

· 前沿与进展 ·

ADVANCES IN
PHARMACEUTICAL SCIENCES



Wee1 激酶及其抑制剂研究进展

杨玥婧, 土振霖, 唐伟方*, 陈亚东**

(中国药科大学理学院, 江苏 南京 211198)

[摘要] 有丝分裂是在细胞周期的精准调控下完成的。细胞周期依靠 G₁/S 期检查点、S 期检查点和 G₂/M 期检查点及时阻滞分裂进程, 确保遗传信息的完整性。由于多数人类肿瘤细胞存在由于 p53 突变、p53 功能缺陷导致 G₁/S 期检查点失活, 从而更依赖于 G₂/M 检查点的调控。细胞周期调节蛋白 Wee1 激酶是 G₂/M 检查点的关键调控因子, 通过磷酸化周期蛋白依赖性激酶 1 (CDK1) 的第 15 位酪氨酸实现 G₂/M 期阻滞, 为 DNA 修复提供了时间。抑制 Wee1 可消除细胞周期阻滞, 使肿瘤细胞过早进入有丝分裂, 产生复制应激和有丝分裂灾难, 且 Wee1 在许多肿瘤中高表达, 因此是一个治疗肿瘤的理想靶点, 目前其抑制剂已成为研究热门。通过对 Wee1 激酶的作用机制、与疾病的相关性和在研小分子抑制剂的临床应用进行详细介绍, 为其进一步研究和应用提供参考。

[关键词] Wee1 激酶; p53 突变; 抗肿瘤; 抑制剂

[中图分类号] R979.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1001-5094 (2022) 01-0905-10

Research Progress of Wee1 Kinase and Its Inhibitors

YANG Yuejing, TU Zhenlin, TANG Weifang, CHEN Yadong

(School of Science, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China)

[Abstract] Mitosis is completed under the precise control of cell cycle, which relies on the checkpoints of G₁/S phase, S phase and G₂/M phase to block the division process in time to ensure the integrity of genetic information. Since most human tumor cells have p53 mutations and p53 functional defects, the G₁/S phase checkpoints are inactivated, leading to higher dependence on the regulation of G₂/M checkpoints. The cell cycle regulatory protein Wee1 kinase is a key regulator of the G₂/M checkpoint. It achieves G₂/M phase blocked by phosphorylation of CDK1 Tyr15, which provides time for DNA repair. Inhibition of Wee1 can eliminate cell cycle block, make tumor cells enter mitosis prematurely, and produce replication stress and mitotic disaster. Wee1 is highly expressed in many tumors, so it is an ideal target for the treatment of tumors, with its inhibitors becoming a hot research topic. This article mainly introduces the mechanism of Wee1 kinase, its relevance to diseases, and the clinical application of small molecule inhibitors under investigation, in order to provide ideas for its further research and application.

[Key words] Wee1 kinase; p53 mutation; antitumor; inhibitor

1 Wee1 激酶概述

Wee1 激酶最早发现于裂殖酵母中, 是丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族的重要成员之一^[1], 属于细胞周期调节蛋白。人类 Wee 家族包括髓鞘转录因子 1 (myelin transcription factor 1, Myt1)、Wee1、Wee2^[2]。Wee1 激酶是一种高度保守的细胞周期调节

蛋白, 人类 *Wee1* 基因编码 647 个氨基酸组成的蛋白, 主要包含 3 个结构域 (见图 1A): N-端结构域、中心激酶结构域和 1 个短的 C-端结构域。N-端结构域是 Wee1 激酶的激活结构域, 也是抑制周期蛋白依赖性激酶 1-周期蛋白 B (cyclin-dependent kinase 1-cyclin B, CDK1-CyclinB) 复合物去磷酸化的潜在位点, 包含 1 个富甘氨酸环 (残基序列 306~311) 和 3 段富含脯氨酸、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸的序列 (残基序列 24~126), 这些泛素化识别位点可以严格控制 Wee1 的细胞内半衰期; C-端结构域主要包含催化段 (残基序列 422~433) 和活化段 (残基序列 462~486)^[3]。

接受日期: 2021-10-10

*** 通信作者:** 唐伟方, 博士生导师;

研究方向: 新药分子设计与合成;

Tel: 025-86185216; **E-mail:** tangwf126@126.com

**** 通信作者:** 陈亚东, 博士生导师;

研究方向: 小分子靶向药物的设计和活性研究;

Tel: 025-86185153; **E-mail:** ydchen@cpu.edu.cn

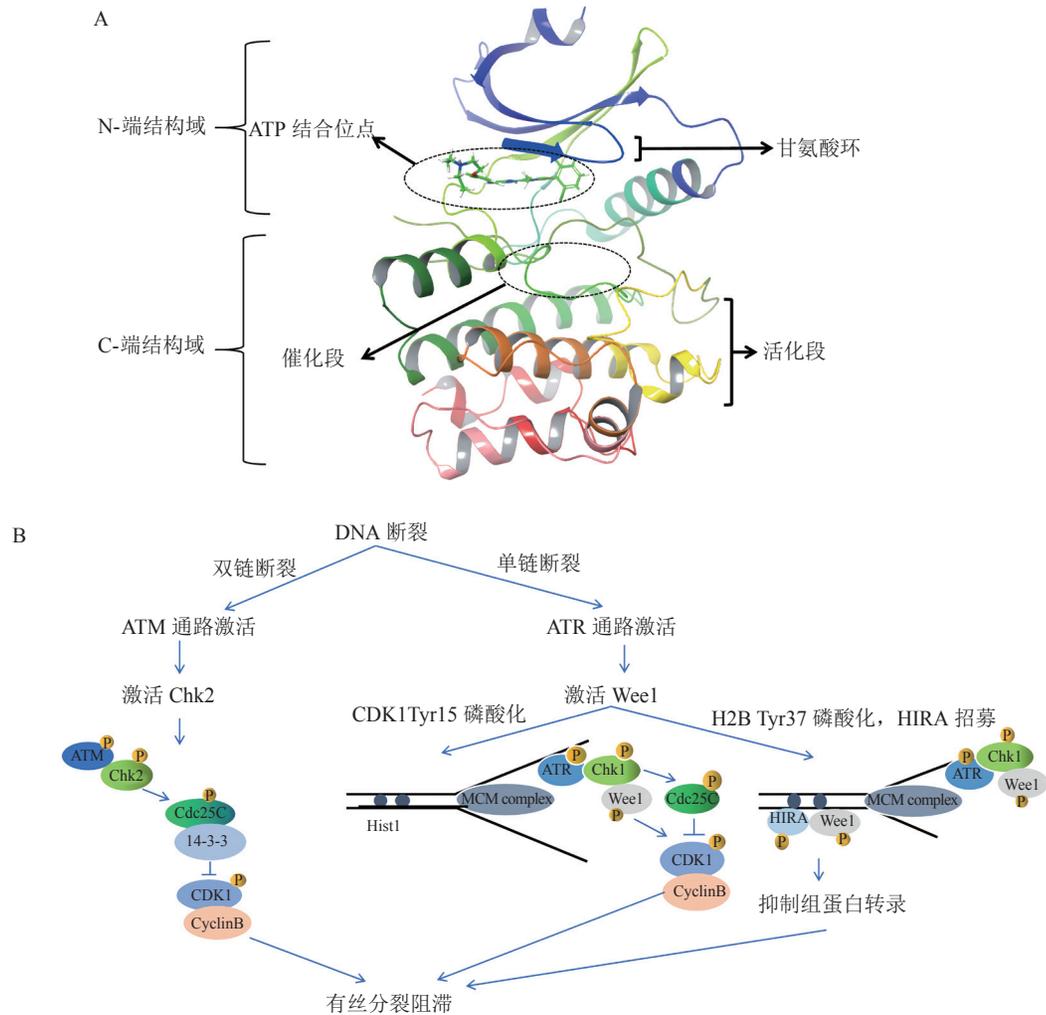
细胞周期包括间期和分裂期, 间期包括合成前期 (G_1 期)、DNA 合成期 (S 期)、DNA 合成后期 (G_2 期), DNA 复制和蛋白质合成在间期完成。在细胞增殖过程中, 多种原因导致 DNA 损伤和染色体变异, 为保证基因组的完整, 间期主要通过 3 个细胞周期检查点 (G_1/S 检查点、S 检查点、 G_2/M 检查点) 对此进行负反馈调节, 及时中断细胞周期进程^[4], 待修复完成后再恢复运转。生理条件下, 在 S 期, Wee1 激酶能磷酸化 CDK1 的第 15 位酪氨酸, 进而抑制 CDK1 活性。在 G_2 期, DNA 复制完成后, Wee1 转而磷酸化组蛋白 2B (histone 2B, H2B) 的 37 位酪氨酸, 抑制转录共激活因子核蛋白 (nuclear protein ataxia-telangiectasia, NPAT) 和 RNA 聚合酶 II 的结合, 并招募上游组蛋白 1 (histone 1, Hist1) 的分子伴侣 HIR 组蛋白细胞周期调控缺陷同源物 A (HIR histone cell cycle regulation defective homolog A, HIRA), 下调 H2B 表达, 抑制 S 期末期组蛋白转录^[5], 维系 DNA-组蛋白的化学计量比。polo 样蛋白激酶 1 (polo-like kinase 1, PLK1) 磷酸化激活周期蛋白 25 同源蛋白 C (cyclin 25 homologous protein C, Cdc25C), Cdc25C 通过去磷酸化激活 CDK1, 活化的 CDK1 结合 CyclinB 形成 CDK1-CyclinB 复合物, 驱动细胞进入分裂期。然而基因毒性应激、烷基化剂、辐射等刺激导致 DNA 发生单链或双链断裂, DNA 损伤反应信号通路 (DNA damage response signaling pathways, DDR) 被激活^[6], 从而激活下游共济失调毛细血管扩张激酶 (ataxia telangiectasia-mutated kinase, ATM) 信号通路或共济失调毛细血管扩张 Rad3 相关激酶 (ataxia telangiectasia and Rad3 related kinase, ATR) 信号通路 (见图 1B)。

DNA 发生单链断裂, ATR 信号通路激活, 细胞周期检查点激酶 1 (checkpoint kinase 1, Chk1) 的 317 位和 345 位丝氨酸经磷酸化而激活, 活化后的 Chk1 同时磷酸化 Cdc25C 和 Wee1^[7], 抑制 Cdc25C、激活 Wee1。Wee1 激酶通过 2 条途径阻滞有丝分裂: 1) 磷酸化组蛋白 H2B 的 37 位酪氨酸, 抑制转录共激活因子 NPAT 和 RNA 聚合酶 II 的结合, 并招募了上游组蛋白伴侣 HIRA, 下调 H2B 表达,

产生 S 期阻滞; 2) 抑制 Cdc25C 从而抑制 CDK1 去磷酸化或直接磷酸化 CDK1 的第 15 位酪氨酸, 抑制 CDK1 活性, 产生 G_2/M 阻滞, 为修复受损 DNA 争取时间, 维持染色质的完整性。DNA 修复完成后, PLK1 磷酸化 Wee1 激酶, 通过泛素连接酶降解 Wee1, 同时, Chk1 对 Cdc25C 抑制作用丧失^[8], CDK1 随后被 Cdc25C 去磷酸化并重新激活, 驱动细胞进入分裂期。

DNA 发生双链断裂, ATM 信号通路激活, 细胞周期检查点激酶 2 (checkpoint kinase 2, Chk2) 磷酸化 Cdc25C 的 216 位丝氨酸, 促进 Cdc25C 与 14-3-3 蛋白结合, 致使 Cdc25C 与细胞质分离^[9], 从而抑制其活性, 进而抑制 CDK1-CyclinB 复合物磷酸化, 抑制细胞进入分裂期。

合成致死 (synthetic lethality, SL) 是指 2 个或多个非致死基因同时失活导致细胞死亡的现象^[10]。在正常细胞中, DNA 损伤还可通过抑癌基因 *p53* 介导的 2 种通路: ATM/ATR-P53-CDK4/CyclinD 和 ATM/ATR-P53-CDK2/CyclinE, 从而抑制抑癌基因 *Rb* 磷酸化, 使细胞阻滞在 G_1 期^[11], 完成 DNA 修复。然而, 在肿瘤细胞中, 抑癌基因 *p53* 突变率较高, 超过 50% 的肿瘤细胞中存在该基因的突变。*p53* 功能缺陷的肿瘤细胞 G_1/S 检查点失活, 这使得 DNA 修复主要依赖于 G_2/M 检查点^[12], 此时抑制 Wee1 会进一步使 G_2/M 检查点失活, 驱动细胞过早进入分裂期, 导致有丝分裂灾难, 从而产生 SL 效应。然而正常细胞的 *p53* 基因功能正常, 能够在 G_1/S 和 G_2/M 期检查点分别检查 DNA 是否完整, Wee1 激酶的活性被抑制时, 其功能上的缺失可以通过 *p53* 依赖的 DNA 损伤修复机制得到补偿。理论上, 抑制 Wee1 激酶活性能够选择性地杀死 *p53* 功能缺陷肿瘤细胞, 而不影响正常细胞, 是一种理想的肿瘤治疗途径。相关研究表明, Wee1 激酶在乳腺癌、卵巢癌、肝癌、宫颈癌、肺癌、鳞状细胞癌、结直肠癌、胃癌、胶质母细胞瘤、桥内弥漫性脑胶质瘤、恶性黑色素瘤中过表达且在卵巢癌、黑色素瘤和胶质母细胞瘤中的高表达与不良预后相关^[13]。因此, Wee1 激酶在相关肿瘤治疗中的作用机制及其抑制剂的开发是当下研究热点。



ATM: ataxia telangiectasia-mutated kinase (共济失调毛细血管扩张激酶); ATR: ataxia telangiectasia and Rad3 related kinase (共济失调毛细血管扩张 Rad3 相关激酶); Chk2: checkpoint kinase 2 (细胞周期检测点激酶 2); CDK1: cyclin-dependent kinase 1 (周期蛋白依赖性激酶 1); H2B: histone 2B (组蛋白 2B); Chk1: checkpoint kinase 1 (细胞周期检查点激酶 1); Cdc25C: cyclin 25 homologous protein C (周期蛋白 25 同源蛋白 C); HIRA: HIR histone cell cycle regulation defective homolog A (HIR 组蛋白细胞周期调控缺陷同源物 A); Hist 1: histone 1 (组蛋白 1); MCM complex: minichromosome maintenance proteins complex (微小染色体维持蛋白复合物); Cyclin B: 周期蛋白 B

图 1 Wee1 激酶结构 (A) 及其阻滞有丝分裂的作用机制 (B)

Figure 1 Structure of Wee1 kinase and its mechanism of action in blocking mitosis

2 Wee1 激酶与相关疾病

2.1 胃癌

胃癌 (gastric carcinoma, GC) 是我国最常见的恶性肿瘤之一。许多化疗药物可引起 GC 中肿瘤细胞的 DNA 损伤。肿瘤细胞缺乏 G₁/S 期, 大多数依赖于 G₂/M 期阻滞^[14]。Wee1 是 G₂/M 检查点的一个关键因素。Kim 等^[15]首次提出 Wee1 激酶可能在胃癌中表达, 经过一系列实验发现 Wee1 在胃癌细胞和淋巴结转移的肿瘤细胞中阳性率较

高, 过表达 Wee1 的肿瘤细胞增殖侵袭能力较强。Zhang 等^[16]还证实了 Wee1 在胃癌细胞中的表达增加, 罗哌卡因 (ropivacaine, Rop) 通过上调 *miR-520a-3p* 基因的表达使 Wee1 和磷脂酰肌醇-3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB, 又称 AKT) 失活最终抑制 GC 中肿瘤细胞增殖、迁移和侵袭, 促进细胞凋亡, 该结果展现了调控 Wee1 通路在 GC 治疗方面的潜力。

2.2 黑色素瘤

恶性黑色素瘤 (malignant melanoma, MM) 是一种由皮肤和其他器官的黑色素细胞产生的肿瘤, 在我国每年约有 2 万新增病例, 虽然靶向治疗已经取得重大进展, 但存在严重的耐药性和治疗后复发的情况。在恶性 MM 中, 无论 *p53* 的状态如何, Wee1 的高表达均可减少肿瘤细胞的 DNA 损伤, 并与恶性 MM 的增殖、转移和不良预后呈正相关。研究表明, 与大多数肿瘤不同, *p53* 在恶性 MM 中表达呈阳性^[17]。Wee1 是有丝分裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号转导通路中小鼠肉瘤病毒致癌基因同源基因 B (mouse sarcoma virus oncogene homologous gene B, *B-Raf*) 下游的关键信号分子, 可以在细胞周期中抑制 *p53*-*p21*-CDK2/CyclinE-*Rb* 通路, 从而使细胞周期在 S 期被阻断, 因此, Wee1 蛋白激酶在 MM 中的表达仍呈阳性^[18]。在动物实验中, Wee1 的高表达和微小 RNA-155 (microRNA-155, miR-155) 的缺失有助于恶性 MM 的转移。研究表明, Wee1 抑制剂和 AKT3 激酶抑制剂联用治疗 MM, 比单用 AKT3 抑制剂更有效^[19]。

2.3 胰腺癌

胰腺癌 (pancreatic ductal adenocarcinoma, PDA) 是一种致死性极高的疾病, 生存率低, 缺乏有效的靶向治疗方案。研究证明, PDA 细胞中 RNA 结合蛋白人类抗原 R (human antigen R, HuR) 沉默使细胞对 DNA 损伤剂敏感, 而 HuR 过表达则会引起抵抗。当 DNA 出现损伤时, HuR 从细胞核易位到细胞质与 Wee1 的 mRNA 结合, 通过稳定其结构上调 Wee1 的表达, Wee1 过表达促进 CDK1 磷酸化从而激活 G₂/M 检查点^[20]。这种新的应激反应机制解释了 PDA 的耐药性, 并证实了 Wee1 的快速翻译可防止 PDA 细胞发生灾难性 DNA 损伤。Kausar 等^[21]发现, Wee1 抑制剂 adavosertib 可使同源重组 (homologous recombination, HR) 功能正常的 PDA 细胞对吉西他滨化疗敏感。

2.4 卵巢癌

卵巢癌 (ovarian cancer, OC) 是妇科恶性肿瘤中死亡率最高的癌症, 早期较难诊断, 发病时多伴

随盆腹腔转移, 虽然铂类化疗可缓解症状, 但复发率高且预后不良, 导致患者 5 年生存率低于 40%。目前, 卵巢癌的靶向治疗药物聚 ADP 核糖聚合酶 (poly ADP-ribose polymerase, PARP) 抑制剂治疗范围仅包括乳腺癌 1 号基因 (breast cancer gene 1, *BRCA1*)、乳腺癌 2 号基因 (breast cancer gene 2, *BRCA2*) 突变、同源重组修复基因缺陷 (homologous recombination deficiency, HRD) 的患者, 应用存在一定局限性。相关研究发现, 由于超过 95% 的卵巢癌患者携带突变的 *p53* 基因, G₁/S 检查点基本失活, 而抑制 Wee1 可进一步使 G₂/M 检查点失活, 导致卵巢癌细胞 DNA 损伤无法修复而最终凋亡^[22]。Wee1 通过下调转录因子 E2F 信号通路抑制 DNA 甲基转移酶 1 (DNA methyltransferase 1, DNMT1) 表达, 进而上调内源性逆转录病毒, 促进肿瘤细胞分泌干扰素, 上调干扰素信号通路, 导致程序性死亡蛋白配体 1 (programmed death-ligand 1, PD-L1) 上调, 最终促进肿瘤增殖^[23]。

3 Wee1 抑制剂研究进展

已报道的 Wee1 激酶抑制剂按结构类型可分为嘧啶并吡啶酮类、嘧啶并吡唑酮类、咪唑并吡咯二酮类及其他类。本文将分别介绍 Wee1 激酶抑制剂的结构及临床研究进展, 表 1 为已进入临床阶段的 Wee1 小分子抑制剂的研究进展。

3.1 嘧啶并吡啶酮类抑制剂

3.1.1 PD0166285 Wang 等^[24]在 2010 年经高通量筛选得到化合物 PD0166285 (1), 但其选择性差, 对 Wee1 的 IC₅₀ 为 24 nmol·L⁻¹, 对细胞原癌基因酪氨酸蛋白激酶 (cell proto-oncogene tyrosine-protein kinase, c-*Src*) 的 IC₅₀ 为 9 nmol·L⁻¹, 未进入临床。Hashimoto 等^[25]发现, PD0166285 在 0.5 μmol·L⁻¹ 浓度下与野生型 p53 B16 小鼠黑色素瘤细胞共同孵育 24 h, 其表现出明显的抗增殖效果; 当 PD0166285 与 Hep3B 人肝癌细胞共同孵育 6 h 可诱导细胞凋亡。机制研究表明: PD0166285 通过抑制 CDK1 的第 15 位酪氨酸去磷酸化和抑制 CyclinB 的表达消除 S 期阻滞、使 G₂/M 检查点失活从而抑制肝癌细胞的增殖。

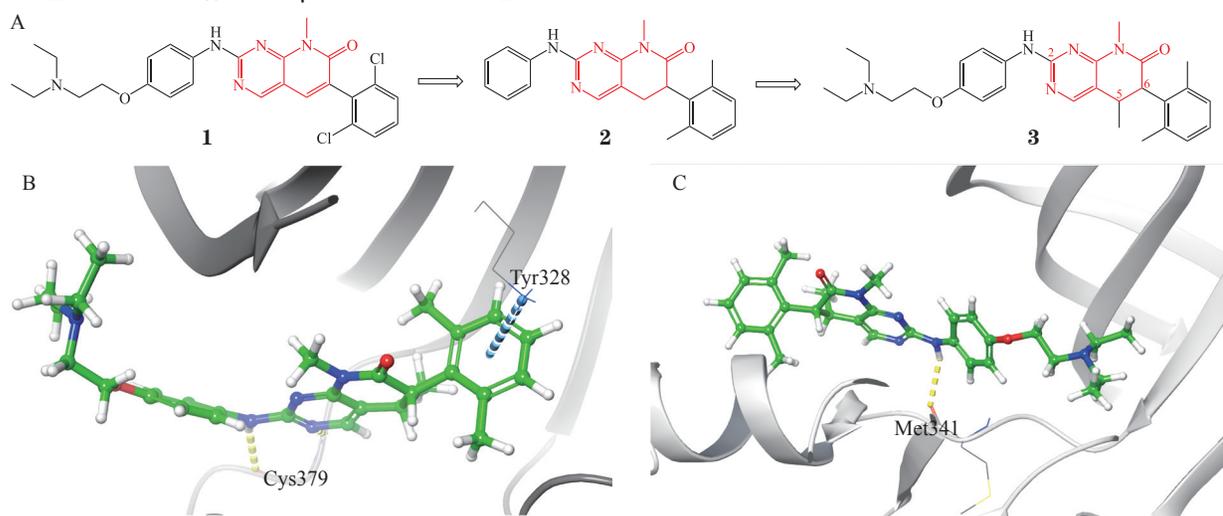
表 1 进入临床的 Wee1 小分子抑制剂

Table 1 Small molecule inhibitors of Wee1 under clinical trials

产品名称	原研公司	适应症	临床试验阶段	临床试验编号
adavosertib	美国默克公司	卵巢癌	II 期	NCT02272790
		胰腺癌	II 期	NCT01357161
		子宫癌	II 期	NCT02037230
ZN-c3	Zentalis Pharmaceuticals	骨肉瘤	II 期	NCT04814108
		骨肉瘤	II 期	NCT04833582
Debio-0123	Debiopharm Group	晚期实体瘤	I 期	NCT03968653
SY-4835	首药(北京)股份有限公司	晚期实体瘤	I 期	CTR20211519
IMP-7068	南京英派药业有限公司	晚期实体瘤	I 期	NCT04768868

为提高激酶选择性, Palmer 等^[26]对 PD0166285 进行优化(见图 2A), 去除苯胺上的含氧侧链及优化右侧苯环得到的化合物 **2**, 其活性急剧下降, 对 Wee1 的 IC_{50} 为 $0.99 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 对 c-Src 的 IC_{50} 为 $14 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$; 而再次引入含氧侧链并在嘧啶并吡啶酮骨架引入甲基得到的化合物 **3**, 其对 Wee1 的 IC_{50} 为 $0.54 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 对 c-Src 的 IC_{50} 为 $0.36 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 相较于化合物 **2**, 化合物 **3** 对 Wee1 的抑制活性略有提升 ($IC_{50}=0.54 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 对 c-Src 的抑制活性则显著下降 ($IC_{50}=0.36 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。将化合物 **3**

分别与 Wee1 激酶和 c-Src 激酶对接(见图 2B 和图 2C)发现: 1) 带有甲基的苯环与嘧啶并吡啶酮骨架垂直; 2) 化合物 **3** 苯胺 N 原子与 c-Src 激酶的氨基酸残基 Met341 形成关键氢键, 而与其与 Wee1 激酶结合模式显示, 苯胺 N 原子和临近的 2 位嘧啶 N 原子均与氨基酸残基 Cys379 形成关键氢键; 3) 吡啶酮 5 位甲基的位阻效应影响化合物 **3** 与 c-Src 的结合; 4) 与 c-Src 激酶相比, 化合物 **3** 右侧苯环与 Wee1 激酶的氨基酸残基 Tyr328 形成额外的 π - π 堆积作用。



注: 黄色线表示氢键, 蓝色表示 π - π 堆积作用

A: 嘧啶并吡啶酮类抑制剂结构优化过程; B: 化合物 **3** 与 Wee1 激酶共晶结构 (PDB ID: 5VC5); C: 化合物 **3** 与 c-Src 激酶共晶结构 (PDB ID: 4O2P)

图 2 嘧啶并吡啶酮类抑制剂结构改造及化合物 **3** 与 Wee1 激酶和 c-Src 激酶结合模式图Figure 2 Structural modification of pyrimidopyridone inhibitors and the binding pattern of compound **3** to Wee1 kinase and c-Src kinase

3.2 嘧啶并吡啶酮类抑制剂

3.2.1 Adavosertib 默克公司研发的 adavosertib (**4**, AZD-1775、MK-177), 其对 Wee1 的 IC_{50} 为 $5.2 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 是首个进入临床的 Wee1 小分子抑制

剂, 2012 年在欧盟获批孤儿药资格, 用于治疗卵巢癌。2013 年, 默克公司将该产品的全球开发和营销授权给阿斯利康公司, 用于治疗实体瘤。目前已进入 II 期临床, 主要用于治疗卵巢癌和胰腺癌。

Adavosertib 抑制 CDK1-CyclinB 复合物进入细胞核从而消除 S 期阻滞, 使 G₂/M 期检查点失活从而诱导肿瘤细胞凋亡。体外研究表明, adavosertib 与 DNA 损伤剂联用时, 先给药 DNA 损伤剂再使用 adavosertib 的疗效较优。在人宫颈腺癌细胞异种移植小鼠模型中, 经口给药卡铂 (50 mg·kg⁻¹), 间隔 24 h 再给予 adavosertib (剂量分别为 10、20 和 30 mg·kg⁻¹) 可剂量依赖性地增强卡铂的抑瘤作用^[27]。Zhang 等^[16]证实 ID8 小鼠卵巢上皮癌细胞中, 无论 p53 是否缺失, adavosertib 都可通过抑制 Wee1 激活 CDK1, 使 G₂/M 检查点失活从而诱导细胞凋亡; 在卵巢癌小鼠模型中, 50 mg·kg⁻¹ 剂量连续经口给药 2 周, 能明显降低恶性腹水发生率。

Adavosertib 对 Wee1 激酶的选择性低, 容易导致耐受性。因此 adavosertib 常与 DNA 损伤剂、DNA 修复抑制剂或聚腺苷二磷酸核糖聚合酶 (poly adenosine diphosphate ribose polymerase, PARP) 抑制剂联合使用。

Adavosertib 可诱导 DNA 损伤, 存在一定细胞毒性。Li 等^[28]发现, 鼠双微体蛋白 2 (murine double minute2, Mdm2) 拮抗剂能通过预激活 p53 蛋白而降低 adavosertib 对野生型细胞的毒性。考虑到 adavosertib 单一用药的毒性作用, 一项涉及 202 例晚期实体瘤患者的 I 期临床研究 (NCT00648648) 评估了 adavosertib 单药及与卡铂、顺铂、吉西他滨联用的疗效: 单药组 adavosertib 分别给药 325、650 和 1 300 mg, 最常见的药物相关不良事件 (adverse event, AE) 是腹泻 (22%) 和疲劳 (22%), 但单药治疗未达到最大耐受剂量 (maximal tolerable dose, MTD)。联合治疗组 MTD 为: adavosertib (225 mg, bid)、顺铂 (200 mg, bid)、吉西他滨 (175 mg, od)^[29]。在 176 例接受联合治疗的可评估患者中, 10% 的患者达到了部分缓解 (partial response, PR)。对 52 例患者的基线肿瘤样本进行分析: 19 例 p53 突变的肿瘤患者中有 4 例 (21%) 达到了 PR。AE 包括: 疲劳 (58%)、恶心 (67%)、呕吐 (35%) 和血小板减少 (44%)。结果表明, adavosertib 与吉西他滨、顺铂、卡铂联合用药是可耐受且有效的。

在卵巢癌治疗方面, 一项涉及 94 例铂耐药的上皮性卵巢癌、输卵管癌或原发性腹膜癌患者的 II 期临床研究 (NCT02272790) 评估了 adavosertib 联合卡铂、吉西他滨治疗的有效性和安全性: 吉西他滨联用组客观缓解率 (objective response rate, ORR) 和中位无进展生存期 (progression-free survival, PFS) 分别为 31.9% 和 5.5 个月, 卡铂联用组疗效最好, 其 ORR 为 66.7%, 中位 PFS 为 12 个月。所有患者都至少产生一次 AE, 3 级 AE 发生率为 40.4%, 4 级 AE 发生率为 41.5%。最常见的不良反应包括贫血 (33%)、中性粒细胞减少 (45.7%)、血小板减少 (31%)、呕吐 (10%) 和腹泻 (10%)^[30]。一项涉及 121 例 p53 突变卵巢癌患者的 II 期临床研究 (NCT01357161) 表明化疗药物与 adavosertib 联用可提高临床抗肿瘤活性: adavosertib 组 (adavosertib、紫杉醇和卡铂联合治疗) 患者的中位 PFS 为 10 个月, ORR 为 81%; 而对照组 PFS 为 1 个月, ORR 为 8%; 安慰剂组 (安慰剂、紫杉醇和卡铂联合治疗) ORR 为 76%^[31]。

在胰腺癌治疗方面, 一项涉及 34 例患者的 II 期临床 (NCT02037230) 研究表明^[32], adavosertib 联合吉西他滨和放疗是有效和可耐受的: 患者总生存期 (overall survival, OS) 显著延长至 21.7 个月, 显示了 adavosertib 在胰腺癌治疗中的应用前景。

3.2.2 ZN-c3 针对 adavosertib 临床试验中存在的耐受性差, 间歇性给药等问题, Zentalis Pharmaceuticals 公司研发出一种口服小分子 Wee1 抑制剂 ZN-c3 (**5**), 选择性好, 细胞毒性较小。2021 年 ZN-c3 在美国获批孤儿药资格, 用于治疗骨肉瘤, 目前已进入 II 期临床。

Huang 等^[33]在对 adavosertib 结构基础上, 对其尾区的 *N*-甲基哌嗪优化 (见图 3) 得到的化合物 **6**、**7**, 小鼠肝微粒体清除率高, 分别为 603 和 1 060 mL·min⁻¹·kg⁻¹, 且低剂量下口服暴露量偏低, 分别为 1 和 0.7 μmol·L⁻¹·h⁻¹; 保留尾区 *N*-甲基哌嗪结构, 优化头区得到的化合物 **8**, H23 细胞抑制活性显著降低 (IC₅₀=1 533 nmol·L⁻¹); 将氟替代为羟基的化合物 **9** 的细胞活性下降 (IC₅₀=2 524 nmol·L⁻¹); 考虑到仲醇结构代谢存在潜在毒性, 优化为叔醇得到的化合物 **10**, 其细胞活性提升了近 8 倍 (IC₅₀=

317 nmol·L⁻¹), 维持较低的肝微清除率 (CL) 为 38 mL·min⁻¹·kg⁻¹ 和血浆蛋白结合率 (PPB) 为 73%, 1 μmol·L⁻¹ 浓度下化合物 **10** 只对 4 种激酶即 Wee1、Polo 样激酶 2 (Polo-like kinase 2, PLK2)、酵母 Sps1/Ste20 相关激酶 4 (yeast Sps1/Ste20-related kinase 4, YSK4) 和表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 的抑制率大于 90%。将甲基改为乙基得到的 ZN-c3, 显示出良好的细胞效力 (IC₅₀ = 103 nmol·L⁻¹) 和内在清除率。1 μmol·L⁻¹ 浓度下只对 5 种激酶即 Wee1、PLK2、YSK4、EGFR、Polo 样激酶 3 (Polo-like kinase 3, PLK3) 的抑制率大于 90%。在小鼠 A427 非小细胞肺癌异种移植模型, 30 mg·kg⁻¹ 剂量给药即可显著抑制 CDK1 磷酸化, 80 mg·kg⁻¹ 剂量给药则表现出与 adavosertib 相当的肿瘤抑制率。

2019 年 11 月, 在美国开展一项涉及 39 例实体瘤患者的 I 期临床试验 (NCT04158336)^[34], 评估 ZN-c3 单独使用的安全性、耐受性、有效性、药动学和药效学, 在晚期或转移性实体瘤患者中开展单药 I 期剂量递增试验 (25~400 mg, qd), 口

服给药 ZN-c3, 有 5 例患者实现 PR, 其中 1 例 IV 期结肠直肠癌并转移至肝脏、淋巴结和胸膜的男性患者, 口服 ZN-c3 (450 mg, qd) 后达到 PR, 总体肿瘤负荷降低了 42%; 1 例 IV 期卵巢癌并转移到胸膜和腹膜的女性患者, 口服 ZN-c3 (175 mg, bid) 后达到 PR, 总体肿瘤负荷降低了 56%; 1 例 IV 期非小细胞肺癌并转移至肝肺的男性患者口服 ZN-c3 (350 mg, qd) 治疗后达到 PR, 总体肿瘤负荷降低了 50%。ZN-c3 常见不良反应包括: 腹泻、呕吐、贫血、外周水肿、碱性磷酸酶升高、味觉障碍、低磷血症、发热、肝酶升高和中性粒细胞计数减少。

2021 年 6 月在澳大利亚、加拿大、格鲁吉亚等国开展 ZN-c3 的 II 期临床试验 (NCT04814108), 针对复发性或持续性子宫癌患者, 评估 ZN-c3 在子宫癌患者中的安全性和有效性, 目前相关数据并未披露。

2021 年 8 月在美国开展 ZN-c3 的 II 期临床试验 (NCT04833582), 针对复发或转移性骨肉瘤的 10 岁及以上患者, 评估 ZN-c3 与吉西他滨联合治疗转移性骨肉瘤患者的安全性和有效性, 目前相关数据并未披露。

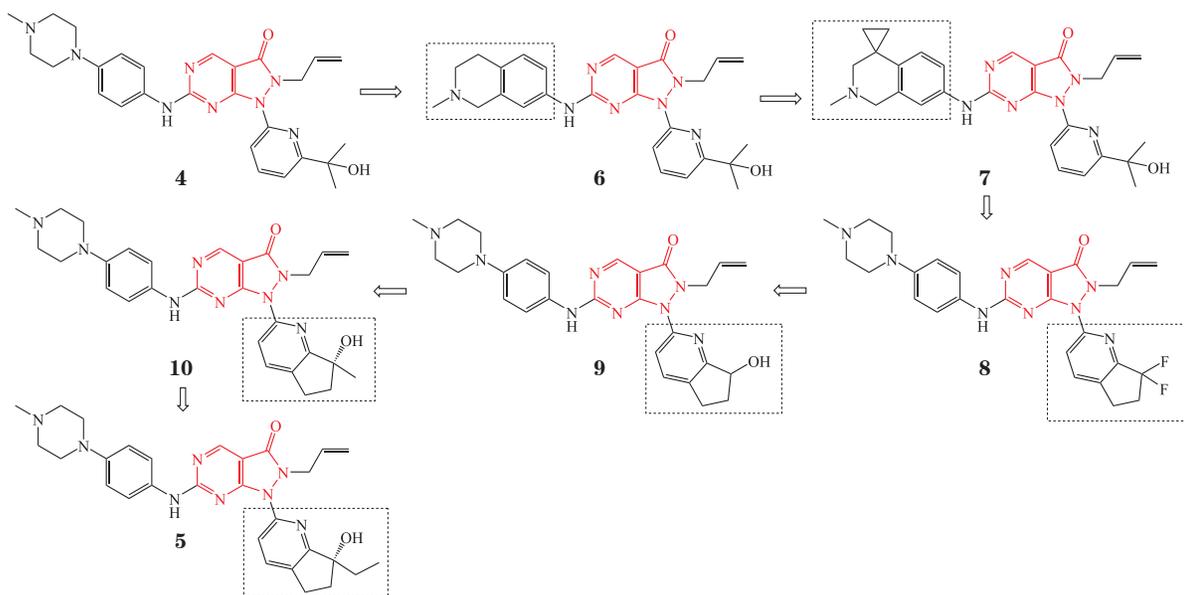


图 3 嘧啶并吡唑酮类化合物结构改造过程

Figure 3 Structural modification process of pyrimidopyrazolones

3.3 咪唑并吡咯二酮类

经高通量筛选得到的化合物 PD0407824 (**11**) 活性较好, 其对 Wee1 的 IC₅₀ 为 97 nmol·L⁻¹、对

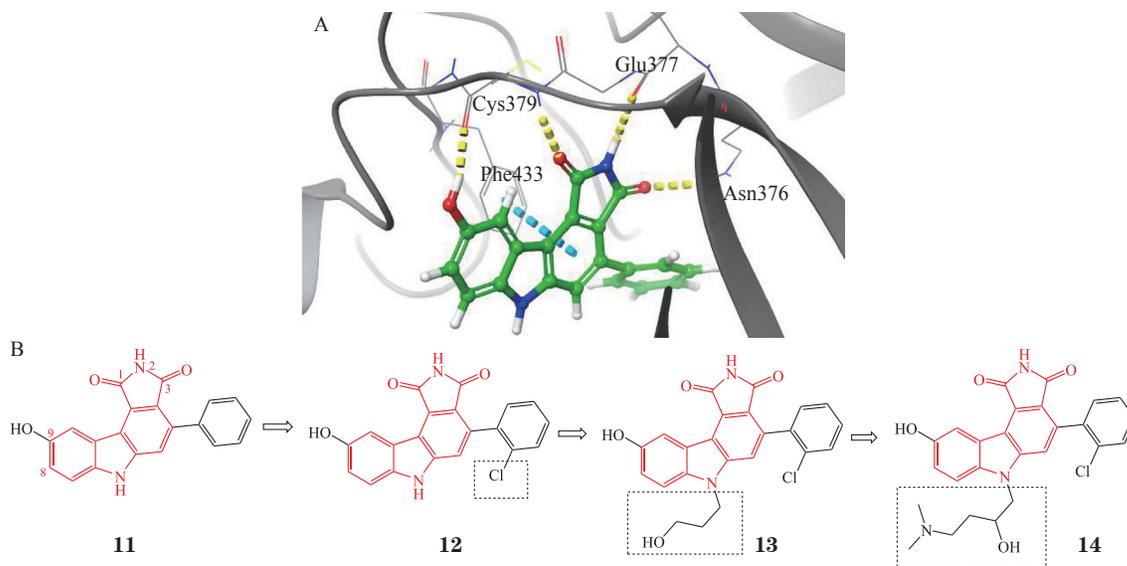
Chk1 的 IC₅₀ 为 47 nmol·L⁻¹, 但其选择性和溶解性差^[35], 未进入临床。化合物 PD0407824 与 Wee1 的结合模式如下 (见图 4A): 1) 在铰链区, 1 位羰

基氧和 9 位羟基氧与铰链区 Cys379 形成氢键; 2) 2 位 N 和 3 位羰基氧分别与 Glu377 和 Asn376 形成氢键; 3) 咪唑环可与 Phe433 形成 π - π 堆积作用; 4) C-8 伸向溶剂可及区。体外实验表明, 其抑制活性主要与 *Wee1* 基因表达水平有关。在 *Wee1* 基因高表达的肿瘤细胞系 (如宫颈癌和乳腺癌细胞) 中, 其可以抑制肿瘤细胞生长并诱导凋亡, 但在 *Wee1* 基因低表达的癌细胞系 (如前列腺癌细胞) 中, 其抑制作用较弱。

优化右侧苯环 (见图 4B) 得到的化合物 **12**, 其对 *Wee1* 的 IC_{50} 为 $11 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、对 Chk1 的 IC_{50}

为 $440 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 在提升 *Wee1* 抑制活性的同时显著提升了选择性, 但同样存在溶解性差的问题。对骨架 N 取代得到的化合物 **13**, 其对 *Wee1* 的 IC_{50} 为 $9 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、对 Chk1 的 IC_{50} 为 $170 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 选择性下降且并未增加溶解度, 进一步优化侧链后得到化合物 **14**, 其对 *Wee1* 的 IC_{50} 为 $58 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、对 Chk1 的 IC_{50} 为 $30 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 溶解度提升但选择性显著下降。

该类化合物虽然存在溶解度差的问题, 但提供了一个与 *Wee1* 结合的全新模式, 为后续抑制剂开发提供了新的思路。



注: 黄色代表氢键, 蓝色代表 π - π 堆积作用

A: PD0407824 与 *Wee1* 激酶对接图 (PDB ID: 3BI6); B: 咪唑并吡咯二酮类抑制剂结构

图 4 咪唑并吡咯二酮类抑制剂结构改造及 PD0407824 与 *Wee1* 激酶结合模式图

Figure 4 Structural modification of carbazolopyrrole diketone inhibitors and the binding pattern of PD0407824 to *Wee1* kinase

3.4 其他

Debio-0123 是 Debiopharm Group 公司研发的一种口服小分子 *Wee1* 激酶抑制剂, 体外实验表明其通过抑制 CDK1 磷酸化, 时间和剂量依赖性地诱导 DNA 损伤, 从而促进肿瘤细胞凋亡, 在无胸腺裸鼠的 A427 皮下异种移植瘤模型中, $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量连续口服给药 28 d, 肿瘤明显消退^[36]。2019 年 7 月, 在荷兰和西班牙开展 I 期临床试验 (NCT03968653), 与卡铂联合治疗复发或难治性局部晚期或转移性实体瘤, 预计在 2022 年 12 月 5 日前完成。

SY-4835 是由首药 (北京) 股份有限公司研发

的一种小分子 *Wee1* 抑制剂, 2021 年 6 月在中国开展实体瘤的 I 期临床试验 (CTR20211519)。

IMP-7068 是南京英派药业有限公司研发的一种小分子 *Wee1* 抑制剂, 2021 年 2 月, 开展 I 期临床试验 (NCT04768868), 评估单药治疗晚期实体瘤患者的安全性、耐受性和初步抗肿瘤活性。

4 结语与展望

在细胞有丝分裂进程中, *Wee1* 激酶在 G_2/M 期检查点发挥关键作用, 其功能异常可引发细胞有丝分裂灾难, 诱导细胞凋亡。由于肿瘤细胞多存在

p53 功能缺陷, 而 *Wee1* 高表达, 故抑制 *Wee1* 可导致肿瘤细胞 SL。虽然 *Wee1* 激酶活性对肿瘤细胞的信号传导起着至关重要的作用, 但迄今为止, 已报道的 *Wee1* 激酶抑制剂绝大部分未能进入临床, 即便是进入临床的抑制剂, 如 *adavosertib* 也因选择性低、存在脱靶效应引发安全性问题。*Adavosertib* 单药治疗存在一定的细胞毒性, 导致 3 级或以上的 AE。*ZN-c3* 选择性优于 *adavosertib*, 但目前临床数据披露较少, 其疗效和潜在毒性尚不明确。

临床试验中 *Wee1* 抑制剂多与其他抗癌药物联用, 然而, 还需要进一步的研究来确定这些药物在临床上潜在的脱靶效应和疗效。如何保持抑制剂本身的疗效, 同时把控 *Wee1* 激酶抑制剂和其他药物或治疗之间的平衡, 给患者带来最大的益处是当下需要解决的问题。因此, 寻找具有高选择性、低毒性的 *Wee1* 抑制剂, 并探索与其他药物联用的方式及剂量仍然是今后研究的重点。

【参考文献】

- [1] Nurse P. Genetic control of cell size at cell division in yeast[J]. *Nature*, 1975, 256(5518): 547-551.
- [2] Mahajan K, Mahajan N P. WEE1 tyrosine kinase, a novel epigenetic modifier[J]. *Trends Genet*, 2013, 29(7): 394-402.
- [3] Nakanishi M, Aado H, Watanabe N, et al. Identification and characterization of human Wee1B, a new member of the Wee1 family of CDK-inhibitory kinases[J]. *Genes Cells*, 2000, 5(10): 839-847.
- [4] Kastan M B, Bartek J. Cell-cycle checkpoints and cancer[J]. *Nature*, 2004, 432(7015): 316-323.
- [5] Mahajan K, Fang B, Koomen J M, et al. H2B Tyr37 phosphorylation suppresses expression of replication-dependent core histone genes[J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2012, 19(9): 930-937.
- [6] Zitouni S, Nabais C, Jana S C, et al. Polo-like kinases: structural variations lead to multiple functions[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(7): 433-452.
- [7] Ma M, Rodriguze A, Sugimoto K, et al. Activation of ATR-related protein kinase upon DNA damage recognition[J]. *Curr Genet*, 2020, 66(2): 327-333.
- [8] Mueller S, Haas-Kogan D A. WEE1 Kinase as a target for cancer therapy[J]. *J Clin Oncol*, 2015, 33(30): 3485-3487.
- [9] Matsuoka S, Rotman G, Ogawa A, et al. Ataxia telangiectasia-mutated phosphorylates Chk2 *in vivo* and *in vitro*[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2000, 97(19): 10389-10394.
- [10] Fang B L. Development of synthetic lethality anticancer therapeutics[J]. *J Med Chem*, 2014, 57(19): 7859-7873.
- [11] Otto T, Sicinski P. Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy[J]. *Nat Rev Canc*, 2017, 17(2): 93-115.
- [12] Toledo L, Neelsen K J, Lukas J, et al. Replication catastrophe: when a checkpoint fails because of exhaustion[J]. *Mol Cell*, 2017, 66(6): 735-749.
- [13] Aarts M, Sharpe R, Garcia-Murillas I, et al. Forced mitotic entry of S-phase cells as a therapeutic strategy induced by inhibition of WEE1[J]. *Canc Discov*, 2012, 2(6): 524-539.
- [14] Kwee R M, Kwee T C. Imaging in local staging of gastric cancer: a systematic review[J]. *J Clin Oncol*, 2007, 25(15): 2107-2116.
- [15] Kim H Y, Cho Y, Kang H, et al. Targeting the WEE1 kinase as a molecular targeted therapy for gastric cancer[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(31): 49902-49916.
- [16] Zhang N L, Xing X J, Gu F C, et al. Ropivacaine inhibits the growth, migration and invasion of gastric cancer through attenuation of WEE1 and PI3K/AKT signaling via miR-520a-3p[J/OL]. *Onco Targets Ther*, 2020, 13: 5309-5321[2021-10-24]. <https://doi.org/10.2147/OTT.S244550>.
- [17] Kuzu O F, Gowda R, Sharma A, et al. Identification of WEE1 as a target to make AKT inhibition more effective in melanoma[J]. *Cancer Biol Ther*, 2018, 19(1): 53-62.
- [18] Disano J A, Huffnagle I, Gowda R, et al. Loss of miR-155 upregulates WEE1 in metastatic melanoma[J]. *Melanoma Res*, 2019, 29(2): 216-219.
- [19] Bhattacharya A, Schmitz U, Wolkenhauer O, et al. Regulation of cell cycle checkpoint kinase WEE1 by miR-195 in malignant melanoma[J]. *Oncogene*, 2013, 32(26): 3175-3183.
- [20] Lal S, Burkhardt R A, Beeharry N, et al. HuR posttranscriptionally regulates WEE1: implications for the DNA damage response in pancreatic cancer cells[J]. *Cancer Res*, 2014, 74(4): 1128-1140.
- [21] Kausar T, Schreiber J S, Karnak D, et al. Sensitization of pancreatic cancers to gemcitabine chemoradiation by WEE1 kinase inhibition depends on homologous recombination repair[J]. *Neoplasia*, 2015, 17(10): 757-766.
- [22] Shackney S E, Shankey T V. Cell cycle models for molecular biology and molecular oncology: exploring new dimensions[J]. *Cytometry*, 1999, 35(2): 97-116.
- [23] Boni A, Cogdill A P, Dang P, et al. Selective BRAF(V600E) inhibition enhances T-cell recognition of melanoma without affecting lymphocyte

- function[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(13): 5213–5219.
- [24] Wang Y, Li J, Booher R N, *et al.* Radiosensitization of p53 mutant cells by PD0166285, a novel G(2) checkpoint abrogator[J]. *Cancer Res*, 2001, 61(22): 8211–8217.
- [25] Hashimoto O, Shinkawa M, Torimura T, *et al.* Cell cycle regulation by the Wee1 inhibitor PD0166285, pyrido [2,3-*d*] pyrimidine, in the B16 mouse melanoma cell line[J/OL]. *BMC Cancer*, 2006, 6: 292[2021-10-24]. <https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2407-6-292>.
- [26] Palmer B D, Smaill J B, Rewcastle G W, *et al.* Structure-activity relationships for 2-anilino-6-phenylpyrido [2,3-*d*] pyrimidin-7(8*H*)-ones as inhibitors of the cellular checkpoint kinase Wee1[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2005, 15(7): 1931–1935.
- [27] Richer A L, Cala J M, O'brien K, *et al.* WEE1 kinase inhibitor AZD1775 has preclinical efficacy in LKB1-deficient non-small cell lung cancer[J]. *Cancer Res*, 2017, 77(17): 4663–4672.
- [28] Li Y Z, Saini P, Sriraman A, *et al.* Mdm2 inhibition confers protection of p53-proficient cells from the cytotoxic effects of Wee1 inhibitors[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(32): 32339–32352.
- [29] Leijen S, van Geel R M J M, Pavlick A C, *et al.* Phase I study evaluating WEE1 inhibitor AZD1 775 as monotherapy and in combination with gemcitabine, cisplatin, or carboplatin in patients with advanced solid tumors[J]. *J Clin Oncol*, 2016, 34(36): 4371–4380.
- [30] Moore K N, Chambers S K, Hamilton E P, *et al.* Adavosertib with chemotherapy (CT) in patients (pts) with platinum-resistant ovarian cancer (PPROC): an open label, four-arm, phase II study[J/OL]. *J Clin Oncol*, 2019, 37(15): S5513[2021-10-24]. https://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2019.37.15_suppl.5513.
- [31] Oza A M, Estevez-Diz M, Grischke E M, *et al.* A biomarker-enriched, randomized phase II trial of adavosertib (AZD1775) plus paclitaxel and carboplatin for women with platinum-sensitive *tp53*-mutant ovarian cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2020, 26(18): 4767–4776.
- [32] Cuneo K C, Morgan M A, Sahai V, *et al.* Dose escalation trial of the Wee1 inhibitor adavosertib (AZD1775) in combination with gemcitabine and radiation for patients with locally advanced pancreatic cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2019, 37(29): 2643–2650.
- [33] Huang P Q, Boren B C, Hegde S G, *et al.* Discovery of ZN-c3, a highly potent and selective Wee1 inhibitor undergoing evaluation in clinical trials for the treatment of cancer[J]. *J Med Chem*, 2021, 64(17): 13004–13024.
- [34] Tolcher A, Mamdani H, Chalasani P, *et al.* Clinical activity of single-agent ZN-c3, an oral WEE1 inhibitor, in a phase I dose-escalation trial in patients with advanced solid tumors[J/OL]. *Cancer Res*, 2021, 81(13): CT016[2021-10-24]. https://cancerres.aacrjournals.org/content/81/13_Supplement/CT016. DOI:10.1158/1538-7445.AM2021-CT106.
- [35] Smaill J B, Lee H H, Palmer B D, *et al.* Synthesis and structure-activity relationships of soluble 8-substituted 4-(2-chlorophenyl)-9-hydroxypyrrulo [3,4-*c*] carbazole-1,3(2*H*,6*H*)-diones as inhibitors of the Wee1 and Chk1 checkpoint kinases[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2008, 18(3): 929–933.
- [36] Gelderblom H, Gietema J A, Desar I M E, *et al.* First-in-human phase I study of a novel oral Wee1 inhibitor (Debio 0123) in combination with carboplatin in patients with advanced solid tumours[J/OL]. *Ann Oncol*, 2020, 31: S501–S502[2021-10-24]. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.08.715>.



【专家介绍】唐伟方：药物化学专业博士生导师，中国药科大学教务处处长。主持和参与国家自然科学基金、江苏省自然科学基金、校企合作等多项科研项目。发表 SCI 论文 20 多篇，申请发明专利 5 项，主编和参编学术著作和教材 8 本。主要研究方向：小分子化学药物的设计与合成、不对称合成及药物合成工艺研究。2015 年作为主要参与人发现的 1.1 类抗肿瘤新药临床前化合物转让给上海复星医药公司，目前在美国、澳大利亚和中国进行 I 期临床试验，2019 年底获美国 FDA 授予孤儿药资格认定，用于治疗急性髓性白血病（AML）。



【专家介绍】陈亚东：博士、教授，药物化学专业和药学信息学专业博士生导师。江苏省“青蓝工程”优秀青年骨干教师（2008），江苏省“青蓝工程”中青年学术带头人（2014）。美国密歇根大学（University of Michigan, Ann Arbor）医学院综合癌症中心访问学者。主持和参与了多项国家自然科学基金、国家重大科技专项“重大新药创制”等科研项目。申请国内专利 14 项、国际专利 1 项、授权 3 项；主编或参编学术著作和教材 3 本；在 *J Med Chem*、*Eur J Med Chem*、*J Chem Inf Model J* 等期刊发表 SCI 论文 80 多篇。2015 年研究团队发现的 1.1 类抗肿瘤新药以 1.5 亿元人民币里程碑金转让给上海复星医药，目前在美国、澳大利亚和中国进行 I 期临床试验，2019 年底获美国 FDA 授予孤儿药资格认定，用于治疗急性髓性白血病（AML）。