosomes africain et américain, toxoplasme, *Leishmania*, microsporidies. Des analogues de CDK ont été clonés chez certains de ces parasites. Les divergences de séquences par rapport aux séquences

humaines permettent d'espérer la découverte d'inhibiteurs de CDK efficaces sur les CDK de parasites mais non sur les CDK humaines correspondantes. L'olomoucine et le flavopiridol inhibent la synthèse de l'ADN de *Plasmodium falciparum in vivo*. A notre connaissance, les inhibiteurs de CDK n'ont pas encore été testés sur la prolifération des parasites pluricellulaires (champignons, helminthes, etc.).

- Les inhibiteurs de CDK sont également étudiés pour leurs applications en neurologie. En effet, ils inhibent, par un mécanisme encore non identifié, l'apoptose de cellules neuronales [39]. Par ailleurs, la kinase CDK5/p35 est l'une des kinases responsables de l'hyperphosphorylation de la protéine tau observée dans les cerveaux des personnes atteintes de la maladie d'Alzheimer [4]. La phosphorylation de MAP-1B, également hyperphosphorylée dans cette maladie, est sensible à l'olomoucine et à la roscovitine. Enfin, une expression anormale de CDK1/cycline B est observée dans les tissus des sujets atteints de maladie d'Alzheimer. Ces observations font des inhibiteurs de CDK des molécules potentiellement très intéressantes dans les neurodégénérescences pathologiques ou les ischémies.

- Trois applications sont à l'étude à l'heure actuelle dans les maladies d'origine virale. En inhibant la CDK2 cellulaire, la roscovitine inhibe la réplication du cytomégalovirus humain [44]. Cet effet est également observé par expression d'un mutant dominant négatif de CDK2. Dans le domaine du SIDA, la kinase activée par la protéine virale Tat a été récemment identifiée : il s'agit d'une CDK, la CDK9/cycline T. Cette kinase est inhibée par différents inhibiteurs [44], dont l'olomoucine et la roscovitine. Cette kinase constitue naturellement une cible de choix. Les familles d'inhibiteurs déjà identifiées seront prochainement testées sur CDK9. Enfin, un article récent montre que la réplication du virus de l'Herpes simplex requiert les CDK cellulaires et est inhibée par la roscovitine et l'olomoucine [45]. L'utilisation pharmacologique éventuelle de cette sensibilité aux inhibiteurs de CDK est à l'étude.

Les potentialités thérapeutiques des inhibiteurs de CDK dépassent large-

ment les possibilités antitumorales envisagées initialement. De très nombreuses compagnies pharmaceutiques et de nombreuses équipes de chimistes, en collaboration avec des biochimistes, se sont lancées dans la recherche et l'optimisation d'inhibiteurs sélectifs de CDK. L'avenir dira si les recherches initiales, effectuées sur les CDK de levures, d'œufs d'oursin, d'ovocytes d'étoile de mer et d'amphibiens, se traduiront un jour par des applications thérapeutiques dont les chercheurs fondamentaux pourront s'honorer ■

Remerciements

Nos travaux sur la recherche d'inhibiteurs chimiques de CDK ont essentiellement été financés par l'Association pour la recherche sur le cancer (ARC 9314), le Conseil régional de Bretagne et le *National Cancer Institute* (Bethesda, MA, USA). Nous remercions Mathieu Chaperon pour l'illustration des structures cristallines inhibiteurs/CDK2 ainsi que le Dr M. Noble (Oxford, GB) pour le logiciel *X-Objects*.

RÉFÉRENCES

1. Morgan D. Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1997; 13: 261-91.
2. Wolowiec D, French M. Kinases dépendantes des cyclines: rôle biologique et implications dans la pathologie humaine. *Med Sci* 1996; 12: 165-73.
3. Darbon JM, Fesquet D, Cavadore JC. De nouveaux régulateurs du cycle cellulaire: les protéines modulatrices des complexes cdk-cyclines. *Med Sci* 1995; 11: 349-56.
4. Imahori K, Uchida T. Physiology and pathology of tau protein kinases in relation to Alzheimer's disease. *J Biochem* 1997; 121: 179-88.
5. Kamb A. Cyclin-dependent kinase inhibitors and human cancer. In: Vogt PK, Reed SI, eds. *Cyclin dependent kinase (cdk) inhibitors*. Berlin: Springer Verlag, 1998: 139-48.
6. Meijer L. Chemical inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Trends Cell Biol* 1996; 6: 393-7.
7. Meijer L, Kim SH. Chemical inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Cell cycle control. Meth Enzymol* 1997; 283: 113-28.

RÉFÉRENCES

8. Vesely J, Havlicek L, Strnad M, *et al.* Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine derivatives. *Eur J Biochem* 1994; 224: 771-86.
9. De Azevedo WF, Leclerc S, Meijer L, Havlicek L, Strnad M, Kim, SH. Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues: crystal structure of human cdk2 complexed with roscovitine. *Eur J Biochem* 1997; 243: 518-26.
10. Meijer L, Borgne A, Mulner O, *et al.* Biochemical and cellular effects of roscovitine, a potent and selective inhibitor of the cyclin-dependent kinases cdc2, cdk2 and cdk5. *Eur J Biochem* 1997; 243: 527-36.
11. Gray N, Thunnissen AM, Kwon S, *et al.* Exploiting chemical libraries, structure, and genomics in the search for new kinase inhibitors. *Science* 1998; 281: 533-8.
12. Brooks EE, Gray NS, Joly A, *et al.* CVT-313, a specific and potent inhibitor of CDK2 that prevents neointimal proliferation. *J Biol Chem* 1997; 272: 29207-11.
13. Park SG, Cheon JY, Lee YH, *et al.* A specific inhibitor of cyclin-dependent protein kinases, CDC2 and CDK2. *Mol Cells* 1996; 6: 679-83.
14. Sedlacek HH, Czech J, Naik R, *et al.* Flavopiridol (L86 8275; NSC 649890), a new kinase inhibitor for tumor therapy. *Int J Oncol* 1996; 9: 1143-68.
15. Zimmermann J. Pharmacologically active pyrimidine derivatives and processes for the preparation thereof. Bâle: PCT Ciba-Geigy, 1995: WO 95/09853.
16. Ruetz S, Woods-Cook K, Solf R, Meyer T, Zimmermann J, Fabbro D. Effect of CGP60474 on cyclin dependent kinase (cdks), cell cycle proliferation and onset of apoptosis in normal and transformed cells. *Proc Am Assoc Cancer Res* 1998; 39: 558.
17. Hoessel R, Leclerc S, Endicott J, *et al.* Indirubin, the active constituent of the Chinese anti-leukemia traditional medicine recipe Danggui Longhui Wan, inhibits cyclin-dependent kinases. *Nat Cell Biol* 1999 (sous presse).
18. Schultz C, Link A, Leost M, *et al.* The paullones, a series of cyclin dependent kinase inhibitors: synthesis, evaluation of CDK1/cyclin B inhibitor, and *in vitro* antitumor activity. *J Med Chem* 1999 (sous presse).
19. Kitagawa M, Okabe T, Ogino H, *et al.* Butyrolactone I, a selective inhibitor of cdk2 and cdc2 kinase. *Oncogene* 1993; 8: 2425-32.
20. Legraverend M, Ludwig O, Bisagni E, Leclerc S, Meijer L. Synthesis of C2 alkynylated purines, a new family of potent inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Bioorg Med Chem Lett* 1998; 8: 793-8.
21. Schow SR, Mackman RL, Blum CL, *et al.* Synthesis and activity of 2,6,9-trisubstituted purines. *Bioorg Med Chem Lett* 1997; 7: 2697-702.
22. Schulze-Gahmen U, Brandsen J, Jones HD, *et al.* Multiple modes of ligand recognition: crystal structures of cyclin-dependent protein kinase 2 in complex with ATP and two inhibitors, olomoucine and isopentenyladenine. *Proteins Struct Funct Genet* 1995; 22: 378-91.
23. De Azevedo WF, Mueller-Dieckmann HJ, Schultz-Gahmen U, Worland PJ, Sausville E, Kim SH. Structural basis for specificity and potency of a flavonoid inhibitor of human CDK2, a cell cycle kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 2735-40.
24. Lawrie AM, Noble ME, Tunnah P, Brown NR, Johnson LN, Endicott JA. Protein kinase inhibition by staurosporine revealed in details of the molecular interaction with CDK2. *Nat Struct Biol* 1997; 4: 796-800.
25. Kaur G, Stedler-Stevenson M, Sebers S, *et al.* Growth inhibition with reversible cell cycle arrest of carcinoma cells by flavone L86-8275. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84: 1736-40.
26. Abraham RT, Acquarone M, Andersen A, *et al.* Cellular effects of olomoucine, an inhibitor of cyclin-dependent kinases. *Biol Cell* 1995; 83: 105-20.
27. Bible KC, Kaufmann SH. Flavopiridol: a cytotoxic flavone that induces cell death in noncycling A549 human lung carcinoma cells. *Cancer Res* 1996; 56: 4856-61.
28. Carlson BA, Dubay MM, Sausville EA, Brizuela L, Worland PJ. Flavopiridol induces G1 arrest with inhibition of cyclin-dependent kinase (CDK) 2 and CDK4 in human breast carcinoma cells. *Cancer Res* 1996; 56: 2973-8.
29. Nishio K, Ishida T, Arioka H, *et al.* Antitumor effects of butyrolactone I, a selective cdc2 kinase inhibitor, on human lung cancer cell lines. *Anticancer Res* 1996; 16: 3387-96.
30. König A, Schwartz GK, Mohammad RM, Al-Katib A, Gabrilove JL. The novel cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol downregulates Bcl-2 and induces growth arrest and apoptosis in chronic B-cell leukemia lines. *Blood* 1997; 90: 4307-12.
31. Schutte B, Nieland L, van Engeland M, Henfling MER, Meijer L, Ramaekers FCS. The effect of the cyclin-dependent kinase inhibitor olomoucine on cell cycle kinetics. *Exp Cell Res* 1997; 236: 4-15.
32. Rudolph B, Saffrich R, Zwicker J, *et al.* Activation of cyclin-dependent kinases by Myc mediates induction of cyclin A, but not apoptosis. *EMBO J* 1996; 15: 3065-76.
33. Ongkeko W, Ferguson DJP, Harris AL, Norbury C. Inactivation of cdc2 increases the level of apoptosis induced by DNA damage. *J Cell Sci* 1995; 108: 2897-904.
34. Shibata Y, Nishimura S, Okuyama A, Nakamura T. p53-independent induction of apoptosis by cyclin-dependent kinase inhibition. *Cell Growth Diff* 1996; 7: 887-91.
35. Schwartz GK, Farsi K, Maslak P, Kelsen DP, Spriggs D. Potentiation of apoptosis by flavopiridol in mitomycin-C-treated gastric and breast cancer cells. *Clin Cancer Res* 1997; 3: 1467-72.
36. Van Engeland M, Kuijpers HJH, Ramaekers FCS, Reutelingsperger CPM, Schutte B. Plasma membrane alterations and cytoskeletal changes in apoptosis. *Exp Cell Res* 1997; 235: 421-30.
37. Arguello F, Alexander M, Sterry JA, *et al.* Flavopiridol induces apoptosis of normal lymphoid cells, causes immunosuppression, and has potent antitumor activity *in vivo* against human leukemia and lymphoma xenografts. *Blood* 1998; 91: 2482-90.
38. Brüsselbach S, Nettelbeck DM, Sedlacek HH, Müller R. Cell cycle-independent induction of apoptosis by the anti-tumor drug flavopiridol in endothelial cells. *Int J Cancer* 1999 (sous presse).
39. Park DS, Farinelli SE, Greene LA. Inhibitors of cyclin-dependent kinases promote survival of post-mitotic neuronally differentiated PC12 cells and sympathetic neurons. *J Biol Chem* 1996; 271: 8161-9.
40. Gil-Gomez G, Berns A, Brady HJM. A link between cell cycle and cell death: Bax and Bcl-2 modulate cdk2 activation during thymocyte apoptosis. *EMBO J* 1998; 17: 7209-18.
41. Senderowicz A, Headlee D, Stinson SF, *et al.* Phase I trial of continuous infusion flavopiridol, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, in patients with refractory neoplasms. *J Clin Oncol* 1998; 16: 1-17.
42. Pippin JW, Qu Q, Meijer L, Shankland SJ. Direct *in vivo* inhibition of the nuclear cell cycle cascade in experimental mesangial proliferative glomerulonephritis with roscovitine, a novel CDK2 antagonist. *J Clin Invest* 1997; 100: 2512-20.
43. Bresnahan WA, Boldogh I, Chi P, Thompson EA, Albrecht T. Inhibition of cellular cdk2 activity blocks human cytomegalovirus replication. *Virology* 1997; 231: 239-47.
44. Mancebo HSY, Lee G, Flygare J, *et al.* P-TEF β kinase is required for HIV Tat transcriptional activation *in vivo* and *in vitro*. *Genes Dev* 1997; 11: 2633-44.
45. Schang LM, Phillips J, Schaffer PA. Requirement for cellular cyclin-dependent kinases in herpes simplex virus replication and transcription. *J Virol* 1998; 72: 5626-37.

Summary

The search for and potential therapeutic applications of chemical inhibitors of cyclin-dependent kinases

Cyclin-dependent kinases (CDK1, 2, 3, 4, 6, 7) trigger and coordinate the cell division cycle phases. They also play a role in neuronal cells (CDK5) and in the control of transcription (CDK 7, 8, 9). Intensive screening has led in a few years to the identification of a series of chemical inhibitors of CDKs. Some of these compounds display remarkable selectivities and efficiencies ($IC_{50} < 25$ nM). Many have been co-crystallised with CDK2 and their atomic interactions with the kinase have been analysed in detail: all are located in the ATP-binding pocket of the enzyme. These inhibitors are anti-mitotic, they arrest cells in G1 and, at higher doses, in G2/M. Furthermore they facilitate or even trigger apoptosis in proliferating cells. In contrast, they protect neuronal cells from apoptosis. The potential use of these inhibitors is being extensively evaluated in cancer chemotherapy (clinical trials, phase I and II). Possible clinical applications are being investigated in other fields: cardiovascular (restenosis, tumoral angiogenesis, atherosclerosis), dermatology (psoriasis), nephrology (glomerulonephritis), parasitology (unicellular parasites such as *Plasmodium*, trypanosomes, toxoplasma, etc.), neurology (Alzheimer's disease), viral infections (cytomegalovirus, HIV, herpes). We anticipate the discovery of novel selective and powerful inhibitors in the near future and hope for their efficient applications in various human pathologies.



Société de Pharmacologie Toxicologie cellulaire

Siège Social
15, rue de l'École-
de-Médecine
75006 PARIS
Téléphone :
01 42 34 68 70
Télécopie :
01 44 07 10 52

TIRÉS A PART

L. Meijer.

m/s n° 4, vol. 15, avril 99