

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta  
Laboratoř růstových regulátorů



## Biochemická a buněčná selektivita inhibitorů cyklin-dependentních kinas

### DISERTAČNÍ PRÁCE

Autor:	<b>Mgr. Denisa Hendrychová</b>
Studijní obor:	P1527 Biologie
Studijní program:	1501V019 Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Vladimír Kryštof, Ph.D.
Rok:	2021

„Prohlašuji, že jsem předloženou disertační práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.“

V Olomouci dne 19.5. 2021

.....



„Ráda bych poděkovala svému školiteli doc. RNDr. Vladimíru Kryštofovi, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost, cenné rady i věcnou kritiku při vypracování této disertační práce. Velké díky patří také Mgr. Radku Jordovi, Ph.D., který mě po celou dobu studií učil a provázel při mé vědecké činnosti. Ráda bych také jmenovitě poděkovala Mgr. Evě Řezníčkové, Ph.D., Mgr. Heleně Rezkové a Mgr. Miroslavu Peřinovi za jejich přínosné rady, podporu a udržení zdravého ducha. Děkuji také celému kolektivu pracovníků Laboratoře růstových regulátorů a vyčleněné Katedry experimentální biologie, zejména Janě Hudcové, Bc. Janě Komárkové a Mgr. Veronice Vojáčkové, a také všem spoluautorům, kteří se podíleli na publikacích.“

## **Bibliografická identifikace**

Jméno a příjmení autora	Denisa Hendrychová
Název práce	Biochemická a buněčná selektivita inhibitorů cyklin-dependentních kinas
Typ práce	Disertační
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci & Ústav experimentální botaniky AVČR
Vedoucí práce	doc. RNDr. Vladimír Kryštof, Ph.D.
Konzultant	Mgr. Radek Jorda, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2021

### **Abstrakt**

V průběhu posledních 30 let bylo objeveno velké množství inhibitorů cyklin-dependentních kinas (CDK), z nichž několik bylo schváleno pro léčbu rakoviny a více než 100 látek je komerčně dostupných jako chemické nástroje pro buněčnou biologii. Nicméně míra, do jaké jsou vlastnosti těchto látek studovány s ohledem na jejich účinnost, selektivitu vůči jednotlivým CDK a buněčné efekty, se významně liší. Inhibitory bývají obvykle označovány jako vysoce selektivní a účinné, nicméně v mnohých případech nebyly dostatečně nebo správně charakterizovány. Znalost biochemické selektivity je přitom nezbytná pro adekvátní interpretaci následků jejich působení a nežádoucích účinků a také pro jejich správné použití v biologických studiích. Nežádoucí účinky však mohou souviset i s jejich nízkou buněčnou selektivitou, kdy tyto látky inhibují kinasy nebo procesy, které podporují nádorové bujení, ale mohou mít esenciální funkci také v nenádorových buňkách. Tato disertační práce je zaměřena na charakterizaci vybraných komerčně dostupných inhibitorů CDK (CDKi), které byly publikovány jako selektivní vůči CDK regulujícím buněčný cyklus. Na základě několika typů experimentů byla hodnocena jejich selektivita vůči CDK1/2/4/5/7/9 a jejich efekty na buněčný cyklus, které byly porovnávány s publikovanými daty. Výsledky poukazují, že většina původně selektivních CDKi by měla být klasifikována jako panselektivní a neměla by být využívána jako selektivních chemických sond. V druhé části práce byl navržen koncept cíleného transportu CDKi konjugovaných s folátem prostřednictvím folátového receptoru exprimovaného nádorovými buňkami. Cytometrickou analýzou byl potvrzen specifický transport konjugátů do nádorových buněk za současného zachování CDK inhibičních vlastností. Cílené doručení inhibitorů tak představuje možný způsob vedoucí k vyšší buněčné selektivě léčiv.

Klíčová slova	Cyklin-dependentní kinasa, inhibitor, selektivita, off-target
Počet stran	83
Počet příloh	3
Jazyk	Český

### **Bibliographical identification**

Autor's first name and surname	Denisa Hendrychová
Title	Biochemical and cellular selectivity of cyclin-dependent kinase inhibitors
Type of thesis	Ph.D. thesis
Department	Laboratory of Growth Regulators, Faculty of Science, Palacký University & Institute of Experimental Botany ASCR
Supervisor	doc. RNDr. Vladimír Kryštof, Ph.D.
Consultant	Mgr. Radek Jorda, Ph.D.
The year of presentation	2021

### **Abstract**

Over the last 30 years a number of small-molecule inhibitors of cyclin-dependent kinases (CDK) have been discovered. Some of them have been approved for the treatment of cancer and more than 100 are commercially available as chemical tools for cell biology. However, the extent to which the properties of these compounds are studied varies significantly with respect to their efficacy, selectivity for individual CDKs and cellular effects. Inhibitors are often claimed to be potent and selective, but they have not been sufficiently or correctly validated in many cases. The knowledge of biochemical selectivity is essential for adequate interpretation of the consequences of their action and side effects, as well as for their correct application in biological studies. However, side effects may also be related to their low cellular selectivity, because they inhibit kinases or processes that promote tumor growth, which may have an essential function in non-tumor cells. This doctoral thesis is focused on the characterisation of selected commercially available CDK inhibitors (CDKi), which are claimed to selectively inhibit cell-cycle regulating CDKs. Selectivity of CDKi toward CDK1/2/4/5/7/9 and their effects on a cell cycle were evaluated in several types of experiments and compared with published data. Results suggest that most originally selective CDKi should be reclassified as pan-selective and should not be used as a selective chemical tools. In the second part of this thesis, the concept of targeted transport of folate-conjugated CDKi through the folate receptor expressed by tumor cells was suggested. Cytometric analysis confirmed the specific transport of the conjugates into tumor cells while preserving their CDK inhibitory properties. Therefore, targeted delivery of inhibitors represents a possible strategy to achieve increased cellular selectivity of drugs.

Keywords	Cyclin-dependent kinase, inhibitor, selectivity, off-target
Number of pages	83
Number of appendices	3
Language	Czech

## OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	7
1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE .....	9
2 CYKLIN-DEPENDENTNÍ KINASY (CDK) .....	11
2.1 Biologické funkce CDK .....	13
2.2 CDK jako terapeutické cíle .....	14
3 NÍZKOMOLEKULÁRNÍ INHIBITORY CDK (CDKi).....	16
3.1 Biochemická selektivita CDKi.....	18
3.1.1 Charakterizace selektivity inhibitorů .....	21
3.1.2 Biofyzikální identifikace cílů kinas v intaktních buňkách.....	23
3.1.3 Genetické přístupy identifikace a validace cíle .....	25
3.2 Současný pokrok ve vývoji selektivních CDKi .....	26
3.2.1 CDK4/6i.....	27
3.2.2 CDK7i.....	30
3.2.3 CDK8/19i.....	31
3.2.4 CDK9i.....	33
3.2.5 CDK12/13i.....	35
3.2.6 Kovalentní inhibitory .....	36
3.2.7 PROTAC.....	40
3.3 Buněčná selektivita CDKi.....	42
4 METODIKA .....	46
4.1 Buněčné kultury .....	46
4.2 Analýza cytotoxicity .....	46
4.3 Kinasový inhibiční test.....	47
4.4 Analýza buněčného cyklu .....	47
4.5 SDS-PAGE a imunodetekce .....	48
4.6 Analýza teplotní denaturace.....	48
4.7 Analýza kompetice na folátovém receptoru.....	50
5 KOMENTOVANÉ VÝSLEDKY A DISKUSE .....	52
5.1 Biochemická selektivita komerčně dostupných CDKi .....	52
5.2 Buněčná selektivita konjugátů 2,6,9-trisubstituovaných purinů .....	57
6 ZÁVĚR.....	60
7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	63
8 CURRICULUM VITAE .....	81
9 PŘÍLOHY .....	83

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ABL	Abelson murine leukemia viral oncogene homolog
ADP	Adenosine diphosphate
Akt	RAC-alpha serine/threonine-protein kinase
ARK5	AMPK-related protein kinase
ATP	Adenosine triphosphate
BCR	Breakpoint cluster region protein
BRET	bioluminescence resonance energy transfer
BSA	Bovine serum albumin
BTK	Bruton kinase
CAMK	Calmodulin/Calcium regulated kinases
Cas9	CRISPR associated protein 9
CDK	Cyclin-dependent kinase
CDKi	Inhibitor of cyclin-dependent kinase
CETSA	Cellular thermal shift assay
Cip/Kip	CDK interacting protein/kinase inhibitory protein
c-Jun	Proto-oncogene c-Jun
CLK	CDC-like kinase
CRISPR	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats
CSNK (CK)	Casein kinase
CTD	C-terminal domain
DARTS	Drug affinity responsive target stability
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
DTT	Dithiothreitol
DYRK	Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EGTA	Ethylene glycol-bis(beta-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid
EMEM	Minimum Essential Medium Eagle
ER <sup>+</sup>	Estrogen receptor positive
ETS2	ETS proto-oncogene 2
FAK	Focal adhesion kinase
FDA	Food and drug administration
FLT3	Fms like tyrosine kinase 3
FR	Folate receptor
GAK	Cyclin-G-associated kinase
GSK	Glycogen synthase kinase
GSK3	Glycogen synthase kinase
HIPK	Homeodomain-interacting protein kinase
IC50	Half maximal inhibitory concentration
INK4	Inhibitor of cyclin-dependent kinase 4
IRAK	Interleukin-1 receptor-associated kinase
KIT	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase

LiP-MS	Limited proteolysis-coupled mass spektrometry
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MBP	Myelin basic protein
Mcl-1	Induced myeloid leukemia cell differentiation protein
MED	Mediator complex
MEF	Mouse embryonic fibroblasts
MEK	Mitogen-activated protein kinase kinase
MLCK	Myosin light chain kinase
MS	Mass spectrometry
mTOR	The mechanistic target of rapamycin
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
Myc	Myc proto-oncogene
NEK	Never in mitosis A-related kinase
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PAK	p21-activated kinase
PARP	Poly [ADP-ribose] polymerase
PBK	PDZ binding kinase
PBS	Phosphate buffered saline
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor
PI3K	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase
PIM	Proto-oncogene serine/threonine-protein kinase
PKN2	Serine/threonine-protein kinase N2
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
PRKD	Protein kinase D
PROTAC	Proteolysis targeting chimera
P-TEFb	Positive transcription elongation factor b
Rb	Retinoblastoma protein
RNA	Ribonucleic acid
ROCK	Rho-associated protein kinase
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
RUNX	Runt-related transcription factor
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SETD	SET domain-containing protein
SNARK	SNF1/AMP kinase-related kinase
SPROX	Stability of proteins from rates of oxidation
STAT3	Signal transducer and activator of transcription
TAOK	Thousand and one amino acid protein kinase
TFIID	Transcription factor IID
TGFβ	Transforming growth factor beta
TPP	Thermal proteome profiling
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
TRK	Tropomyosin-related kinase
TTK	Phosphotyrosine picked threonine-protein kinase
ULK	Unc-51-like kinase
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WT	Wild type

## 1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE

Proteinkinasy tvoří jednu z největších enzymových rodin lidského genomu a působí jako klíčové signální přenašeče v řadě biologických procesů (Manning *et al.*, 2002). V podstatě každý přenos signálu v buňce probíhá prostřednictvím fosfotransferových kaskád tvořených proteinkinasami a jejich narušená funkce je spojována s rozvojem řady chorob včetně nádorových onemocnění (Zhang *et al.*, 2009). Proteinkinasy tak poskytují rozsáhlou skupinu buněčných cílů pro terapeutickou intervenci prostřednictvím modulace jejich aktivity. V průběhu posledních 30 let byla objevena celá řada jejich nízkomolekulárních inhibitorů a více než 50 látek bylo schváleno pro klinické použití v protinádorové léčbě, přičemž většina z nich reversibilně interaguje s ATP-vazebným místem kinas (Roskoski, 2021).

Vysoký stupeň strukturní podobnosti ATP-vazebného místa však poskytuje pouze omezené možnosti selektivně modulovat jednotlivé kinasy a dostupné inhibitory tak často interagují s více než jedním proteinem. I když je tato skutečnost všeobecně známa, dostupnost informací o biochemické selektivitě jednotlivých inhibitorů se výrazně liší (Klaeger *et al.*, 2017). Identifikace biochemických cílů a mechanismu účinku sice není podmínkou pro schválení látek pro léčebné použití, nicméně jejich nedostatečná charakterizace společně s nesprávnou selekcí pacientů ztlačně přispívá k selhání léčiv při jejich klinickém hodnocení (Lin *et al.*, 2019). Inhibice vedlejších cílů (tzv. *off-targets*) je totiž často zodpovědná za nežádoucí vedlejší účinky a toxicitu. V některých případech mohou mít ale i výhodné důsledky a tato aktivita mimo primární cíl může být nezbytná pro jejich protinádorový účinek. Kromě toho znalost mechanismu účinku umožňuje odhalit biomarkery pro selekci vhodných pacientů a predikci terapeutické odpovědi. Je prokázáno, že klinické studie využívající prediktivní biomarkery pro výběr pacientů mají přibližně dvakrát větší míru úspěšnosti než ty, které je nevyužívají (Wong *et al.*, 2019). Informace o biochemické selektivitě inhibitorů jsou však důležité také pro adekvátní interpretaci biologických účinků látek a jejich správné použití v základním výzkumu, ve kterém jsou často využívány pro cílenou inhibici za účelem pochopení základních buněčných pochodů a funkcí kinas. Nedostatečně nebo chybně stanovená selektivita inhibitorů vede k zavádějícím výsledkům a komplikuje tyto studie, které jsou zásadní pro vědu a výzkum (Munoz, 2017; Lin *et al.*, 2019).

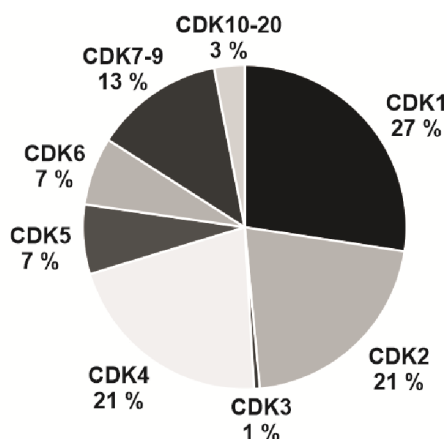
Nežádoucí vedlejší účinky a systémová toxicita však mohou být způsobeny i nízkou buněčnou selektivitou proteinkinasových inhibitorů. Většina těchto látek inhibuje kiny a procesy, které podporují nádorové bujení, ale mohou mít esenciální funkci také v normálních nenádorových buňkách. Jejich inhibice pak vede k nežádoucím účinkům, které limitují účinnost léčby. Zvýšení hladiny inhibitorů v cílových buňkách nebo tkáních prostřednictvím selektivního transportu může představovat účinný způsob pro zlepšení efektivity léčby proteinkinasovými inhibitory (Van Beuge *et al.*, 2012; Ferguson *et Gray*, 2018).

Cílem této disertační práce bylo poukázat na důležitost studia biochemické selektivity proteinkinasových inhibitorů a ověřit potenciál selektivního transportu prostřednictvím folátového receptoru, který by mohl vést ke zvýšení buněčné selektivity protinádorových léčiv.



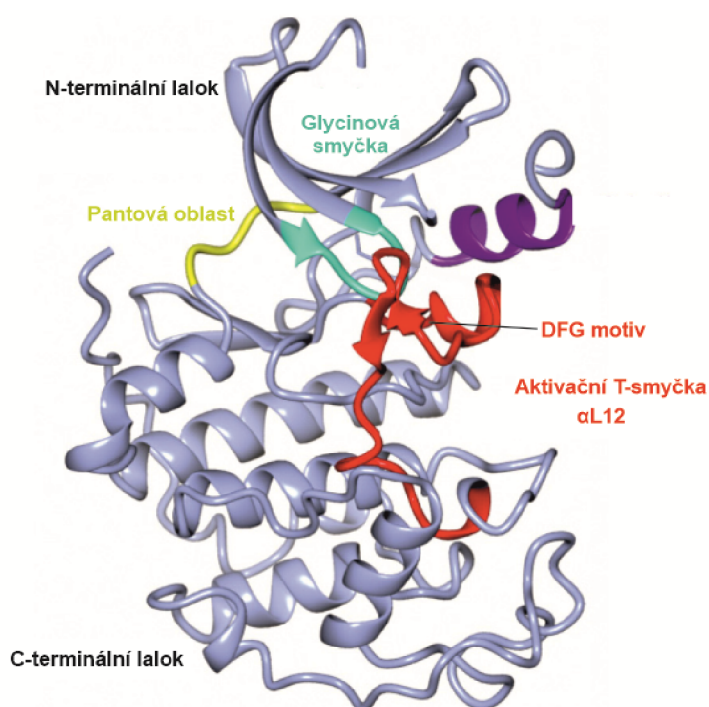
## 2 CYKLIN-DEPENDENTNÍ KINASY (CDK)

Cyklin-dependentní kinasy (CDK) představují skupinu serin/threoninových proteinkinas, jejichž katalytická aktivita je řízena intracelulární interakcí s regulační podjednotkou, kterou je obvykle odpovídající cyklin (Malumbres *et Barbacid*, 2005; Malumbres, 2014). Rodina CDK spadá na základě sekvence kinasové domény do CMGC větve kinomu. V lidském genomu je kódováno 21 členů CDK a nejméně 29 cyklinů s jedinečnými i redundantními vlastnostmi v rámci rodiny (Manning *et al.*, 2002; Malumbres *et Barbacid*, 2005; Cao *et al.*, 2014). CDK jsou nejčastěji známy jako klíčové regulátory buněčného cyklu a transkripce (Lim *et Kaldis*, 2013; Malumbres, 2014; Hydbring *et al.*, 2016; Palmer *et Kaldis*, 2020). Nicméně jsou zapojeny v mnohem širším spektru buněčných procesů, jako je oprava DNA (Trovesi *et al.*, 2013), sestřih (Hu *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2006a), regulace mitochondriálních funkcí (Lopez-Mejia *et Fajas*, 2015), metabolismus (Wang *et al.*, 2017), epigenetické regulace (Chen *et al.*, 2010) nebo vezikulární transport (Palmer *et al.*, 2005). CDK mají také funkce asociované s vývojem a diferenciací (Hydbring *et al.*, 2016), které zahrnují neurogenezi (Lim *et al.*, 2017), angiogenezi a migraci (Liebl *et al.*, 2010), sebe-obnovu kmenových buněk, hematopoézu (Steinman, 2002) nebo spermatogenezi (Palmer *et al.*, 2019). Biologické funkce a regulace mnohých CDK však dosud nebyly zcela objasněny. Mezi nejvíce prostudované patří právě CDK1/2/4 a 6 regulující buněčný cyklus, případně CDK7 a 9 regulující transkripci. Nicméně pro CDK10-20 bylo dosud publikováno pouze omezené množství informací a je pravděpodobné, že v následujících letech budou odhaleny jejich další významné funkce a substráty (**Obr. 1**).



**Obr. 1:** Zastoupení publikací o jednotlivých CDK na portálu PubMed (duben 2021).

Obdobně jako jiné proteinkinasy mají i CDK dvoualočnatou terciární strukturu tvořenou  $\beta$ -skládanými listy na N-konci a  $\alpha$ -helixy na C-konci, které jsou propojeny pantovou oblastí. Mezi těmito laloky se nachází konzervovaná katalytická kapsa obsahující ATP-vazebné místo, doménu pro vazbu cyklinu a aktivační T-smyčku, která začíná konzervovanou aminokyselinovou sekvencí asparagin-fenylalanin-glycin (DFG) (**Obr. 2**). CDK v monomerní podobě jsou neaktivní z důvodu uzavření ATP-vazebného místa T-smyčkou a jejich hladina v buňkách je konstantní (Malumbres *et* Barbacid, 2009; Wood *et* Endicott, 2018). Katalytická aktivace je obvykle řízena oscilací hladiny cyklinů, kdy vazba odpovídajícího cyklinu vede k tvorbě heterodimeru a k rozsáhlým konformačním změnám. Dochází k odklopení T-smyčky, odhalení substrát-vazebného místa a přeskupení residuí v aktivním místě, které umožní enzymatickou aktivaci CDK. Kromě toho se však na regulaci jejich aktivity podílejí také inhibiční a aktivační fosforylace, které jsou zprostředkovány inhibičními kinasami Wee1 a Myt1 nebo CDK-aktivačními kinasami. Aktivitu CDK regulují také endogenní inhibitory z rodiny Cip/Kip (p21, p27, p57) and INK4 (p16, p15, p18) (Echalier *et al.*, 2010; Whittaker *et al.*, 2017).



**Obr. 2:** Dvoualočnatá terciární struktura monomerní CDK2 (převzato z Wood *et* Endicott, 2018).

## 2.1 Biologické funkce CDK

CDK jsou známé především jako klíčové enzymy, které regulují progresi jednotlivými fázemi buněčného cyklu. V časně G1 fázi dochází v odpovědi na mitogenní signalizaci k expresi cyklinů D, které následně vytvářejí komplexy s CDK4/6. Aktivní komplexy iniciují fosforylaci nádorového supresoru retinoblastomového proteinu (Rb) (Malumbres *et* Barbacid, 2001; Narasimha *et al.*, 2014). Hypofosforylace Rb vede k částečnému uvolnění transkripčních faktorů z rodiny E2F a následně k transkripci podřízených genů nezbytných pro progresi buněčným cyklem včetně cyklinu E, který asociuje s CDK2. Vzniklý aktivní komplex dále hyperfosforyluje Rb, dochází k úplnému uvolnění E2F a k expresi genů nezbytných pro průchod G1/S restriční bodem (Weinberg, 1995; Sherr, 2000). Cykliny D a E jsou v časně S fázi degradovány. CDK2 je následně aktivována cyklinem A, které společně řídí progresi S fázi a syntézu DNA. Na fázovém rozhraní S/G2 přebírá funkci komplex CDK1/cyklin A. CDK1/cyklin B pak nakonec dokončuje mitotické procesy. Navzdory tomuto vysoce regulovanému procesu je CDK1 jedinou CDK esenciální pro průchod buněčným cyklem savců, zatímco funkce ostatních kinas této rodiny jsou zastupitelné (Malumbres *et* Barbacid, 2001, 2005; Santamaria *et al.*, 2007). Komplex CDK3/cyklin C fosforyluje Rb na rozhraní G0/G1 a také částečně přispívá ke vstupu do S fáze (Ren *et* Rollins, 2004).

Kromě buněčného cyklu další členové CDK rodiny regulují transkripci. CDK7/cyklin H je součástí multiproteinového iniciačního komplexu TFIID, CDK8/19/cyklin C je součástí mediátorového komplexu MED, zatímco CDK9/cyklin T tvoří elongační faktor P-TEFb. Tyto kiny se účastní přímé regulace transkripce prostřednictvím fosforylace C-terminální domény (CTD) RNA polymerasy II (Compe *et* Egly, 2012; Tsai *et al.*, 2013; Paparidis *et al.*, 2017). CDK však obvykle nemají pouze jednu funkci. Například CDK7 jako CDK-aktivační kinasa fosforyluje T-smyčku CDK regulujících buněčných cyklus, čímž umožňuje jejich plnou aktivaci, zatímco CDK8 působí také jako koaktivátor dráhy WTN- $\beta$ -catenin, p53 dráhy nebo TGF $\beta$  signalizace (Malumbres *et* Barbacid, 2005; Donner *et al.*, 2007, 2010; Firestein *et al.*, 2008). Mezi regulátory transkripce patří také CDK12 a CDK13, které jsou aktivovány cyklinem K. CDK12/cyklin K navíc reguluje alternativní sestřih a expresi genů zapojených do odpovědi

na poškození DNA, stres nebo teplotní šok (Greifenberg *et al.*, 2016; Lui *et al.*, 2018). CDK10/cyklin M reguluje transkripci nepřímo prostřednictvím fosforylace substrátů, jako je PKN2 nebo transkripční faktor ETS2 (Guen *et al.*, 2017). CDK11/cyklin L se také účastní regulace transkripce fosforylací CTD RNA polymerasy II a sestřihu. Podle nejnovějších studií je tento komplex nezbytný pro transkripci histonových genů (Gajdušková *et al.*, 2020) a také negativně reguluje signální dráhu WNT- $\beta$ -catenin (Ou *et al.*, 2020).

Ostatní členové rodiny CDK mají podstatně odlišnější a často tkáňově specifické funkce, z nichž všechny nejsou dosud známé. CDK14 se účastní WNT- $\beta$ -catenin signalizace důležité pro vývojové procesy a progresi buněčného cyklu (Davidson *et Niehrs*, 2010), zatímco CDK15 má funkci antiapoptotickou (Park *et al.*, 2014). CDK16 je exprimována ve varlatech, kde působí při spermatogenezi (Mikolcevic *et al.*, 2012), a v mozku, kde reguluje diferenciaci neuronů a jejich funkci (Ou *et al.*, 2010). Mezi málo prostudované kiny patří CDK17, u níž se předpokládá, že má roli v mitochondriálních funkcích neuronů (Hirose *et al.*, 2000). CDK18 udržuje genomovou stabilitu (Barone *et al.*, 2016) a reguluje dynamiku cytoskeletu, buněčnou migraci a adhezi (Matsuda *et al.*, 2017). Kromě regulace transkripce je CDK19 také regulátorem odpovědi na stres zprostředkované nádorovým supresorem p53 (Audetat *et al.*, 2017). CDK20 byla v některých studiích označena jako druhá CDK-aktivační kinasa, nicméně její funkce zůstává nepotvrzena (Liu *et al.*, 2004; Wohlbold *et al.*, 2006). Zvláštní postavení má CDK5, která není aktivována cyklinem, ale proteiny p35 a p39. Je exprimována v post-mitotických buňkách nervového systému a je nezbytná pro synaptickou plasticitu a neurotransmisi (Shupp *et al.*, 2017).

## 2.2 CDK jako terapeutické cíle

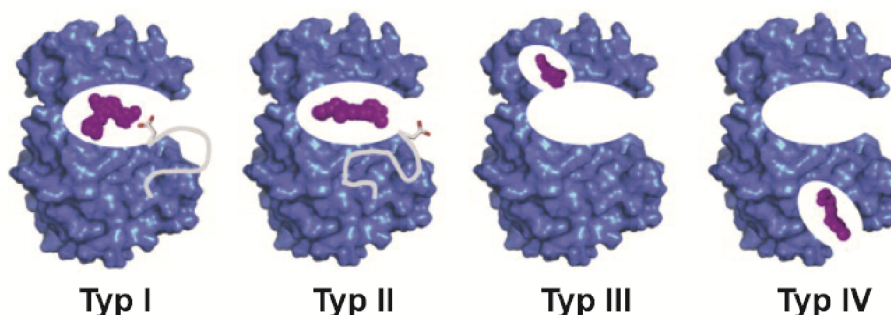
CDK se jako klíčové regulátory řady biologických procesů staly atraktivním cílem pro vývoj nízkomolekulárních inhibitorů jako protinádorových léčiv. Za fyziologických podmínek je aktivace CDK velmi přísně regulována. V řadě nádorových onemocnění jsou však signální dráhy CDK narušeny, což obvykle vede k deregulované proliferaci a nadměrnému přežívání buněk (Malumbres *et Barbacid*, 2005; Shapiro, 2006; Peyressatre *et al.*, 2015), které patří mezi základní znaky nádorové transformace (Hanahan *et Weinberg*, 2011). Onkogenní změny

v CDK signalizaci se vyskytují u více než 90 % lidských nádorů (Bonelli *et al.*, 2014). Nejčastěji se jedná o aberace postihující cykliny a endogenní inhibitory či modulátory CDK nebo nadřazené signální dráhy. Může se jednat jak o genetické změny zahrnující amplifikace, chromozomální translokace, bodové mutace, inserce či delece, ale i o epigenetické změny, nadměrnou či předčasnou expresi proteinů nebo jejich nesprávnou buněčnou lokalizaci. Tyto změny vedou k chybné aktivaci CDK, přičemž incidence mutací ve vlastních CDK je velmi nízká (Peyressatre *et al.*, 2015; Roskoski, 2016). Cyklin D1 je například amplifikován až ve 40 % všech nádorů včetně karcinomů prsu, plic nebo melanomů (Musgrove *et al.*, 2011; Santarius *et al.*, 2010), zatímco cyklin E např. v karcinomech ovarií a dělohy (Nakayama *et al.*, 2010; Kuhn *et al.*, 2014). Tato data naznačují, že farmakologická inhibice CDK může být efektivním způsobem pro léčbu řady nádorových onemocnění včetně karcinomů různého typu, hematologických malignit i sarkomů (Roskoski, 2019).

Kromě malignit byly abnormality v aktivitě CDK zaznamenány také ve spojení se vznikem dalších onemocnění a jejich inhibitory tak mají potenciálně mnohem širší využití. Například pro léčbu virových infekcí jsou navrhovány inhibitory CDK regulujících RNA polymerasu II. Kromě vlivu na HIV (Nemeth *et al.*, 2012) byly nedávno inhibitory CDK popsány také jako modulátory replikace a transkripce SARS-CoV-2 způsobujícího akutní respirační onemocnění (Bouhaddou *et al.*, 2020). Hyperaktivita CDK5 je zase spojována s patogenezí neurodegenerativních poruch jako je Alzheimerova choroba a inhibice CDK5 by mohla zpomalit ztrátu neuronových buněk a paměti (López-Tobón *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2016). CDK1 byla identifikována jako klíčová kinasa, která podporuje ranou proliferaci cyst při autosomálně dominantním polycystickém onemocnění ledvin, a její inhibice na myších modelech zabraňuje jejich růstu (Bukanov *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2021). Inhibice CDK má však potenciál také při léčbě mírné mozkové ischemie (Katchanov *et al.*, 2001) a při traumatických poraněních mozku, při kterých CDK inhibitory potlačují buněčnou smrt neuronů (Kabadi *et al.*, 2014). Kromě toho je lze potenciálně využít i při léčbě parazitických infekcí, jako je leishmanióza či malárie (Walker *et al.*, 2011), nebo při zánětlivých onemocněních (Fox *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2012).

### 3 NÍZKOMOLEKULÁRNÍ INHIBITORY CDK (CDKi)

V průběhu posledních 30 let byla objevena celá řada inhibitorů CDK (CDKi), které tvoří různorodou skupinu molekul s odlišnými chemickými vlastnostmi. Podle jejich vazebného módu je lze rozdělit na ATP-kompetitivní a nekompetitivní. Velká většina dosud objevených CDKi spadá do skupiny ATP kompetitorů typu I vázajících se do ATP-vazebného místa kinasu v aktivní konformaci, tedy s DFG motivem T-smyčky směřujícím do aktivního místa. Inhibitory typu II tvoří o něco méně početnou skupinu a váží se na kinasu v neaktivní konformaci s motivem DFG orientovaným ven z ATP-vazebné kapsy. V posledním desetiletí však došlo i k objevu alosterických inhibitorů. Mezi ně patří inhibitory typu III, které interagují výhradně s alosterickou kapsou sousedící s ATP-vazebnou kapsou, a inhibitory typu IV vázající alosterická místa vzdálená od této kapsy (**Obr. 3**). Významné a rozšiřující se skupiny tvoří také kovalentní ATP-kompetitivní inhibitory a sloučeniny indukující selektivní degradaci CDK (Heptinstall *et al.*, 2018; Sánchez-Martínez *et al.*, 2019).



**Obr. 3:** Typy reversibilních kinasových inhibitorů (upraveno podle Wu *et al.*, 2015).

Vývoj selektivních CDKi byl zpočátku považován za poměrně náročný vzhledem k vysokému stupni jak strukturní, tak sekvenční podobnosti mezi ATP-vazebnými místy CDK, která poskytuje pouze omezené možnosti selektivně inhibovat jednotlivé isoformy CDK (Whittaker *et al.*, 2017; Heptinstall *et al.*, 2018; Wood *et al.*, 2018). V souvislosti s touto limitací byla první generace CDKi relativně nespecifická a inhibovala větší počet CDK. Tyto látky bývají označovány jako pan-selektivní a řadí se k nim např. flavopiridol (alvocidib) (Kaur *et al.*, 1992), olomoucín (Veselý *et al.*, 1994) nebo roskovitín (seliciclib) (Havlíček *et al.*, 1997). Vyznačovaly se omezenou protinádorovou

aktivitou a nežádoucími účinky a toxicitou. Tyto limitace zřejmě vyplývaly z jejich nízké účinnosti a ze současné inhibice většího počtu kinas, které jsou nezbytné pro proliferaci a přežívání normálních nenádorových buněk. V důsledku selhání pan-selektivních inhibitorů CDK se vývoj zaměřil na látky s vyšší účinností a selektivitou. Toto úsilí vedlo k určitému zúžení selektivity v rámci kinomu a k inhibici menšího počtu CDK, nicméně ani tyto látky není možné považovat za vysoce selektivní (Asghar *et al.*, 2015). Do druhé generace spadá např. dinaciclib (SCH727965) (Parry *et al.*, 2010), R547 (DePinto *et al.*, 2006) nebo AZD5438 (Byth *et al.*, 2009). Řada těchto inhibitorů druhé generace se v preklinických studiích jeví jako velmi slibných, nicméně ani většina z těchto látek úspěšně neprošla dalším klinickým testováním. Žádná z těchto látek nebyla schválena pro klinické použití, ale některé z nich se stále nachází v testování jako např. fadraciclib (CYC065) (Pozzi *et al.*, 2010).

Neúspěch první a druhé generace CDKi v klinickém testování je připisován omezeným znalostem a nedostatku metod, jež neumožňovaly zcela objasnit, které CDK nebo i jiné kiny tyto látky inhibují. Neznámý mechanismus účinku pak navíc neumožňoval vhodnou selekci pacientů, jež by odpovídaly na tuto léčbu (Asghar *et al.*, 2015; Peyressatre *et al.*, 2015). Přestože ani tyto inhibitory nebyly úspěšné v klinických studiích a vyznačovaly se nízkou selektivitou, posloužily jako průkopníci vývoje selektivnějších látek (Whittaker *et al.*, 2017).

Průlomem ve vývoji CDKi byl až objev pyrido[2,3-*d*]pyrimidinového jádra, které vykazovalo vysokou selektivitu vůči CDK4/6 (VanderWel *et al.*, 2005). Optimalizace tohoto skeletu vedla k vývoji palbociclibu (Ibrance, PD0332991) (Fry *et al.*, 2004), který byl v roce 2015 jako první CDK inhibitor schválen Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) pro léčbu rakoviny prsu (Beaver *et al.*, 2015; Walker *et al.*, 2016). O dva roky později pak schválení následovalo pro další dva CDK4/6i, ribociclib (Kisqali, LEE011) (Syed, 2017) a abemaciclib (Verzenio, LY283519) (Kim, 2017). Tyto tři látky jsou dosud jedinými CDK inhibitory schválenými pro klinické použití a jejich identifikace poukázala na to, že i přes vysokou podobnost ATP-vazebného místa je možné vyvinout selektivní CDKi. Tento úspěch vzbudil zájem vědců o vývoj dalších látek selektivně cílících i jiné CDK, a to nejenom z důvodu jejich terapeutického potenciálu v léčbě řady onemocnění, ale i použití v biologických studiích jako vysoce selektivní chemické sondy pro cílenou inhibici CDK na farmakologické úrovni.

### 3.1 Biochemická selektivita CDKi

Ačkoliv v současné době existuje velké množství CDK inhibitorů a více než 100 těchto látek je komerčně dostupných jako chemické nástroje pro buněčnou biologii, jejich kvalita se významně liší s ohledem na jejich účinnost, selektivitu vůči jednotlivým CDK a buněčné efekty. Odborná veřejnost se totiž stále potýká s nedostatečnou charakterizací, a to zejména jejich biochemické selektivity nejen vůči jednotlivým CDK, ale i dalším cílům. Základní problém spočívá v tom, že v prvotních fázích vývoje jsou inhibitory obvykle popsány a následně komerčně prodávány jako vysoce potentní a selektivní látky vůči danému cíli, nicméně v mnohých případech nebyly dostatečně nebo správně charakterizovány. Výsledkem je, že informace o jejich selektivitě jsou často neúplné a mnohdy je komplikované je najít, protože společně s dalšími látkami jsou součástí rozsáhlejších studií, které byly provedeny až výrazně později. Znalost biochemické selektivity je přitom nezbytná pro jejich správné použití a adekvátní interpretaci následků jejich působení (Klaeger *et al.*, 2017; Munoz, 2017; Wells *et al.*, 2020).

Ukazuje se, že základním mechanismem účinku řady kinasových inhibitorů není inhibice původně předpokládaného primárního cíle, ale inhibice vedlejších cílů, tzv. *off-targets* (Lin *et al.*, 2019). Například roskovitin byl dlouhou dobu považován za selektivní inhibitor CDK1/2 a 5, ale bylo zjištěno, že také inhibuje transkripci prostřednictvím inhibice CDK7 a 9, která je zřejmě převládajícím mechanismem účinku (Whittaker *et al.*, 2004, 2007). CGP74514A byl na základě silné inhibice CDK1 klasifikován jako selektivní CDK1 inhibitor bez dalšího testování jiných cílů (Imbach *et al.*, 1999). Dlouhou dobu byl v biologických studiích chybně používán jako selektivní inhibitor CDK1 (Chen *et al.*, 2006b; Pernicová *et al.*, 2014) a až později bylo zjištěno, že se vyznačuje pan-selektivní inhibicí (Anastassiadis *et al.*, 2011; Gao *et al.*, 2013; Jorda *et al.*, 2018a). Zajímavým příkladem je také látka OTS964, která byla považována za inhibitor PBK (Matsuo *et al.*, 2014). Pozdější studie však odhalily, že PBK není esenciální pro proliferaci a že převažujícím mechanismem účinku OTS964 je inhibice CDK11. Pro tutu kinasu do té doby nebyl vyvinut žádný farmakologický inhibitor a tento objev tak může mít významný dosah na vývoj dalších CDK11i (Lin *et al.*, 2019).



Plošnou analýzou selektivity více než 240 kinasových inhibitorů bylo odhaleno, že vedlejšími cíli mohou být i jiné nekinasové proteiny, které přispívají k cytotoxickým účinkům látky. Mezi typické nekinasové cíle patří např. tubulin, receptory spřažené s G proteiny nebo proteiny obsahující bromodomény; ty však mnohdy zůstávají neodhaleny, neboť se hledají právě hlavně proteinkinasy (Munoz, 2017). Nedostatečně prostudovaná selektivita se týká také klinicky testovaných látek. Nedávná studie odhalila, že původně stanovené primární cíle minimálně 7 protinádorových léčiv, které jsou v současné době testovány v klinických studiích, jsou postradatelné pro jejich účinnost, a tudíž mechanismus účinku těchto léčiv je vlastně neznámý (Lin *et al.*, 2019). Dá se proto očekávat, že s rozvojem metodologických přístupů dojde k přehodnocení mechanismu účinku řady léčiv, a to nejen ze skupiny proteinkinasových inhibitorů.

CDKi s přesně definovanou biochemickou selektivitou mají nezbytnou roli v základním výzkumu, kdy jsou využívány pro cílenou inhibici kinasy za účelem studia funkcí jednotlivých CDK a pro pochopení základních buněčných pochodů. Jak již bylo zmíněno, řada CDK, zejména CDK10-20, postrádá kompletní funkční anotaci a právě CDK-selektivní chemické sondy by mohly umožnit charakterizaci následků jejich inhibice. Jejich použití totiž skýtá ve srovnání s genetickými přístupy jisté výhody. Vyřazení genu prostřednictvím genetických modifikací, jako je RNA interference nebo editování genomu metodou CRISPR/Cas9, totiž obvykle neumožňuje zachytit okamžité účinky. Genetické manipulace navíc nesou riziko rozvoje kompenzačních mechanismů nebo spontánních mutací, které mohou vést k odlišnému fenotypu. V případě genů nezbytných pro embryonální vývoj tento přístup navíc není možný a farmakologická inhibice CDKi na proteinové úrovni má tak v tomto směru významné postavení (Whittaker *et al.*, 2017). Mnohé látky, které jsou uváděny jako vysoce selektivní vůči danému cíli, však nespĺňují kritéria vhodné chemické sondy zahrnující přesně definovanou selektivitu a biologickou aktivitu. Pro některé CDK, včetně CDK15/18 a 20, navíc dosud nebyl identifikován žádný dostatečně účinný inhibitor. Podrobnější studie by tak mohly odhalit jejich vhodné inhibitory, které by umožnily studium biologických funkcí kinas (Sánchez-Martínez *et al.*, 2019; Wells *et al.*, 2020).

Právě tyto méně prostudované CDK jsou také častými neodhalenými vedlejšími nebo i primárními cíli inhibitorů kinas. Z 214 klinicky testovaných kinasových inhibitorů se více než 10 % léčiv vyznačovalo vazbou vůči CDK16 nebo CDK17, která do té doby

nebyla odhalena (Klaeger *et al.*, 2017), a není jasné, zda jejich inhibice je přínosná pro terapeutickou intervenci, anebo je naopak spojena s nežádoucími vedlejšími účinky. Ukazuje se, že i původně udávané selektivní CDKi interagují s podstatně vyšší afinitou s méně prostudovanými členy CDK rodiny. Z těchto důvodů by měl být kladen větší důraz i na studium interakcí s těmito kinasami. Komplexní analýza selektivity v prostředí intaktních buněk totiž například odhalila, že původně selektivní CDK2 inhibitor II. typu označovaný jako KO3861 (Alexander *et al.*, 2015) disponuje podstatně vyšší afinitou vůči CDK8/19. Tento výsledek klasifikoval KO3861 na CDK8/19i a poukázal, že inhibice typu II je potenciální strategií efektivního cílení těchto homologních kinas (Wells *et al.*, 2020). Dlouhou dobu nebyl také identifikován žádný inhibitor CDK10. Nedávná studie však poukázala, že CDK10 je vedlejším cílem několika nových CDK9 selektivních inhibitorů, MC180295, AZD4573 a NVP-2, přičemž tento cíl u dvou z nich v původních studiích vůbec nebyl zaznamenán (Robert *et al.*, 2020). Tyto látky představují slibný výchozí bod pro vývoj dalších analogů, které by mohly selektivně inhibovat CDK10 a které by významně napomohly při studiu jejích funkcí a odhalení, zda představuje významný terapeutický cíl.

Ačkoliv se může zdát, že polyfarmakologie je spíše negativním faktorem, který je nutné prostudovat z důvodu vysvětlení nežádoucích účinků, tak její existence může mít i výhodné důsledky. Poskytuje totiž příležitost pro tzv. *repurposing*, kdy jsou již existující látky využity k jiným účelům jako vysoce účinné inhibitory původně neodhalených cílů. Takové látky pak mohou být použity pro léčbu odlišných onemocnění, než bylo původně zamýšleno. Tento přístup znovuvyužití již existujících léčiv významně snižuje čas i náklady na vývoj (Chaudhari *et al.*, 2017; Cha *et al.*, 2018). Úspěšným klinickým příkladem *repurposingu* je imatinib, který byl schválen pro léčbu chronické myeloidní leukémie prostřednictvím cílení onkogení BCR-ABL kinasy (Capdeville *et al.*, 2002; Cohen *et al.*, 2002). Později bylo zjištěno, že imatinib účinně inhibuje i KIT a PDGFR receptory růstových faktorů, což vedlo k přesměrování klinického vývoje k léčbě gastrointestinálních stromálních tumorů a myelodysplastických a myeloproliferativních chorob (Apperley *et al.*, 2002; Dagher *et al.*, 2002; Piccaluga *et al.*, 2007). Obdobným způsobem by například mohla být využita silná inhibice CDK4/6i, palbociclibu a abemaciclibu, vůči CLK1 kinase, která je považována za slibný cíl pro léčbu Duchennovy svalové dystrofie (Sako *et al.*, 2017; Uitdehaag *et al.*, 2019).

### 3.1.1 Charakterizace selektivity inhibitorů

Pro jednoznačnou charakterizaci selektivity a molekulární farmakologie inhibitorů je nezbytné provádět testování na několika úrovních. Prvním krokem je identifikace všech biologických cílů, se kterými látka interaguje, a to nejen *in vitro* na enzymové úrovni, ale i v živých buněčných systémech. Dále pak ověřit, že inhibitor je schopen dosáhnout primárního cíle v intaktních buňkách, a potvrdit, že inhibice tohoto cíle je odpovědná za výsledný buněčný efekt (Munoz, 2017). Nicméně tento způsob identifikace cílů dodnes zůstává náročným úkolem z důvodu značných limitací současných metod. V podstatě neexistuje žádný univerzálně použitelný přístup vhodný pro všechny látky a buněčné cíle, a proto je doporučováno využívat kombinace různých technologií, které jsou založeny na odlišných principech, čímž se zvyšuje úspěšnost identifikace všech relevantních cílů.

Základními a standardně používanými metodami identifikace cílů inhibitorů kinas byla dlouhou dobu biochemické měření enzymové aktivity, které kvantifikuje tvorbu produktu reakce (fosforylovaný substrát nebo ADP) (Wang *et al.*, 2015). Obvykle jde o bezbuněčné experimenty využívající rekombinantních proteinů nebo jejich domén v odlišných koncentracích, než je typické v buněčném prostředí. Navíc se odlišují od proteinů plné délky exprimovaných v buněčných podmínkách, a to zejména v post-translačních modifikacích, které ovlivňují stabilitu nebo specifické interakce, jež obvykle závisí na tkáňovém či buněčném typu. Tyto podmínky neodpovídají fyziologicky relevantnímu prostředí a všechny tyto faktory mohou ovlivnit interakci látky, a tudíž i výsledky testů (Klaeger *et al.*, 2017). Na buněčné úrovni bylo standardní testování omezeno na analýzu inhibice fosforylace podřízených substrátů a výslednou fenotypovou buněčnou odpověď. Přístup založený na analýze substrátů je však významně zatížen funkční redundancí, kdy jeden substrát je fosforylován různými CDK, které se vzájemně zastupují. Typickým příkladem je protein Rb, který je fosforylován několika CDK regulujícími buněčný cyklus, nebo RNA polymerasa II fosforylovaná transkripčními CDK. Pro některé CDK navíc dosud nebyl identifikován žádný substrát. V případě fenotypových screeningových přístupů je velmi obtížné přiřadit fenotyp vyvolaný látkou k definovanému buněčnému cíli a odpovídajícímu mechanismu působení (Munoz, 2017; Pasquer *et al.*, 2020).

Výše uvedená omezení a vysoká četnost neočekávané aktivity látek podnítila v posledním desetiletí k vývoji sofistikovanějších chemoproteomických metod. U novějších inhibitorů, zvláště pokud mají být používány klinicky nebo jako chemické nástroje, je celoproteomové testování selektivity už poměrně běžnou záležitostí obvykle zprostředkovanou platformami komerčních společností využívajících metody založené na kvantifikaci katalytického produktu nebo afinity (Pan *et al.*, 2016; Wright *et al.*, 2016; Hacker *et al.*, 2017). Kinasové enzymatické testy kvantifikující produkt reakce využívají např. platformy jako je HotSpot (Reaction Biology), KinaseProfiler (Eurofins) založené na radiometrickém principu nebo metody založené na kvantifikaci ADP (ADP Hunter HS nebo ADP Quest HS, DiscoverX) využívající fluorescenčních detekčních koncovek. Za zlatý standard jsou považovány právě radiometrické testy vzhledem k relativně nízkému stupni falešně pozitivních výsledků oproti např. fluorescenčním přístupům, které jsou navíc technologicky náročnější a nákladnější. Mezi nejznámější komerční platformy kvantifikující afinitu inhibitoru ke kinase patří např. KinomeScan Technology (DiscoverX) nebo LanthaScreen Eu Kinase Binding Assay (ThermoFisher Scientific). Na rozdíl od metod založených na kvantifikaci aktivity mohou být prováděny s aktivními i neaktivními kinasami obvykle bez přítomnosti ATP nebo substrátu, tudíž výsledky nemohou být ovlivněny jejich koncentrací. Obecně však nejsou schopny detekovat substrátově-specifické inhibitory nebo také látky interagující s jinými doménami, než je kinasová. Vazebná aktivita látky se navíc nemusí vždy promítnout do vlivu na aktivitu kinasy (Wang *et al.*, 2015). I tyto pokročilejší metody se tedy vyznačují určitými limitacemi. Použití řady z nich je omezeno pouze na rekombinantní proteiny nebo případně buněčné lysáty, které neumožňují zachytit interakce nebo metabolické konverze probíhající pouze v intaktním buněčném prostředí (Chen *et al.*, 2020; Park *et al.*, 2019). Z těchto důvodů se v současnosti pozornost zaměřuje na pokročilejší přístupy hodnocení interakcí ve fyziologicky relevantním prostředí intaktních buněk.

Nedávno byla také vyvinuta technologie, která umožňuje ověřit buněčnou dostupnost inhibitoru a jeho schopnost vázat cíl v intaktních buňkách. Příslušná kinasa je exprimována v analyzovaných živých buňkách s luciferasovou značkou NanoLuc. Pro detekci interakce látky s inhibitorem byly vyvinuty a optimalizovány bifunkční foto-afinitní sondy BRET (bioluminiscenční rezonanční přenos energie) na základě struktury známých inhibitorů.

V případě navázání sondy k příslušné fúzní NanoLuc-kinase je generován signál, který je ovlivněn kompeticí se studovaným inhibitorem (Vasta *et al.*, 2018). Wells a kol. využili tento systém ve vztahu ke všem 21 členům CDK rodiny, což umožnilo analýzu selektivity inhibitorů vůči celé CDK rodině v živých buňkách (Wells *et al.*, 2020). Součástí analýzy bylo 46 vybraných CDKi, které v minulosti postoupily do klinického testování. Pro CDK4/6, 8/19, 9 a 12 se podařilo identifikovat CDKi s nanomolární afinitou a vysokým indexem selektivity (palbociclib a ribociclib pro CDK4/6; CCT251545 pro CDK8/19; BAY-1251152 a atveciclib pro CDK9; THZ531 pro CDK12). Pro CDK7 byla identifikována pouze jedna látka s poměrně nižší selektivitou a intracelulární účinností (BS-181). Testované CDK2i a duální CDK1/2i účinkující v nanomolárních koncentracích byly označeny v této studii jako látky s velmi nízkou selektivitou, které interagovaly i s dalšími členy CDK rodiny, zejména CDK14-18 (např. CDKI-73 nebo RGB286639). Vzhledem k tomu, že velká většina testovaných CDKi se vyznačovala vyšší promiskuitou v buňkách, než bylo původně udáváno na základě nebuněčných experimentů, tato studie poukazuje na důležitost testování v relevantních fyziologických podmínkách (Wells *et al.*, 2020).

### **3.1.2 Biofyzikální identifikace cílů kinas v intaktních buňkách**

Současný rozvoj hybridní hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením umožnil identifikovat intracelulární cíle na základě biofyzikálních změn indukovaných vazbou inhibitoru (ligandu), které se projeví rozdílnou teplotní, chemickou nebo proteolytickou stabilitou cíle (Park *et al.*, 2019; Pasquer *et al.*, 2020; Sun *et al.*, 2021).

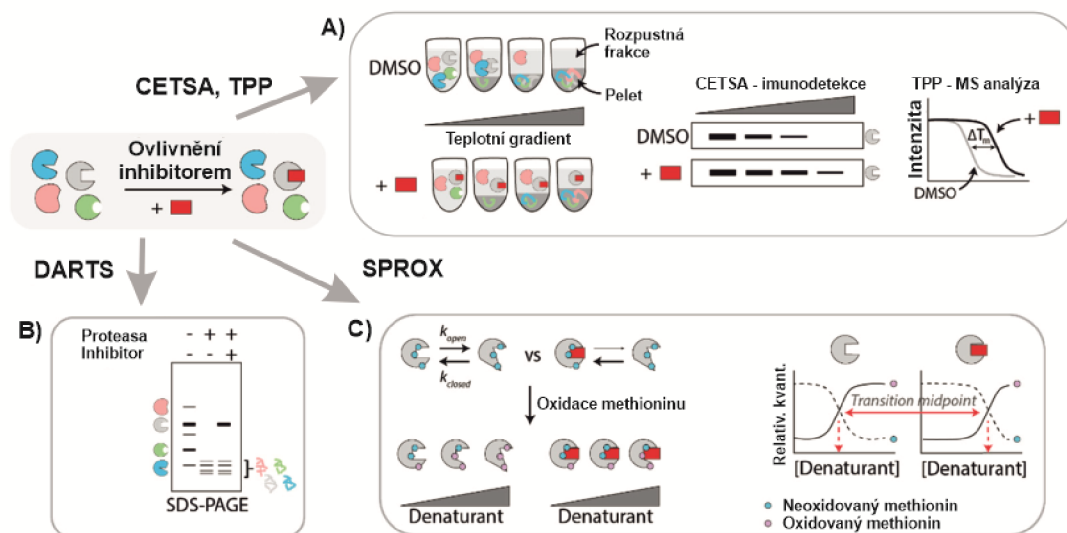
Analýza teplotní denaturace (*cellular thermal shift assay*, CETSA) je založena na měření změn v teplotní stabilitě proteinů po vazbě ligandu v buněčném prostředí, a to buď lyzátů, anebo intaktních buněk. Je obecně známo, že termodynamické a kinetické změny proteinů spojené s vazbou ligandu mají tendenci posunout tzv. bod tání ( $T_m$ ) k vyšším teplotám, jejímž výsledkem je zvýšení teplotní stability proteinu (Molina *et al.*, 2013; Jafari *et al.*, 2014; Molina *et Nordlund*, 2016). Palbociclib patřil mezi jednu z prvních látek testovaných touto metodou, kdy byla ověřena jeho selektivita vůči CDK4/6, přičemž nebyla pozorována stabilizace CDK2 ani 9 v intaktních buňkách (Molina *et al.*, 2013). Tato prvotní studie prokázala nespornou užitečnost této metody a od té doby se stala široce používanou

technikou, která byla využita i v této práci (Jorda *et al.*, 2018b, **Příloha I**). Od imunodetekce, která podstatně limitovala množství analyzovaných cílů, se posunula k implementaci hmotnostní spektrometrie (termální proteomové profilování, TPP) umožňující analýzu celého proteomu i několika vzorků současně při jednom běhu (**Obr. 4A**) (Ball *et al.*, 2020). TPP například odhalila, že palbociclib a v nižší míře i ribociclib indukuje teplotní stabilizaci řady kinas PI3K/Akt/mTOR dráhy a 20S proteasomu. Díky tomu bylo zjištěno, že proteasomální aktivace je jedním z buněčných efektů palbociclibu a že se zřejmě podílí i na indukci senescence (Miettinen *et al.*, 2018).

Druhý přístup využívá chemické denaturace proteinů a stanovení stupně oxidace methioninových residuí. Metoda označovaná jako SPROX (*stability of proteins from rates of oxidation*) je založena na principu termodynamických změn při skládání proteinů (West *et al.*, 2008). Předpokládá se, že za fyziologických podmínek se velká většina hydrofobních methioninových residuí proteinu nachází uvnitř jeho struktury a stupeň jejich oxidace je tedy nízký. Působením rostoucích koncentrací denaturačních látek dochází k jejich odhalení a jsou tak vystaveny oxidaci. Oxidované methioniny jsou pak následně detekovány kvantitativní hmotnostní spektrometrií. Cílové proteiny inhibitoru jsou stanoveny na základě porovnání zakřivení křivek, které vyjadřují množství oxidovaného methioninu *versus* koncentrace denaturační látky (**Obr. 4B**). Nevýhodou této metody je fakt, že frekvence výskytu methioninů je v rámci proteomu nízká, a proto proteiny, které nenesou žádný methionin, nemohou být tímto způsobem analyzovány (Strickland *et al.*, 2013; West *et al.*, 2010).

Vazba ligandu vede nejenom k teplotní stabilizaci, ale i ke zvýšení proteolytické stability proteinu. Na tomto principu je založena metoda DARTS (*drug affinity responsive target stability*), jež byla v prvotní verzi aplikována na buněčný lyzát, který byl vystaven slabým proteolytickým podmínkám v přítomnosti a nepřítomnosti studované látky, přičemž interakce látky s cílovými proteiny zvyšovala jejich odolnost vůči enzymatické digesci. Po separaci gelovou elektroforézou byly analyzovány hmotnostní spektrometrií proteiny s odlišnou intenzitou (Lomenick *et al.*, 2009). Tato metoda byla rozšířena i na intaktní buňky ve spojení s přímou hmotnostní analýzou (*limited proteolysis-coupled mass spectrometry*, LiP-MS) (Schopper *et al.*, 2017), nicméně v praxi není příliš používána (**Obr. 4C**). Poměrně nedávno však byla uvedena její modifikace, která umožňuje analyzovat

i komplexní lidské vzorky na proteomové úrovni, což by mohlo vést k rozšíření jejího použití v praxi (Piazza *et al.*, 2020).



**Obr. 4:** Schématické znázornění principu biofyzikálních přístupů identifikace cílů **A)** teplotní denaturací (*cellular thermal shift assay*, CETSA; termální proteomové profilování, TPP), **B)** chemickou denaturací (*stability of proteins from rates of oxidation*, SPROX), **C)** omezenou proteolýzou (*limited proteolysis-coupled mass spectrometry*, LiP-MS) (upraveno podle Pasquer *et al.*, 2020).

### 3.1.3 Genetické přístupy identifikace a validace cíle

Důležitým krokem při validaci je také potvrzení, že inhibice identifikovaného cíle je odpovědná za výsledný buněčný efekt inhibitoru. Tyto přístupy lze rozdělit do dvou skupin. První je založen na identifikaci mutací, které způsobují rezistenci vůči studované látce, a druhý vychází z narušení funkce genu kódujícího potenciální cíl a následného sledování fenotypového projevu a změn citlivosti na inhibitor (Pasquer *et al.*, 2020).

V prvním případě se předpokládá, že buněčné linie kultivované v přítomnosti cytotoxické látky buď nepřežijí, anebo si vyvinou mutace, díky nimž budou rezistentní vůči této látce. Se současným pokrokem sekvenovacích technik je nyní možné identifikovat geny nesoucí tyto mutace na úrovni transkriptomu nebo genomu. Takové geny jsou pak hypoteticky považovány za ty, které kódují proteinový cíl testované látky. Nicméně za tuto rezistenci mohou být odpovědné i mutace v genech členů podřízených

signálních drah, kompenzační mechanismy nebo transportní proteiny, takže tento způsob ověření nemusí být jednoznačný (Pasquer *et al.*, 2020).

Druhý přístup je realizován prostřednictvím malých interferujících nebo vlásenkových RNA, které zabráňují expresi cílového proteinu. Výsledný fenotyp je pak srovnáván s fenotypem indukovaným farmakologicky. Interference se však vyznačuje vedlejšími účinky, které mohou komplikovat analýzu (Lin *et al.*, 2019). Editování genomu technikou CRISPR/Cas9 výrazně rozšířilo schopnost generovat farmakologicky relevantní buněčné modely pro validaci cílů (Shalem *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2014). Nicméně i přesto výsledný fenotyp nemusí korelovat s farmakologickým vzhledem k rozdílům v načasování (okamžitě působící farmakologický inhibitor *versus* pomalý účinek genového editování) a v povaze změny (inhibice *versus* absence) (Munoz, 2017).

U kinas je navíc nutné počítat s nekatalytickými funkcemi, které ovlivňují fenotypový projev. CDK6 například přímo interaguje a inhibuje transkripční aktivitu RUNX1 a blokuje tak myeloidní diferenciaci (Fujimoto *et al.*, 2007). Kromě toho také aktivuje c-Jun a STAT3, což vede k indukci transkripce p16, endogenního inhibitoru CDK4/6, a také vaskulárního endoteliálního růstového faktoru VEGF-A (Kollmann *et al.*, 2013). K expresi tohoto faktoru přispívá také cyklin D1 a společně s CDK6 jsou tak považovány za možné regulátory nádorové angiogeneze (Yasui *et al.*, 2006; Tadesse *et al.*, 2015). Tyto funkce nejsou závislé na kinasové aktivitě CDK, tudíž nemohou být ovlivněny konvenčními kompetitory, nicméně jsou zasaženy genetickým editováním, po němž pak výsledný fenotypový projev nemusí korelovat s farmakologickou inhibicí. Při identifikaci cílů tedy nelze spoléhat ani pouze na genetické přístupy.

### **3.2 Současný pokrok ve vývoji selektivních CDKi**

Díky rozvoji strukturní biologie a celoproteomového testování selektivity i ve fyziologicky relevantním prostředí a pochopení vztahu mezi strukturou a aktivitou látky bylo dnes již vyvinuto velké množství selektivních CDKi. Velká většina těchto látek reversibilně kompetuje s ATP o vazbu v aktivním místě. Vysoká podobnost ATP-vazebného místa, která omezuje selektivní inhibici, však podnítila i k vývoji dalších strategií. Inhibitory mohou například interagovat s alternativními proteinovými místy, která nejsou konzervovaná



v rámci kinomu, a tudíž se předpokládá, že by mohly poskytovat vyšší stupeň selektivity. Takovými látkami jsou kovalentní inhibitory, které obvykle modifikují cysteiny uvnitř nebo v blízkosti ATP-vazebné kapsy, nebo alosterické inhibitory (Peyressatre *et al.*, 2015; Heptinstall *et al.*, 2018; Sánchez-Martínez *et al.*, 2019). Nejnovějším přístupem je také vývoj konjugátů, které jsou schopny selektivně degradovat CDK (Churcher, 2018; Scheepstra *et al.*, 2019). Vzhledem k úspěchu palbociclibu, ribociclibu a abemaciclibu v klinickém použití jsou v posledních letech vyvíjeny především selektivní CDK4/6i, ale poměrně vysoké selektivity bylo dosaženo také při vývoji inhibitorů CDK7, 8/19, 9 nebo CDK12/13 (Heptinstall *et al.*, 2018).

Následující kapitoly poskytují přehled relevantního pokroku ve vývoji selektivních CDK inhibitorů s důrazem na látky komerčně dostupné, které jsou nabízeny společnostmi jako SelleckChem, SigmaAldrich, MedChemExpress, Tocris nebo Santa Cruz Biotechnology. Látky, které byly jednoznačně klasifikovány na pan-selektivní, nejsou v této kapitole zahrnuty. Některé inhibitory jsou označovány jako vysoce selektivní pouze na základě publikovaného patentu, ve kterém mnohdy byly testovány pouze vůči několika CDK. Selektivitu těchto látek nelze objektivně hodnotit, proto nejsou zahrnuty. Informace o inhibitech diskutovaných v těchto kapitolách jsou přehledně shrnuty v **Tab. 1** na konci kapitol.

### 3.2.1 CDK4/6i

Skupina CDK4/6 selektivních inhibitorů dosáhla největšího úspěchu v klinickém použití (**Obr. 5**). Jejich hlavní mechanismus účinku je založen především na inhibici fosforylace Rb a následném zablokování buněčného cyklu v G1 fázi v důsledku inhibice CDK4/6. Účinek těchto látek je spíše cytostatický bez výrazné indukce buněčné smrti, což je pravděpodobně důvodem jejich nízké toxicity při terapeutickém použití (Asghar *et al.*, 2015; Knudsen *et al.*, 2017). S postupným rozvojem znalostí v molekulární biologii se však ukazuje, že CDK4/6 mají řadu dalších funkcí, jako je například vliv na buněčný metabolismus nebo proteasomální aktivitu, které byly podrobněji diskutovány v příložené práci (**Hendrychová *et al.*, 2020, Příloha II**). Inhibice těchto funkcí pak má vliv na výsledný fenotyp a CDK4/6i tak mohou působit na progresi nádorů i jinými způsoby než prostým zablokováním buněčného cyklu (Klein *et al.*, 2018).

Přestože objevu palbociclibu, ribociclibu a abemaciclibu, které byly schváleny FDA, předcházela řada látek označovaných jako vysoce selektivní vůči CDK4/6, mnohé z nich se vyznačují pan-selektivním charakterem, jenž byl odhalen v příložené práci (**Jorda *et al.*, 2018b, Příloha I**), a tyto látky již byly re-klasifikovány. V posledních letech se pozornost zaměřila právě především na palbociclib, ribociclib a abemaciclib, které se staly objektem zájmu řady nezávislých studií, a jejich selektivita byla velmi podrobně prostudována. Díky tomu však byly objeveny další vedlejší cíle a biologické efekty spojené s jejich působením, jež shrnuje příložená práce (**Hendrychová *et al.*, 2020, Příloha II**).

Palbociclib byl vyvinut modifikací pyrido[2,3-d]pyrimidinového jádra (Fry *et al.*, 2004) a stal se prvním schváleným inhibítorem CDK pro léčbu metastatické rakoviny prsu (Beaver *et al.*, 2015; Laderian *et al.*, 2017; Walker *et al.*, 2016). Ve vazebném kompetičním testu se však vyznačoval srovnatelnou afinitou jak k CDK16/17, tak k CDK4/6 (Cousins *et al.*, 2018). Nicméně tyto cíle nebyly potvrzeny buněčným testem, ve kterém naopak disponoval výhradní CDK4/6 selektivitou v rámci CDK rodiny (Wells *et al.*, 2020). Palbociclib ale disponuje poměrně nízkou selektivitou, která zahrnuje řadu lipidových kinas fosfatidylinositolové dráhy, kinasy CSNK2 rodiny (Sumi *et al.*, 2015; Klaeger *et al.*, 2017; Cousins *et al.*, 2018; Klein *et al.*, 2018; Miettinen *et al.*, 2018) a také další vedlejší cíle jako HIPK, CLK, TTK, ULK nebo FLT3 zejména při vyšších koncentracích (Chen *et al.*, 2016; Klaeger *et al.*, 2017; Uitdehaag *et al.*, 2019; Hafner *et al.*, 2019; Kim *et al.*, 2020).

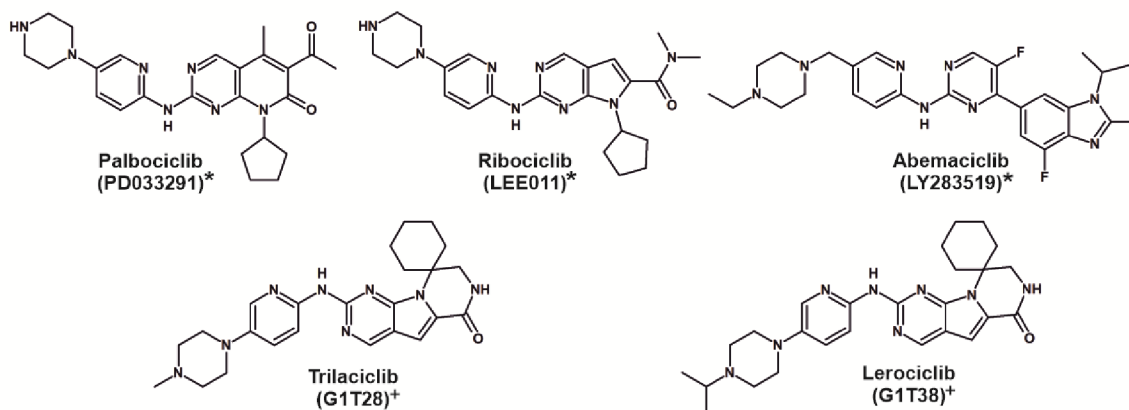
Ribociclib byl odvozen ze stejné struktury jako palbociclib (Rader *et al.*, 2013) a ze tří schválených inhibitorů je nejselektivnější vůči CDK4/6, a to i v intaktních buňkách. Ve vyšších koncentracích inhiboval pouze minimum vedlejších cílů jako je CAMK2 a GAK (Chen *et al.*, 2016; Cousins *et al.*, 2018; Hafner *et al.*, 2019; Uitdehaag *et al.*, 2019; Kim *et al.*, 2020; Wells *et al.*, 2020). Vysoká selektivita pravděpodobně souvisí s jeho nižší potencí a pro dosažení efektivního protinádorového účinku se proto klinicky využívá v duální terapii s dalšími léčivy (Uitdehaag *et al.*, 2019).

Posledním schváleným inhibítorem je derivát 6-pyrimidin-benzimidazolu, abemaciclib (Dickler *et al.*, 2017; Sledge *et al.*, 2017), který má nejvyšší potenci, ale disponuje nejnižší selektivitou. Vykazuje inhibici většího počtu dalších CDK včetně CDK1-2/5/7-9/12-17 a 19, nicméně výsledky studií se v tomto ohledu podstatně rozcházejí vzhledem k použitým podmínkám metod a přístupů (Chen *et al.*, 2016; Cousins *et al.*, 2018; Min *et al.*, 2018;

Uitdehaag *et al.*, 2019; Wells *et al.*, 2020). Například CDK9 byla identifikována jako vedlejší cíl v biochemických testech (Gelbert *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2016; Hafner *et al.*, 2019), avšak její inhibice nebyla potvrzena v buněčných testech a je tudíž považována za bezpředmětnou (Gelbert *et al.*, 2014; Torres-Guzmán *et al.*, 2017). Mimo CDK rodinu inhibuje také CSNK2, DYRK, HIPK, CAMK2, PIM a GSK3 $\alpha/\beta$  kinasy (Gelbert *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2016; Hafner *et al.*, 2019; Uitdehaag *et al.*, 2019; Kim *et al.*, 2020). Tento široký farmakologický profil pravděpodobně přispívá k jeho vysoké účinnosti a silnému negativnímu efektu na viabilitu nádorových buněk. Díky tomu je účinný v klinice i v monoterapii, nicméně by neměl být označován jako selektivní CDK4/6i (Dickler *et al.*, 2017; Sledge *et al.*, 2017).

Jedním z nejnovějších CDK4/6i je trilaciclib (G1T28) založený na struktuře tricyklického laktamu, který byl původně vyvinut za účelem ochrany proti myelosupresi vyvolané v průběhu chemoterapie prostřednictvím regulace proliferace kmenových a progenitorových hematopoetických buněk, která je vysoce závislá právě na CDK4/6. Je selektivním inhibitorem CDK4/6, který neinhibuje další CDK kromě CDK9 (Bisi *et al.*, 2016; Wells *et al.*, 2020), jejíž inhibice však nebyla potvrzena v buněčném prostředí (Wells *et al.*, 2020). Studie analyzující jeho selektivitu ale odhalila řadu dalších cílů včetně FLT3 (D835V), FLT3, PRKD1-3, ULK1/2, MEK5 nebo GAK. Proteiny NEK10 a SNARK se dokonce vyznačovaly hodnotami  $K_i$  srovnatelnými s CDK4 (Bisi *et al.*, 2016). Modifikací stejného strukturního motivu byl vytvořen lerociclib (G1T38) s lepšími farmakokinetickými i farmakodynamickými vlastnostmi. V porovnání s trilaciclibem disponuje vyšší selektivitou v rámci kinomu a stejně jako trilaciclib se vyznačuje inhibicí CDK9 pouze v biochemickém testu. Mezi jeho další cíle patří NEK10, SNARK, ULK2 a TTK (Bisi *et al.*, 2017; Wells *et al.*, 2020).

V současné době je v klinických studiích testováno více než 10 dalších CDK4/6i, ovšem o řadě látek bylo publikováno zatím pouze minimum informací, ze kterých nelze vyvozovat jejich selektivitu, z toho důvodu nejsou zde zahrnuty.



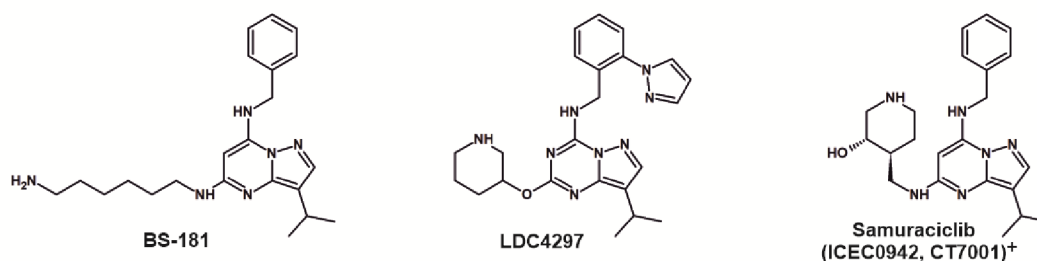
**Obr. 5:** Chemická struktura CDK4/6 inhibitorů (\* indikuje schválení FDA; + probíhající klinické testování).

### 3.2.2 CDK7i

V rámci skupiny CDK7i bylo dosud vyvinuto pouze několik inhibitorů publikovaných jako CDK7 selektivní (**Obr. 6**) (Sava *et al.*, 2020). Preklinické studie ukázaly, že tyto látky působí především prostřednictvím inhibice aktivující fosforylace CTD RNA polymerasy II vedoucí k represi transkripce, zejména genů asociovaných se super-enhancery. Mechanismem účinku je však i zablokování buněčného cyklu, jelikož CDK7 je aktivační kinasou dalších CDK regulujících cyklus. Inhibice CDK7 mimo jiné vede také ke genomové nestabilitě a k indukci apoptózy (Olson *et al.*, 2019; Sava *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2020). Mnoho mechanistických detailů a funkcí CDK7 však dlouhou dobu nebylo zcela pochopeno částečně z důvodu použití nedostatečně selektivních inhibitorů jako chemických sond, které poskytovaly rozporuplné výsledky. Z tohoto důvodu například není dosud zcela jasné, které CDK jsou odpovědné za fosforylaci serinu-2, 5 a 7 CTD domény RNA polymerasy II (Sava *et al.*, 2020).

Prvním selektivním inhibitorem CDK7 se stal již v roce 2009 pyrazolo[1,5-a]pyrimidinový derivát, BS-181, který se strukturně podobá pan-selektivnímu roskovitinu. Efektivně inhibuje CDK7, ale v nižší míře i CDK2, nicméně pouze za vysoké 10  $\mu\text{M}$  koncentrace (Ali *et al.*, 2009). Jeho vysoká selektivita byla potvrzena i analýzou v prostředí intaktních buněk, kdy byl označen za jednu z nejvhodnějších CDK7-selektivních chemických sond (Wells *et al.*, 2020). V rámci kinomu byl ale testován pouze vůči 70 kinasám, což nevylučuje existenci jiných vedlejších cílů (Ali *et al.*, 2009).

Za účelem zlepšení farmakologických vlastností byl vytvořen jeho analog, samuracilib (ICEC0942, CT7001) (Hazel *et al.*, 2017; Patel *et al.*, 2018), který však inhibuje také CDK2-4 a 10 (Wells *et al.*, 2020). Méně selektivním analogem je také LDC4297 (Kelso *et al.*, 2014; Hutterer *et al.*, 2015), který disponuje inhibiční aktivitou vůči CDK1-6 a také vůči TAIRE skupině CDK (Wells *et al.*, 2020). QS1189 je pyrazolo-triazinový derivát, jehož struktura nebyla dosud publikována. Jeho selektivita dosud byla ověřována pouze biochemickým testem v původní studii, ve které se vyznačoval i slabší inhibiční aktivitou vůči CDK2/5 a 16 (Choi *et al.*, 2019). Jeho použití by tedy mělo předcházet další podrobnější testování.



**Obr. 6:** Chemická struktura CDK7 inhibitorů (+ indikuje probíhající klinické testování).

### 3.2.3 CDK8/19i

CDK8 a její paralog CDK19 se vyznačují vysokou homologií a jsou často inhibovány jako vedlejší cíle pan-selektivních CDKi, nicméně byly vyvinuty i jejich duální inhibitory (**Obr. 7**). Vysoká podobnost těchto kinas neumožňuje jejich individuální farmakologickou inhibici, a proto dosud nebyly pochopeny rozdíly v jejich účincích a zůstávají tak relativně málo prostudovanými CDK (Wu *et al.*, 2021). Jejich farmakologická inhibice vede k potlačení proliferace některých malignit jako je akutní myeloidní leukémie nebo ER<sup>+</sup> rakoviny prsu. Následky jejich inhibice jsou však závislé na specifickém buněčném kontextu, kdy CDK8 může zaujímat funkci onkogenu, anebo nádorového supresoru (McDermott *et al.*, 2017; Rzymiski *et al.*, 2017).

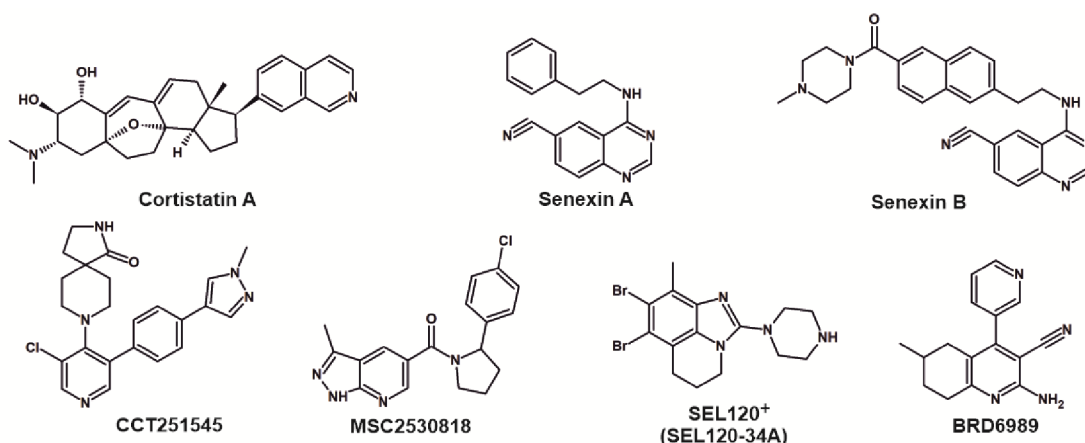
Vývoj CDK8/19i odstartoval objev cortistatinu A, který se stal prvním publikovaným ligandem CDK8, nicméně se vyznačoval také vysokou afinitou vůči CDK11 a ROCK kinasám (Cee *et al.*, 2009). Interakce s těmito vedlejšími cíli nebo jinými CDK však byla později

vyvrácena (Pelish *et al.*, 2015). V roce 2012 byla objevena skupina chinazolinových sloučenin označovaných jako SNX2, z nichž senexin A se stal komerčně dostupnou látkou (Porter *et al.*, 2012; McDermott *et al.*, 2017). Optimalizací jeho struktury vznikl lépe rozpustný senexin B (SNX-1-165) (Roninson *et al.*, 2013). Farmakologická inhibice senexiny fenotypově odpovídala CRISPR/Cas9 vyřazení genů CDK8/19 (Porter *et al.*, 2012; McDermott *et al.*, 2017). Pozdější kinomová analýza odhalila MAP4K2 jako vedlejší cíl senexinu B, avšak s hodnotou  $K_d$  10x vyšší než pro CDK8 (Chen *et al.*, 2019).

Optimalizací struktury inhibitoru signální dráhy WNT byl vyvinut CCT251545 (Mallinger *et al.*, 2015), který byl identifikován jako selektivní CDK8/19 inhibitor na základě několika různých přístupů (Dale *et al.*, 2015; Wells *et al.*, 2020). Společně s MSC2530818, který je derivátem imidazothiadiazolu, se obě látky vyznačují také inhibicí GSK3 kinas (Dale *et al.*, 2015; Czodrowski *et al.*, 2016). MSC2530818 v *in vivo* testech ale disponoval neočekávanou systémovou toxicitou, která není běžná při inhibici CDK8/19 (Clarke *et al.*, 2016) a která je pravděpodobně spojena s inhibicí GSK3 kinas nebo jiných neodhalených cílů (Chen *et al.*, 2019).

Zvláštní postavení má inhibitor BRD6989, který se vyznačuje nižší účinností než předchozí zmiňované látky, nicméně selektivně inhibuje CDK8, nikoliv CDK19. Kromě CDK8 však byly identifikovány jako jeho vedlejší cíle také lipidové kinasy, PI3KC2A a PI3KCG (Johannessen *et al.*, 2017).

Jedním z nejnovějších CDK8/19i je tricyklický benzimidazol, SEL120 (SEL120-34A) (Rzymiski *et al.*, 2017), který se v současné době nachází v klinickém testování pro léčbu akutní myeloidní leukémie (Borthakur *et al.*, 2019). SEL120 se vyznačuje vysokou selektivitou v rámci CDK rodiny v kinasovém inhibičním testu i v intaktních buňkách (Rzymiski *et al.*, 2017; Wells *et al.*, 2020), nicméně jeho aktivita vůči dalším cílům z kinomu nebyla publikována.



**Obr. 7:** Chemická struktura CDK8/19 inhibitorů (+ indikuje probíhající klinické testování).

### 3.2.4 CDK9i

Základním mechanismem působení CDK9i je inhibice fosforylace CTD RNA polymerasy II, která je mimo jiné asociována s poklesem hladiny anti-apoptotických proteinů Mcl-1 a onkoproteinu Myc vedoucí k rozsáhlé apoptóze (Wu *et al.*, 2020). Podobně jako v případě CDK7 i CDK9 je cílem mnoha pan-selektivních inhibitorů a v současné době je již komerčně dostupných celá řada látek, které jsou uváděny jako CDK selektivní, nicméně jejich vlastnosti se významně liší (**Obr. 8**).

CAN508 byl jedním z prvních inhibitorů vykazujících preferenční inhibici CDK9, nicméně také inhibuje CDK2. V rámci kinomu byl testován pouze vůči 100 kinasám, což nevyklučuje možnou inhibici vedlejších cílů (Kryštof *et al.*, 2006, 2011). Podobným příkladem je LDC067 (LDC000067), který disponuje vysokou selektivitou vůči CDK9 v rámci CDK rodiny, nicméně kinomová analýza selektivity zahrnovala pouze 28 dalších kinas (Albert *et al.*, 2014; Wells *et al.*, 2020). Podrobně charakterizovanou látkou je CDK9i (CDK9-IN2), která však s nižší účinností inhibuje také DYRK kiny (Lu *et al.*, 2015).

Atuveciclib (BAY-1143572) a jeho strukturální derivát BAY-1251152 byly vyvinuty stejnou výzkumnou skupinou a jako první CDK9i vstoupily do klinických studií. Disponují vysokou selektivitou vůči CDK, a to >50x vyšší než vůči jiným CDK. Mezi vedlejší cíle atuveciclibu patří GSK3 kiny, ale celokinomová analýza selektivity BAY-1251152 nebyla zveřejněna (Scholz *et al.*, 2016; Lücking *et al.*, 2017; Luecking *et al.*, 2017;

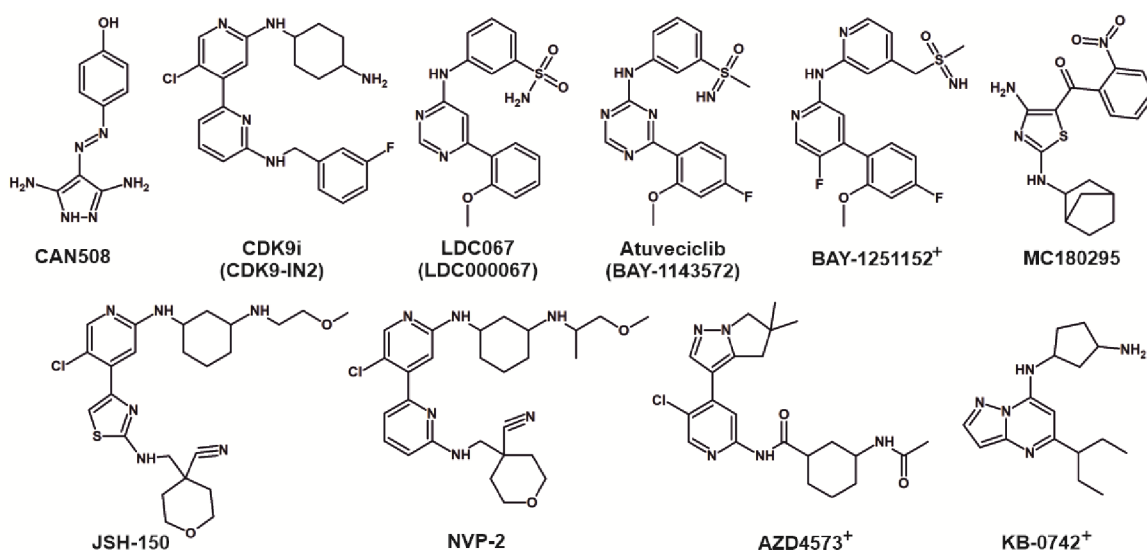
Byrne *et al.*, 2018). BAY-1251152 se vyznačuje vyšší účinností i selektivitou oproti atueveciclibu a byl doporučen jako vhodná CDK9-selektivní chemická sonda (Luecking *et al.*, 2017; Wells *et al.*, 2020). GSK3 kinasy jsou také vedlejším cílem MS180295 (Zhang *et al.*, 2018; Kirubakaran *et al.*, 2020). Kromě CDK9 ale účinně inhibuje také CDK10 a ve vyšších koncentracích inhibuje také fosforylaci substrátu CDK4/6 kinas (Zhang *et al.*, 2018; Robert *et al.*, 2020; Kirubakaran *et al.*, 2020).

Selektivitou vůči CDK9 disponuje také méně známý JSH-150, a to >300x vyšší než vůči jiným CDK. V rámci kinomu byla zaznamenána interakce pouze s DYRK1, nicméně od jeho vývoje nebyl dále testován (Wang *et al.*, 2018). Strukturně podobný NVP-2 ve vazebném kompetičním testu kromě CDK9 inhiboval i DYRK1, CDK7 a 13. V kinasovém inhibičním testu však CDK7 nebyla inhibována. Rozdíly v těchto výsledcích jsou připisovány tomu, že na rozdíl od kompetičního testu byla kinasová reakce prováděna v přítomnosti příslušného cyklinu, který způsobuje změny v konformaci ATP-vazebného místa CDK7, jejímž výsledkem je znemožnění vazby inhibitoru (Olson *et al.*, 2018). Chemoproteomická analýza buněčných lyzátů naopak odhalila CDK9 a 10 jako primární cíle a NVP-2 je tak ukázkovým příkladem rozdílnosti výsledků odlišných metod (Olson *et al.*, 2018; Robert *et al.*, 2020).

AZD4573 patří mezi jeden z nejnovějších inhibitorů, který je testován v klinických studiích a uváděn jako CDK9 selektivní. Disponuje však inhibicí dalších kinas včetně CDK1-6, CK, DYRK i GSK3, a to již v nízkých koncentracích (Barlaam *et al.*, 2020; Cidado *et al.*, 2020). CDK1-3 patřily mezi nejvíce inhibované vedlejší cíle (Cidado *et al.*, 2020) společně s CDK10 (Robert *et al.*, 2020). Selektivita AZD4573 by měla být zvážena, zejména vůči CDK1 a 3, jejichž inhibice byla pozorována také u jiných strukturně podobných amidopyridinů ze stejné série (Barlaam *et al.*, 2020).

Poslední méně známou látkou s >50x vyšší selektivitou vůči CDK9 v rámci CDK rodiny je KB-0742 (Richters *et al.*, 2021). Tento inhibitor vznikl optimalizací struktury KI-ARv-03, který byl podrobně charakterizován na základě biochemických i buněčných testů a který disponuje vysokou selektivitou vůči CDK9 i v rámci kinomu. Tato charakterizace však nebyla provedena s KB-0742 a je známo, že i malé změny struktury mohou vést k naprosto odlišným vlastnostem, a proto nelze vyloučit inhibici dalších vedlejších cílů (Richters *et al.*, 2021).





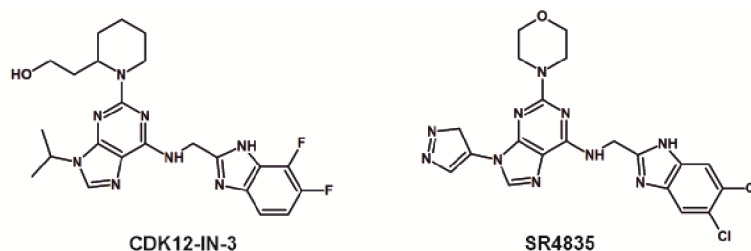
**Obr. 8:** Chemická struktura CDK9 inhibitorů (+ indikuje probíhající klinické testování).

### 3.2.5 CDK12/13i

CDK12 a 13 patří mezi transkripční kinasy, jejichž fyziologické funkce jsou postupně odhalovány až v posledních letech, a to prostřednictvím genetických přístupů, protože dlouhou dobu neexistoval žádný selektivní inhibitor. Bylo zjištěno, že inhibice CDK12 a 13 snižuje expresi řady genů zapojených do odpovědi na poškození DNA, jejímž následkem je zvýšení citlivosti na látky poškozující DNA nebo PARP inhibitory. Synergickým působením těchto látek dochází k akumulaci letálních poškození DNA a k buněčné smrti (Bajrami *et al.*, 2014; Krajewska *et al.*, 2019). Z tohoto důvodu se CDK12 a 13 staly objektem zájmu vývoje selektivních inhibitorů (**Obr. 9**). Tyto dvě kinasy jsou velmi úzce příbuzné a jejich ATP-vazebná místa jsou téměř identická, nicméně regulují odlišné geny (Greifenberg *et al.*, 2016; Johannessen *et al.*, 2017).

Díky znalosti krystalových struktur a modelování byl na základě struktury vysoce účinného dinaciclibu a inhibitoru SR-3029 vykazujícího účinnost vůči CDK12 vyvinut ATP-kompetitivní CDK12-IN-3. Vyznačuje se selektivitou vůči CDK12, ale v nižší míře inhibuje také CDK9 a 13, IRAK1, PI4KB a TAOK1 (sloučenina 7, Johannessen *et al.*, 2017).

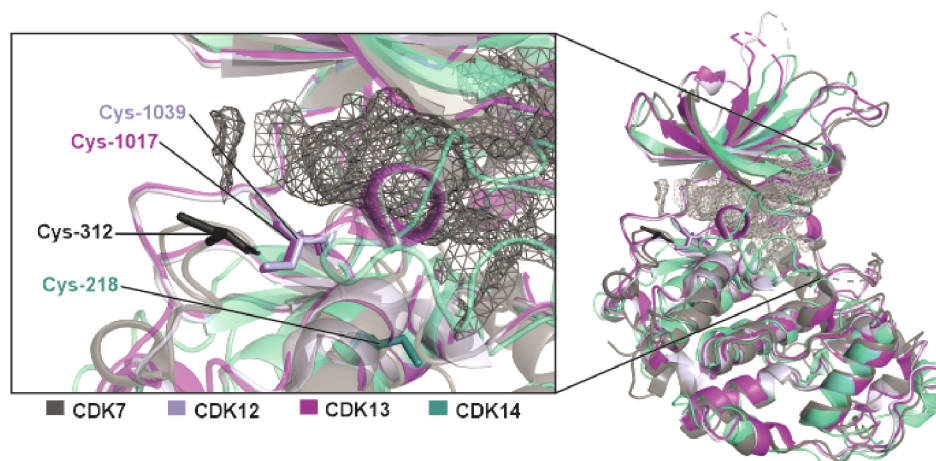
Dalším selektivním CDK12/13i je SR-483, který disponuje pouze nízkou afinitou vůči dalším cílům jako jsou CDK4/6/9 a GSK3 kinasy. Jeho selektivita byla testována v rámci celého kinomu pouze nebuněčnými technologiemi, avšak farmakologická inhibice fenotypově odpovídala genetické inhibici CDK12/13 (Quereda *et al.*, 2019).



Obr. 9: Chemická struktura CDK12/13 inhibitorů.

### 3.2.6 Kovalentní inhibitory

Kovalentní inhibice je poměrně atraktivní strategií pro dosažení vysoké účinnosti a dlouhodobější terapeutické odpovědi díky vysoké afinitě těchto látek. Ta umožňuje nižší a méně časté dávkování oproti jiným nekovalentním léčivům a potenciálně tak snižuje incidenci nežádoucích vedlejších účinků a resistance. Tyto látky mají však také své nevýhody jako je nežádoucí farmakokinetika a vysoká reaktivita, která bývá často spojována s nízkou selektivitou. Přes počáteční skepsi však řada studií poukázala na to, že mohou být účinnými i poměrně selektivními inhibitory s praktickým využitím (Sánchez-Martínez *et al.*, 2019; Sutanto *et al.*, 2020). Mezi nejnovější kovalentní inhibitory schválené pro terapeutickou léčbu patří selektivní inhibitor BTK, zanubrutinib (Syed, 2020), nebo EGFR, dacomitinib (Shirley, 2018), a určitý pokrok byl zaznamenán i ve vývoji kovalentních inhibitorů CDK. V této souvislosti bylo popsáno několik cysteinových residuí kinas CDK7/12/13 a 14, které umožňují jejich kovalentní inhibici (Sánchez-Martínez *et al.*, 2019). Na základě strukturního porovnání však bylo zjištěno, že cysteiny 1039 a 1017 se u CDK12, respektive CDK13, vyskytují ve stejné pozici, a tudíž jejich modifikátory inhibují obě tyto kinasy (Obr. 10). Kovalentní inhibice je však efektivním mechanismem, který umožňuje poměrně selektivní inhibici CDK, protože cílí nekonzervované cysteiny uvnitř nebo v blízkosti ATP-vazebné kapsy na rozdíl od konvenčních ATP kompetitorů. V rámci této skupiny bylo již vyvinuto několik látek, jejichž struktura je zobrazena na Obr. 11.



**Obr. 10:** Strukturní porovnání CDK7/12/13 a 14 s vyznačením cysteinových residuí umožňujících jejich kovalentní inhibici.

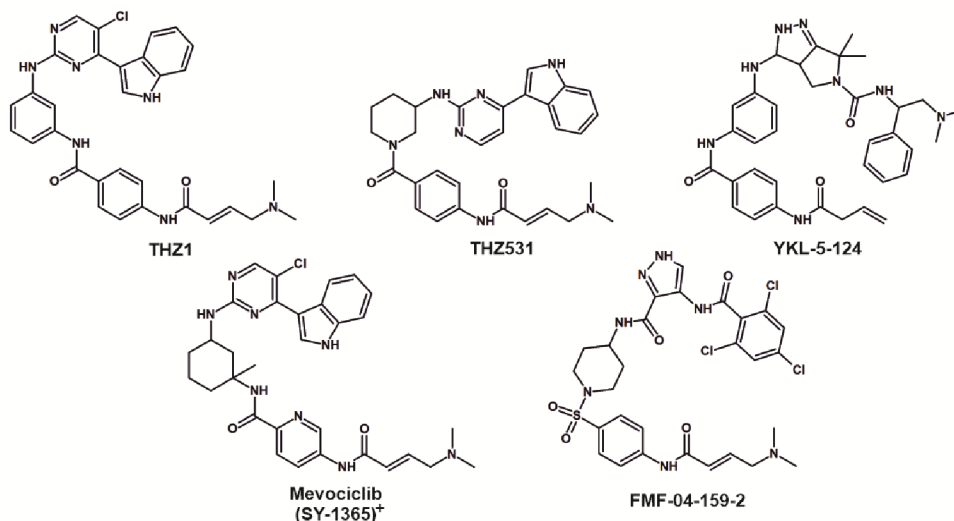
V roce 2014 byl objeven THZ1 jako první kovalentní inhibitor CDK rodiny (Kwiatkowski *et al.*, 2014). THZ1 je fenylaminopyrimidin nesoucí akrylamidovou skupinu, která kovalentně modifikuje cystein-312 CDK7, nicméně také inhibuje CDK12 a 13 ve vyšších koncentracích (Kwiatkowski *et al.*, 2014). Struktura THZ1 však byla využita pro vývoj dalších selektivnějších inhibitorů transkripčních kinas. Modifikací jeho struktury vznikl THZ531, který interaguje s cysteinem-1039 CDK12 a cysteinem-1017 CDK13 a ireversibilně inhibuje jejich aktivitu (Zhang *et al.*, 2016). Inhibice CDK7 a 9 v kinasovém inhibičním testu byla více než 50x slabší než vůči primárním cílům a jeho selektivita byla potvrzena i napříč kinomem (Zhang *et al.*, 2016; Gao *et al.*, 2018). Testování na buněčné úrovni odhalilo, že při nižších koncentracích ( $<1 \mu\text{M}$ ) v intaktních buňkách interaguje pouze s CDK12 (Wells *et al.*, 2020). Zajímavostí je, že analogy THZ1 i THZ531, které nenesly akrylamidovou skupinu, a tudíž nebyly schopny kovalentní interakce, se vyznačovaly podstatně nižší selektivitou, což ukazuje, že tento kovalentní mechanismus inhibice je nezbytný pro jejich aktivitu. Cílení jedinečných nukleofilních cysteinů zejména lokalizovaných mimo kinasovou doménu tedy představuje efektivní způsob selektivní inhibice CDK, který umožňuje obejít vysokou sekvenční a strukturní podobnost ATP-vazebného místa (Kwiatkowski *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2016; Gao *et al.*, 2018).

O několik let později byl objeven YKL-5-124, který interaguje s cysteinem-312 CDK7 a je neaktivní vůči CDK12 a CDK13 (Olson *et al.*, 2019). Vzhledem k jeho vysoké selektivitě

a účinnosti byl využit jako chemická sonda pro studium důsledků farmakologické inhibice CDK7 na buněčný cyklus a globální transkripci, nicméně jeho selektivita nebyla testována v buněčných experimentech (Olson *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2020).

Cílenou modifikací struktury THZ1 vznikl také mevocielib (SY-1365) s vyšší účinností a selektivitou vůči CDK7 prostřednictvím interakce s cysteinem-317. Disponuje poměrně vysokou selektivitou, kdy pouze 7 kinas z 468 testovaných se vyznačovala inhibicí vyšší než 90 %. Jedním z těchto vedlejších cílů je však i CDK15. Mevocielib jako první CDK7 inhibitor vstoupil v roce 2017 do klinických studií a je nyní testován pro léčbu pacientů s rakovinou prsu a ovarií (Hu *et al.*, 2019).

Cystein-218 byl identifikován jako jedinečná aminokyselina vyskytující se v rámci CDK rodiny v této pozici pouze ve struktuře CDK14. Na základě sekvenčního a strukturního porovnání bylo také zjištěno, že v rámci kinomu je tento cystein přítomen pouze u 3 dalších kinas JNK rodiny. Cystein-218 je cílem dříve popsaného kovalentního inhibitoru JNK kinas, JNK-IN-7, ale také panelektivního inhibitoru AT7519, který inhibuje CDK14. Toto residuum tak poskytuje výhodný cíl pro dosažení vysoké selektivity kovalentní inhibicí CDK14. Hybridizací struktury JNK-IN-7 se strukturou AT7519 byl vytvořen inhibitor FMF-04-159-2 jako potentní kovalentní inhibitor CDK14, který ale také nekovalentně inhibuje CDK2/10 a 16-17 v mikromolárních koncentracích. Jeho použití jako chemická selektivní sonda vůči CDK14 je tedy striktně vymezeno pouze na kontrolované experimenty s vymytím látky (Ferguson *et al.*, 2019).



**Obr. 11:** Chemická struktura kovalentních CDK inhibitorů (+ indikuje probíhající klinické testování).

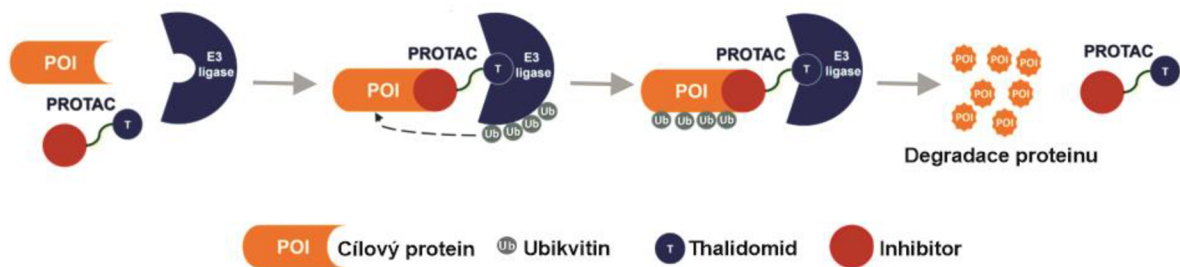
**Tab. 1:** Přehled komerčně dostupných inhibitorů, které byly klasifikovány jako selektivní vůči specifickým CDK, a jejich vedlejších cílů společně se zhodnocením úrovně charakterizace jejich selektivity.

Rok publ.	Název inhibitoru	Publikovaný primární cíl	Identifikované vedlejší cíle	Počet použitých metod	Maximální počet kinas	Charakterizace
2004	Palbociclib (PD0332991)	CDK4/6	CDK16/17?, PIP4/5, PIK3, CSNK2, HIPK1-3, CLK1/2, TTK, TRK, ULK2/3, FLT3	>5	520	Dostatečná
2013	Ribociclib (LEE011)	CDK4/6	CAMK2, GAK, QIK, TTK	>5	520	Dostatečná
2014	Abemaciclib (LY283519)	CDK4/6	CDK1/2, CDK5?, CDK7-8, CDK12-17?, CDK19, CSNK2, HIPK1-3, CLK1/2, DYRK1-3, CAMK2, PIM1/3, GSK3 $\alpha/\beta$ , IRAK1, AAK1, ERK8, FLT3	>5	520	Dostatečná
2016	Trilaciclib (G1T28)	CDK4/6	NEK10, SNARK, PRKD1-3, ULK1/2, GAK, MEK5, PIP5, FLT3 (D835V), FLT3	3	468	Dostatečná
2017	Lerociclib (G1T38)	CDK4/6	NEK10, SNARK, PRKD1/3, ULK2, TTK, FLT3 (D835V), FLT3 (ITD, D835V)	3	468	Dostatečná
2009	BS-181	CDK7	CDK2	2	70	Nedostatečná
2015	LDC4297	CDK7	CDK1-6, CDK15-18	3	333	Dostatečná
2017	Samuraciclib (ICEC0942, CT7001)	CDK7	CDK2-4, CDK10	4	117	Nedostatečná
2019	QS1189	CDK7	CDK2, CDK5, CDK16	1	410	Nedostatečná
2009	Cortistatin A	CDK8/19	CDK11?, ROCK?	4	402	Dostatečná
2012	Senexin A	CDK8/19		1	N.p.	Nedostatečná
2013	Senexin B	CDK8/19	MAP4K2	2	468	Nedostatečná
2015	CCT251545	CDK8/19	GSK3 $\alpha/\beta$	4	291	Nedostatečná
2016	MSC2530818	CDK8/19	GSK3 $\alpha/\beta$	2	468	Nedostatečná
2017	SEL120 (SEL120-34A)	CDK8/19		2	N.p.	Nedostatečná
2017	BRD6989	CDK8	PI3KC2A, PI3KCG	4	414	Dostatečná
2006	CAN508	CDK9	CDK2	2	100	Nedostatečná
2014	LDC067 (LDC000067)	CDK9	CDK2	4	28	Nedostatečná
2015	CDK9i (CDK9-IN2)	CDK9	DYRK	3	>400	Dostatečná
2016	Atuveciclib (BAY-1143572)	CDK9	GSK3	3	230	Nedostatečná
2017	BAY-1251152	CDK9		>2	N.p.	-
2018	MS180295	CDK9	CDK4/6, CDK10, GSK3	3	250	Nedostatečná
2018	JSH-150	CDK9	DYRK1	2	468	Nedostatečná
2018	NVP-2	CDK9	CDK7?, CDK9-10, CDK13, DYRK1	2	468	Nedostatečná
2020	AZD4573	CDK9	CDK1-6, CDK10, CSNK, DYRK, GSK3	3	468	Dostatečná
2021	KB-0742	CDK9		1	16	Nedostatečná
2017	CDK12-IN-3	CDK12	CDK9, CDK13, IRAK1, PI4KB, TAOK1	3	352	Dostatečná
2019	SR-483	CDK12/13	CDK4/6, CDK9, GSK3	3	450	Dostatečná
2014	THZ1	CDK7	CDK12-13	2	251	Nedostatečná
2016	THZ531	CDK12/13		5	456	Dostatečná
2019	YKL-5-124	CDK7		3	232	Nedostatečná
2019	Mevociclib (SY-1365)	CDK7	CDK15, RSK4, DYRK1B, JNK1-3, PIP5K2C	2	468	Nedostatečná
2019	FMF-04-159-2	CDK14	CDK2, CDK10, CDK16-18	3	300	Dostatečná

N.p. ... data nebyla publikována

### 3.2.7 PROTAC

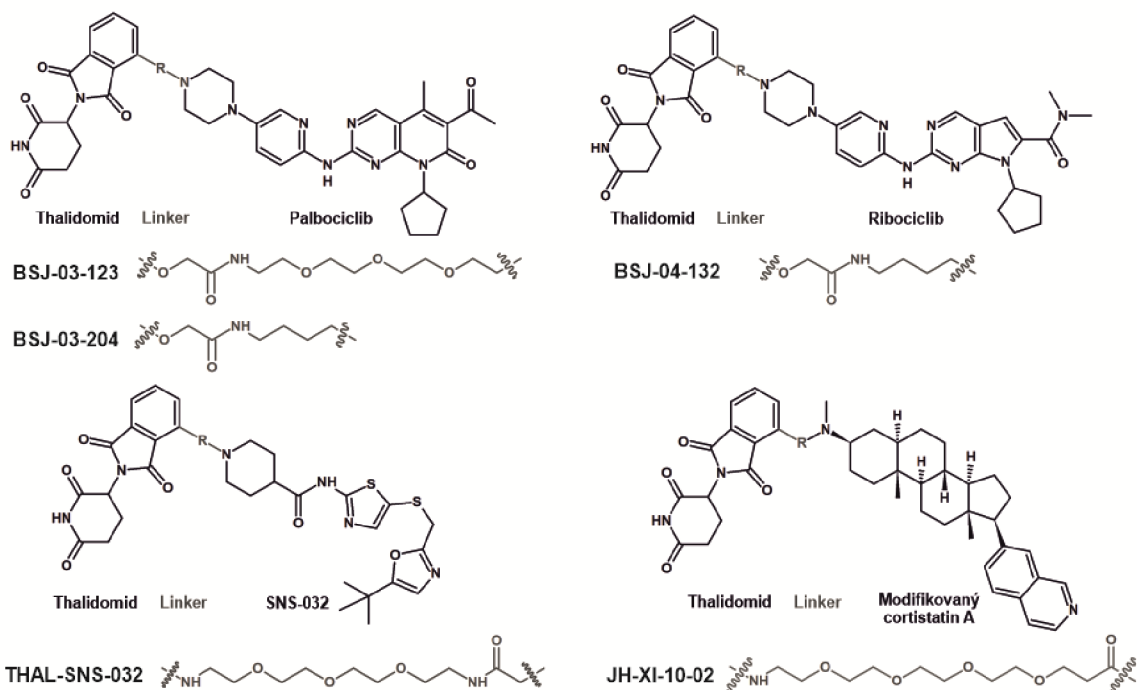
Velmi slibnou strategií modulace CDK je jejich selektivní proteolýza indukovaná chemicky. Nejběžnější jsou proteolytické chiméry (tzv. *proteolysis targeting chimera*, PROTAC) (Sun *et al.*, 2019), které jsou heterobifunkčními molekulami skládajícími se z vlastní struktury inhibitoru konjugované prostřednictvím flexibilního linkeru s ligandem pro E3 ubikvitin ligasu. Tento ternární komplex dostává cílovou kinasu do těsné blízkosti s E3 ligasou, což umožní transfer ubikvitinu na lysinové residuum kinasy, pokud je přítomno v její struktuře. Polyubikvitinovaná kinasa je rozpoznána ubikvitin-proteasomovým systémem a je degradována (**Obr. 12**) (Hughes *et al.*, 2017; Bozhenko *et al.*, 2013). Výhodou této strategie oproti konvenčním CDKi je inhibice jak kinasových, tak i nekinasových funkcí cílové CDK, kterou lze překonat pouze opětovnou proteosyntézou. Tento přístup také snižuje možnost rozvoje rezistence prostřednictvím mutací nebo nadměrné exprese a akumulace kompenzačního proteinu. Vývoj konjugátů PROTAC díky tomu vzbudil velký zájem v klinice, nicméně je zapotřebí dalších studií pro ověření jejich účinnosti a bezpečnosti (Sun *et al.*, 2019). Významné postavení má však také v základním výzkumu, kde umožňuje rychle a kompletně vyřadit kinasu z funkce na proteinové úrovni. Atraktivní vlastností konjugátů PROTAC je, že poměrně neselektivní konvenční inhibitory transformuje v selektivní degradéry. ATP-vazebné místo CDK se sice vyznačuje vysokou podobností, nicméně okolní povrchy a distribuce lysinových residuí je odlišná u různých CDK. Díky tomu lze vyvinout selektivní CDK degradéry, protože ubikvitinace a proteosomální degradace vyžaduje vhodně umístěný povrchově exponovaný lysinový zbytek. Při vhodném návrhu struktury PROTAC konjugátu, tak může být dosaženo vysoce selektivní degradace kinas. Nicméně je třeba podotknout, že i takto selektivní konjugáty PROTAC se stále vyznačují určitou mírou inhibice katalytické aktivity dalších cílů. Ta je však významně omezena vzhledem k tomu, že k degradaci dochází obvykle již při nižších koncentracích látky (Robb *et al.*, 2017; Olson *et al.*, 2018; Qiu *et al.*, 2021).



**Obr. 12:** Mechanismus působení PROTAC konjugátů (upraveno podle Krajčovičová *et al.*, 2019).

V současné době existuje již řada různých konstruktů založených na inhibitech CDK4/6 schválených pro klinické použití, ale i PROTAC degradující CDK2/8 nebo 9 (**Obr. 13**) (Brand *et al.*, 2019; Jiang *et al.*, 2019; Sun *et al.*, 2019; F. Zhou *et al.*, 2020). Téměř ve všech případech byl využit jako ligand E3 ubiquitin ligasy derivát thalidomidu nebo pomalidomidu. Komerčně dostupných látek je však zatím pouze omezené množství. BSJ-03-204 degraduje CDK4/6, zatímco BSJ-04-132 a BSJ-03-123 selektivně pouze CDK4 nebo CDK6. Takové selektivity v případě konvenčních kompetitorů dosud nebylo dosaženo. Tyto degradéry jsou založeny na struktuře CDK4/6i, degradují své primární cíle při koncentraci 100 nM a vyznačují se silnějšími antiproliferačními účinky (Brand *et al.*, 2019; Jiang *et al.*, 2019). Dosud jediným dostupným konjugátem degradujícím CDK8 je JH-XI-10-02, který je založený na modifikované struktuře cortistatinu A a který se nevyznačuje degradací CDK19 (Hatcher *et al.*, 2018). THAL-SNS-032, jehož struktura je odvozena z pan-selektivního inhibitoru SNS-032, se vyznačuje selektivní degradací CDK9 v živých buňkách, aniž by degradoval další cíle inhibované SNS-032. Tato skutečnost je připisována působení konjugátů PROTAC již v sub-stechiometrických koncentracích, které jsou dostačující pro selektivní degradaci CDK9, nikoliv však pro katalytickou inhibici dalších cílů (Olson *et al.*, 2018). Do skupiny CDK9 degradérů spadají také konjugáty prodávané pod názvem PROTAC CDK9 degradér-1 (sloučenina 3, Robb *et al.*, 2017) a -2 (sloučenina 11c, Bian *et al.*, 2018).





Obr. 13: Chemická struktura PROTAC konjugátů.

### 3.3 Buněčná selektivita CDKi

Kinasové inhibitory se vyznačují promiskuitou nejen na biochemické úrovni, ale i nízkou selektivitou při jejich tkáňové a buněčné distribuci. Většina cílí na kinasy či procesy, jejichž regulace je u nádorových buněk narušena, avšak tyto kinasy mohou mít esenciální funkci také v jiných nepatologických procesech normálních nenádorových buněk (Van Beuge et al., 2012; Ferguson *et al.*, 2018). Nízká buněčná selektivita vede k akumulaci látky i v jiných orgánech, což může způsobovat systémovou toxicitu, která významně omezuje dávkování léčiva a mnohdy bývá příčinou vyřazení z klinického použití. Jedním z nejzávažnějších vedlejších účinků je rozvoj srdečních poruch. Kromě toho se může jednat např. o dermatologické, hematologické nebo gastrointestinální komplikace, otoky apod. (Force *et al.*, 2007; Hartmann *et al.*, 2009).

Systémy umožňující cílený transport léčiv jsou dlouho dobu intenzivně studovány a představují slibný způsob zvýšení buněčné selektivity protinádorových léčiv, a tedy snížení jejich toxicity vůči nenádorovým buňkám. Intenzivní výzkum probíhající posledních 30 let

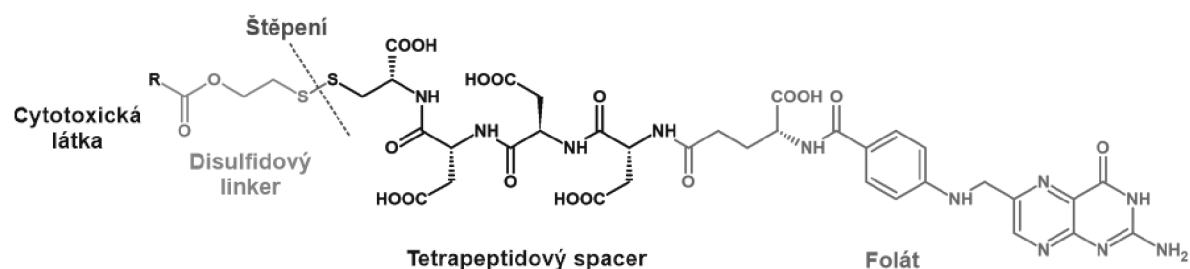


vedl k vývoji několika různých přístupů umožňujících preferenční cílení léčiv. Mnohé z nich jsou založeny na často se vyskytující zvýšené expresi antigenů nebo receptorů na povrchu nádorových buněk (Kok *et al.*, 2010; Srinivasarao *et al.*, 2017; Zhao *et al.*, 2020). Selektivního transportu může být dosaženo použitím cytotoxického léčiva konjugovaného s molekulou (ligandem) rozpoznávající nádorově-specifický antigen exprimovaný v dostatečném množství. Takovou molekulou mohou být látky různého charakteru jako jsou foláty, monosacharidy, deriváty močoviny, aptamery aj., ale také peptidy (Srinivasarao *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2020). Dalším způsobem cílení je využití liposomálního systému, který umožňuje transport jak hydrofilních látek zabudovaných v membráně liposomu, tak i lipofilních látek v jeho vodném středu. Specifického cílení je dosaženo připojením ligandu na povrch liposomu, který je obvykle chráněn biokompatibilním polymerem jako je polyethylenglykol (Sercombe *et al.*, 2015). Obdobným způsobem lze využít také přirozených nebo geneticky upravených buněk, kdy jsou terapeutika navázána na buněčný povrch nebo zapouzdřená uvnitř buňky (Srinivasarao *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2020).

Jednou z nejpoužívanějších nízkomolekulárních látek využívaných pro cílení léčiv je folát (Zhao *et al.*, 2020). Foláty se vyskytují ve dvou podobách, a to v oxidované formě kyseliny listové nebo jako přirozeně se vyskytující redukované foláty. Jsou esenciální pro biosyntézu purinů a thymidinu nezbytných pro syntézu a opravu DNA všech buněk (Gonen *et al.*, 2012). Za fyziologických podmínek je extracelulární folát do buněk transportován především nízkoafinitivními folátovými nosiči nebo transportéry, ale také glykoproteinovými folátovými receptory (FR), které foláty specificky vážou s vysokou afinitou a transportují endocytózou do buněk (Antony, 1996; Leamon *et al.*, 2004; Zwicke *et al.*, 2012). Exprese FR $\alpha$  v nezhooubných tkáních je však poměrně vzácná a je úzce omezena především na epitelální buňky dělohy, placenty, sítnice, plic a ledvin. FR $\alpha$  jsou navíc lokalizovány pouze na apikálním/luminálním povrchu nenádorových buněk, což podstatně omezuje jejich expozici foláty v krevním oběhu (Parker *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2020). Jsou však vysoce exprimovány ve více než 40 % lidských nádorů, včetně nádorů ovaríí a endometria, karcinomů plic, ledvin, prsu a tlustého střeva a také nádorů centrální nervové soustavy (Ledermann *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2020). Při nádorové transformaci navíc dochází ke ztrátě polarizace lokalizace receptorů a nádorová

buňka pak nese FR $\alpha$  na celém svém povrchu (Kane *et al.*, 1988). Díky tomu je konjugace folátu s terapeutikem považována za účinný způsob zvýšení buněčné selektivity vůči nádorovým buňkám (Szigetvari *et al.*, 2018).

Folátový transportní systém je objektem studií již několik let a na základě řady neúčinných pokusů byla odhalena některá základní kritéria pro vytvoření funkčních folátových konjugátů. V počátečních studiích byla pozornost zaměřena především na schopnost konjugátu transportovat léčivo do nádorových buněk bez ohledu na vztah mezi strukturou a aktivitou konjugátu a uvolnění léčiva z jeho struktury, což vedlo k řadě selhání (Leamon *et Reddy*, 2004; Vlahov *et Leamon*, 2012). Tato limitace byla odstraněna zavedením disulfidového linkeru uspořádaného mezi folátem a cytotoxickou látkou, která je díky redukci disulfidové vazby glutationem uvolněna. Tohoto typu linkeru bylo využito u konjugátů jako maytansin (Ladino *et al.*, 1997), tubulysin (Leamon *et al.*, 2008) nebo vintafolid (Vlahov *et al.*, 2006). Dalším kritériem bylo zvýšení hydrofility sloučenin. Většina nízkomolekulárních cytotoxických látek má lipofilní charakter, který umožňuje náhodnou pasivní difuzi skrz buněčné membrány. Aby nedocházelo k neselektivní pasivní difuzi konjugátů, bylo nutné do jejich struktury zařadit spacer obsahující zbytky polárních nabitých aminokyselin, které zvyšují jejich hydrofilitu (**Obr. 14**). Takové hydrofilní konjugáty pak mohou vstupovat do buněk výhradně přes FR-zprostředkovaný přenos (Vlahov *et Leamon*, 2012).



**Obr. 14:** Příklad chemické struktury folátového konjugátu se štěpitelným disulfidovým linkerem a hydrofilním tetrapeptidovým spacerem.

Několik konjugátů již bylo testováno v klinických studiích včetně vintafolidu (Vergote *et* Leamon, 2015), nicméně dosud nebyl žádný schválen pro použití v léčbě rakoviny. Hlavními důvody selhání testovaných látek byla jejich nízká účinnost a nedostatek biomarkerů pro vhodnou selekci pacientů. Tyto látky však poukázaly na potenciál tohoto přístupu, který by mohl přispět k diagnostice a léčbě onkologických pacientů (Scaranti *et al.*, 2020). CDK inhibitory se vyznačují vysokou biochemickou i buněčnou účinností, nicméně jejich klinické použití je mnohdy limitováno nízkou buněčnou selektivitou. Tato skutečnost podnítila k rozvoji prvních konjugátů CDK inhibitorů s foláty, které jsou schopny vázat folátový receptor FR<sup>+</sup> nádorových buněk a vyznačují se vysokou biochemickou účinností vůči CDK2. Tento koncept byl popsán v jedné z příložených prací a poukazuje na účinný způsob vývoje inhibitorů s vyšší selektivitou vůči nádorovým buňkám (Krajčovičová *et al.*, 2017, Příloha III).

## 4 METODIKA

### 4.1 Buněčné kultury

Lidské nádorové buněčné linie HCT116 wt, HeLa, MCF7, A549, MDA-MB-231 a Hep-G2 byly získány z The European Collection of Authenticated Cell Cultures. Buněčná linie HCC-827 byla koupena z DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures. Linie HCT116 CDK2<sup>-/-</sup> byla získána od dr. Daniela Fishera (CNRS, Montpellier, Francie) a všechny použité linie myších embryonálních fibroblastů MEFs byly získány od dr. Mariana Barbacida (CNIO, Madrid, Španělsko).

Všechny linie byly kultivovány při 37 °C a v atmosféře 5% CO<sub>2</sub>. Pro linie HCT116 wt, HeLa, MCF7, A549, MDA-MB-231 bylo použito kultivační médium DMEM. Toto médium bylo pro linii HCT116 CDK2<sup>-/-</sup> a myší embryonální fibroblasty MEFs obohaceno navíc o glukosu (4,5 g/l). Buněčná linie Hep-G2 byla kultivována v médium EMEM a linie HCC-827 v RPMI. Použitá média byla vždy doplněna 10 - 20% fetálním bovinním sérem, streptomycinem (100 µg/ml), penicilinem (100 U/ml) a L-glutaminem (2 mM).

### 4.2 Analýza cytotoxicity

Pro stanovení cytotoxických účinků látek byly použity metody MTT a calcein AM. Kolorimetrická metoda MTT je založena na schopnosti mitochondriálních dehydrogenas živých buněk redukovat MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid) na silně pigmentovaný formazán, který je následně rozpuštěn, a poté je stanovena jeho absorbance. Principem fluorescenční metody calcein AM je hydrolyza calceinu AM intracelulárními esterasami živých buněk na calcein, který silně fluoreskuje.

Buněčné linie byly vysazeny do 96-jamkové mikrotitrační destičky a druhý den byly ovlivněny testovanými látkami v příslušných koncentracích v triplicátu po dobu 72 hodin. Následně byl přidán roztok MTT (výsledná koncentrace 1 mg/ml) po dobu 4 hod. Vzniklý formazán byl rozpuštěn v DMSO a byla stanovena absorbance při 570 nm spektrofotometrem Infinite M200 PRO (Tecan). V případě metody Calcein AM byl po 72 hodinové inkubaci s testovanými látkami přidán roztok Calceinu AM (výsledná koncentrace 1 µg/ml) a po 1 hod byla změřena fluorescence při 485/538 nm na fluorimetru Fluoroskan Ascent (Labsystems). Všechna měření byla provedena v alespoň 3 technických replikátech.

### 4.3 Kinasový inhibiční test

Kinasová reakce byla provedena standardizovaným kinasovým inhibičním testem s rekombinantními CDK1/B1, CDK2/E1 (exprimovaných v hmyzích buňkách Sf9), CDK2/A2 (exprimovaných v *E. coli*), CDK4/D1, CDK5/p25, CDK7/H/MAT1, CDK9/T1 (Proqinase) a aurora A, B (Sigma). Jako substrát byl použit histon H1 (CDK1/2/5), RPPTLSPIPHIPR peptid (CDK4), (YSPTSPS)<sub>2</sub>KK peptid (CDK7), nebo MBP (Aurora A/B). Reakce probíhala v přítomnosti ATP, 0,05  $\mu\text{Ci}$  [ $\gamma$ -<sup>33</sup>P]ATP a testované látky v kinasovém reakčním pufru v celkovém objemu 10  $\mu\text{l}$  (koncentrace DMSO v reakci nepřesáhla 0,2 %) v mikrotitrační destičce s použitím Eppendorf ThermoMixer (350 rpm, 30 °C). Koncentrace ATP v kinasové reakci byla stanovena na základě hodnot  $K_m$  testovaných kinas. Reakce byla vždy zastavena přidávkem 5  $\mu\text{l}$  3% kyseliny fosforečné. Z každé reakční směsi bylo poté nanášeno 5  $\mu\text{l}$  na P-81 fosfocelulosu (Whatman), která byla následně 3x promyta 0,5% kyselinou fosforečnou po dobu 6 min a poté opláchnuta 96% ethanolem a usušena. Fosfocelulosový papír byl exponován v kazetě s citlivou deskou přes noc a poté byla citlivá deska oskenována skenerem FLA7000 (Fujifilm). Koncentrace testované látky nezbytná pro redukcí kinasové aktivity na 50 % ( $\text{IC}_{50}$ ) byla stanovena z křivek závislosti fosforylace na koncentraci testovaných látek s využitím programu Origin verze 6.0. Všechny reakce byly provedeny nejméně ve třech technických replikátech.

### 4.4 Analýza buněčného cyklu

Buněčné linie byly vysazeny na Petriho kultivační desky a druhý den byly ovlivněny testovanými látkami. Po 24 hod inkubace byly buňky sklizeny trypsinizací a zafixovány ve vychlazeném 70% ethanolu. Zafixované vzorky byly rehydratovány PBS a následně inkubovány 30 min v 2N HCl s 0,5% Tritonem X-100. Pro neutralizaci byly promyty v 0,1M  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  (pH = 8,5) a poté nabarveny roztokem propidium jodidu (výsledná koncentrace 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Po půl hodinové inkubaci byl měřen relativní obsah jaderné DNA pomocí průtokového cytometru BD FACS Verse s BD FACSuite Software verze 1.0.6 (BD Biosciences) s využitím excitačního laseru o vlnové délce 488 nm. Získaná data byla analyzována pomocí softwaru ModFit LT verze 4.1.7 (Verity Software house).

#### **4.5 SDS-PAGE a imunodetekce**

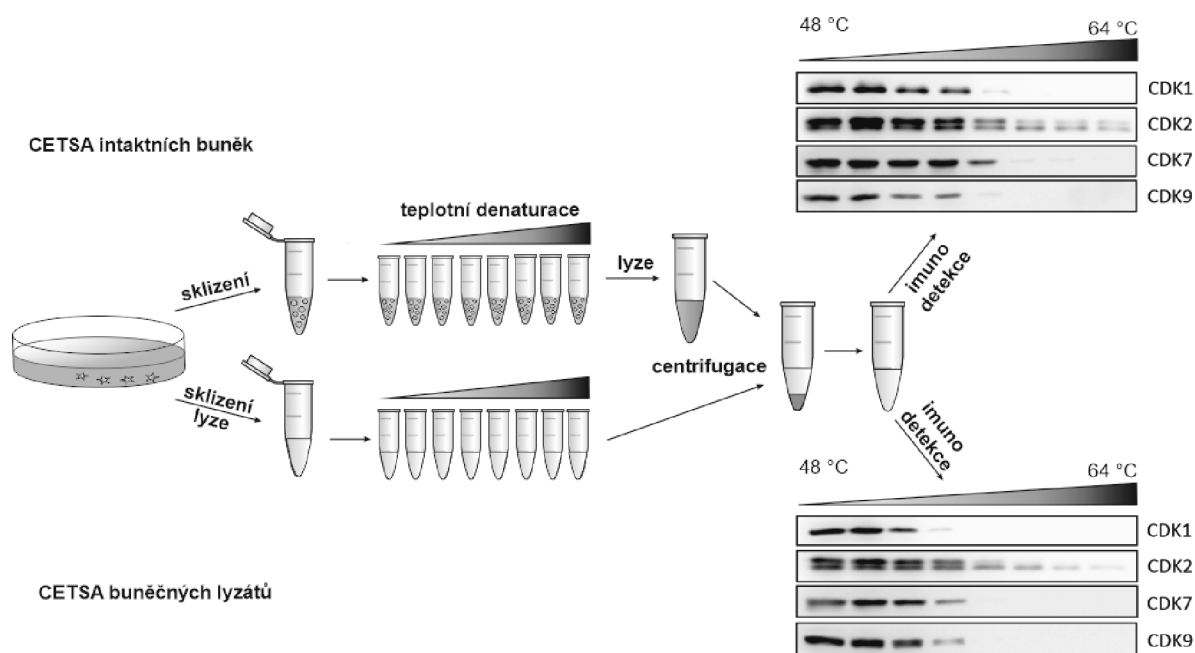
Buňky určené pro imunodetekci proteinů byly po ovlivnění příslušnými látkami sklizeny a následně lyzovány po dobu 20 min v RIPA pufru (20 mM TRIS pH = 7,4; 100 mM NaCl; 2 mM EGTA; 5 mM EDTA; 0,2% Nonidet P-40 pH = 7,4; před použitím přidáno: 1 mM DTT; 1 mM PMSF; 1 mM Na<sub>2</sub>VO<sub>3</sub>; 2 mM NaF; 0,5 µg/ml leupeptin a 2 µg/ml aprotinin). Pomocí ultrazvukového homogenizátoru byly vzorky sonikovány a poté zcentrifugovány. Spektrofotometrickou Bradfordovou metodou (Bradford, 1976) byla změřena koncentrace proteinů ve vzorcích. Po vyrovnání koncentrace k nim byl přidán vzorkovací pufr (0,3 M TRIS pH = 6,8; 10% SDS; 50% glycerol; 0,05% bromfenolová modř; 5% 2-merkptoethanol) a následně byly denaturovány při 95 °C po dobu 3 min.

Proteiny byly separovány polyakrylamidovou gelovou elektroforézou za denaturujících podmínek a následně pomocí western blotingu přeneseny na nitrocelulosovou membránu. Membrány byly blokovány v 3% BSA a následně inkubovány s primárními a sekundárními protilátkami značenými křenovou peroxidázou. Kvantifikace byla provedena s použitím chemiluminiscenčního kitu ECL (Thermo Scientific) za použití CCD kamery LAS4000 (FujiFilm). Specifikace jednotlivých protilátek jsou uvedeny v příslušných publikacích.

#### **4.6 Analýza teplotní denaturace**

Tato metoda byla nově používaným přístupem testování, a proto bylo nejprve nutné optimalizovat její podmínky. Buněčná linie byla vysazena na Petriho kultivační misky a druhý den byla ovlivněna testovanými látkami v příslušných koncentracích. Po 3 hodinové inkubaci byly buňky sklizeny, přičemž tato doba je dostačující pro interakci látky s cílovou kinasou, ale zároveň nedochází k ovlivnění buněčné viability oproti kontrolnímu vzorku neovlivněných buněk. Vlastní analýza teplotní denaturace byla provedena dvěma přístupy. V prvním případě byly sklizené buňky nejprve lyzovány RIPA pufrém podle předchozí kapitoly a lyzáty s vyrovnanými hladinami proteinů byly rozděleny po 50 µl do PCR stripů. V druhém případě byla sklizená buněčná suspenze doplněna o inhibitory proteas a poté byla rozdělena po 50 µl do PCR stripů. Takto připravené vzorky byly vystaveny teplotní denaturaci. V obou případech byly vzorky předeřhřáty po dobu 1 min na 25 °C a poté byla provedena denaturace v požadovaném teplotním gradientu s následným ochlazením po dobu 1 min,

a to pomocí termocykléru MJ Mini (BioRad). Rozsah teplotního gradientu byl vždy zvolen na základě předběžných experimentů, při kterých byl stanoven tzv. bod tání ( $T_m$ ), při kterém dochází k denaturaci jednotlivých kinas. Takto denaturované vzorky intaktních buněk pak byly lyzovány opakovaným zmražením a zahřátím pomocí tekutého dusíku a termobloku nastaveného na 25 °C. Následně byla v obou případech provedena centrifugace pro odstranění precipitovaných a agregovaných proteinů (případně zbytků buněk) a k supernatantu byl přidán vzorkovací pufr. Teplotní stabilita proteinů byla stanovena imunodetekcí (jejíž postup byl popsán v předchozí kapitole) a porovnáním bodů tání mezi kontrolními a ovlivněnými vzorky. V obou přístupech bylo dosaženo srovnatelných výsledků s tím rozdílem, že proteiny v intaktních buňkách disponují vyšší teplotou bodu tání, a tudíž bylo nutné použít vyšší teploty oproti buněčným lyzátům (**Obr. 15**). Pro výsledné experimenty byl nakonec zvolen přístup teplotní denaturace buněčných lyzátů vzhledem k tomu, že poskytuje určité technické výhody, kdy lze sklizené buňky zamrazit a pokračovat v experimentu později.

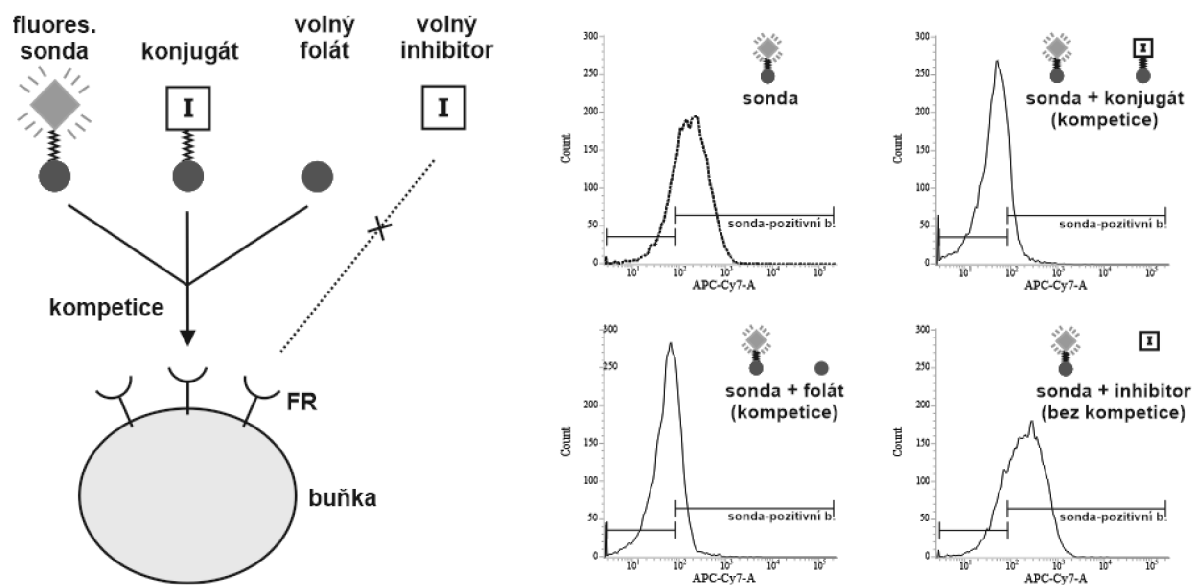


**Obr. 15:** Schématické znázornění použitých metodických přístupů CETSA a porovnání výsledků teplotní denaturace CDK1/2/7 a 9 v intaktních buňkách a v buněčných lyzátech.

#### 4.7 Analýza kompetice na folátovém receptoru

Buněčné linie byly vysazeny na Petriho kultivační misky a byly inkubovány po dobu 24 hodin. Poté bylo vyměněno kultivačním médiu za médium bez folátů a antibiotik s přidavkem 10% dialyzovaného fetálního séra, aby bylo možné kontrolovat množství folátů při experimentu, a v tomto médiu byly inkubovány dalších 24 hodin. Poté byly buňky kultivovány 1 hod při 37 °C s fluorescenční sondou cílicí folátový receptor, FolateRSense 680 (Perkin Elmer), nejprve v přítomnosti, nebo nepřítomnosti samotného folátu jako kompetičního agens. Po inkubaci byly buňky opláchnuty PBS pro odstranění nespecificky navázaných folátů, resuspendovány v PBS a bylo měřeno zastoupení buněk s navázanou fluorescenční sondou pomocí průtokového cytometru BD FACS Verse s BD FACSuite Software verze 1.0.6 (BD Biosciences) s využitím excitačního laseru o vlnové délce 640 nm. Získaná data byla analyzována pomocí softwaru BD FACSuite TM (BD Biosciences). V tomto kroku byla optimalizována koncentrace fluorescenční sondy pro dosažení specifické interakce s FR a koncentrace vlastního folátu pro jejich dostatečnou kompetici. Také byla tímto způsobem ověřována exprese FR ve vybraných buněčných liniích MDA-MB-231, HepG2, A549, HCC-827 a HeLa. Po potvrzení silné exprese FR buněčnou linií HeLa a zoptimalizování metody byla testována také vazba vlastních folátových konjugátů. Buňky HeLa byly vysazeny a kultivovány stejným způsobem a následně inkubovány 1 hod s 1 μM fluorescenční sondou v nepřítomnosti, nebo přítomnosti testovaného konjugátu, nekonjugovaného inhibitoru, nebo samotného folátu. Poté byly opláchnuty PBS a analyzovány průtokovým cytometrem (**Obr. 16**).





**Obr. 16:** Schématické znázornění kompetice testovaných látek na folátovém receptoru (FR) a reprezentativní výsledky cytometrické analýzy procentuálního zastoupení buněk s navázanou fluorescenční sondou FolateRSense 680 v nepřítomnosti, nebo v přítomnosti testovaného konjugátu, samotného folátu, nebo nekonjugovaného inhibitoru (upraveno podle Krajčovičová *et al.*, 2017).

## 5 KOMENTOVANÉ VÝSLEDKY A DISKUSE

### 5.1 Biochemická selektivita komerčně dostupných CDKi

Během několika desítek let bylo vyvinuto velké množství CDKi, které se vyznačují různou mírou charakterizace jejich biochemické selektivity, z nichž více než 100 látek je komerčně dostupných. Především látky objevené před 20-30 lety byly klasifikovány na základě původních publikací. V té době však znalosti o CDK byly značně limitované a látky byly testovány pouze vůči několika kinasám, nicméně i přesto jsou komerčně nabízeny jako selektivní vůči určité CDK. Podrobnější charakterizace byla provedena jen pro některé CDKi, a to až podstatně později, a je obvykle součástí rozsáhlejších studií, kde tyto informace není jednoduché rychle a účelně najít. Katalogy komerčních společností navíc nedostatečně aktualizují své produktové listy o tato novější data, a pokud se uživatel spoléhá pouze na uvedené informace, lze snadno vybrat nevhodnou chemickou sondu s naprosto odlišnou selektivitou, než je uváděno (Arrowsmith *et al.*, 2015). Vzhledem k této skutečnosti si řada CDKi zaslouží bližší přezkoumání jejich selektivity, aby k takovým případům nedocházelo.

Z těchto důvodů byla v příložené práci charakterizována biochemická selektivita 31 vybraných komerčně dostupných CDKi (**Tab. 2**), které byly uváděny jako selektivní vůči CDK1, 2 nebo 4/6 a pro které nebyly dostupné úplné informace o jejich selektivě, anebo se vyznačovaly neočekávanými biologickými efekty spojenými s inhibicí dalších kinas (**Jorda *et al.*, 2018b, Příloha I**). Látky, které se vyznačovaly pan-selektivním charakterem, nebo jejichž selektivita byla popsána jinde, nebyly zahrnuty. Selektivita byla testována v biochemickém inhibičním testu vůči CDK1/2/4/6/7/9 a studován byl také vliv těchto inhibitorů na buněčný cyklus průtokovou cytometrií. Inhibice některých cílů byla ověřována analýzou teplotní denaturace nebo fosforylace přímých substrátů. Tyto účinky byly spojovány s biochemickým profilem látek a s publikovanými daty.

V rámci skupiny CDK1 selektivních inhibitorů bylo testováno pět látek, z nichž benfluoren (Brachwitz *et al.*, 2003), elbfluoren (Voigt *et al.*, 2005) a „CDK1 inhibitor“ (Andreani *et al.*, 2000) překvapivě nedosáhly dostatečné inhibiční aktivity vůči žádné z testovaných CDK (**Příloha I, Obr. 3**). Publikovaná data „CDK1 inhibitoru“ navíc odhalila neselektivní inhibici řady dalších kinas inhibovaných podstatně více než CDK1 (Anastassiadis *et al.*, 2011). Mechanismus, kterým „CDK1 inhibitor“ indukoval G2/M blok

buněčného cyklu, tedy nelze spojovat s inhibicí CDK1 (**Příloha I, Obr. 2**), ale spíše jiných cílů, jako je např. MLCK způsobující obdobné mitotické defekty (Gao *et al.*, 2013). V případě benfluorenu a elbfluorenu nebyl dokonce pozorován žádný vliv na buněčný cyklus linie HCT116 (**Příloha I, Obr. 2A**). CGP74514A byl na základě silné inhibice CDK1 klasifikován jako selektivní CDK1 inhibitor bez dalšího testování jiných cílů (Imbach *et al.*, 1999). Publikovaná indukce G2/M bloku buněčného cyklu by mohla být částečně v souladu s inhibicí tohoto cíle (Pernicová *et al.*, 2014; Jorda *et al.*, 2015), ale výsledky cytometrické analýzy poukazují pouze na částečný blok odpovídající spíše inhibici CDK2 jako primárního cíle (**Příloha I, Obr. 2, 3**). Navzdory dříve publikovaným datům odkazujícím na jeho pan-selektivitu zahrnující právě CDK2, ale i další kinyasy jako PAK (Eswaran *et al.*, 2007; Fedorov *et al.*, 2007), byl nesprávně používán jako CDK1 selektivní inhibitor v několika studiích (Chen *et al.*, 2006b, 2012). V rámci této testované skupiny pouze RO3306 (Vassilev *et al.*, 2006) dosáhl dostatečné selektivity vůči CDK1, která koresponduje i s indukovaným buněčným efektem a s výsledky termodenaturační analýzy (**Příloha I, Obr. 2, 3**). Podle publikovaných dat však RO3306 disponuje inhibicí dalších kinas z CMGC rodiny, zejména DYRK (MRC Kinase Profiling Inhibitor Database, 2021).

Skupina CDK2 inhibitorů tvoří jednu z nejpočetnějších, avšak tyto látky často inhibují druhý primární cíl, zejména CDK1, 5 nebo 9 vzhledem k jejich sekvenční podobnosti, a jsou pak označovány jako duální inhibitory. V rámci studie bylo testováno šest látek uváděných jako selektivní vůči CDK2, nicméně ani jedna z nich nespĺnila kritéria selektivní sondy. Ačkoliv „CDK2 inhibitor II“ (Davis *et al.*, 2001) disponoval selektivitou vůči CDK2 v kinasovém inhibičním testu, která odpovídala indukovanému buněčnému efektu, tedy zvýšenému počtu buněk zablokovaných v G2/M fázi (**Příloha I, Obr. 4, S3**), jeho použití je podstatně limitováno nízkou rozpustností, která byla při testech zaznamenána. Inhibitor SU9516 (Lane *et al.*, 2001) jako jedna z mála látek byl charakterizován poměrně podrobně (Moshinsky *et al.*, 2003; Xiong *et al.*, 2010; Anastassiadis *et al.*, 2011), avšak kromě CDK2 interagoval v kinasovém testu i s CDK5 (**Příloha I, Obr. 4**). Inhibice CDK5 byla zaznamenána také pro CVT313 („CDK2 inhibitor III“) (Brooks *et al.*, 1997) a GW8510 (Davis *et al.*, 2001) (**Příloha I, Obr. 4**). Všechny tři látky indukovaly pokles fosforylace serinu-732 FAK kinyasy (**Příloha I, S3**), která je považována za přímý substrát CDK5

(Daval *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2017). Tento výsledek společně s dalšími publikovanými daty potvrzuje inhibici CDK5 (Anastassiadis *et al.*, 2011). SU9516 a GW8510 způsobují zablokování cyklu v G2/M fázi, a to i buněčné linie HCT116 s vyřazeným genem pro CDK2, což indikuje inhibici CDK1 (**Příloha I, S3**). Naproti tomu miliciclib (PHA848125) (Brasca *et al.*, 2009) v nízkých koncentracích zablokoval buňky v G1 fázi, což odpovídá inhibici CDK4, zatímco ve vyšších dávkách buněčný efekt korespondoval s inhibicí CDK2 (**Příloha I, Obr. 4, S4**). Zajímavým příkladem je látka NU6140 („CDK2 inhibitor IV“) (Pennati *et al.*, 2005), která se na panelu CDK v kinasovém inhibičním testu jevila jako CDK2 selektivní (**Příloha I, Obr. 4**), nicméně způsobovala výraznou tetraploidizaci buněk odpovídající inhibici jiných mitotických kinas (**Příloha I, Obr. 5A**). Publikovaná studie odhalila aurora kinasy jako jedny z nejvíce inhibovaných kinas (Anastassiadis *et al.*, 2011) a jejich inhibice byla potvrzena kinasovým inhibičním testem i analýzou fosforylace histonu H3, přímého substrátu aurory B (**Příloha I, Obr. 5B, C**). Tyto výsledky tak poskytují nový pohled na možný mechanismus účinku NU6140.

CDK4 a 6 disponují strukturou mírně odlišnou od jiných CDK, díky které jsou jejich inhibitory obvykle více selektivní (Echalier *et al.*, 2014), což pravděpodobně napomohlo k úspěšnému schválení palbociclibu, ribociclibu a abemaciclibu pro léčbu rakoviny prsu. V rámci testovaného panelu kinas disponovaly všechny tři látky silnou inhibicí CDK4 (**Příloha I, Obr. 6**), nicméně na základě publikovaných dat inhibují i další vedlejší cíle, jak bylo nastíněno v teoretické části práce. Analýza buněčného cyklu potvrdila inhibici CDK4 s očekávaným G1 blokem buněčného cyklu bez výrazné indukce apoptózy již v nanomolárních koncentracích (**Příloha I, Obr. 7A, S4**). Při vyšších dávkách abemaciclib i palbociclib zvyšují procentuální zastoupení buněk v G2/M fázi v důsledku inhibice dalších cílů (**Příloha I, Obr. S5**) (Liu *et al.*, 2012; Hafner *et al.*, 2019). Tři z dalších testovaných látek, NSC625987 („CDK4 inhibitor II“) (Kubo *et al.*, 1999), ryuvidin („CDK4 inhibitor III“) (Ryu *et al.*, 2000) a CINK4 („CDK4/6 inhibitor IV“) (Soni *et al.*, 2001), nedosáhly dostatečné inhibice žádné z testovaných CDK a ani přesvědčivého buněčného účinku odpovídajícímu inhibici CDK4 (**Příloha I, Obr. 6, 7**) (Anastassiadis *et al.*, 2011; Gao *et al.*, 2013). Použití ryuvidinu je navíc významně omezeno jeho nízkou rozpustností, která byla zaznamenána při analýzách. Tyto látky pravděpodobně působí odlišným mechanismem účinku. „CDK4 inhibitor V“ (Tsou *et al.*, 2009), arcyriaflavin A

(Sánchez-Martínez *et al.*, 2003) a jeho derivát „CDK4 inhibitor” (Zhu *et al.*, 2003) sice inhibují CDK4, nicméně také CDK1/2 a 5 (**Příloha I, Obr. 6**). ON123300 byl popsán jako inhibitor CDK4 a ARK5 (Reddy *et al.*, 2014). V nanomolárních koncentracích způsobuje předpokládaný G1 blok buněčného cyklu linie HCT116, nicméně v mikromolárních dávkách se projevuje také inhibicí CDK2 spojenou s G2/M blokem (**Příloha I, Obr. 6, 7**), což bylo zaznamenáno také v případě lymfatických linií (Divakar *et al.*, 2016). Jeho aplikace jako CDK4 selektivní inhibitor je tedy striktně vymezena použitím vhodné koncentrace.

Poslední testovanou skupinu tvořilo 10 duálních CDKi. Žádná z těchto látek selektivně neinhibovala pouze dvě udávané CDK v kinasovém inhibičním testu (**Příloha I, Obr. 8**). Pouze tři z nich, BMS265246 (Misra *et al.*, 2003), BML259 (Helal *et al.*, 2004) a „CDK2/9 inhibitor” (S. Wang *et al.*, 2004), opravdu inhibovaly jejich udávané primární cíle s největší účinností. Na základě analýzy fosforylace serinu-732 kinasy FAK bylo zjištěno, že všechny tři látky společně s „CDK1/2 inhibitorem III” (R. Lin *et al.*, 2005) a CGP60474 (Ruetz *et al.*, 2003) kromě udávaných primárních cílů inhibují také CDK5, což je také v souladu s výsledky biochemického testu (**Příloha I, Obr. S6, 8**). „CDK1/2 inhibitor III” a CGP60474 disponovaly poměrně vysokou afinitou také vůči transkripčním kinasám CDK7 a 9, nicméně jejich inhibice se neprojevila poklesem fosforylace RNA polymerasy II (**Příloha I, Obr. S6, 8**). Duální inhibitory BIO (6-BIO) (Meijer *et al.*, 2003) a (R)-DRF053 kromě CDK inhibují také další vedlejší cíle, GSK3 $\beta$ , respektive CSNK1 $\delta$  (Polychronopoulos *et al.*, 2004; Oumata *et al.*, 2008), zatímco „CDK1/5 inhibitor” (Ortega *et al.*, 2002) a PNU112455A95 (Clare *et al.*, 2001) mají pouze velmi omezenou inhibiční aktivitu vůči CDK (**Příloha I, Obr. 8**). Zajímavým příkladem je NU6102, který byl původně popsán jako duální inhibitor CDK1 a 2 (Davies *et al.*, 2002; Hardcastle *et al.*, 2004), ale pozdější studie odhalily, že se vyznačuje selektivitou pouze k CDK2 (Coxon *et al.*, 2017; Echalié *et al.*, 2012; Jorda *et al.*, 2018a; Krasinska *et al.*, 2008). Kinasový inhibiční test potvrdil preferenci vůči CDK2, nicméně NU6102 indukoval výrazný G2/M blok linie HCT116 s vyřazeným genem pro CDK2, což značí inhibici CDK1 (**Příloha I, Obr. 8, S7**).

**Tab. 2:** Přehled testovaných inhibitorů CDK a jejich cílů stanovených v této dizertační práci.

Rok publikace	Název inhibitoru	Publikovaný primární cíl	Identifikované cíle v rámci studie
1999	CGP74514A	CDK1	CDK1-2
2000	CDK1 inhibitor	CDK1	
2003	Benfluoren	CDK1	-
2005	Elbfluoren	CDK1	-
2006	RO3306 (CDK1 inhibitor IV)	CDK1	CDK1
1997	CVT313 (CDK2 inhibitor III)	CDK2	CDK2, CDK5
2001	GW8510	CDK2	CDK1-2, CDK5
2001	CDK2 inhibitor II	CDK2	CDK2
2001	SU9516	CDK2	CDK1-2, CDK5
2005	NU6140 (CDK2 inhibitor IV)	CDK2	CDK2, Aurora kinasy
2009	Milciclib (PHA848125)	CDK2	CDK2, CDK4
1999	NSC625987 (CDK4 inhibitor II)	CDK4/6	-
2000	Ryuvidin (CDK4 inhibitor III)	CDK4/6	-
2001	CINK4 (CDK4/6 inhibitor IV)	CDK4/6	-
2003	Arcyriaflavin A	CDK4/6	CDK1-6
2003	CDK4 inhibitor	CDK4/6	CDK1-6
2004	Palbociclib	CDK4/6	CDK4/6, ?
2009	CDK4 inhibitor V	CDK4/6	CDK4/6, CDK1-2
2013	Ribociclib	CDK4/6	CDK4/6
2014	Abemaciclib	CDK4/6	CDK4/6, ?
2014	ON123300	CDK4/6	CDK4/6, CDK2
2003	CGP60474	CDK1/2	CDK1-2, CDK5
2002	NU6102	CDK1/2	CDK1-2
2003	BMS265246	CDK1/2	CDK1-2, CDK5
2005	CDK1/2 inhibitor III	CDK1/2	CDK1-2, CDK5
2002	CDK1/5 inhibitor	CDK1/5	-
2004	(R)-DRF053	CDK1/5	CDK2, CDK5
2001	PNU112455A	CDK2/5	-
2003	BIO (6-BIO)	CDK2/5	CDK1-6
2004	BML259	CDK2/5	CDK1-2, CDK5
2004	CDK2/9 inhibitor	CDK2/9	CDK1-2, CDK5, CDK9

## 5.2 Buněčná selektivita konjugátů 2,6,9-trisubstituovaných purinů

Jeden z prvních objevených CDK inhibitorů, roskovitin (Havlíček *et al.*, 1997), poukázal na účinnou biologickou aktivitu 2,6,9-trisubstituovaného purinového skeletu, který se díky tomu stal inspirací pro vývoj dalších derivátů s lepšími biologickými i farmakokinetickými vlastnostmi. Zejména puriny nesoucí biarylmethylamino nebo biarylamino substituenty v pozici 6 se vyznačovaly zlepšením CDK-inhibičních a antiproliferačních vlastností. Potenciální klinická aplikace těchto látek je však limitována nízkou buněčnou selektivitou (Bettayeb *et al.*, 2008; Oumata *et al.*, 2008; Trova *et al.*, 2009). Tato skutečnost podnítila k vytvoření prvního konceptu konjugátů CDK inhibitorů s folátovým transportním systémem, který potenciálně zvyšuje selektivitu vůči nádorovým buňkám (Krajčovičová *et al.*, 2017, Příloha III).

Na základě krystalových struktur CDK2 a folátových konjugátů s jinými cytostatiky (Vergote *et Leamon*, 2015) bylo navrženo a syntetizováno 7 folátových konjugátů **17a-g** (Příloha III, Tab. 1). Tyto sloučeniny jsou založeny na struktuře 2,6,9-trisubstituovaných purinů nesoucích 4-aminocyklohexylamin v pozici 2, které se vyznačují CDK2-inhibičními a antiproliferačními účinky (Gucký *et al.*, 2013). Terminální amino skupina těchto látek poskytuje vhodnou funkční skupinu pro konjugaci s folátem prostřednictvím disulfidového linkerem, přičemž tato modifikace neinterferuje s vazbou inhibitoru s katalytickou doménou CDK. Tento typ linkeru umožňuje kompletní uvolnění inhibitoru v redukčním prostředí glutathionu v endosomech, čímž není narušena jeho inhibiční aktivita. Oligopeptidový spacer tvořený kyselinou aspartátovou zvyšuje celkovou hydrofilitu konjugátu, která zajišťuje selektivní transport prostřednictvím FR, nikoliv pasivní difuzí (Vlahov *et Leamon*, 2012).

Nejprve byl stanoven cytotoxický účinek nasyntetizovaných konjugátů na nádorovou linii HeLa, u níž byla prokázána exprese folátového receptoru (Příloha III, Obr. S24 a S25) (Liu *et al.*, 2007; Song *et al.*, 2012). Nejvíce účinný konjugát **17d** byl na základě těchto výsledků zvolen pro další detailnější studie. Skupinou M. Sourala byla provedena simulace disulfidové reakce, která mimikuje uvolnění inhibitoru *in vitro* v přítomnosti redukčního činidla, dithiothreitolu nebo glutathionu, pro ověření funkčnosti systému. Byla zaznamenána kompletní redukce disulfidového linkeru již po 5 min působení redukčního prostředí a po uplynutí 20 hod došlo k úplnému uvolnění samotného inhibitoru (Příloha III, Obr. 2).

Naproti tomu v případě nejznámějšího folátového konjugátu, vintafolidu, byla kompletní redukce disulfidového linkeru glutathionem zaznamenána až po 2 h, zatímco v případě dithiothreitolu po 10 min (Vlahov *et Leamon*, 2012). Následně byla průtokovou cytometrií testována schopnost konjugátu **17d** vázat FR nádorové linie HeLa s použitím fluorescenční sondy cílící folátový receptor, FolateRSense 680, jako kompetičního agens (**Příloha III, Obr. 3A**). Buněčná linie HeLa byla vybrána s ohledem na vysokou expresi FR a podstatně vyšší cytotoxický účinek **17d** než vůči jiným testovaným liniím. Výsledky cytometrické analýzy potvrdily, že konjugovaný inhibitor podstatně snížil procentuální zastoupení buněk s navázanou fluorescenční sondou, a to dokonce účinněji než volný folát (**Příloha III, Obr. 3B**). Tato kompetice byla koncentračně závislá s hodnotou  $IC_{50}$  v mikromolárním rozsahu (**Příloha III, Obr. 4**). V kontrolním experimentu samotný nekonjugovaný inhibitor s fluorescenční sondou nekompetoval. Tyto analýzy potvrzují specifický transport konjugátu **17d** prostřednictvím FR. Podobných výsledků bylo dosaženo i v případě ostatních látek ze série (**Tab. 3**). Na závěr byla testována inhibiční aktivita **17d** vůči CDK2 v komplexu s cyklinem E standardizovaným kinasovým inhibičním testem, kdy tento konjugát dosáhl srovnatelné kinasové inhibiční aktivity ( $IC_{50} = 77$  nM) jako nekonjugovaný inhibitor **17d'** ( $IC_{50} = 41$  nM), a to i v nepřítomnosti redukčního činidla.

**Tab. 3:** Zastoupení buněk pozitivních na fluorescenční sondu FolateRSense 680, která váže folátový receptor, **A**) v přítomnosti volného folátu nebo testovaných konjugátů **17a-17g** v koncentraci 50  $\mu$ M, nebo **B**) v přítomnosti rostoucí koncentrace konjugátu **17d**, nebo **17g**, nebo jejich prekurzorových volných inhibitorů **17d'**, nebo **17g'**.

<b>A</b>		<b>B</b>		
	Látka	% zastoupení buněk pozitivních na sondu	Látka	% zastoupení buněk pozitivních na sondu
Fluor.sonda 1 $\mu$ M	CTRL	72.1	CTRL	75.6
	volný folát 50 $\mu$ M	22.6	<b>17d</b> 0.05 $\mu$ M	70.6
	17a 50 $\mu$ M	12.7	<b>17d</b> 0.5 $\mu$ M	63.5
	17b 50 $\mu$ M	10.3	<b>17d</b> 5 $\mu$ M	33.8
	17c 50 $\mu$ M	12.9	<b>17d</b> 50 $\mu$ M	11.4
	<b>17d</b> 50 $\mu$ M	11.4	inhibitor <b>17d'</b> 5 $\mu$ M	72.0
	17e 50 $\mu$ M	15.7	inhibitor <b>17d'</b> 50 $\mu$ M	74.4
	17f 50 $\mu$ M	11.5	17g 0.05 $\mu$ M	72.4
	17g 50 $\mu$ M	13.6	17g 0.5 $\mu$ M	64.9
			17g 5 $\mu$ M	36.7
			17g 50 $\mu$ M	13.6
			inhibitor <b>17g'</b> 5 $\mu$ M	71.0
			inhibitor <b>17g'</b> 50 $\mu$ M	72.7



Tyto výsledky souhrnně potvrzují, že vazba folátu přes amino skupinu CDK inhibitorů neblokuje interakci konjugátu s ATP-vazebným místem CDK2 a jeho účinnost tedy není limitována rychlostí uvolnění samotného inhibitoru v buňkách. Zachování vysoké účinnosti inhibitorů je jedním z významných faktorů, které ovlivňují úspěšnost při klinickém použití. Přestože se některé folátové konjugáty dostaly do klinického testování, jako např. vintafolid (Vlahov *et al.*, 2006; Dosio *et al.*, 2010) nebo BMS-753493 (Peethambaram *et al.*, 2015), žádný z nich dosud nebyl schválen právě v důsledku jejich nízké účinnosti (Scaranti *et al.*, 2020). Vintafolid se vyznačuje pouze omezenou účinností při monoterapeutické léčbě, která vyžaduje jeho použití v kombinaci s jinými chemoterapeutiky, která jsou však neselektivní a způsobují nežádoucí vedlejší účinky (Naumann *et al.*, 2013; Hanna *et al.*, 2014). Konjugace folátu s CDK inhibitory s vysokou biochemickou i buněčnou účinností by v tomto ohledu mohly představovat vývoj efektivních inhibitorů s vyšší selektivitou vůči nádorovým buňkám.

## 6 ZÁVĚR

V současné době existuje řada komerčně dostupných CDKi poměrně odlišných chemických struktur, které dosáhly různého stupně preklinického či klinického vývoje. Tři z těchto látek byly schváleny jako protinádorová léčiva a desítky dalších se aktuálně nachází v klinickém testování. Přestože většina látek neuspěla v klinickém vývoji, poskytují nepřehledné množství nástrojů pro chemickou biologii při studiu biologických pochodů spojených s funkcí CDK a také ve vývoji účinnějších léčiv. Kvalita těchto sloučenin, s ohledem na biochemickou účinnost, selektivitu a biologické účinky, se však může podstatně lišit. Inhibitory jsou totiž na počátku vývoje mnohdy označovány za vysoce účinné a selektivní vůči určitému cíli, ale v mnoha případech se toto tvrzení ukázalo jako nepravdivé. V důsledku nedostatečné charakterizace jejich biochemické selektivity totiž nejsou správně identifikovány jejich cíle, se kterými interagují. Inhibice neodhalených vedlejších, anebo i primárních cílů limituje jejich použití jako selektivních chemických sond, ale i jejich klinický vývoj.

První část této dizertační práce byla věnována charakterizaci biochemické selektivity a biologických účinků vybraných komerčně dostupných CDKi, které byly uváděny jako selektivní vůči CDK1, 2 nebo 4/6, a tyto výsledky byly porovnávány s publikovanými daty. Bylo hodnoceno, zda tyto látky splňují kritéria vhodných selektivních chemických sond, která zahrnují dostatečnou selektivitu ( $>50$ násobný rozdíl v hodnotách  $IC_{50}$  v biochemickém testu zahrnujícím alespoň 125 kinas), biochemickou ( $<100$  nM) a buněčnou účinnost ( $<500$  nM). Tato kritéria byla souhrnně definována jako tzv. *fitness factor* (Frye, 2010; Workman *et al.*, 2010; Knapp *et al.*, 2013). Bylo zjištěno, že z 31 látek pouze palbociclib, abemaciclib a ribociclib splňují všechna kritéria selektivních chemických sond. Ze skupiny CDK2 inhibitorů, pouze inhibitory NU6102 a „CDK2 inhibitor II“ disponují dostatečnou selektivitou vůči CDK2, nicméně nedosáhly dostatečné buněčné účinnosti. Porovnáním testovaných CDK1 inhibitorů bylo zjištěno, že pouze RO3306 je vhodným kandidátem z této skupiny; žádná jiná látka nedosáhla tak vysoké selektivity pro CDK1. Všechny studované duální inhibitory by měly být klasifikovány jako pan-selektivní, protože žádný z nich neinhibuje pouze dvě udávané CDK. Vhodným kandidátem pro duální CDK2/5 inhibitor by mohl být CVT313, který byl původně udáván jako CDK2 selektivní. Velká většina testovaných látek, včetně CDK4/6 inhibitorů, způsobuje mírnou, avšak koncentračně závislou

akumulaci buněk v G2/M fázi buněčného cyklu, která indikuje podstatně komplexnější mechanismus účinku. Například CDK4/6 inhibitor ON123300 indukuje G1 blok, který od určité koncentrace přechází v G2/M v důsledku inhibice CDK2. Tento jev se vyskytuje u látek s nanomolární afinitou vůči CDK4, ale nízkým indexem selektivity, jako má také „CDK4 inhibitor“ nebo milciclib. V případě některých látek dokonce nebyla prokázána inhibice CDK jako primárních buněčných cílů navzdory původním publikovaným datům a mnohé z nich zřejmě inhibují i jiné proteinkiny v rámci kinomu. Zatímco hlavní cíl „CDK1 inhibitoru“ zůstává neodhalen, NU6140 byl vyhodnocen jako silný inhibitor aurora kinas. Na základě těchto výsledků jsou aurora kiny již uváděny v produktových listech jako vedlejší cíle NU6140 řady komerčních společností. Publikovaná data pro BIO, ON1233000 a milciclib odhalila, že tyto látky jsou také účinnými inhibitory dalších kinas v kinomu jako GSK3, ARK5, nebo TRK (Albanese *et al.*, 2010; Meijer *et al.*, 2003; Reddy *et al.*, 2014). Pro řadu látek však nejsou dostupná kompletní data o jejich selektivě v rámci kinomu, v důsledku čehož nejsou odhaleny jejich další vedlejší cíle, anebo jsou testovány pouze v jedné, často suboptimální, koncentraci. Například „CDK1/2 inhibitor III“ byl analyzován v koncentraci 500 nM, kdy více než polovina z testovaných kinas byla inhibována s účinností >50 %, nicméně s ohledem na jeho buněčnou účinnost by měla být použita podstatně nižší koncentrace, díky které by byly vyfiltrovány nerelevantní cíle (Anastassiadis *et al.*, 2011). Vedlejšími cíli ale mohou být také jiné nekinasové cíle, například ryavidin v klinicky relevantních dávkách inhibuje také metyltransferasu SETD8 (Blum *et al.*, 2014). Ze získaných výsledků je evidentní, že informace o biochemické selektivě jsou nezbytné pro pochopení mechanismu účinku a pro výběr vhodné selektivní sondy. Biochemické testy by měly být vždy doplněny o buněčné testy a další analýzy pro dosažení korektní a úplné validace selektivity inhibitorů.

Kinasové inhibitory se však vyznačují promiskuitou nejen na biochemické, ale i na buněčné úrovni, kdy dochází k jejich akumulaci i ve zdravých nenádorových buňkách. Většina těchto látek inhibuje kiny či procesy, které podporují nádorové bujení, ale mohou mít esenciální funkci také v nenádorových buňkách. Jejich inhibice pak může způsobovat systémovou toxicitu a vyřazení z klinického použití. 2,6,9-trisubstituované puriny se vyznačují významnými CDK-inhibičními a antiproliferačními vlastnostmi, ale jejich potenciální klinická aplikace je limitována právě nízkou buněčnou selektivitou. Cílené zvýšení hladiny inhibitorů

v nádorových buňkách prostřednictvím selektivního transportu může představovat účinný způsob pro zlepšení efektivity léčby těmito proteinkinasovými inhibitory.

Tato skutečnost podnítila k vytvoření prvního konceptu folátového transportního systému založeného na konjugátech 2,6,9-trisubstituovaných purinů, jehož funkčnost byla ověřována v druhé části této dizertační práce. Tyto CDK inhibitory se vyznačují CDK2-inhibičními a antiproliferačními účinky (Gucký *et al.*, 2013) a jejich terminální amino skupina poskytuje vhodnou funkční skupinu pro konjugaci s folátem prostřednictvím disulfidového linkeru, která neblokuje interakci konjugátu s ATP-vazebným místem CDK. Konjugát **17d** byl na základě nejvyšších cytotoxických účinků vybrán pro podrobnější studie. Na základě *in vitro* simulace bylo ověřeno účinné uvolnění samotného inhibitoru ze struktury konjugátu působením redukčního prostředí. Cytometrickou analýzou byl potvrzen specifický transport konjugátu prostřednictvím FR do nádorových buněk a zachování jeho CDK2 inhibičních vlastností, které nejsou limitovány rychlostí uvolnění samotného inhibitoru v buňkách. Tento koncept tak naznačuje možnou cestu vývoje protinádorových léčiv s vyšší buněčnou selektivitou.

## 7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Albanese, C., Alzani, R., Amboldi, N., Avanzi, N., Ballinari, D., Brasca, M. G., Festuccia, C., Fiorentini, F., Locatelli, G., Pastori, W., Patton, V., Roletto, F., Colotta, F., Galvani, A., Isacchi, A., Moll, J., Pesenti, E., Mercurio, C., & Ciomei, M. (2010). Dual targeting of CDK and tropomyosin receptor kinase families by the oral inhibitor PHA-848125, an agent with broad-spectrum antitumor efficacy. *Molecular Cancer Therapeutics*, 9(8), 2243–2254.
- Albert, T. K., Rigault, C., Eickhoff, J., Baumgart, K., Antrecht, C., Klebl, B., Mittler, G., & Meisterernst, M. (2014). Characterization of molecular and cellular functions of the cyclin-dependent kinase CDK9 using a novel specific inhibitor. *British Journal of Pharmacology*, 171(1), 55–68.
- Alexander, L. T., Möbitz, H., Druce, P., Savitsky, P., Fedorov, O., Elkins, J. M., Deane, C. M., Cowan-Jacob, S. W., & Knapp, S. (2015). Type II Inhibitors Targeting CDK2. *ACS Chemical Biology*, 10(9), 2116–2125.
- Ali, S., Heathcote, D. A., Kroll, S. H. B., Jogalekar, A. S., Scheiper, B., Patel, H., Brackow, J., Siwicka, A., Fuchter, M. J., Periyasamy, M., Tolhurst, R. S., Kanneganti, S. K., Snyder, J. P., Liotta, D. C., Aboagye, E. O., Barrett, A. G. M., & Coombes, R. C. (2009). The development of a selective cyclin-dependent kinase inhibitor that shows antitumor activity. *Cancer Research*, 69(15), 6208–6215.
- Anastassiadis, T., Deacon, S. W., Devarajan, K., Ma, H., & Peterson, J. R. (2011). Comprehensive assay of kinase catalytic activity reveals features of kinase inhibitor selectivity. *Nature Biotechnology*, 29(11), 1039–1045.
- Andreani, A., Cavalli, A., Granaiola, M., Leoni, A., Locatelli, A., Morigi, R., Rambaldi, M., Recanatini, M., Garnier, M., & Meijer, L. (2000). Imidazo[2,1-b]thiazolylmethylene- and indolylmethylene-2-indolinones: A new class of cyclin-dependent kinase inhibitors. Design, synthesis, and CDK1/cyclin B inhibition. *Anti-Cancer Drug Design*, 15(6), 447–452.
- Antony, A. C. (1996). Folate receptors. *Annual Review of Nutrition*, 16, 501–521.
- Apperley, J. F., Gardembas, M., Melo, J. V., Russell-Jones, R., Bain, B. J., Baxter, E. J., Chase, A., Chessells, J. M., Colombat, M., Dearden, C. E., Dimitrijevic, S., Mahon, F.-X., Marin, D., Nikolova, Z., Olavarria, E., Silbermann, S., Schultheis, B., Cross, N. C. P., & Goldman, J. M. (2002). Response to Imatinib Mesylate in Patients with Chronic Myeloproliferative Diseases with Rearrangements of the Platelet-Derived Growth Factor Receptor Beta. *New England Journal of Medicine*, 347(7), 481–487.
- Arrowsmith, C. H., Audia, J. E., Austin, C., Baell, J., Bennett, J., Blagg, J., Bountra, C., Brennan, P. E., Brown, P. J., Bunnage, M. E., Buser-Doepner, C., Campbell, R. M., Carter, A. J., Cohen, P., Copeland, R. A., Cravatt, B., Dahlin, J. L., Dhanak, D., Edwards, A. M., ... Zuercher, W. J. (2015). The promise and peril of chemical probes. *Nature Chemical Biology*, 11(8), 536–541.
- Asghar, U., Witkiewicz, A. K., Turner, N. C., & Knudsen, E. S. (2015). The history and future of targeting cyclin-dependent kinases in cancer therapy. *Nature Reviews Drug Discovery*, 14(2), 130–146.
- Audetat, K. A., Galbraith, M. D., Odell, A. T., Lee, T., Pandey, A., Espinosa, J. M., Dowell, R. D., & Taatjes, D. J. (2017). A Kinase-Independent Role for Cyclin-Dependent Kinase 19 in p53 Response. *Molecular and Cellular Biology*, 37(13), e00626-16.
- Bajrami, I., Frankum, J. R., Konde, A., Miller, R. E., Rehman, F. L., Brough, R., Campbell, J., Sims, D., Rafiq, R., Hooper, S., Chen, L., Kozarewa, I., Assiotis, I., Fenwick, K., Natrajan, R., Lord, C. J., & Ashworth, A. (2014). Genome-wide profiling of genetic synthetic lethality identifies CDK12 as a novel determinant of PARP1/2 inhibitor sensitivity. *Cancer Research*, 74(1), 287–297.
- Ball, K. A., Webb, K. J., Coleman, S. J., Cozzolino, K. A., Jacobsen, J., Jones, K. R., Stowell, M. H. B., & Old, W. M. (2020). An isothermal shift assay for proteome scale drug-target identification. *Communications Biology*, 3(1), 75.
- Barlaam, B., Casella, R., Cidado, J., Cook, C., De Savi, C., Dishington, A., Donald, C. S., Drew, L., Ferguson, A. D., Ferguson, D., Glossop, S., Grebe, T., Gu, C., Hande, S., Hawkins, J., Hird, A. W., Holmes, J., Horstlick, J., Jiang, Y., ... Yao, T. (2020). Discovery of AZD4573, a Potent and Selective Inhibitor of CDK9 That Enables Short Duration of Target Engagement for the Treatment of Hematological Malignancies. *Journal of Medicinal Chemistry*, 63(24), 15564–15590.
- Barone, G., Staples, C. J., Ganesh, A., Patterson, K. W., Bryne, D. P., Myers, K. N., Patil, A. A., Evers, C. E., Maslen, S., Skehel, J. M., Evers, P. A., & Collis, S. J. (2016). Human CDK18 promotes replication stress signaling and genome stability. *Nucleic Acids Research*, 44(18), 8772–8785.

- Beaver, J. A., Amiri-Kordestani, L., Charlab, R., Chen, W., Palmby, T., Tilley, A., Zirkelbach, J. F., Yu, J., Liu, Q., Zhao, L., Crich, J., Chen, X. H., Hughes, M., Bloomquist, E., Tang, S., Sridhara, R., Kluetz, P. G., Kim, G., Ibrahim, A., ... Cortazar, P. (2015). FDA approval: Palbociclib for the treatment of postmenopausal patients with estrogen receptor-positive, HER2-negative metastatic breast cancer. *Clinical Cancer Research*, 21(21), 4760–4766.
- Bettayeb, K., Oumata, N., Echalié, A., Ferandin, Y., Endicott, J. A., Galons, H., & Meijer, L. (2008). CR8, a potent and selective, roscovitine-derived inhibitor of cyclin-dependent kinases. *Oncogene*, 27(44), 5797–5807.
- Bian, J., Ren, J., Li, Y., Wang, J., Xu, X., Feng, Y., Tang, H., Wang, Y., & Li, Z. (2018). Discovery of Wogonin-based PROTACs against CDK9 and capable of achieving antitumor activity. *Bioorganic Chemistry*, 81, 373–381.
- Bisi, J. E., Sorrentino, J. A., Roberts, P. J., Tavares, F. X., & Strum, J. C. (2016). Preclinical characterization of G1T28: A novel CDK4/6 inhibitor for reduction of chemotherapy-induced myelosuppression. *Molecular Cancer Therapeutics*, 15(5), 783–793.
- Bisi, J. E., Sorrentino, J. A., Jordan, J. L., Darr, D. D., Roberts, P. J., Tavares, F. X., & Strum, J. C. (2017). Preclinical development of G1T38: A novel, potent and selective inhibitor of cyclin dependent kinases 4/6 for use as an oral antineoplastic in patients with CDK4/6 sensitive tumors. *Oncotarget*, 8(26), 42343–42358.
- Blum, G., Ibáñez, G., Rao, X., Shum, D., Radu, C., Djaballah, H., Rice, J. C., & Luo, M. (2014). Small-molecule inhibitors of setd8 with cellular activity. *ACS Chemical Biology*, 9(11), 2471–2478.
- Bonelli, P., Tuccillo, F. M., Borrelli, A., Schiattarella, A., & Buonaguro, F. M. (2014). CDK/CCN and CDKI alterations for cancer prognosis and therapeutic predictivity. *BioMed Research International*, 2014, 361020.
- Borthakur, G. M., Donnellan, W. B., Solomon, S. R., Abboud, C., Nazha, A., Mazan, M., Mikula, M., Majewska, E., Wiklik, K., Golas, A., Järås, M., Chapellier, M., Polak, A., Bialas, A., Windak, R., Ostrowski, J., Juszczynski, P., Chrom, P., Rzymiski, T., & Brzózka, K. (2019). SEL120 - a First-in-Class CDK8/19 Inhibitor As a Novel Option for the Treatment of Acute Myeloid Leukemia and High-Risk Myelodysplastic Syndrome - Data from Preclinical Studies and Introduction to a Phase Ib Clinical Trial. *Blood*, 134(Supplement 1), 2651–2651.
- Bouhaddou, M., Memon, D., Meyer, B., White, K. M., Rezelj, V. V., Correa Marrero, M., Polacco, B. J., Melnyk, J. E., Ulferts, S., Kaake, R. M., Batra, J., Richards, A. L., Stevenson, E., Gordon, D. E., Rojic, A., Obernier, K., Fabius, J. M., Soucheray, M., Miorin, L., ... Krogan, N. J. (2020). The Global Phosphorylation Landscape of SARS-CoV-2 Infection. *Cell*, 182(3), 685-712.e19.
- Bozhenko, V. K., Kulinich, T. M., Kudinova, E. A., Boldyrev, A., & Solodkij, V. A. (2013). New targeted anti CDK4/6 peptide MM-D37K. *Journal of Clinical Oncology*, 31(Supplement 15), e13545–e13545.
- Brachwitz, K., Voigt, B., Meijer, L., Lozach, O., Schächtele, C., Molnár, J., & Hilgeroth, A. (2003). Evaluation of the first cytostatically active 1-aza-9-oxafluorenes as novel selective CDK1 inhibitors with P-glycoprotein modulating properties. *Journal of Medicinal Chemistry*, 46(5), 876–879.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254.
- Brand, M., Jiang, B., Bauer, S., Donovan, K. A., Liang, Y., Wang, E. S., Nowak, R. P., Yuan, J. C., Zhang, T., Kwiatkowski, N., Müller, A. C., Fischer, E. S., Gray, N. S., & Winter, G. E. (2019). Homolog-Selective Degradation as a Strategy to Probe the Function of CDK6 in AML. *Cell Chemical Biology*, 26(2), 300-306.e9.
- Brasca, M. G., Amboldi, N., Ballinari, D., Cameron, A., Casale, E., Cervi, G., Colombo, M., Colotta, F., Croci, V., D'Alessio, R., Fiorentini, F., Isacchi, A., Mercurio, C., Moretti, W., Panzeri, A., Pastori, W., Pevarello, P., Quartieri, F., Roletto, F., ... Ciomei, M. (2009). Identification of N,1,4,4-tetramethyl-8-[[4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl] amino]-4,5-dihydro-1H-pyrazolo[4,3-h]quinazoline-3-carboxamide (PHA-848125), a potent, orally available cyclin dependent kinase inhibitor. *Journal of Medicinal Chemistry*, 52(16), 5152–5163.
- Brooks, E. E., Gray, N. S., Joly, A., Kerwar, S. S., Lum, R., Mackman, R. L., Norman, T. C., Rosete, J., Rowe, M., Schow, S. R., Schultz, P. G., Wang, X., Wick, M. M., & Shiffman, D. (1997). CVT-313, a specific and potent inhibitor of CDK2 that prevents neointimal proliferation. *Journal of Biological Chemistry*, 272(46), 29207–29211.

- Bukanov, N. O., Smith, L. A., Klinger, K. W., Ledbetter, S. R., & Ibraghimov-Beskrovnaya, O. (2006). Long-lasting arrest of murine polycystic kidney disease with CDK inhibitor roscovitine. *Nature*, 444(7121), 949–952.
- Byrne, M., Frattini, M. G., Ottmann, O. G., Mantzaris, I., Wermke, M., Lee, D. J., Morillo, D., Scholz, A., Ince, S., Valencia, R., Souza, F., & Cordoba, R. (2018). Phase I Study of the PTEFb Inhibitor BAY 1251152 in Patients with Acute Myelogenous Leukemia. *Blood*, 132(Supplement 1), 4055–4055.
- Byth, K. F., Thomas, A., Hughes, G., Forder, C., McGregor, A., Geh, C., Oakes, S., Green, C., Walker, M., Newcombe, N., Green, S., Growcott, J., Barker, A., & Wilkinson, R. W. (2009). AZD5438, a potent oral inhibitor of cyclin-dependent kinases 1, 2, and 9, leads to pharmacodynamic changes and potent antitumor effects in human tumor xenografts. *Molecular Cancer Therapeutics*, 8(7), 1856–1866.
- Cao, L., Chen, F., Yang, X., Xu, W., Xie, J., & Yu, L. (2014). Phylogenetic analysis of CDK and cyclin proteins in premetazoan lineages. *BMC Evolutionary Biology*, 14(1), 10.
- Capdeville, R., Buchdunger, E., Zimmermann, J., & Matter, A. (2002). Glivec (ST1571, imatinib), a rationally developed, targeted anticancer drug. *Nature Reviews Drug Discovery*, 1(7), 493–502.
- Cee, V. J., Chen, D. Y. K., Lee, M. R., & Nicolaou, K. C. (2009). Cortistatin A is a high-affinity ligand of protein kinases ROCK, CDK8, and CDK11. *Angewandte Chemie - International Edition*, 48(47), 8952–8957.
- Cha, Y., Erez, T., Reynolds, I. J., Kumar, D., Ross, J., Koytiger, G., Kusko, R., Zeskind, B., Risso, S., Kagan, E., Papapetropoulos, S., Grossman, I., & Laifenfeld, D. (2018). Drug repurposing from the perspective of pharmaceutical companies. *British Journal of Pharmacology*, 175(2), 168–180.
- Chaudhari, R., Tan, Z., Huang, B., & Zhang, S. (2017). Computational polypharmacology: a new paradigm for drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 12(3), 279–291.
- Chen, H. H., Wang, Y. C., & Fann, M. J. (2006a). Identification and Characterization of the CDK12/Cyclin L1 Complex Involved in Alternative Splicing Regulation. *Molecular and Cellular Biology*, 26(7), 2736–2745.
- Chen, S., Xu, Y., Yuan, X., Bubley, G. J., & Balk, S. P. (2006b). Androgen receptor phosphorylation and stabilization in prostate cancer by cyclin-dependent kinase 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(43), 15969–15974.
- Chen, S., Bohrer, L. R., Rai, A. N., Pan, Y., Gan, L., Zhou, X., Bagchi, A., Simon, J. A., & Huang, H. (2010). Cyclin-dependent kinases regulate epigenetic gene silencing through phosphorylation of EZH2. *Nature Cell Biology*, 12(11), 1108–1114.
- Chen, S., Gulla, S., Cai, C., & Balk, S. P. (2012). Androgen receptor serine 81 phosphorylation mediates chromatin binding and transcriptional activation. *Journal of Biological Chemistry*, 287(11), 8571–8583.
- Chen, P., Lee, N. V., Hu, W., Xu, M., Ferre, R. A., Lam, H., Bergqvist, S., Solowiej, J., Diehl, W., He, Y. A., Yu, X., Nagata, A., Vanarsdale, T., & Murray, B. W. (2016). Spectrum and degree of CDK drug interactions predicts clinical performance. *Molecular Cancer Therapeutics*, 15(10), 2273–2281.
- Chen, M., Li, J., Liang, J., Thompson, Z. S., Kathrein, K., Broude, E. V., & Roninson, I. B. (2019). Systemic Toxicity Reported for CDK8/19 Inhibitors CCT251921 and MSC2530818 Is Not Due to Target Inhibition. *Cells*, 8(11), 1413.
- Chen, X., Wang, Y., Ma, N., Tian, J., Shao, Y., Zhu, B., Wong, Y. K., Liang, Z., Zou, C., & Wang, J. (2020). Target identification of natural medicine with chemical proteomics approach: probe synthesis, target fishing and protein identification. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1), 72.
- Choi, Y. J., Kim, D. H., Yoon, D. H., Suh, C., Choi, C. M., Lee, J. C., Hong, J. Y., & Rho, J. K. (2019). Efficacy of the novel CDK7 inhibitor QS1189 in mantle cell lymphoma. *Scientific Reports*, 9(1), 7193.
- Churcher, I. (2018). Protac-Induced Protein Degradation in Drug Discovery: Breaking the Rules or Just Making New Ones? *Journal of Medicinal Chemistry*, 61(2), 444–452.
- Cidado, J., Boiko, S., Proia, T., Ferguson, D., Criscione, S. W., Martin, M. S., Pop-Damkov, P., Su, N., Franklin, V. N. R., Chilamakuri, C. S. R., D'Santos, C. S., Shao, W., Saeh, J. C., Koch, R., Weinstock, D. M., Zinda, M., Fawell, S. E., & Drew, L. (2020). AZD4573 is a highly selective CDK9 inhibitor that suppresses Mcl-1 and induces apoptosis in hematologic cancer cells. *Clinical Cancer Research*, 26(4), 922–934.
- Clare, P. M., Poorman, R. A., Kelley, L. C., Watenpaugh, K. D., Bannow, C. A., & Leach, K. L. (2001). The Cyclin-dependent Kinases cdk2 and cdk5 Act by a Random, Anticooperative Kinetic Mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 276(51), 48292–48299.

- Clarke, P. A., Ortiz-Ruiz, M. J., TePoele, R., Adeniji-Popoola, O., Box, G., Court, W., Czasch, S., El Bawab, S., Esdar, C., Ewan, K., Gowan, S., De Haven Brandon, A., Hewitt, P., Hobbs, S. M., Kaufmann, W., Mallinger, A., Raynaud, F., Roc, T., Rohdich, F., ... Wienke, D. (2016). Assessing the mechanism and therapeutic potential of modulators of the human Mediator complex-associated protein kinases. *ELife*, 5, e20722.
- Cohen, M. H., Williams, G., Johnson, J. R., Duan, J., Gobburu, J., Rahman, A., Benson, K., Leighton, J., Kim, S. K., Wood, R., Rothmann, M., Chen, G., Maung U, K., Staten, A. M., & Pazdur, R. (2002). Approval summary for imatinib mesylate capsules in the treatment of chronic Myelogenous Leukemia. *Clinical Cancer Research*, 8(5), 935–942.
- Compe, E., & Egly, J. M. (2012). TFIIF: When transcription met DNA repair. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(6), 343–354.
- Cousins, E. M., Goldfarb, D., Yan, F., Roques, J., Darr, D., Johnson, G. L., & Major, M. B. (2018). Competitive Kinase Enrichment Proteomics Reveals that Abemaciclib Inhibits GSK3b and Activates WNT Signaling. *Molecular Cancer Research*, 16(2), 333–344.
- Coxon, C. R., Anscombe, E., Harnor, S. J., Martin, M. P., Carbain, B., Golding, B. T., Hardcastle, I. R., Harlow, L. K., Korolchuk, S., Matheson, C. J., Newell, D. R., Noble, M. E. M., Sivaprakasam, M., Tudhope, S. J., Turner, D. M., Wang, L. Z., Wedge, S. R., Wong, C., Griffin, R. J., ... Cano, C. (2017). Cyclin-Dependent Kinase (CDK) Inhibitors: Structure-Activity Relationships and Insights into the CDK-2 Selectivity of 6-Substituted 2-Arylamino-purines. *Journal of Medicinal Chemistry*, 60(5), 1746–1767.
- Czodrowski, P., Mallinger, A., Wienke, D., Esdar, C., Pöschke, O., Busch, M., Rohdich, F., Eccles, S. A., Ortiz-Ruiz, M. J., Schneider, R., Raynaud, F. I., Clarke, P. A., Musil, D., Schwarz, D., Dale, T., Urbahns, K., Blagg, J., & Schiemann, K. (2016). Structure-Based Optimization of Potent, Selective, and Orally Bioavailable CDK8 Inhibitors Discovered by High-Throughput Screening. *Journal of Medicinal Chemistry*, 59(20), 9337–9349.
- Dagher, R., Cohen, M., Williams, G., Rothmann, M., Gobburu, J., Robbie, G., Rahman, A., Chen, G., Staten, A., Griebel, D., & Pazdur, R. (2002). Approval summary: Imatinib mesylate in the treatment of metastatic and/or unresectable malignant gastrointestinal stromal tumors. *Clinical Cancer Research*, 8(10), 3034–3038.
- Dale, T., Clarke, P. A., Esdar, C., Waalboer, D., Adeniji-Popoola, O., Ortiz-Ruiz, M. J., Mallinger, A., Samant, R. S., Czodrowski, P., Musil, D., Schwarz, D., Schneider, K., Stubbs, M., Ewan, K., Fraser, E., TePoele, R., Court, W., Box, G., Valenti, M., ... Blagg, J. (2015). A selective chemical probe for exploring the role of CDK8 and CDK19 in human disease. *Nature Chemical Biology*, 11(12), 973–980.
- Daval, M., Gurlo, T., Costes, S., Huang, C. J., & Butler, P. C. (2011). Cyclin-dependent kinase 5 promotes pancreatic  $\beta$ -cell survival via Fak-Akt signaling pathways. *Diabetes*, 60(4), 1186–1197.
- Davidson, G., & Niehrs, C. (2010). Emerging links between CDK cell cycle regulators and Wnt signaling. *Trends in Cell Biology*, 20(8), 453–460.
- Davies, T. G., Bentley, J., Arris, C. E., Boyle, F. T., Curtin, N. J., Endicott, J. A., Gibson, A. E., Golding, B. T., Griffin, R. J., Hardcastle, I. R., Jewsbury, P., Johnson, L. N., Mesguiche, V., Newell, D. R., Noble, M. E. M., Tucker, J. A., Wang, L., & Whitfield, H. J. (2002). Structure-based design of a potent purine-based cyclin-dependent kinase inhibitor. *Nature Structural Biology*, 9(10), 745–749.
- Davis, S. T., Benson, B. G., Bramson, H. N., Chapman, D. E., Dickerson, S. H., Dold, K. M., Eberwein, D. J., Edelstein, M., Frye, S. V., Gampe, J., Griffin, R. J., Harris, P. A., Hassell, A. M., Holmes, W. D., Hunter, R. N., Knick, V. B., Lackey, K., Lovejoy, B., Luzzio, M. J., ... Kuyper, L. F. (2001). Prevention of chemotherapy-induced alopecia in rats by CDK inhibitors. *Science*, 291(5501), 134–137.
- DePinto, W., Chu, X. J., Smith, M., Packman, K., Goelzer, P., Lovey, A., Chen, Y., Qian, H., Hamid, R., Xiang, Q., Tovar, C., Blain, R., Nevins, T., Higgins, B., Luistro, L., Kolinsky, K., Felix, B., Hussain, S., & Heimbrook, D. (2006). In vitro and in vivo activity of R547: A potent selective cyclin-dependent kinase inhibitor currently in phase I clinical trials. *Molecular Cancer Therapeutics*, 5(11), 2644–2658.
- Dickler, M. N., Tolaney, S. M., Rugo, H. S., Cortes, J., Dieras, V., Patt, D., Wildiers, H., Hudis, C. A., O'Shaughnessy, J., Zamora, E., Yardley, D. A., Frenzel, M., Koustenis, A., & Baselga, J. (2017). MONARCH 1, a phase II study of abemaciclib, a CDK4 and CDK6 inhibitor, as a single agent, in patients with refractory HR+/HER2- metastatic breast cancer. *Clinical Cancer Research*, 23(17), 5218–5224.



- Divakar, S. K. A., Ramana Reddy, M. V., Cosenza, S. C., Baker, S. J., Perumal, D., Antonelli, A. C., Brody, J., Akula, B., Parekh, S., & Premkumar Reddy, E. (2016). Dual inhibition of CDK4/Rb and PI3K/AKT/mTOR pathways by ON123300 induces synthetic lethality in mantle cell lymphomas. *Leukemia*, 30(1), 86–93.
- Donner, A. J., Szostek, S., Hoover, J. M., & Espinosa, J. M. (2007). CDK8 Is a Stimulus-Specific Positive Coregulator of p53 Target Genes. *Molecular Cell*, 27(1), 121–133.
- Donner, A. J., Ebmeier, C. C., Taatjes, D. J., & Espinosa, J. M. (2010). CDK8 is a positive regulator of transcriptional elongation within the serum response network. *Nature Structural and Molecular Biology*, 17(2), 194–201.
- Dosio, F., Milla, P., & Cattel, L. (2010). EC-145, a folate-targeted Vinca alkaloid conjugate for the potential treatment of folate receptor-expressing cancers. *Current Opinion in Investigational Drugs*, 11(12), 1424–1433.
- Echalier, A., Endicott, J. A., & Noble, M. E. M. (2010). Recent developments in cyclin-dependent kinase biochemical and structural studies. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1804(3), 511–519.
- Echalier, A., Cot, E., Camasses, A., Hodimont, E., Hoh, F., Jay, P., Sheinerman, F., Krasinska, L., & Fisher, D. (2012). An integrated chemical biology approach provides insight into Cdk2 functional redundancy and inhibitor sensitivity. *Chemistry and Biology*, 19(8), 1028–1040.
- Echalier, A., Hole, A. J., Lolli, G., Endicott, J. A., & Noble, M. E. M. (2014). An inhibitor's-eye view of the ATP-binding site of CDKs in different regulatory states. *ACS Chemical Biology*, 9(6), 1251–1256.
- Eswaran, J., Lee, W. H., Debreczeni, J. E., Filippakopoulos, P., Turnbull, A., Fedorov, O., Deacon, S. W., Peterson, J. R., & Knapp, S. (2007). Crystal Structures of the p21-Activated Kinases PAK4, PAK5, and PAK6 Reveal Catalytic Domain Plasticity of Active Group II PAKs. *Structure*, 15(2), 201–213.
- Fedorov, O., Marsden, B., Pogacic, V., Rellos, P., Müller, S., Bullock, A. N., Schwaller, J., Sundström, M., & Knapp, S. (2007). A systematic interaction map of validated kinase inhibitors with Ser/Thr kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(51), 20523–20528.
- Ferguson, F. M., & Gray, N. S. (2018). Kinase inhibitors: The road ahead. *Nature Reviews Drug Discovery*, 17(5), 353–376.
- Ferguson, F. M., Doctor, Z. M., Ficarro, S. B., Browne, C. M., Marto, J. A., Johnson, J. L., Yaron, T. M., Cantley, L. C., Kim, N. D., Sim, T., Berberich, M. J., Kalocsay, M., Sorger, P. K., & Gray, N. S. (2019). Discovery of Covalent CDK14 Inhibitors with Pan-TAIRE Family Specificity. *Cell Chemical Biology*, 26(6), 804–817.e12.
- Firestein, R., Bass, A. J., Kim, S. Y., Dunn, I. F., Silver, S. J., Guney, I., Freed, E., Ligon, A. H., Vena, N., Ogino, S., Chheda, M. G., Tamayo, P., Finn, S., Shrestha, Y., Boehm, J. S., Jain, S., Bojarski, E., Mermel, C., Barretina, J., ... Hahn, W. C. (2008). CDK8 is a colorectal cancer oncogene that regulates  $\beta$ -catenin activity. *Nature*, 455(7212), 547–551.
- Force, T., Krause, D. S., & Van Etten, R. A. (2007). Molecular mechanisms of cardiotoxicity of tyrosine kinase inhibition. *Nature Reviews Cancer*, 7(5), 332–344.
- Fox, S., Leitch, A. E., Duffin, R., Haslett, C., & Rossi, A. G. (2010). Neutrophil apoptosis: Relevance to the innate immune response and inflammatory disease. *Journal of Innate Immunity*, 2(3), 216–227.
- Fry, D. W., Harvey, P. J., Keller, P. R., Elliott, W. L., Meade, M. A., Trachet, E., Albassam, M., Zheng, X. X., Leopold, W. R., Pryer, N. K., & Toogood, P. L. (2004). Specific inhibition of cyclin-dependent kinase 4/6 by PD 0332991 and associated antitumor activity in human tumor xenografts. *Molecular Cancer Therapeutics*, 3(11), 1427–1437.
- Frye, S. V. (2010). The art of the chemical probe. *Nature Chemical Biology*, 6(3), 159–161.
- Fujimoto, T., Anderson, K., Jacobsen, S. E. W., Nishikawa, S. I., & Nerlov, C. (2007). Cdk6 blocks myeloid differentiation by interfering with Runx1 DNA binding and Runx1-C/EBP $\alpha$  interaction. *EMBO Journal*, 26(9), 2361–2370.
- Gajdušková, P., Ruiz de los Mozos, I., Rájecký, M., Hluchý, M., Ule, J., & Blažek, D. (2020). CDK11 is required for transcription of replication-dependent histone genes. *Nature Structural and Molecular Biology*, 27(5), 500–510.
- Gao, Y., Davies, S. P., Augustin, M., Woodward, A., Patel, U. A., Kovelman, R., & Harvey, K. J. (2013). A broad activity screen in support of a chemogenomic map for kinase signalling research and drug discovery. *Biochemical Journal*, 451(2), 313–328.

- Gao, Y., Zhang, T., Terai, H., Ficarro, S. B., Kwiatkowski, N., Hao, M. F., Sharma, B., Christensen, C. L., Chipumuro, E., Wong, K. kin, Marto, J. A., Hammerman, P. S., Gray, N. S., & George, R. E. (2018). Overcoming Resistance to the THZ Series of Covalent Transcriptional CDK Inhibitors. *Cell Chemical Biology*, 25(2), 135-142.e5.
- Gelbert, L. M., Cai, S., Lin, X., Sánchez-Martínez, C., Prado, M. Del, Lallena, M. J., Torres, R., Ajamie, R. T., Wishart, G. N., Flack, R. S., Neubauer, B. L., Young, J., Chan, E. M., Iversen, P., Cronier, D., Kreklau, E., & De Dios, A. (2014). Preclinical characterization of the CDK4/6 inhibitor LY2835219: In-vivo cell cycle-dependent/independent anti-tumor activities alone/in combination with gemcitabine. *Investigational New Drugs*, 32(5), 825-837.
- Gonen, N., & Assaraf, Y. G. (2012). Antifolates in cancer therapy: Structure, activity and mechanisms of drug resistance. *Drug Resistance Updates*, 15(4), 183-210.
- Greifenberg, A. K., Hönig, D., Pilarova, K., Düster, R., Bartholomeeusen, K., Böskén, C. A., Anand, K., Blazek, D., & Geyer, M. (2016). Structural and Functional Analysis of the Cdk13/Cyclin K Complex. *Cell Reports*, 14(2), 320-331.
- Gucký, T., Jorda, R., Zatloukal, M., Bazgier, V., Berka, K., Řezníčková, E., Béres, T., Strnad, M., & Kryštof, V. (2013). A novel series of highly potent 2,6,9-trisubstituted purine cyclin-dependent kinase inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 56(15), 6234-6247.
- Guen, V. J., Gamble, C., Lees, J. A., & Colas, P. (2017). The awakening of the CDK10/Cyclin M protein kinase. *Oncotarget*, 8(30), 50174-50186.
- Hacker, S. M., Backus, K. M., Lazear, M. R., Forli, S., Correia, B. E., & Cravatt, B. F. (2017). Global profiling of lysine reactivity and ligandability in the human proteome. *Nature Chemistry*, 9(12), 1181-1190.
- Hafner, M., Mills, C. E., Subramanian, K., Chen, C., Chung, M., Boswell, S. A., Everley, R. A., Liu, C., Walmsley, C. S., Juric, D., & Sorger, P. K. (2019). Multiomics Profiling Establishes the Polypharmacology of FDA-Approved CDK4/6 Inhibitors and the Potential for Differential Clinical Activity. *Cell Chemical Biology*, 26(8), 1067-1080.e8.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646-674.
- Hanna, N., Juhász, E., Cainap, C., Gladkov, O., Ramlau, R., Juan-Vidal, O., Lal, R., Symanowski, J., Perez, W., Nguyen, B., & Harb, W. (2014). Target: a Randomized, Phase Ii Trial Comparing Vintafolide Versus Vintafolide Plus Docetaxel, Versus Docetaxel Alone in Second-Line Treatment of Folate-Receptor-Positive Non-Small Cell Lung Cancer (NscLc) Patients. *Annals of Oncology*, 25(Supplement 4), v1.
- Hardcastle, I. R., Arris, C. E., Bentley, J., Boyle, F. T., Chen, Y., Curtin, N. J., Endicott, J. A., Gibson, A. E., Golding, B. T., Griffin, R. J., Jewsbury, P., Menyerol, J., Mesguiche, V., Newell, D. R., Noble, M. E. M., Pratt, D. J., Wang, L. Z., & Whitfield, H. J. (2004). N2-substituted O6-cyclohexylmethylguanidine derivatives: Potent inhibitors of cyclin-dependent kinases 1 and 2. *Journal of Medicinal Chemistry*, 47(15), 3710-3722.
- Hartmann, J., Haap, M., Kopp, H.-G., & Lipp, H.-P. (2009). Tyrosine Kinase Inhibitors – A Review on Pharmacology, Metabolism and Side Effects. *Current Drug Metabolism*, 10(5), 470-481.
- Hatcher, J. M., Wang, E. S., Johannessen, L., Kwiatkowski, N., Sim, T., & Gray, N. S. (2018). Development of Highly Potent and Selective Steroidal Inhibitors and Degraders of CDK8. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 9(6), 540-545.
- Havlíček, L., Hanuš, J., Veselý, J., Leclerc, S., Meijer, L., Shaw, G., & Strnad, M. (1997). Cytokinin-derived cyclin-dependent kinase inhibitors: Synthesis and cdc2 inhibitory activity of olomoucine and related compounds. *Journal of Medicinal Chemistry*, 40(4), 408-412.
- Hazel, P., Kroll, S. H. B., Bondke, A., Barbazanges, M., Patel, H., Fuchter, M. J., Coombes, R. C., Ali, S., Barrett, A. G. M., & Freemont, P. S. (2017). Inhibitor selectivity for cyclin-dependent kinase 7: A structural, thermodynamic, and modelling study. *ChemMedChem*, 12(5), 372-380.
- Helal, C. J., Sanner, M. A., Cooper, C. B., Gant, T., Adam, M., Lucas, J. C., Kang, Z., Kupchinsky, S., Ahljanian, M. K., Tate, B., Menniti, F. S., Kelly, K., & Peterson, M. (2004). Discovery and SAR of 2-aminothiazole inhibitors of cyclin-dependent kinase 5/p25 as a potential treatment for Alzheimer's disease. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 14(22), 5521-5525.
- Hendrychová, D., Jorda, R., & Kryštof, V. (2021). How selective are clinical CDK4/6 inhibitors? *Medicinal Research Reviews*, 41(3), 1578-1598.
- Heptinstall, A. B., Adiyasa, I., Cano, C., & Hardcastle, I. R. (2018). Recent advances in CDK inhibitors for cancer therapy. *Future Medicinal Chemistry*, 10(11), 1369-1388.

- Hirose, T., Kawabuchi, M., Tamaru, T., Okumura, N., Nagai, K., & Okada, M. (2000). Identification of tudor repeat associator with PCTAIRE 2 (Trap). A novel protein that interacts with the N-terminal domain of PCTAIRE 2 in rat brain. *European Journal of Biochemistry*, 267(7), 2113–2121.
- Hu, D., Mayeda, A., Trembley, J. H., Lahti, J. M., & Kidd, V. J. (2003). CDK11 complexes promote pre-mRNA splicing. *Journal of Biological Chemistry*, 278(10), 8623–8629.
- Hu, S., Marineau, J. J., Rajagopal, N., Hamman, K. B., Choi, Y. J., Schmidt, D. R., Ke, N., Johannessen, L., Bradley, M. J., Orlando, D. A., Alnemy, S. R., Ren, Y., Ciblat, S., Winter, D. K., Kabro, A., Sprott, K. T., Hodgson, J. G., Fritz, C. C., Carulli, J. P., ... Olson, E. R. (2019). Discovery and characterization of SY-1365, a selective, covalent inhibitor of CDK7. *Cancer Research*, 79(13), 3479–3491.
- Hughes, S. J., & Ciulli, A. (2017). Molecular recognition of ternary complexes: A new dimension in the structure-guided design of chemical degraders. *Essays in Biochemistry*, 61(5), 505–516.
- Hutterer, C., Eickhoff, J., Milbradt, J., Korn, K., Zeiträger, I., Bahsi, H., Wagner, S., Zischinsky, G., Wolf, A., Degenhart, C., Unger, A., Baumann, M., Klebl, B., & Marschall, M. (2015). A novel CDK7 inhibitor of the pyrazolotriazine class exerts broad-spectrum antiviral activity at nanomolar concentrations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(4), 2062–2071.
- Hydbring, P., Malumbres, M., & Sicinski, P. (2016). Non-canonical functions of cell cycle cyclins and cyclin-dependent kinases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 17(5), 280–292.
- Imbach, P., Capraro, H. G., Furet, P., Mett, H., Meyer, T., & Zimmermann, J. (1999). 2,6,9-Trisubstituted purines: Optimization towards highly potent and selective CDK1 inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 9(1), 91–96.
- Jafari, R., Almqvist, H., Axelsson, H., Ignatushchenko, M., Lundbäck, T., Nordlund, P., & Molina, D. M. (2014). The cellular thermal shift assay for evaluating drug target interactions in cells. *Nature Protocols*, 9(9), 2100–2122.
- Jiang, B., Wang, E. S., Donovan, K. A., Liang, Y., Fischer, E. S., Zhang, T., & Gray, N. S. (2019). Development of Dual and Selective Degradors of Cyclin-Dependent Kinases 4 and 6. *Angewandte Chemie - International Edition*, 58(19), 6321–6326.
- Johannessen, L., Sundberg, T. B., O'Connell, D. J., Kolde, R., Berstler, J., Billings, K. J., Khor, B., Seashore-Ludlow, B., Fassl, A., Russell, C. N., Latorre, I. J., Jiang, B., Graham, D. B., Perez, J. R., Sicinski, P., Phillips, A. J., Schreiber, S. L., Gray, N. S., Shamji, A. F., & Xavier, R. J. (2017). Small-molecule studies identify CDK8 as a regulator of IL-10 in myeloid cells. *Nature Chemical Biology*, 13(10), 1102–1108.
- Jorda, R., Schütznerová, E., Cankař, P., Brychtová, V., Navrátilová, J., & Kryštof, V. (2015). Novel arylazopyrazole inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 23(9), 1975–1981.
- Jorda, R., Bučková, Z., Řezníčková, E., Bouchal, J., & Kryštof, V. (2018a). Selective inhibition reveals cyclin-dependent kinase 2 as another kinase that phosphorylates the androgen receptor at serine 81. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1865(2), 354–363.
- Jorda, R., Hendrychová, D., Voller, J., Řezníčková, E., Gucký, T., & Kryštof, V. (2018b). How Selective Are Pharmacological Inhibitors of Cell-Cycle-Regulating Cyclin-Dependent Kinases? *Journal of Medicinal Chemistry*, 61(20), 9105–9120.
- Kabadi, S. V., Stoica, B. A., Loane, D. J., Luo, T., & Faden, A. I. (2014). CR8, a novel inhibitor of CDK, limits microglial activation, astrocytosis, neuronal loss, and neurologic dysfunction after experimental traumatic brain injury. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 34(3), 502–513.
- Kane, M. A., Elwood, P. C., Portillo, R. M., Antony, A. C., Najfeld, V., Finley, A., Waxman, S., & Kolhouse, J. F. (1988). Influence on immunoreactive folate-binding proteins of extracellular folate concentration in cultured human cells. *The Journal of Clinical Investigation*, 81(5), 1398–1406.
- Katchanov, J., Harms, C., Gertz, K., Hauck, L., Waeber, C., Hirt, L., Priller, J., Von Harsdorf, R., Brück, W., Hörtnagl, H., Dirnagl, U., Bhide, P. G., & Endres, M. (2001). Mild cerebral ischemia induces loss of cyclin-dependent kinase inhibitors and activation of cell cycle machinery before delayed neuronal cell death. *Journal of Neuroscience*, 21(14), 5045–5053.
- Kaur, G., Stetler-stevenson, M., Sebers, S., Worland, P., Sedlacek, H., Myers, C., Czech, J., Naik, R., & Sausville, E. (1992). Growth inhibition with reversible cell cycle arrest of carcinoma cells by flavone 186-8275. *Journal of the National Cancer Institute*, 84(22), 1736–1740.

- Kelso, T. W. R., Baumgart, K., Eickhoff, J., Albert, T., Antrecht, C., Lemcke, S., Klebl, B., & Meisterernst, M. (2014). Cyclin-Dependent Kinase 7 Controls mRNA Synthesis by Affecting Stability of Preinitiation Complexes, Leading to Altered Gene Expression, Cell Cycle Progression, and Survival of Tumor Cells. *Molecular and Cellular Biology*, 34(19), 3675–3688.
- Kim, E. S. (2017). Abemaciclib: First Global Approval. *Drugs*, 77(18), 2063–2070.
- Kim, S., Tiedt, R., Loo, A., Horn, T., Delach, S., Kovats, S., Haas, K., Engstler, B. S., Cao, A., Pinzon-Ortiz, M., Mulford, I., Acker, M. G., Chopra, R., Brain, C., Tomaso, E. di, Sellers, W. R., & Caponigro, G. (2020). Correction: The potent and selective cyclin-dependent kinases 4 and 6 inhibitor ribociclib (LEE011) is a versatile combination partner in preclinical cancer models. *Oncotarget*, 11(14), 1289–1289.
- Kirubakaran, P., Morton, G., Zhang, P., Zhang, H., Gordon, J., Abou-Gharbia, M., Issa, J. P. J., Wu, J., Childers, W., & Karanicolos, J. (2020). Explore selectivity and structure-activity relationships. *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2020.06.08.138602>
- Klaeger, S., Heinzlmeir, S., Wilhelm, M., Polzer, H., Vick, B., Koenig, P. A., Reinecke, M., Ruprecht, B., Petzoldt, S., Meng, C., Zecha, J., Reiter, K., Qiao, H., Helm, D., Koch, H., Schoof, M., Canevari, G., Casale, E., Re Depaolini, S., ... Kuster, B. (2017). The target landscape of clinical kinase drugs. *Science*, 358(6367), eaan4368.
- Klein, M. E., Kovatcheva, M., Davis, L. E., Tap, W. D., & Koff, A. (2018). CDK4/6 Inhibitors: The Mechanism of Action May Not Be as Simple as Once Thought. *Cancer Cell*, 34(1), 9–20.
- Knapp, S., Arruda, P., Blagg, J., Burley, S., Drewry, D. H., Edwards, A., Fabbro, D., Gillespie, P., Gray, N. S., Kuster, B., Lackey, K. E., Mazzafera, P., Tomkinson, N. C. O., Willson, T. M., Workman, P., & Zuercher, W. J. (2013). A public-private partnership to unlock the untargeted kinome. *Nature Chemical Biology*, 9(1), 3–7.
- Knudsen, E. S., & Witkiewicz, A. K. (2017). The Strange Case of CDK4/6 Inhibitors: Mechanisms, Resistance, and Combination Strategies. *Trends in Cancer*, 3(1), 39–55.
- Kok, R., Temming, K., & Fretz, M. (2010). Organ- and Cell-Type Specific Delivery of Kinase Inhibitors: A Novel Approach in the Development of Targeted Drugs. *Current Molecular Pharmacology*, 1(1), 1–12.
- Kollmann, K., Heller, G., Schneckenleithner, C., Warsch, W., Scheicher, R., Ott, R. G., Schäfer, M., Fajmann, S., Schleder, M., Schiefer, A. I., Reichart, U., Mayerhofer, M., Hoeller, C., Zöchbauer-Müller, S., Kerjaschki, D., Bock, C., Kenner, L., Hoefler, G., Freissmuth, M., ... Sexl, V. (2013). A kinase-independent function of CDK6 links the cell cycle to tumor angiogenesis. *Cancer Cell*, 24(2), 167–181.
- Krajčovičová, S., Gucký, T., Hendrychová, D., Kryštof, V., & Sural, M. (2017). A Stepwise Approach for the Synthesis of Folic Acid Conjugates with Protein Kinase Inhibitors. *Journal of Organic Chemistry*, 82(24), 13530–13541.
- Krajčovičová, S., Jorda, R., Hendrychová, D., Kryštof, V., & Sural, M. (2019). Solid-phase synthesis for thalidomide-based proteolysis-targeting chimeras (PROTAC). *Chemical Communications*, 55(7), 929–932.
- Krajewska, M., Dries, R., Grassetti, A. V., Dust, S., Gao, Y., Huang, H., Sharma, B., Day, D. S., Kwiatkowski, N., Pomaville, M., Dodd, O., Chipumuro, E., Zhang, T., Greenleaf, A. L., Yuan, G. C., Gray, N. S., Young, R. A., Geyer, M., Gerber, S. A., & George, R. E. (2019). CDK12 loss in cancer cells affects DNA damage response genes through premature cleavage and polyadenylation. *Nature Communications*, 10(1), 1757.
- Krasinska, L., Cot, E., & Fisher, D. (2008). Selective chemical inhibition as a tool to study Cdk1 and Cdk2 functions in the cell cycle. *Cell Cycle*, 7(12), 1702–1708.
- Kryštof, V., Cankař, P., Fryšová, I., Slouka, J., Kontopidis, G., Džubák, P., Hajdúch, M., Srovnal, J., De Azevedo, W. F., Orság, M., Paprskářová, M., Rolčík, J., Látr, A., Fischer, P. M., & Strnad, M. (2006). 4-Arylazo-3,5-diamino-1H-pyrazole CDK inhibitors: SAR study, crystal structure in complex with CDK2, selectivity, and cellular effects. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49(22), 6500–6509.
- Kryštof, V., Rárová, L., Liebl, J., Zahler, S., Jorda, R., Voller, J., & Cankař, P. (2011). The selective P-TEFb inhibitor CAN508 targets angiogenesis. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 46(9), 4289–4294.
- Kubo, A., Nakagawa, K., Varma, R. K., Conrad, N. K., Cheng, J. Q., Lee, W. C., Testa, J. R., Johnson, B. E., Kaye, F. J., & Kelley, M. J. (1999). The p16 status of tumor cell lines identifies small molecule inhibitors specific for cyclin-dependent kinase 4. *Clinical Cancer Research*, 5(12), 4279–4286.
- Kuhn, E., Bahadiri-Talbot, A., & Shih, I. M. (2014). Frequent CCNE1 amplification in endometrial intraepithelial carcinoma and uterine serous carcinoma. *Modern Pathology*, 27(7), 1014–1019.

- Kwiatkowski, N., Zhang, T., Rahl, P. B., Abraham, B. J., Reddy, J., Ficarro, S. B., Dastur, A., Amzallag, A., Ramaswamy, S., Tesar, B., Jenkins, C. E., Hannett, N. M., McMillin, D., Sanda, T., Sim, T., Kim, N. D., Look, T., Mitsiades, C. S., Weng, A. P., ... Gray, N. S. (2014). Targeting transcription regulation in cancer with a covalent CDK7 inhibitor. *Nature*, 511(7511), 616–620.
- Laderian, B., & Fojo, T. (2017). CDK4/6 Inhibition as a therapeutic strategy in breast cancer: palbociclib, ribociclib, and abemaciclib. *Seminars in Oncology*, 44(6), 395–403.
- Ladino, C. A., Chari, R. V. J., Bourret, L. A., Kedersha, N. L., & Goldmacher, V. S. (1997). Folate-maytansinoids: Target-selective drugs of low molecular weight. *International Journal of Cancer*, 73(6), 859–864.
- Lane, M. E., Yu, B., Pestell, R. G., Wadler, S., Rice, A., Lipson, K. E., Liang, C., Sun, L., Tang, C., & McMahon, G. (2001). A novel cdk2-selective inhibitor, SU9516, induces apoptosis in colon carcinoma cells. *Cancer Research*, 61(16), 6170–6177.
- Leamon, C. P., & Reddy, J. A. (2004). Folate-targeted chemotherapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56(8), 1127–1141.
- Leamon, C. P., Reddy, J. A., Vetzal, M., Dorton, R., Westrick, E., Parker, N., Wang, Y., & Vlahov, I. (2008). Folate targeting enables durable and specific antitumor responses from a therapeutically null tubulysin B analogue. *Cancer Research*, 68(23), 9839–9844.
- Ledermann, J. A., Canevari, S., & Thigpen, T. (2015). Targeting the folate receptor: Diagnostic and therapeutic approaches to personalize cancer treatments. *Annals of Oncology*, 26(10), 2034–2043.
- Liebl, J., Weitensteiner, S. B., Vereb, G., Takács, L., Fürst, R., Vollmar, A. M., & Zahler, S. (2010). Cyclin-dependent kinase 5 regulates endothelial cell migration and angiogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 285(46), 35932–35943.
- Lim, S., & Kaldis, P. (2013). Cdks, cyclins and CKIs: Roles beyond cell cycle regulation. *Development (Cambridge)*, 140(15), 3079–3093.
- Lim, S., Bhinge, A., Bragado Alonso, S., Aksoy, I., Aprea, J., Cheok, C. F., Calegari, F., Stanton, L. W., & Kaldis, P. (2017). Cyclin-Dependent Kinase-Dependent Phosphorylation of Sox2 at Serine 39 Regulates Neurogenesis. *Molecular and Cellular Biology*, 37(16), e00201-17.
- Lin, R., Connolly, P. J., Huang, S., Wetter, S. K., Lu, Y., Murray, W. V., Emanuel, S. L., Gruninger, R. H., Fuentes-Pesquera, A. R., Rugg, C. A., Middleton, S. A., & Jolliffe, L. K. (2005). 1-Acyl-1H-[1,2,4]triazole-3,5-diamine analogues as novel and potent anticancer cyclin-dependent kinase inhibitors: Synthesis and evaluation of biological activities. *Journal of Medicinal Chemistry*, 48(13), 4208–4211.
- Lin, A., Giuliano, C. J., Palladino, A., John, K. M., Abramowicz, C., Yuan, M., Lou, Sausville, E. L., Lukow, D. A., Liu, L., Chait, A. R., Galluzzo, Z. C., Tucker, C., & Sheltzer, J. M. (2019). Off-target toxicity is a common mechanism of action of cancer drugs undergoing clinical trials. *Science Translational Medicine*, 11(509), eaaw8412.
- Liu, Y., Wu, C., & Galaktionov, K. (2004). p42, a Novel Cyclin-dependent Kinase-activating Kinase in Mammalian Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 279(6), 4507–4514.
- Liu, L., Zhu, X., Zhang, D., Huang, J., & Li, G. (2007). An electrochemical method to detect folate receptor positive tumor cells. *Electrochemistry Communications*, 9(10), 2547–2550.
- Liu, F., & Korc, M. (2012). Cdk4/6 inhibition induces epithelial-mesenchymal transition and enhances invasiveness in pancreatic cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 11(10), 2138–2148.
- Liu, S. L., Wang, C., Jiang, T., Tan, L., Xing, A., & Yu, J. T. (2016). The Role of Cdk5 in Alzheimer's Disease. *Molecular Neurobiology*, 53(7), 4328–4342.
- Lomenick, B., Hao, R., Jonai, N., Chin, R. M., Aghajan, M., Warburton, S., Wang, J., Wu, R. P., Gomez, F., Loo, J. A., Wohlschlegel, J. A., Vondrisk, T. M., Pelletier, J., Herschman, H. R., Clardy, J., Clarke, C. F., & Huang, J. (2009). Target identification using drug affinity responsive target stability (DARTS). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(51), 21984–21989.
- Lopez-Mejia, I. C., & Fajas, L. (2015). Cell cycle regulation of mitochondrial function. *Current Opinion in Cell Biology*, 33, 19–25.
- López-Tobón, A., Castro-Álvarez, J. F., Piedrahita, D., Boudreau, R. L., Gallego-Gómez, J. C., & Cardona-Gómez, G. P. (2011). Silencing of CDK5 as potential therapy for Alzheimer's disease. *Reviews in the Neurosciences*, 22(2), 143–152.

- Lu, H., Xue, Y., Yu, G. K., Arias, C., Lin, J., Fong, S., Faure, M., Weisburd, B., Ji, X., Mercier, A., Sutton, J., Luo, K., Gao, Z., & Zhou, Q. (2015). Compensatory induction of MYC expression by sustained CDK9 inhibition via a BRD4-dependent mechanism. *ELife*, 4, e06535.
- Lücking, U., Scholz, A., Lienau, P., Siemeister, G., Kosemund, D., Bohlmann, R., Briem, H., Terebesi, I., Meyer, K., Prella, K., Denner, K., Bömer, U., Schäfer, M., Eis, K., Valencia, R., Ince, S., von Nussbaum, F., Mumberg, D., Ziegelbauer, K., ... Brands, M. (2017). Identification of Atuveciclib (BAY 1143572), the First Highly Selective, Clinical PTEFb/CDK9 Inhibitor for the Treatment of Cancer. *ChemMedChem*, 12(21), 1776–1793.
- Luecking, U. T., Scholz, A., Kosemund, D., Bohlmann, R., Briem, H., Lienau, P., Siemeister, G., Terebesi, I., Meyer, K., Prella, K., Valencia, R., Ince, S., Nussbaum, F. von, Mumberg, D., Ziegelbauer, K., & Brands, M. (2017). Abstract 984: Identification of potent and highly selective PTEFb inhibitor BAY 1251152 for the treatment of cancer: from p.o. to i.v. application via scaffold hops. 984–984.
- Lui, G. Y. L., Grandori, C., & Kemp, C. J. (2018). CDK12: An emerging therapeutic target for cancer. *Journal of Clinical Pathology*, 71(11), 957–962.
- Machleidt, T., Woodroffe, C. C., Schwinn, M. K., Méndez, J., Robers, M. B., Zimmerman, K., Otto, P., Daniels, D. L., Kirkland, T. A., & Wood, K. V. (2015). NanoBRET-A Novel BRET Platform for the Analysis of Protein-Protein Interactions. *ACS Chemical Biology*, 10(8), 1797–1804.
- Mallinger, A., Crumpler, S., Pichowicz, M., Waalboer, D., Stubbs, M., Adeniji-Popoola, O., Wood, B., Smith, E., Thai, C., Henley, A. T., Georgi, K., Court, W., Hobbs, S., Box, G., Ortiz-Ruiz, M. J., Valenti, M., De Haven Brandon, A., Tepoele, R., Leuthner, B., ... Blagg, J. (2015). Discovery of potent, orally bioavailable, small-molecule inhibitors of WNT signaling from a cell-based pathway screen. *Journal of Medicinal Chemistry*, 58(4), 1717–1735.
- Malumbres, M. (2014). Cyclin-dependent kinases. *Genome Biology*, 15(6), 122.
- Malumbres, M., & Barbacid, M. (2001). To cycle or not to cycle: A critical decision in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 1(3), 222–231.
- Malumbres, M., & Barbacid, M. (2005). Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends in Biochemical Sciences*, 30(11), 630–641.
- Malumbres, M., & Barbacid, M. (2009). Cell cycle, CDKs and cancer: A changing paradigm. *Nature Reviews Cancer*, 9(3), 153–166.
- Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T., & Sudarsanam, S. (2002). The protein kinase complement of the human genome. *Science*, 298(5600), 1912–1934.
- Molina, M. D., Jafari, R., Ignatushchenko, M., Seki, T., Larsson, E. A., Dan, C., Sreekumar, L., Cao, Y., & Nordlund, P. (2013). Monitoring drug target engagement in cells and tissues using the cellular thermal shift assay. *Science*, 341(6141), 84–87.
- Molina, M. D., & Nordlund, P. (2016). The Cellular Thermal Shift Assay: A Novel Biophysical Assay for in Situ Drug Target Engagement and Mechanistic Biomarker Studies. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 56, 141–161.
- Matsuda, S., Kawamoto, K., Miyamoto, K., Tsuji, A., & Yuasa, K. (2017). PCTK3/CDK18 regulates cell migration and adhesion by negatively modulating FAK activity. *Scientific Reports*, 7, 45545.
- Matsuo, Y., Park, J. H., Miyamoto, T., Yamamoto, S., Hisada, S., Alachkar, H., & Nakamura, Y. (2014). TOPK inhibitor induces complete tumor regression in xenograft models of human cancer through inhibition of cytokinesis. *Science Translational Medicine*, 6(259), 259ra145.
- McDermott, M. S. J., Chumanovich, A. A., Lim, C. U., Liang, J., Chen, M., Altilia, S., Oliver, D., Rae, J. M., Shtutman, M., Kiaris, H., Gyorffy, B., Roninson, I. B., & Broude, E. V. (2017). Inhibition of CDK8 mediator kinase suppresses estrogen dependent transcription and the growth of estrogen receptor positive breast cancer. *Oncotarget*, 8(8), 12558–12575.
- Meijer, L., Skaltsounis, A. L., Magiatis, P., Polychronopoulos, P., Knockaert, M., Leost, M., Ryan, X. P., Vonica, C. A., Brivanlou, A., Dajani, R., Crovace, C., Tarricone, C., Musacchio, A., Roe, S. M., Pearl, L., & Greengard, P. (2003). GSK-3-Selective Inhibitors Derived from Tyrian Purple Indirubins. *Chemistry and Biology*, 10(12), 1255–1266.
- Miettinen, T. P., Peltier, J., Härtlova, A., Gierliński, M., Jansen, V. M., Trost, M., & Björklund, M. (2018). Thermal proteome profiling of breast cancer cells reveals proteasomal activation by CDK 4/6 inhibitor palbociclib. *The EMBO Journal*, 37(10), e98359.

- Mikolcevic, P., Sigl, R., Rauch, V., Hess, M. W., Pfaller, K., Barisic, M., Pelliniemi, L. J., Boesl, M., & Geley, S. (2012). Cyclin-Dependent Kinase 16/PCTAIRE Kinase 1 Is Activated by Cyclin Y and Is Essential for Spermatogenesis. *Molecular and Cellular Biology*, 32(4), 868–879.
- Min, A., Kim, J. E., Kim, Y. J., Lim, J. M., Kim, S., Kim, J. W., Lee, K. H., Kim, T. Y., Oh, D. Y., Bang, Y. J., & Im, S. A. (2018). Cyclin E overexpression confers resistance to the CDK4/6 specific inhibitor palbociclib in gastric cancer cells. *Cancer Letters*, 430, 123–132.
- Misra, R. N., Xiao, H. Y., Rawlins, D. B., Shan, W., Kellar, K. A., Mulheron, J. G., Sack, J. S., Tokarski, J. S., Kimball, S. D., & Webster, K. R. (2003). 1H-pyrazolo[3,4-b]pyridine inhibitors of cyclin-dependent kinases: Highly potent 2,6-difluorophenacyl analogues. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 13(14), 2405–2408.
- Moshinsky, D. J., Bellamacina, C. R., Boisvert, D. C., Huang, P., Hui, T., Jancarik, J., Kim, S. H., & Rice, A. G. (2003). SU9516: Biochemical analysis of cdk inhibition and crystal structure in complex with cdk2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 310(3), 1026–1031.
- MRC Kinase Profiling Inhibitor Database (duben 2021). <http://www.kinase-screen.mrc.ac.uk/screening-compounds/608458>.
- Munoz, L. (2017). Non-kinase targets of protein kinase inhibitors. *Nature Reviews Drug Discovery*, 16(6), 424–440.
- Musgrove, E. A., Caldon, C. E., Barraclough, J., Stone, A., & Sutherland, R. L. (2011). Cyclin D as a therapeutic target in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 11(8), 558–572.
- Nakayama, N., Nakayama, K., Shamima, Y., Ishikawa, M., Katagiri, A., Iida, K., & Miyazaki, K. (2010). Gene amplification CCNE1 is related to poor survival and potential therapeutic target in ovarian cancer. *Cancer*, 116(11), 2621–2634.
- Narasimha, A. M., Kaulich, M., Shapiro, G. S., Choi, Y. J., Sicinski, P., & Dowdy, S. F. (2014). Cyclin D activates the Rb tumor suppressor by mono-phosphorylation. *ELife*, 2014(3), e02872.
- Naumann, R. W., Coleman, R. L., Burger, R. A., Sausville, E. A., Kutarska, E., Ghamande, S. A., Gabrail, N. Y., DePasquale, S. E., Nowara, E., Gilbert, L., Gersh, R. H., Teneriello, M. G., Harb, W. A., Konstantinopoulos, P. A., Penson, R. T., Symanowski, J. T., Lovejoy, C. D., Leamon, C. P., Morgenstern, D. E., & Messmann, R. A. (2013). PRECEDENT: A randomized phase II trial comparing vintafolide (EC145) and pegylated liposomal doxorubicin (PLD) in combination versus PLD alone in patients with platinum-resistant ovarian cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 31(35), 4400–4406.
- Nemeth, G., Varga, Z., Greff, Z., Bencze, G., Sipos, A., Szantai-Kis, C., Baska, F., Gyuris, A., Kelemenics, K., Szathmary, Z., Minarovits, J., Keri, G., & Orfi, L. (2012). Novel, Selective CDK9 Inhibitors for the Treatment of HIV Infection. *Current Medicinal Chemistry*, 18(3), 342–358.
- Olson, C. M., Jiang, B., Erb, M. A., Liang, Y., Doctor, Z. M., Zhang, Z., Zhang, T., Kwiatkowski, N., Boukhali, M., Green, J. L., Haas, W., Nomanbhoy, T., Fischer, E. S., Young, R. A., Bradner, J. E., Winter, G. E., & Gray, N. S. (2018). Pharmacological perturbation of CDK9 using selective CDK9 inhibition or degradation. *Nature Chemical Biology*, 14(2), 163–170.
- Olson, C. M., Liang, Y., Leggett, A., Park, W. D., Li, L., Mills, C. E., Elsarrag, S. Z., Ficarro, S. B., Zhang, T., Düster, R., Geyer, M., Sim, T., Marto, J. A., Sorger, P. K., Westover, K. D., Lin, C. Y., Kwiatkowski, N., & Gray, N. S. (2019). Development of a Selective CDK7 Covalent Inhibitor Reveals Predominant Cell-Cycle Phenotype. *Cell Chemical Biology*, 26(6), 792–803.e10.
- Ortega, M. A., Montoya, M. E., Zarranz, B., Jaso, A., Aldana, I., Leclerc, S., Meijer, L., & Monge, A. (2002). Pyrazolo[3,4-b]quinoxalines. A new class of cyclin-dependent kinases inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 10(7), 2177–2184.
- Ou, C. Y., Poon, V. Y., Maeder, C. I., Watanabe, S., Lehrman, E. K., Fu, A. K. Y., Park, M., Fu, W. Y., Jorgensen, E. M., Ip, N. Y., & Shen, K. (2010). Two cyclin-dependent kinase pathways are essential for polarized trafficking of presynaptic components. *Cell*, 141(5), 846–858.
- Ou, D., Chen, L., He, J., Rong, Z., Gao, J., Li, Z., Liu, L., Tang, F., Li, J., Deng, Y., & Sun, L. (2020). CDK11 negatively regulates Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in the endosomal compartment by affecting microtubule stability. *Cancer Biology and Medicine*, 17(2), 328–342.
- Oumata, N., Bettayeb, K., Ferandin, Y., Demange, L., Lopez-Giral, A., Goddard, M. L., Myrianthopoulos, V., Mikros, E., Flajolet, M., Greengard, P., Meijer, L., & Galons, H. (2008). Roscovitine-derived, dual-specificity inhibitors of cyclin-dependent kinases and casein kinases 1. *Journal of Medicinal Chemistry*, 51(17), 5229–5242.

- Palmer, K. J., Konkel, J. E., & Stephens, D. J. (2005). PCTAIRE protein kinases interact directly with the COPII complex and modulate secretory cargo transport. *Journal of Cell Science*, 118(17), 3839–3847.
- Palmer, N., Talib, S. Z. A., & Kaldis, P. (2019). Diverse roles for CDK-associated activity during spermatogenesis. *FEBS Letters*, 593(20), 2925–2949.
- Palmer, N., & Kaldis, P. (2020). Less-well known functions of cyclin/CDK complexes. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 107, 54–62.
- Pan, S., Zhang, H., Wang, C., Yao, S. C. L., & Yao, S. Q. (2016). Target identification of natural products and bioactive compounds using affinity-based probes. *Natural Product Reports*, 33(5), 612–620.
- Papariadis, N. F. dos S., Durvale, M. C., & Canduri, F. (2017). The emerging picture of CDK9/P-TEFb: more than 20 years of advances since PITALRE. *Molecular BioSystems*, 13(2), 246–276.
- Park, M. H., Kim, S. Y., Kim, Y. J., & Chung, Y. H. (2014). ALS2CR7 (CDK15) attenuates TRAIL induced apoptosis by inducing phosphorylation of survivin Thr34. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 450(1), 129–134.
- Park, H., Ha, J., & Park, S. B. (2019). Label-free target identification in drug discovery via phenotypic screening. *Current Opinion in Chemical Biology*, 50, 66–72.
- Parker, N., Turk, M. J., Westrick, E., Lewis, J. D., Low, P. S., & Leamon, C. P. (2005). Folate receptor expression in carcinomas and normal tissues determined by a quantitative radioligand binding assay. *Analytical Biochemistry*, 338(2), 284–293.
- Parry, D., Guzi, T., Shanahan, F., Davis, N., Prabhavalkar, D., Wiswell, D., Seghezzi, W., Paruch, K., Dwyer, M. P., Doll, R., Nomeir, A., Windsor, W., Fischmann, T., Wang, Y., Oft, M., Chen, T., Kirschmeier, P., & Lees, E. M. (2010). Dinaciclib (SCH 727965), a novel and potent cyclin-dependent kinase inhibitor. *Molecular Cancer Therapeutics*, 9(8), 2344–2353.
- Pasquer, Q. T. L., Tsakoumagkos, I. A., & Hoogendoorn, S. (2020). From Phenotypic Hit to Chemical Probe: Chemical Biology Approaches to Elucidate Small Molecule Action in Complex Biological Systems. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(23), 5702.
- Patel, H., Periyasamy, M., Sava, G. P., Bondke, A., Slafer, B. W., Kroll, S. H. B., Barbazanges, M., Starkey, R., Ottaviani, S., Harrod, A., Aboagye, E. O., Buluwela, L., Fuchter, M. J., Barrett, A. G. M., Charles Coombes, R., & Ali, S. (2018). ICEC0942, an orally bioavailable selective inhibitor of cdk7 for cancer treatment. *Molecular Cancer Therapeutics*, 17(6), 1156–1166.
- Peethambaram, P. P., Hartmann, L. C., Jonker, D. J., De Jonge, M., Plummer, E. R., Martin, L., Konner, J., Marshall, J., Goss, G. D., Teslenko, V., Clemens, P. L., Cohen, L. J., Ahlers, C. M., & Alland, L. (2015). A phase I pharmacokinetic and safety analysis of epothilone folate (BMS-753493), a folate receptor targeted chemotherapeutic agent in humans with advanced solid tumors. *Investigational New Drugs*, 33(2), 321–331.
- Pelish, H. E., Liao, B. B., Nituлесcu, I. I., Tangpeerachaikul, A., Poss, Z. C., Da Silva, D. H., Caruso, B. T., Arefolov, A., Fadeyi, O., Christie, A. L., Du, K., Banka, D., Schneider, E. V., Jestel, A., Zou, G., Si, C., Ebmeier, C. C., Bronson, R. T., Krivtsov, A. V., ... Shair, M. D. (2015). Mediator kinase inhibition further activates super-enhancer-associated genes in AML. *Nature*, 526(7572), 273–276.
- Pennati, M., Campbell, A. J., Curto, M., Binda, M., Cheng, Y. Z., Wang, L. Z., Curtin, N., Golding, B. T., Griffin, R. J., Hardcastle, I. R., Henderson, A., Zaffaroni, N., & Newell, D. R. (2005). Potentiation of paclitaxel-induced apoptosis by the novel cyclin-dependent kinase inhibitor NU6140: A possible role for survivin down-regulation. *Molecular Cancer Therapeutics*, 4(9), 1328–1337.
- Pernicová, Z., Slabáková, E., Fedr, R., Šimečková, Š., Jaroš, J., Suchánková, T., Bouchal, J., Kharaišvili, G., Král, M., Kozubík, A., & Souček, K. (2014). The role of high cell density in the promotion of neuroendocrine transdifferentiation of prostate cancer cells. *Molecular Cancer*, 13(1), 113.
- Peyressatre, M., Prével, C., Pellerano, M., & Morris, M. C. (2015). Targeting cyclin-dependent kinases in human cancers: From small molecules to peptide inhibitors. *Cancers*, 7(1), 179–237.
- Piazza, I., Beaton, N., Bruderer, R., Knobloch, T., Barbisan, C., Chandat, L., Sudau, A., Siepe, I., Rinner, O., de Souza, N., Picotti, P., & Reiter, L. (2020). A machine learning-based chemoproteomic approach to identify drug targets and binding sites in complex proteomes. *Nature Communications*, 11(1), 4200.
- Piccaluga, P. P., Rondoni, M., Paolini, S., Rosti, G., Martinelli, G., & Baccarani, M. (2007). Imatinib mesylate in the treatment of hematologic malignancies. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 7(10), 1597–1611.



- Polychronopoulos, P., Magiatis, P., Skaltsounis, A. L., Myrianthopoulos, V., Mikros, E., Tarricone, A., Musacchio, A., Roe, S. M., Pearl, L., Leost, M., Greengard, P., & Meijer, L. (2004). Structural Basis for the Synthesis of Indirubins as Potent and Selective Inhibitors of Glycogen Synthase Kinase-3 and Cyclin-Dependent Kinases. *Journal of Medicinal Chemistry*, 47(4), 935–946.
- Porter, D. C., Farmaki, E., Altilia, S., Schools, G. P., West, D. K., Chen, M., Chang, B. D., Puzyrev, A. T., Lim, C. U., Rokow-Kittell, R., Friedhoff, L. T., Papavassiliou, A. G., Kalurupalle, S., Hurteau, G., Shi, J., Baran, P. S., Gyorffy, B., Wentland, M. P., Broude, E. V., ... Roninson, I. B. (2012). Cyclin-dependent kinase 8 mediates chemotherapy-induced tumor-promoting paracrine activities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(34), 13799–13804.
- Pozzi, S., Cirstea, D., Santo, L., Nabikejje, D. M., Patel, K., Luly, K. M., Gharti-Chhetry, G., Vallet, S., Eda, H., Hideshima, T., Green, S. R., Anderson, K. C., Scadden, D. T., & Raje, N. (2010). CYC065, a Potent Derivative of Seliciclib Is Active In Multiple Myeloma In Preclinical Studies. *Blood*, 116(21), 2999–2999.
- Qiu, X., Li, Y., Yu, B., Ren, J., Huang, H., Wang, M., Ding, H., Li, Z., Wang, J., & Bian, J. (2021). Discovery of selective CDK9 degraders with enhancing antiproliferative activity through PROTAC conversion. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 211, 113091.
- Quereda, V., Bayle, S., Vena, F., Frydman, S. M., Monastyrskiy, A., Roush, W. R., & Duckett, D. R. (2019). Therapeutic Targeting of CDK12/CDK13 in Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer Cell*, 36(5), 545–558.e7.
- Rader, J., Russell, M. R., Hart, L. S., Nakazawa, M. S., Belcastro, L. T., Martinez, D., Li, Y., Carpenter, E. L., Attiyeh, E. F., Diskin, S. J., Kim, S., Parasuraman, S., Caponigro, G., Schnepf, R. W., Wood, A. C., Pawel, B., Cole, K. A., & Maris, J. M. (2013). Dual CDK4/CDK6 inhibition induces cell-cycle arrest and senescence in neuroblastoma. *Clinical Cancer Research*, 19(22), 6173–6182.
- Reddy, M. V. R., Akula, B., Cosenza, S. C., Athuluridivakar, S., Mallireddigari, M. R., Pallela, V. R., Billa, V. K., Subbaiah, D. R. C. V., Bharathi, E. V., Vasquez-Del Carprio, R., Padgaonkar, A., Baker, S. J., & Reddy, E. P. (2014). Discovery of 8-cyclopentyl-2-[4-(4-methyl-piperazin-1-yl)-phenylamino]-7-oxo-7,8-dihydro-pyrido[2,3-d]pyrimidine-6-carbonitrile (7x) as a potent inhibitor of cyclin-dependent kinase 4 (CDK4) and AMPK-related kinase 5 (ARK5). *Journal of Medicinal Chemistry*, 57(3), 578–599.
- Ren, S., & Rollins, B. J. (2004). Cyclin C/Cdk3 promotes Rb-dependent G0 exit. *Cell*, 117(2), 239–251.
- Richters, A., Doyle, S. K., Freeman, D. B., Lee, C., Leifer, B. S., Jagannathan, S., Kabinger, F., Koren, J. V., Struntz, N. B., Urgiles, J., Stagg, R. A., Curtin, B. H., Chatterjee, D., Mathea, S., Mikochik, P. J., Hopkins, T. D., Gao, H., Branch, J. R., Xin, H., ... Koehler, A. N. (2021). Modulating Androgen Receptor-Driven Transcription in Prostate Cancer with Selective CDK9 Inhibitors. *Cell Chemical Biology*, 28(2), 134–147.e14.
- Robb, C. M., Contreras, J. I., Kour, S., Taylor, M. A., Abid, M., Sonawane, Y. A., Zahid, M., Murry, D. J., Natarajan, A., & Rana, S. (2017). Chemically induced degradation of CDK9 by a proteolysis targeting chimera (PROTAC). *Chemical Communications*, 53(54), 7577–7580.
- Robert, T., Johnson, J. L., Guichaoua, R., Yaron, T. M., Bach, S., Cantley, L. C., & Colas, P. (2020). Development of a CDK10/CycM in vitro Kinase Screening Assay and Identification of First Small-Molecule Inhibitors. *Frontiers in Chemistry*, 8, 147.
- Roninson, I. B., Porter, D. C., & Wentland, M. P. (2013). Cdk8/cdk19 selective inhibitors and their use in anti-metastatic and chemopreventative methods for cancer. U.S. Patent No. WO2013116786.
- Roskoski, R. (2016). Cyclin-dependent protein kinase inhibitors including palbociclib as anticancer drugs. *Pharmacological Research*, 107, 249–275.
- Roskoski, R. (2019). Cyclin-dependent protein serine/threonine kinase inhibitors as anticancer drugs. *Pharmacological Research*, 139, 471–488.
- Roskoski, R. (2021). Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors: A 2021 update. *Pharmacological Research*, 165, 105463.
- Ruetz, S., Fabbro, D., Zimmermann, J., Meyer, T., & Gray, N. (2003). Chemical and biological profile of dual Cdk1 and Cdk2 inhibitors. *Current Medicinal Chemistry - Anti-Cancer Agents*, 3(1), 1–14.
- Ryu, C. K., Kang, H. Y., Lee, S. K., Nam, K. A., Hong, C. Y., Ko, W. G., & Lee, B. H. (2000). 5-Arylamino-2-methyl-4,7-dioxobenzothiazoles as inhibitors of cyclin-dependent kinase 4 and cytotoxic agents. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 10(5), 461–464.

- Rzyski, T., Mikula, M., Zylkiewicz, E., Dreas, A., Wiklik, K., Golas, A., Wójcik, K., Masiejczyk, M., Wróbel, A., Dolata, I., Kitlinska, A., Statkiewicz, M., Kuklinska, U., Goryca, K., Sapala, L., Grochowska, A., Cabaj, A., Szajewska-Skuta, M., Gabor-Worwa, E., ... Brzózka, K. (2017). SEL120-34A is a novel CDK8 inhibitor active in AML cells with high levels of serine phosphorylation of STAT1 and STAT5 transactivation domains. *Oncotarget*, 8(20), 33779–33795.
- Sako, Y., Ninomiya, K., Okuno, Y., Toyomoto, M., Nishida, A., Koike, Y., Ohe, K., Kii, I., Yoshida, S., Hashimoto, N., Hosoya, T., Matsuo, M., & Hagiwara, M. (2017). Development of an orally available inhibitor of CLK1 for skipping a mutated dystrophin exon in Duchenne muscular dystrophy. *Scientific Reports*, 7, 46126.
- Sánchez-Martínez, C., Shih, C., Faul, M. M., Zhu, G., Paal, M., Somoza, C., Li, T., Kumrich, C. A., Winneroski, L. L., Xun, Z., Brooks, H. B., Patel, B. K. R., Schultz, R. M., DeHahn, T. B., Spencer, C. D., Watkins, S. A., Considine, E., Dempsey, J. A., Ogg, C. A., ... Wagner, J. (2003). Aryl[a]pyrrolo[3,4-c]carbazoles as selective Cyclin D1-CDK4 inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 13(21), 3835–3839.
- Sánchez-Martínez, C., Lallena, M. J., Sanfeliciano, S. G., & de Dios, A. (2019). Cyclin dependent kinase (CDK) inhibitors as anticancer drugs: Recent advances (2015–2019). *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 29(20), 126637.
- Santamaría, D., Barrière, C., Cerqueira, A., Hunt, S., Tardy, C., Newton, K., Cáceres, J. F., Dubus, P., Malumbres, M., & Barbacid, M. (2007). Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle. *Nature*, 448(7155), 811–815.
- Santarius, T., Shipley, J., Brewer, D., Stratton, M. R., & Cooper, C. S. (2010). A census of amplified and overexpressed human cancer genes. *Nature Reviews Cancer*, 10(1), 59–64.
- Sava, G. P., Fan, H., Coombes, R. C., Buluwela, L., & Ali, S. (2020). CDK7 inhibitors as anticancer drugs. *Cancer and Metastasis Reviews*, 39(3), 805–823.
- Scaranti, M., Cojocar, E., Banerjee, S., & Banerji, U. (2020). Exploiting the folate receptor  $\alpha$  in oncology. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 17(6), 349–359.
- Scheepstra, M., Hekking, K. F. W., van Hijfte, L., & Folmer, R. H. A. (2019). Bivalent Ligands for Protein Degradation in Drug Discovery. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 17, 160–176.
- Scholz, A., Oellerich, T., Hussain, A., Lindner, S., Luecking, U., Walter, A. O., Ellinghaus, P., Valencia, R., von Nussbaum, F., Mumberg, D., Brands, M., Ince, S., Serve, H., & Ziegelbauer, K. (2016). BAY 1143572, a first-in-class, highly selective, potent and orally available inhibitor of PTEFb/CDK9 currently in Phase I, shows convincing anti-tumor activity in preclinical models of acute myeloid leukemia (AML). *AACR 107th Annual Meeting 2016; New Orleans, LA, Abstract 3022*.
- Schopper, S., Kahraman, A., Leuenberger, P., Feng, Y., Piazza, I., Müller, O., Boersema, P. J., & Picotti, P. (2017). Measuring protein structural changes on a proteome-wide scale using limited proteolysis-coupled mass spectrometry. *Nature Protocols*, 12(11), 2391–2410.
- Sercombe, L., Veerati, T., Moheimani, F., Wu, S. Y., Sood, A. K., & Hua, S. (2015). Advances and challenges of liposome assisted drug delivery. *Frontiers in Pharmacology*, 6, 286.
- Shalem, O., Sanjana, N. E., Hartenian, E., Shi, X., Scott, D. A., Mikkelsen, T. S., Heckl, D., Ebert, B. L., Root, D. E., Doench, J. G., & Zhang, F. (2014). Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *Science*, 343(6166), 84–87.
- Shapiro, G. I. (2006). Cyclin-dependent kinase pathways as targets for cancer treatment. *Journal of Clinical Oncology*, 24(11), 1770–1783.
- Sherr, C. J. (2000). The pezcoller lecture: Cancer cell cycles revisited. *Cancer Research*, 60(14), 3689–3695.
- Shirley, M. (2018). Dacomitinib: First Global Approval. *Drugs*, 78(18), 1947–1953.
- Shupp, A., Casimiro, M. C., & Pestell, R. G. (2017). Biological functions of CDK5 and potential CDK5 targeted clinical treatments. *Oncotarget*, 8(10), 17373–17382.
- Sledge, G. W., Toi, M., Neven, P., Sohn, J., Inoue, K., Pivot, X., Burdaeva, O., Okera, M., Masuda, N., Kaufman, P. A., Koh, H., Grischke, E. M., Frenzel, M., Lin, Y., Barriga, S., Smith, I. C., Bourayou, N., & Llombart-Cussac, A. (2017). MONARCH 2: Abemaciclib in combination with fulvestrant in women with HR+/HER2-advanced breast cancer who had progressed while receiving endocrine therapy. *Journal of Clinical Oncology*, 35(25), 2875–2884.
- Song, Y., Shi, W., Chen, W., Li, X., & Ma, H. (2012). Fluorescent carbon nanodots conjugated with folic acid for distinguishing folate-receptor-positive cancer cells from normal cells. *Journal of Materials Chemistry*, 22(25), 12568–12573.

- Soni, R., O'Reilly, T., Furet, P., Muller, L., Stephan, C., Zumstein-Mecker, S., Fretz, H., Fabbro, D., & Chaudhuri, B. (2001). Selective in vivo and in vitro effects of a small molecule inhibitor of cyclin-dependent kinase 4. *Journal of the National Cancer Institute*, 93(6), 436–446.
- Srinivasarao, M., Galliford, C. V., & Low, P. S. (2015). Principles in the design of ligand-targeted cancer therapeutics and imaging agents. *Nature Reviews Drug Discovery*, 14(3), 203–219.
- Srinivasarao, M., & Low, P. S. (2017). Ligand-Targeted Drug Delivery. *Chemical Reviews*, 117(19), 12133–12164.
- Steinman, R. A. (2002). Cell cycle regulators and hematopoiesis. *Oncogene*, 21(2), 3403–3413.
- Strickland, E. C., Geer, M. A., Tran, D. T., Adhikari, J., West, G. M., Dearmond, P. D., Xu, Y., & Fitzgerald, M. C. (2013). Thermodynamic analysis of protein-ligand binding interactions in complex biological mixtures using the stability of proteins from rates of oxidation. *Nature Protocols*, 8(1), 148–161.
- Sumi, N. J., Kuenzi, B. M., Knezevic, C. E., Rensing Rix, L. L., & Rix, U. (2015). Chemoproteomics Reveals Novel Protein and Lipid Kinase Targets of Clinical CDK4/6 Inhibitors in Lung Cancer. *ACS Chemical Biology*, 10(12), 2680–2686.
- Sun, X., Gao, H., Yang, Y., He, M., Wu, Y., Song, Y., Tong, Y., & Rao, Y. (2019). Protacs: Great opportunities for academia and industry. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 4(1), 64.
- Sun, J., Prabhu, N., Tang, J., Yang, F., Jia, L., Guo, J., Xiao, K., Tam, W. L., Nordlund, P., & Dai, L. (2021). Recent advances in proteome-wide label-free target deconvolution for bioactive small molecules. *Medicinal Research Reviews*. <https://doi.org/10.1002/med.21788>
- Sutanto, F., Konstantinidou, M., & Dömling, A. (2020). Covalent inhibitors: A rational approach to drug discovery. *RSC Medicinal Chemistry*, 11(8), 876–884.
- Syed, Y. Y. (2017). Ribociclib: First Global Approval. *Drugs*, 77(7), 799–807.
- Syed, Y. Y. (2020). Zanutrutinib: First Approval. *Drugs*, 80(1), 91–97.
- Szigetvari, N. M., Dhawan, D., Ramos-Vara, J. A., Leamon, C. P., Klein, P. J., Audrey Ruple, A., Heng, H. G., Pugh, M. R., Rao, S., Vlahov, I. R., Deshuillers, P. L., Low, P. S., Fourez, L. M., Cournoyer, A. M., & Knapp, D. W. (2018). Phase I/II clinical trial of the targeted chemotherapeutic drug, folate-tubulysin, in dogs with naturally-occurring invasive urothelial carcinoma. *Oncotarget*, 9(97), 37042–37053.
- Tadesse, S., Yu, M., Kumarasiri, M., Le, B. T., & Wang, S. (2015). Targeting CDK6 in cancer: State of the art and new insights. *Cell Cycle*, 14(20), 3220–3230.
- Torres-Guzmán, R., Calsina, B., Hermoso, A., Baquero, C., Alvarez, B., Amat, J., McNulty, A. M., Gong, X., Boehnke, K., Du, J., de Dios, A., Beckmann, R. P., Buchanan, S., & Lallena, M. J. (2017). Preclinical characterization of abemaciclib in hormone receptor positive breast cancer. *Oncotarget*, 8(41), 69493–69507.
- Trova, M. P., Barnes, K. D., Alicea, L., Benanti, T., Bielaska, M., Bilotta, J., Bliss, B., Duong, T. N., Haydar, S., Herr, R. J., Hui, Y., Johnson, M., Lehman, J. M., Peace, D., Rainka, M., Snider, P., Salamone, S., Tregay, S., Zheng, X., & Friedrich, T. D. (2009). Heterobiaryl purine derivatives as potent antiproliferative agents: Inhibitors of cyclin dependent kinases. Part II. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 19(23), 6613–6617.
- Trovesi, C., Manfrini, N., Falcettoni, M., & Longhese, M. P. (2013). Regulation of the DNA damage response by cyclin-dependent kinases. *Journal of Molecular Biology*, 425(23), 4756–4766.
- Tsai, K. L., Sato, S., Tomomori-Sato, C., Conaway, R. C., Conaway, J. W., & Asturias, F. J. (2013). A conserved Mediator-CDK8 kinase module association regulates Mediator-RNA polymerase II interaction. *Nature Structural and Molecular Biology*, 20(5), 611–619.
- Tsou, H. R., Liu, X., Birnberg, G., Kaplan, J., Otteng, M., Tran, T., Kutterer, K., Tang, Z., Suayan, R., Zask, A., Ravi, M., Bretz, A., Grillo, M., McGinnis, J. P., Rabindran, S. K., Ayril-Kaloustian, S., & Mansour, T. S. (2009). Discovery of 4-(benzylaminomethylene)isoquinoline-1,3-(2H,4H)-diones and 4-[(pyridylmethyl)aminomethylene]isoquinoline-1,3-(2H,4H)-diones as potent and selective inhibitors of the cyclin-dependent kinase 4. *Journal of Medicinal Chemistry*, 52(8), 2289–2310.
- Uitdehaag, J. C. M., Kooijman, J. J., de Roos, J. A. D. M., Prinsen, M. B. W., Dylus, J., Willemsen-Seegers, N., Kawase, Y., Sawa, M., de Man, J., van Gerwen, S. J. C., Buijsman, R. C., & Zaman, G. J. R. (2019). Combined cellular and biochemical profiling to identify predictive drug response biomarkers for kinase inhibitors approved for clinical use between 2013 and 2017. *Molecular Cancer Therapeutics*, 18(2), 470–481.
- Van Beuge, M. M., Poelstra, K., & Prakash, J. (2012). Specific delivery of kinase inhibitors in nonmalignant and malignant diseases. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 9(1), 59–70.

- VanderWel, S. N., Harvey, P. J., McNamara, D. J., Repine, J. T., Keller, P. R., Quin, J., Booth, R. J., Elliott, W. L., Dobrusin, E. M., Fry, D. W., & Toogood, P. L. (2005). Pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-ones as specific inhibitors of cyclin-dependent kinase 4. *Journal of Medicinal Chemistry*, 48(7), 2371–2387.
- Vassilev, L. T., Tovar, C., Chen, S., Knezevic, D., Zhao, X., Sun, H., Heimbrook, D. C., & Chen, L. (2006). Selective small-molecule inhibitor reveals critical mitotic functions of human CDK1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(28), 10660–10665.
- Vasta, J. D., Corona, C. R., Wilkinson, J., Zimprich, C. A., Hartnett, J. R., Ingold, M. R., Zimmerman, K., Machleidt, T., Kirkland, T. A., Huwiler, K. G., Ohana, R. F., Slater, M., Otto, P., Cong, M., Wells, C. I., Berger, B. T., Hanke, T., Glas, C., Ding, K., ... Robers, M. B. (2018). Quantitative, Wide-Spectrum Kinase Profiling in Live Cells for Assessing the Effect of Cellular ATP on Target Engagement. *Cell Chemical Biology*, 25(2), 206-214.e11.
- Vergote, I., & Leamon, C. P. (2015). Vintafolide: A novel targeted therapy for the treatment of folate receptor expressing tumors. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 7(4), 206–218.
- Vesely, J., Havlíček, L., Strnad, M., Blow, J. J., Donella - Deana, A., Pinna, L., Letham, D. S., Kato, J. - y, Detivaud, L., Leclerc, S., & Meijer, L. (1994). Inhibition of Cyclin - Dependent Kinases by Purine Analogues. *European Journal of Biochemistry*, 224(2), 771–786.
- Vlahov, I. R., Santhapuram, H. K. R., Kleindl, P. J., Howard, S. J., Stanford, K. M., & Leamon, C. P. (2006). Design and regioselective synthesis of a new generation of targeted chemotherapeutics. Part 1: EC145, a folic acid conjugate of desacetylvinblastine monohydrazone. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 16(19), 5093–5096.
- Vlahov, I. R., & Leamon, C. P. (2012). Engineering folate-drug conjugates to target cancer: From chemistry to clinic. *Bioconjugate Chemistry*, 23(7), 1357–1369.
- Voigt, B., Meijer, L., Lozach, O., Schächtele, C., Totzke, F., & Hilgeroth, A. (2005). Novel CDK inhibition profiles of structurally varied 1-aza-9-oxafluorenes. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 15(3), 823–825.
- Walker, R. G., Thomson, G., Malone, K., Nowicki, M. W., Brown, E., Blake, D. G., Turner, N. J., Walkinshaw, M. D., Grant, K. M., & Mottram, J. C. (2011). High throughput screens yield small molecule inhibitors of leishmania CRK3:CYC6 cyclin-dependent kinase. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(4), e1033.
- Walker, A. J., Wedam, S., Amiri-Kordestani, L., Bloomquist, E., Tang, S., Sridhara, R., Chen, W., Palmby, T. R., Zirkelbach, J. F., Fu, W., Liu, Q., Tilley, A., Kim, G., Kluetz, P. G., McKee, A. E., & Pazdur, R. (2016). FDA approval of palbociclib in combination with fulvestrant for the treatment of hormone receptor-positive, HER2-negative metastatic breast cancer. *Clinical Cancer Research*, 22(20), 4968–4972.
- Wang, S., Meades, C., Wood, G., Osnowski, A., Anderson, S., Yuill, R., Thomas, M., Mezna, M., Jackson, W., Midgley, C., Griffiths, G., Fleming, I., Green, S., McNae, I., Wu, S. Y., McInnes, C., Zheleva, D., Walkinshaw, M. D., & Fischer, P. M. (2004). 2-Anilino-4-(thiazol-5-yl)pyrimidine CDK Inhibitors: Synthesis, SAR Analysis, X-ray Crystallography, and Biological Activity. *Journal of Medicinal Chemistry*, 47(7):1662-75.
- Wang, K., Hampson, P., Hazeldine, J., Kryštof, V., Strnad, M., Pechan, P., & Lord, J. M. (2012). Cyclin-dependent kinase 9 activity regulates neutrophil spontaneous apoptosis. *PLoS ONE*, 7(1), e30128.
- Wang, Y., & Ma, H. (2015). Protein kinase profiling assays: A technology review. *Drug Discovery Today: Technologies*, 18, 1–8.
- Wang, H., Nicolay, B. N., Chick, J. M., Gao, X., Geng, Y., Ren, H., Gao, H., Yang, G., Williams, J. A., Suski, J. M., Keibler, M. A., Sicinska, E., Gerdemann, U., Haining, W. N., Roberts, T. M., Polyak, K., Gygi, S. P., Dyson, N. J., & Sicinski, P. (2017). The metabolic function of cyclin D3-CDK6 kinase in cancer cell survival. *Nature*, 546(7658), 426–430.
- Wang, B., Wu, J., Wu, Y., Chen, C., Zou, F., Wang, A., Wu, H., Hu, Z., Jiang, Z., Liu, Q., Wang, W., Zhang, Y., Liu, F., Zhao, M., Hu, J., Huang, T., Ge, J., Wang, L., Ren, T., ... Liu, Q. (2018). Discovery of 4-(((4-(5-chloro-2-(((1s,4s)-4-((2-methoxyethyl)amino)cyclohexyl)amino)pyridin-4-yl)thiazol-2-yl)amino)methyl)tetrahydro-2H-pyran-4-carbonitrile (JSH-150) as a novel highly selective and potent CDK9 kinase inhibitor. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 158, 896–916.
- Weinberg, R. A. (1995). The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*, 81(3), 323–330.
- Wells, C. I., Vasta, J. D., Corona, C. R., Wilkinson, J., Zimprich, C. A., Ingold, M. R., Pickett, J. E., Drewry, D. H., Pugh, K. M., Schwinn, M. K., Hwang, B. (Brian), Zegzouti, H., Huber, K. V. M., Cong, M., Meisenheimer, P. L., Willson, T. M., & Robers, M. B. (2020). Quantifying CDK inhibitor selectivity in live cells. *Nature Communications*, 11(1), 2743.

- West, G. M., Tang, L., & Fitzgerald, M. C. (2008). Thermodynamic analysis of protein stability and ligand binding using a chemical modification- and mass spectrometry-based strategy. *Analytical Chemistry*, 80(11), 4175–4185.
- West, G. M., Tucker, C. L., Xu, T., Park, S. K., Han, X., Yates, J. R., & Fitzgerald, M. C. (2010). Quantitative proteomics approach for identifying protein-drug interactions in complex mixtures using protein stability measurements. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(20), 9078–9082.
- Whittaker, S. R., Walton, M. I., Garrett, M. D., & Workman, P. (2004). The Cyclin-dependent Kinase Inhibitor CYC202 (R-Roscovitin) Inhibits Retinoblastoma Protein Phosphorylation, Causes Loss of Cyclin D1, and Activates the Mitogen-activated Protein Kinase Pathway. *Cancer Research*, 64(1), 262–272.
- Whittaker, S. R., Te Poele, R. H., Chan, F., Linardopoulos, S., Walton, M. I., Garrett, M. D., & Workman, P. (2007). The cyclin-dependent kinase inhibitor seliciclib (R-roscovitin; CYC202) decreases the expression of mitotic control genes and prevents entry into mitosis. *Cell Cycle*, 6(24), 3114–3131.
- Whittaker, S. R., Mallinger, A., Workman, P., & Clarke, P. A. (2017). Inhibitors of cyclin-dependent kinases as cancer therapeutics. *Pharmacology and Therapeutics*, 173, 83–105.
- Wohlbold, L., Larochelle, S., Liao, J. C. F., Livshits, G., Singer, J., Shokat, K. M., & Fisher, R. P. (2006). The cyclin-dependent kinase (CDK) family member PNQALRE/CCRK supports cell proliferation but has no intrinsic CDK-activating kinase (CAK) activity. *Cell Cycle*, 5(5), 546–554.
- Wood, D. J., & Endicott, J. A. (2018). Structural insights into the functional diversity of the CDK–cyclin family. *Open Biology*, 8(9), 180112.
- Workman, P., & Collins, I. (2010). Probing the Probes: Fitness Factors For Small Molecule Tools. *Chemistry and Biology*, 17(6), 561–577.
- Wright, M. H., & Sieber, S. A. (2016). Chemical proteomics approaches for identifying the cellular targets of natural products. *Natural Product Reports*, 33(5), 681–708.
- Wu, P., Nielsen, T. E., & Clausen, M. H. (2015). FDA-approved small-molecule kinase inhibitors. *Trends in Pharmacological Sciences*, 36(7), 422–439.
- Wu, T., Qin, Z., Tian, Y., Wang, J., Xu, C., Li, Z., & Bian, J. (2020). Recent Developments in the Biology and Medicinal Chemistry of CDK9 Inhibitors: An Update. *Journal of Medicinal Chemistry*, 63(22), 13228–13257.
- Wu, D., Zhang, Z., Chen, X., Yan, Y., & Liu, X. (2021). Angel or Devil? - CDK8 as the new drug target. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 213, 113043.
- Xiong, X., Zhang, Y., Gao, X., Dong, Z., Li, L., Ji, C., Fu, L., Luo, X., Liu, H., & Mei, C. (2010). B5, a novel pyrrole-substituted indolinone, exerts potent antitumor efficacy through G2/M cell cycle arrest. *Investigational New Drugs*, 28(1), 26–34.
- Yasui, M., Yamamoto, H., Ngan, C. Y., Damdinsuren, B., Sugita, Y., Fukunaga, H., Gu, J., Maeda, M., Takemasa, I., Ikeda, M., Fujio, Y., Sekimoto, M., Matsuura, N., Weinstein, I. B., & Monden, M. (2006). Antisense to cyclin D1 inhibits vascular endothelial growth factor-stimulated growth of vascular endothelial cells: Implication of tumor vascularization. *Clinical Cancer Research*, 12(15), 4720–4729.
- Zhang, J., Yang, P. L., & Gray, N. S. (2009). Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nature Reviews Cancer*, 9(1), 28–39.
- Zhang, T., Kwiatkowski, N., Olson, C. M., Dixon-Clarke, S. E., Abraham, B. J., Greifenberg, A. K., Ficarro, S. B., Elkins, J. M., Liang, Y., Hannett, N. M., Manz, T., Hao, M., Bartkowiak, B., Greenleaf, A. L., Marto, J. A., Geyer, M., Bullock, A. N., Young, R. A., & Gray, N. S. (2016). Covalent targeting of remote cysteine residues to develop CDK12 and CDK13 inhibitors. *Nature Chemical Biology*, 12(10), 876–884.
- Zhang, H., Pandey, S., Travers, M., Sun, H., Morton, G., Madzo, J., Chung, W., Khowsathit, J., Perez-Leal, O., Barrero, C. A., Merali, C., Okamoto, Y., Sato, T., Pan, J., Garriga, J., Bhanu, N. V., Simithy, J., Patel, B., Huang, J., ... Issa, J. P. J. (2018). Targeting CDK9 Reactivates Epigenetically Silenced Genes in Cancer. *Cell*, 175(5), 1244-1258.e26.
- Zhang, H., Christensen, C. L., Dries, R., Oser, M. G., Deng, J., Diskin, B., Li, F., Pan, Y., Zhang, X., Yin, Y., Papadopoulos, E., Pyon, V., Thakurdin, C., Kwiatkowski, N., Jani, K., Rabin, A. R., Castro, D. M., Chen, T., Silver, H., ... Wong, K. K. (2020). CDK7 Inhibition Potentiates Genome Instability Triggering Anti-tumor Immunity in Small Cell Lung Cancer. *Cancer Cell*, 37(1), 37-54.e9.

- Zhang, C., Balbo, B., Ma, M., Zhao, J., Tian, X., Kluger, Y., & Somlo, S. (2021). Cyclin-dependent kinase 1 activity is a driver of cyst growth in polycystic kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology*, 32(1), 41–51.
- Zhao, Z., Ukidve, A., Kim, J., & Mitragotri, S. (2020). Targeting Strategies for Tissue-Specific Drug Delivery. *Cell*, 181(1), 151–167.
- Zhou, Y., Zhu, S., Cai, C., Yuan, P., Li, C., Huang, Y., & Wei, W. (2014). High-throughput screening of a CRISPR/Cas9 library for functional genomics in human cells. *Nature*, 509(7501), 487–491.
- Zhou, X., Gu, R., Han, X., Wu, G., & Liu, J. (2017). Cyclin-dependent kinase 5 controls vasculogenic mimicry formation in non-small cell lung cancer via the FAK-AKT signaling pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 492(3), 447–452.
- Zhou, F., Chen, L., Cao, C., Yu, J., Luo, X., Zhou, P., Zhao, L., Du, W., Cheng, J., Xie, Y., & Chen, Y. (2020). Development of selective mono or dual PROTAC degrader probe of CDK isoforms. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 187, 111952.
- Zhu, G., Conner, S. E., Zhou, X., Shih, C., Li, T., Anderson, B. D., Brooks, H. B., Morris Campbell, R., Considine, E., Dempsey, J. A., Faul, M. M., Ogg, C., Patel, B., Schultz, R. M., Spencer, C. D., Teicher, B., & Watkins, S. A. (2003). Synthesis, structure-activity relationship, and biological studies of indolocarbazoles as potent cyclin D1-CDK4 inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 46(11), 2027–2030.
- Zwicke, G. L., Ali Mansoori, G., & Jeffery, C. J. (2012). Utilizing the folate receptor for active targeting of cancer nanotherapeutics. *Nano Reviews*, 3(1), 18496.

## 8 CURRICULUM VITAE

**Jméno a příjmení:** Denisa Hendrychová  
**Narozena:** 26.2.1992 v Uherské Hradišti  
**Bydliště:** Nešporova 17, 779 00 Olomouc

### Vzdělání:

2016 – nyní Experimentální biologie – doktorské studium  
Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta  
2014 – 2016 Molekulární a buněčná biologie – magisterské studium  
Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta  
2011 – 2014 Molekulární a buněčná biologie – bakalářské studium  
Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta

### Pedagogická činnost:

2016 – nyní LRR/BUBCV - Cvičení z buněčné biologie  
2020 – nyní LRR/IZVB - Informační zdroje v biologii a medicíně (podíl na výuce)

### Zahraniční stáž:

2018 – 2019 6 měsíců - Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier, Centre National De La Recherche Scientifique (prof. Daniel Fisher - Nuclear Control of Cell Proliferation)

### Seznam publikovaných prací:

1. **Hendrychová, D.**, Jorda, R., Kryštof, V. (2021): How selective are clinical CDK4/6 inhibitors? *Med Res Rev* 41, 1578-1598.
2. Jorda, R., Magar, P., **Hendrychová, D.**, Pauk, K., Dibus, M., Pilařová, E., Imramovský, A., Kryštof, V. (2020): Novel modified leucine and phenylalanine dipeptides modulate viability and attachment of cancer cells. *Eur J Med Chem.* 188, 112036.
3. Salas, C., Zarate, A.M., Kryštof, V., Mella, J., Faundez, M., Brea, J., Loza, M.I., Brito, I., **Hendrychová, D.**, Jorda, R., Cabrera, A.R., Tapia, R.A., Espinosa-Bustos, C. (2020): Promising 2,6,9-Trisubstituted Purine Derivatives for Anticancer Compounds: Synthesis, 3D-QSAR, and Preliminary Biological Assays. *Int J Mol Sci.* 21, 161.
4. Xavier, N.M., Goncalves-Pereira, R., Jorda, R., **Hendrychová, D.**, Oliveira, M.C. (2019): Novel dodecyl-containing azido and glucuronamide-based nucleosides exhibiting anticancer potential. *Pure Appl. Chem.* 91, 1085-1105.
5. Krajčovičová, S., Jorda, R., **Hendrychová, D.**, Kryštof, V., Soral, M. (2019): Solid-phase synthesis for thalidomide-based proteolysis-targeting chimeras (PROTAC). *Chem Commun (Camb).* 55, 929-932.

6. Jorda, R.\*, **Hendrychová, D.\***, Voller, J., Řezníčková, E., Gucký, T., Kryštof, V. (2018): How Selective Are Pharmacological Inhibitors of Cell-Cycle-Regulating Cyclin-Dependent Kinases? *J Med Chem.* 61, 9105-9120. \*Sdílené prvoautorství
7. Krajčovičová, S., Gucký, T., **Hendrychová, D.**, Kryštof, V., Sural, M. (2017): A Stepwise Approach for the Synthesis of Folic Acid Conjugates with Protein Kinase Inhibitors. *J Org Chem.* 82, 13530-13541.

#### Konferenční příspěvky:

1. **Hendrychová, D.:** How selective are pharmacological inhibitors of cyclin-dependent kinases? Chemistry and Biology of Phytohormones and Related Substances, květen 24-26, 2018, Luhačovice, Česká republika. Ústní prezentace.
2. **Hendrychová, D.**, Řezníčková, E., Gucký, T., Krajčovičová, S., Sural, M., Kryštof, V.: Folic acid conjugates with purine cyclin-dependent kinase inhibitors. XIII. Diagnostic, Predictive and Experimental Oncology Days, listopad 28-30, 2017, Olomouc, Česká republika. Poster.
3. **Hendrychová, D.**, Jorda, R., Řezníčková, E., Kryštof, V.: Promiscuity and selectivity of commercially available inhibitors of cyclin-dependent kinases. VII International Symposium on Advances in Synthetic and Medicinal Chemistry, srpen 27-31, 2017, Vídeň, Rakousko. Poster.
4. **Hendrychová, D.:** Selectivity of commercially available inhibitors of cyclin-dependent kinases. Chemistry and Biology of Phytohormones and Related Substances, květen 21-23, 2017, Kouty nad Desnou, Česká republika. Ústní prezentace.
5. Jorda, R., **Hendrychová, D.:** Are commercially available selective inhibitors of cyclin-dependent kinases really selective? Cell Cycle meeting, CNRS, září 22, 2016, Montpellier, Francie. Poster.
6. Jorda, R., Řezníčková, E., **Hendrychová, D.**, Skrášková, Z., Kryštof, V.: Are commercially-available selective inhibitors of cyclin-dependent kinases really selective? 12<sup>th</sup> International Congress of Cell Biology, červenec 21-25, 2016, Praha, Česká republika. Poster.

#### Ocenění:

- 2020 – O cenu děkana 2020, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci  
3. místo v doktorské sekci biologie a ekologie
- 2018 – O cenu děkana 2018, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci  
1. místo v doktorské sekci biologie a ekologie



## 9 PŘÍLOHY

Tato disertační práce shrnuje a odkazuje na následující seznam publikací, které jsou přiloženy a v textu označovány jako **příloha I-III**.

**Příloha I:** Jorda, R.\*, **Hendrychová, D.\***, Voller, J., Řezníčková, E., Gucký, T., Kryštof, V. (2018): How Selective Are Pharmacological Inhibitors of Cell-Cycle-Regulating Cyclin-Dependent Kinases? *J Med Chem.* 61, 9105-9120. \*Sdílené prvoautorství

DH jako sdílený prvoautor publikace (40 %) provedla všechny biologické experimenty, které analyzují buněčný cyklus, a zoptimalizovala a provedla analýzu teplotní denaturace studovaných proteinů. Podílela se na manuskriptu vytvořením databáze biochemické selektivity komerčně dostupných inhibitorů cyklin-dependentních kinas.

**Příloha II:** **Hendrychová, D.**, Jorda, R., Kryštof, V. (2021): How selective are clinical CDK4/6 inhibitors? *Med Res Rev* 41, 1578-1598.

DH jako první autor publikace (70 %) sepsala literární přehled shrnující aktuální informace o buněčné odpovědi inhibice cyklin-dependentních kinas 4/6 a o selektivě jejich inhibitorů, které byly schváleny pro léčbu rakoviny.

**Příloha III:** Krajčovičová, S., Gucký, T., **Hendrychová, D.**, Kryštof, V., Sural, M. (2017): A Stepwise Approach for the Synthesis of Folic Acid Conjugates with Protein Kinase Inhibitors. *J Org Chem.* 82, 13530-13541.

DH jako spoluautor této publikace (25 %) zoptimalizovala a provedla biologické experimenty, které stanovují cytotoxické účinky folátových konjugátů s inhibitory cyklin-dependentních kinas a které ověřují jejich preferenční transport do nádorových buněk. Provedení experimentů sepsala v manuskriptu.

# PŘÍLOHA I

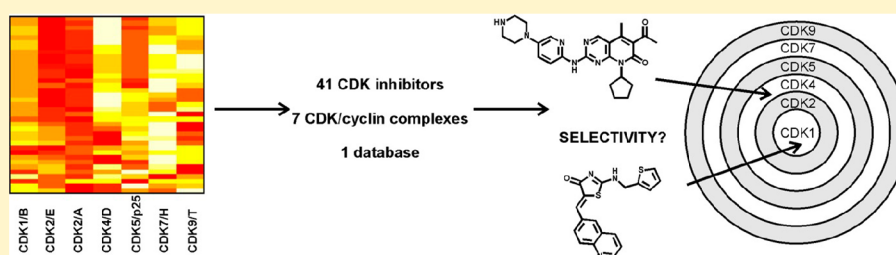
Jorda, R.\*, **Hendrychová, D.\***, Voller, J., Řezníčková, E., Gucký, T., Kryštof, V. (2018):  
How Selective Are Pharmacological Inhibitors of Cell-Cycle-Regulating Cyclin-Dependent  
Kinases? J Med Chem. 61, 9105-9120. \*Sdílené prvoautorství

## How Selective Are Pharmacological Inhibitors of Cell-Cycle-Regulating Cyclin-Dependent Kinases?

Radek Jorda,<sup>\*,#</sup> Denisa Hendrychová,<sup>#</sup> Jiří Voller, Eva Řezníčková, Tomáš Gucký, and Vladimír Kryštof<sup>1b</sup>

Laboratory of Growth Regulators, Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Palacký University and Institute of Experimental Botany ASCR, Šlechtitelů 27, 78371 Olomouc, Czech Republic

### Supporting Information



**ABSTRACT:** Cyclin-dependent kinases (CDKs) are an important and emerging class of drug targets for which many small-molecule inhibitors have been developed. However, there is often insufficient data available on the selectivity of CDK inhibitors (CDKi) to attribute the effects on the presumed target CDK to these inhibitors. Here, we highlight discrepancies between the kinase selectivity of CDKi and the phenotype exhibited; we evaluated 31 CDKi (claimed to target CDK1–4) for activity toward CDKs 1, 2, 4, 5, 7, 9 and for effects on the cell cycle. Our results suggest that most CDKi should be reclassified as pan-selective and should not be used as a tool. In addition, some compounds did not even inhibit CDKs as their primary cellular targets; for example, NU6140 showed potent inhibition of Aurora kinases. We also established an online database of commercially available CDKi for critical evaluation of their utility as molecular probes. Our results should help researchers select the most relevant chemical tools for their specific applications.

### INTRODUCTION

A substantial fraction of proteins are modified by phosphorylation catalyzed by protein kinases,<sup>1</sup> which represent the largest group of cellular targets for directed anticancer therapy. The human genome encodes 518 protein kinases, which regulate most cellular processes. However, the complexity of protein phosphorylation networks makes experimental studies aimed at dissecting the functions of individual kinases and identifying kinase substrates challenging. The use of various approaches such as RNA interference, chemical inhibitors, in vivo knockout mouse models, or CRISPR/Cas9 technology often leads to discrepancies or contradictions.<sup>2</sup>

An important criterion for a good chemical probe is biological selectivity for the principal target.<sup>3,4</sup> While the range of chemical probes targeting several protein kinases appears to be sufficient, with dozens of commercially available inhibitors for certain kinases, the selectivity information available is often incomplete or hard to find.<sup>5</sup>

Cyclin-dependent kinases (CDKs), together with other cell-cycle protein kinases (Aurora, polo-like, and checkpoint kinases), have been well validated as targets for cancer treatment; three inhibitors have already been approved as drugs.<sup>6</sup> The human CDK family comprises 20 members; some members have been described as essential regulators of the cell cycle (CDKs 1, 2, 4, 6), while others are involved in diverse

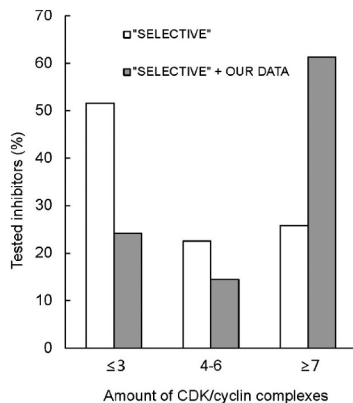
cell-cycle-independent processes, such as regulation of transcription (CDKs 7, 8, 9, 11, 12), splicing (CDK12), DNA repair (CDKs 2, 9, 12), migration and angiogenesis (CDK5), or spermatogenesis (CDK16). In addition, most CDKs have numerous substrates and often participate in quite distinct processes, such as CDK7 (serving as both a CDK-activation kinase and an activator of RNA polymerase II), CDK5 (regulating neuronal function and cell migration), CDK9 and CDK12 (activation of RNA polymerase II, DNA damage response), and CDK6 (cell cycle, kinase-independent transcriptional regulation).<sup>7–11</sup> Nevertheless, the precise biological function of some CDKs and cyclins has yet to be convincingly established.

Intensive research in the development of CDK inhibitors (CDKi) has led to the identification of many compounds that differ in selectivity toward members of the CDK family and in potency and cellular effects. Currently, over 100 different CDKi are commercially available for experimental work (Supporting Information, File S1). These CDKi are often classified according to their selectivity as described in the original literature, but in some cases the selectivity has not

**Received:** January 31, 2018

**Published:** September 20, 2018

been well studied. The classification of compounds discovered 10–20 years ago may be incorrect due to the limited knowledge of other CDKs at that time; many such “selective” CDK inhibitors were assayed against at most 3 kinases out of 20 (Figure 1). Some CDKi were classified as pan-selective (i.e.,



**Figure 1.** Histogram showing the percentage of tested “selective” CDK inhibitors against specified number of CDK/cyclin complexes. Formerly, 52% of “selective” CDK inhibitors (62 inhibitors included) were assayed against at most 3 CDK complexes out of 20 (only  $IC_{50}$ ,  $K_i$  and  $K_d$  data included) (white bars) while after complementation with our data (gray bars), 61% of CDK inhibitors were characterized by at least 7 CDK/cyclin complexes inhibited. Information about classification, alternative names, CAS numbers, kinase inhibition data, and references of inhibitors are available in the [Supporting Information, File S1](#).

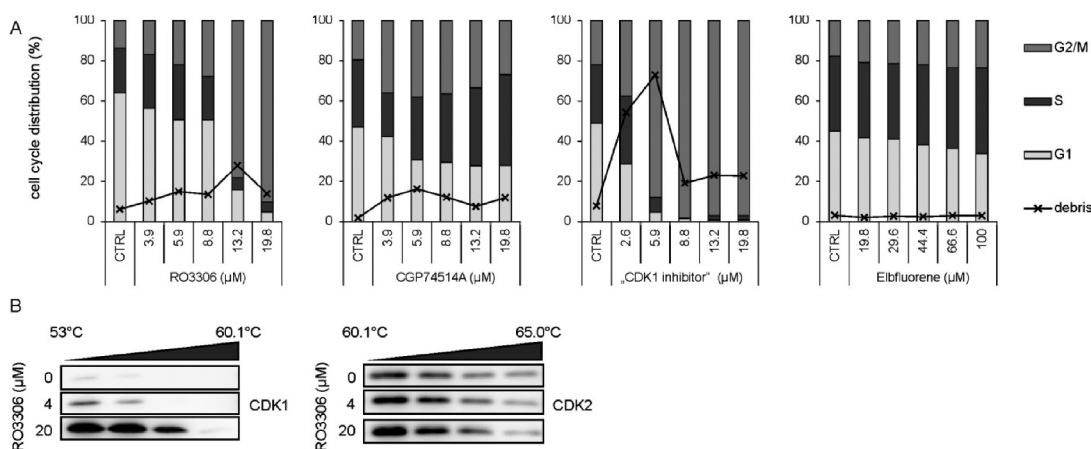
inhibiting most CDKs), whereas the rest were classified as selective inhibitors for a single CDK or two specific CDKs (usually referred to as dual inhibitors) ([Supporting Information, File S1](#)). The latter classification, in particular, merits closer inspection because in many cases there is little obvious mechanistic basis that could explain dual selectivity. In fact, in-depth characterizations of the selectivity of many such compounds have often been published later.<sup>12–19</sup> However, these characterizations have often been part of large studies addressing several kinase inhibitors and are not easy to find in the literature. Importantly, commercial catalogues frequently

do not reflect these updates, and if a scientist relies solely on information provided in the product datasheet, an unsuitable probe could easily be selected and purchased.

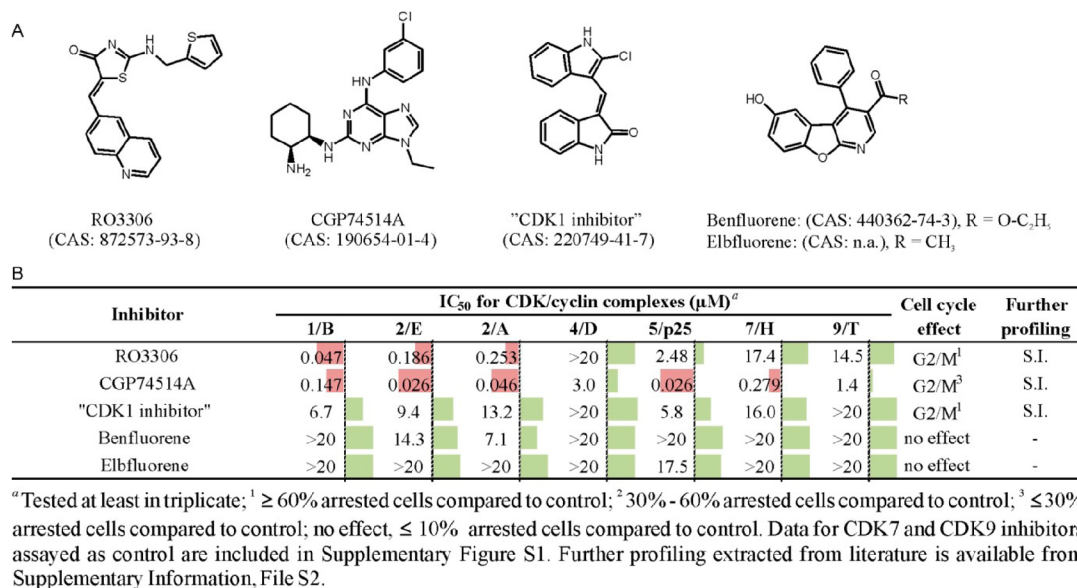
Our aim was to provide more information about inhibitors targeting cell-cycle CDKs that we considered to be insufficiently validated and to increase the available knowledge about these compounds as chemical tools; to do so we evaluated these inhibitors in terms of activity against a panel of CDKs 1, 2, 4, 5, 7, and 9 (Figure 1) and effects on the cell cycle of HCT-116, a cell line commonly used for phenotypic screen of cell-cycle modulators.<sup>20</sup> We did not evaluate inhibitors that display a pan-selective pattern of inhibition or whose inhibitory preferences for CDKs have been described in detail elsewhere (such as the clinically developed dinaciclib, SNS032, roscovitine, flavopiridol, and AT7519, which are also less selective). Our study further highlights discrepancies between kinase selectivity and the phenotype exhibited. These results should help researchers select the most relevant chemical tools for their specific applications.

## RESULTS

**CDK1 Inhibitors: RO3306 Is the Most Suitable CDK1 Chemical Probe to Date.** The strong reported CDK1/B inhibition by the purine-based CGP74514A (published  $IC_{50}$  = 31 nM)<sup>21</sup> led to a simple classification of this inhibitor as a CDK1-selective without any further investigation of other possible targets. The reported G2/M cell cycle arrest is partly in line with the expected target,<sup>22–24</sup> but our own results (the G2/M-arrested population increased only by 19% compared to control after 24 h treatment with 5.9  $\mu$ M compound) indicated that CDK1 is unlikely to be the sole target (Figure 2A). Indeed, our biochemical assays revealed that this inhibitor primarily targets CDK2 rather than CDK1 (Figure 3). These results are in agreement with broad kinase selectivity profiling using a radiometric filter-binding assay.<sup>12,16</sup> CGP74514A was tested at three concentrations against >300 kinases, and the results obtained indicate that it exhibits a pan-selective pattern of inhibition ([Supporting Information, File S2](#)). Interestingly, screening based on a thermal shift assay revealed that CGP74514A has a preference for group II of p21-activated kinases (PAKs), which are known nonspecific targets of purine-based CDK inhibitors.<sup>15,25</sup> Despite the availability of



**Figure 2.** (A) Effect of inhibitors designated CDK1-selective on the cell cycle of HCT-116 cells treated for 24 h: flow cytometric analysis (10 000 counts) of DNA stained with propidium iodide. (B) Immunoblot confirming thermal stabilization of CDK1 protein levels by RO3306 in HCT-116 cells after 4 h of treatment.



**Figure 3.** (A) Structures of inhibitors designated as CDK1 selective. (B) Kinase inhibition data expressed as IC<sub>50</sub> values complemented by graphic illustration of the selectivity for certain CDK. Red and green bars indicate CDK activity on a log<sub>10</sub> scale (midpoint corresponds to 1 μM, and maximum for red and green is 1 nM and 100 μM, respectively). Cellular phenotype is determined in HCT-116 cells treated for 24 h.

sufficient information about CGP74514A targeting CDK2, it has been used several times as a CDK1-specific chemical probe.<sup>24,26,27</sup> Some authors were aware that the identity of the cellular target of this inhibitor was unclear and therefore compared CGP74514A with RO3306,<sup>22–24</sup> another well-established CDK1 inhibitor (discussed below).

"CDK1 inhibitor" (compound **8a**; published IC<sub>50</sub> = 5.8 μM), was developed from a library of 2-indolinone derivatives based on the predicted binding to the homology model of CDK1;<sup>28</sup> however, further kinase inhibition or biological data for this compound have not been published. Our measurement confirmed its micromolar potency toward CDK1 but not the selectivity (Figure 3). Published data from a broad-spectrum kinase profiling of "CDK1 inhibitor" also revealed nonselective inhibition of several kinases;<sup>16</sup> importantly, CDK1 is not present among the most sensitive kinases (CDK1 ranks 103rd out of 292) (Supporting Information, File S2).<sup>12</sup> Nevertheless, this compound arrested HCT-116 cells in the G2/M phases (Figure 2A), but due to poor potency and due to the nonselective nature of "CDK1 inhibitor", the underlying mechanism for this arrest might not be the inhibition of CDK1. Another possible target is MLCK (11% residual activity with 10 μM compound),<sup>16</sup> the inhibition of which can cause similar mitotic defects and cytokinesis failure.<sup>29</sup>

The 1-aza-9-oxafluorenes benfluorene and elbfluorene have also been designated as CDK1-selective inhibitors.<sup>30,31</sup> The more effective elbfluorene inhibits CDK1 (published IC<sub>50</sub> = 4.2 μM), while inhibition of CDK2 and CDK4 was not observed at up to 100 μM.<sup>31</sup> However, our measurement did not confirm inhibition of CDK1 or of any other tested CDKs (Figure 3). In addition, we did not observe any effect on the cell cycle profile of the inhibitor-treated HCT-116 cells (Figure 2A).

The thiazolinone derivative RO3306<sup>32</sup> is probably the most frequently used chemical tool in studies investigating the role of CDK1.<sup>27,33,34</sup> Surprisingly, the selectivity profile of RO3306 has only been partially revealed; a recent article described

RO3306 potency only toward CDK1 and CDK2,<sup>35</sup> and partial kinase profiling data showed that CDK2/A and CDK9/T were only weakly inhibited.<sup>36</sup> Nevertheless, published data<sup>36</sup> demonstrate that RO3306 can also effectively inhibit other kinases from the CMGC group of kinome, especially DYRKs (Supporting Information, File S2). We complemented this kinase profile and confirmed the high selectivity of RO3306 for CDK1 (Figure 3).<sup>37</sup> Consistent with potent CDK1 inhibition, RO3306 treatment strongly arrested the cell cycle of the HCT-116 cell line in the G2/M phase (Figure 2A). This result has been described in many studies on different cell lines as usually leading to a substantial G2/M block or to cyclin B accumulation,<sup>23,24,33,38,39</sup> which clearly corresponds to the inhibition of CDK1 at the cellular level.

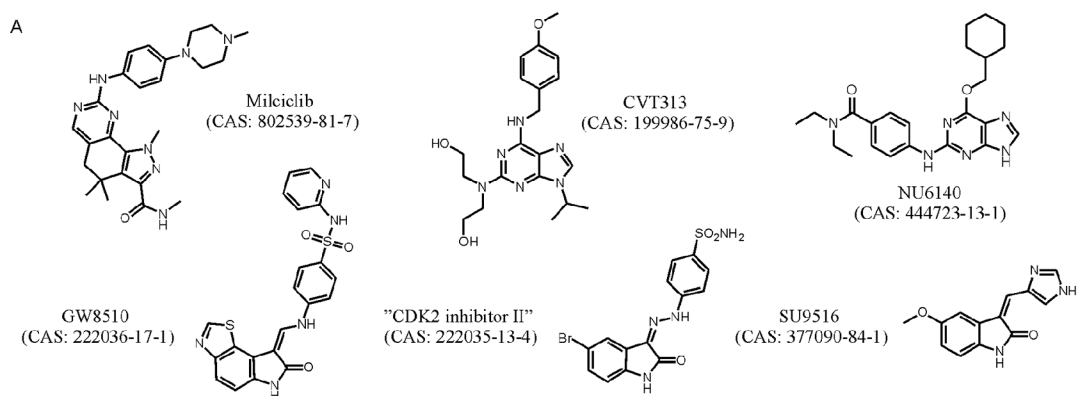
To further confirm the direct interaction of studied inhibitors with CDK1, we performed a cellular thermal shift assay (CeTSA), which is based on the ligand-induced thermal stabilization of target proteins<sup>40,41</sup> of HCT-116 cells treated with different concentrations of compounds that affect the cell cycle of these cells. Our data clearly showed that, in contrast to CGP74514A and "CDK1 inhibitor" (Supporting Information, Figure S2), only RO3306 can stabilize CDK1 expression levels in inhibitor-treated cells (Figure 2B).

The above-mentioned results strongly highlight RO3306 as the most suitable tool for pharmacological inhibition of CDK1, while CGP74514A should be classified as a pan-selective inhibitor. "CDK1 inhibitor", benfluorene, and elbfluorene were identified as being inactive toward CDKs.

**CDK2 Inhibitors: NU6140 Strongly Inhibits Aurora Kinases in Vitro.** Inhibitors that have been claimed to exhibit selectivity for CDK2 are the most numerous; however, most of them are designated as dual inhibitors due to the strong activities of these compounds toward the structurally related CDK1 and in some cases toward CDK5 and CDK9 (see Supporting Information, File S1).

Purine derivatives CVT313 (marketed as "CDK2 inhibitor III")<sup>42</sup> and NU6140 (marketed as "CDK2 inhibitor IV")<sup>43</sup>

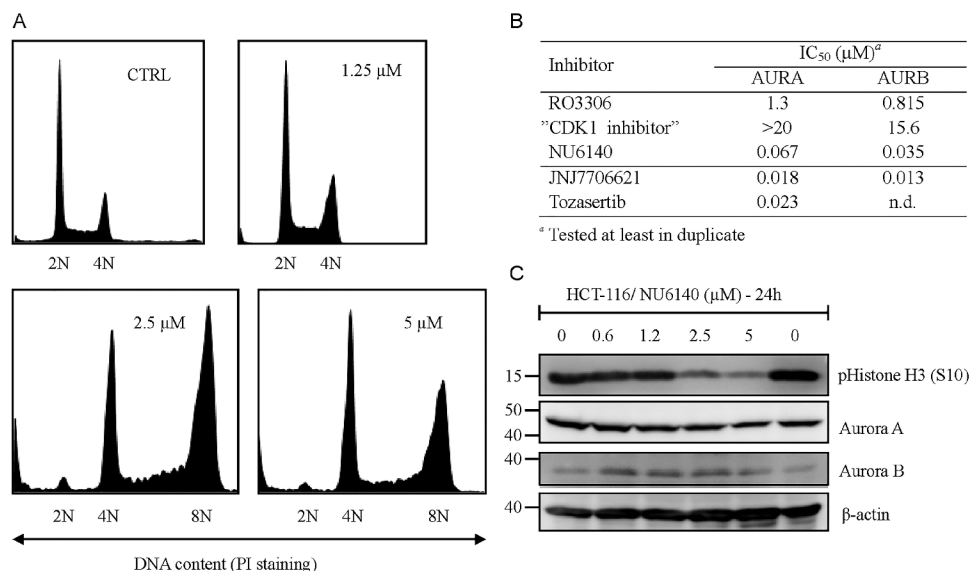




Inhibitor	IC <sub>50</sub> for CDK/cyclin complexes (μM) <sup>a</sup>							Cell cycle effect	Further profiling
	1/B	2/E	2/A	4/D	5/p25	7/H	9/T		
Miliciclib	1.2	0.590 <sup>1</sup>	0.109 <sup>1</sup>	0.220 <sup>1</sup>	0.383 <sup>1</sup>	0.270 <sup>1</sup>	7.7	G1↓ + G2/M <sup>2</sup> ↑	S.I.
CVT313	3.7	0.176 <sup>1</sup>	0.220 <sup>1</sup>	>20	0.419 <sup>1</sup>	9.2	2.3	G2/M <sup>3</sup>	S.I.
NU6140	5.8	1.1	0.407 <sup>1</sup>	0.940	8.8	2.3	5.1	G2/M <sup>1</sup> + 8N	S.I.
GW8510	0.049 <sup>1</sup>	0.003 <sup>1</sup>	0.003 <sup>1</sup>	0.139 <sup>1</sup>	0.007 <sup>1</sup>	0.317 <sup>1</sup>	0.543 <sup>1</sup>		-
"CDK2 inhibitor II"	1.3	0.031 <sup>1</sup>	0.041 <sup>1</sup>	2.8	0.738	19.7	1.1	G2/M <sup>3</sup>	-
SU9516	0.168 <sup>1</sup>	0.026 <sup>1</sup>	0.027 <sup>1</sup>	1.7	0.022 <sup>1</sup>	0.905	1.5	G2/M <sup>2</sup>	S.I.

<sup>a</sup>Tested at least in triplicate; <sup>1</sup> ≥ 60% arrested cells compared to control; <sup>2</sup> 30% - 60% arrested cells compared to control; <sup>3</sup> ≤ 30% arrested cells compared to control; no effect, ≤ 10% arrested cells compared to control. Arrows indicate dominant phenotypes at lower or higher concentrations. Data for CDK7 and CDK9 inhibitors assayed as control are included in Supplementary Figure S1. Further profiling extracted from literature is available from Supplementary Information, File S2.

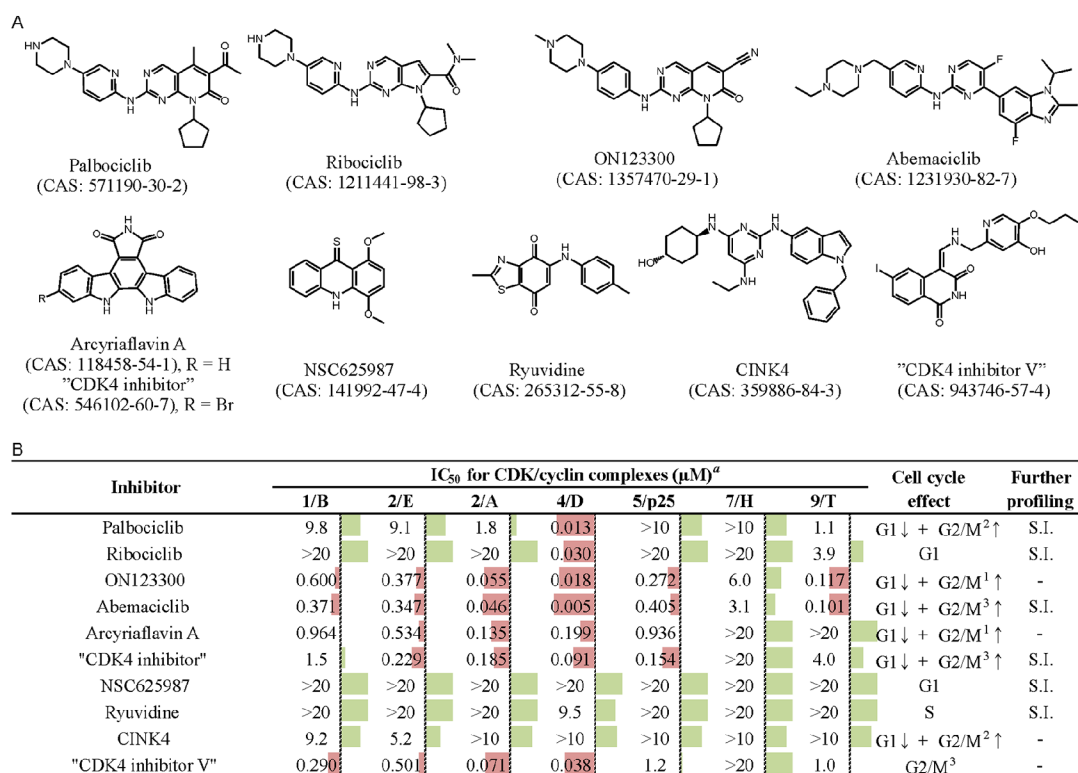
**Figure 4.** (A) Structures of inhibitors designated as CDK2 selective. (B) Kinase inhibition data expressed as IC<sub>50</sub> values complemented by graphic illustration of the selectivity for certain CDK. Red and green bars indicate CDK activity on a log<sub>10</sub> scale (midpoint corresponds to 1 μM; maximum for red and green is 1 nM and 100 μM, respectively). Cellular phenotype is determined in HCT-116 cells treated for 24 h.



**Figure 5.** (A) Effect of different concentrations of NU6140 on the cell cycle of HCT-116 cells treated for 24 h: flow cytometric analysis (10 000 counts) of DNA stained with propidium iodide. (B) Inhibition of Aurora kinases by different CDK inhibitors. JNJ7706621 (dual CDK/AUR inhibitor) and tozasertib (AURs inhibitor) were used as positive controls. (C) Immunoblotting analysis of Aurora kinases and phospho-histone H3 in HCT-116 cells treated with NU6140 for 24 h. β-Actin was used as a loading control.

inhibit CDK2 in a nanomolar range and exhibit selectivity over CDK1 and transcriptional CDKs (Figure 4). Nevertheless, we found that CVT313 also interacts with recombinant CDK5 (Figure 4), which is in line with published profiling.<sup>12</sup> In addition, cellular inhibition of CDK5 with CVT313 was confirmed by monitoring of phosphorylated FAK at S732 that

was shown to be a direct target of CDK5 (Supporting Information, File S2).<sup>44-46</sup> Both the purines arrested HCT-116 cells in the G2/M phase, but NU6140 treatment resulted in a significant tetraploid population (Figure 5A). This observation led us to hypothesize that the main target of NU6140 might not be CDK2 (determined IC<sub>50</sub> = 0.4 μM) but



<sup>a</sup>Tested at least in triplicate; <sup>1</sup> ≥ 60% arrested cells compared to control; <sup>2</sup> 30%–60% arrested cells compared to control; <sup>3</sup> ≤ 30% arrested cells compared to control; no effect, ≤ 10% arrested cells compared to control. Arrows indicate dominant phenotypes at lower or higher concentrations. Data for CDK7 and CDK9 inhibitors assayed as control are included in Supplementary Figure S1. Further profiling extracted from literature is available from Supplementary Information, File S2.

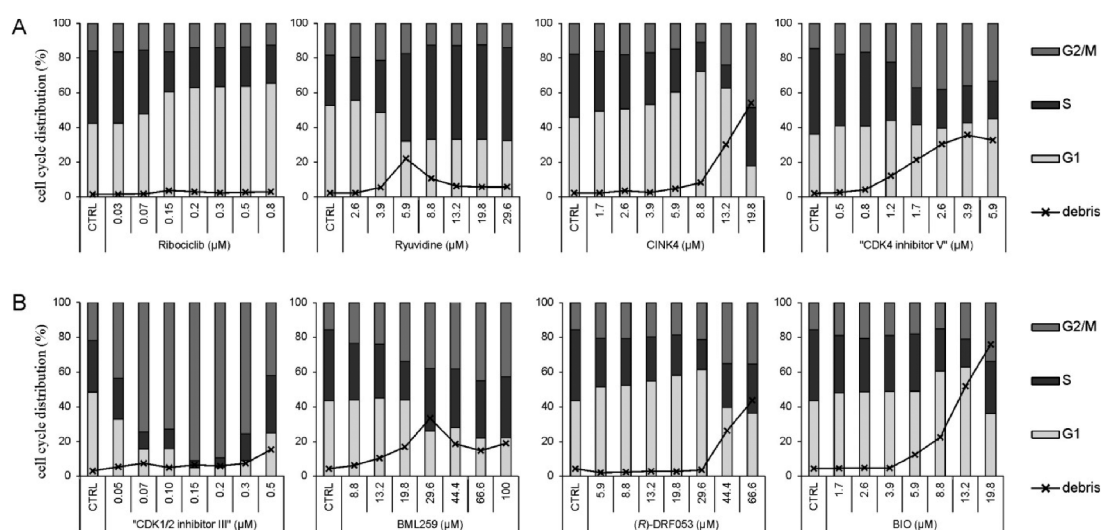
**Figure 6.** (A) Structures of inhibitors designated as CDK4 selective. (B) Kinase inhibition data expressed as IC<sub>50</sub> values complemented by graphic illustration of the selectivity for certain CDK. Red and green bars indicate CDK activity on a log<sub>10</sub> scale (midpoint corresponds to 1 μM; maximum for red and green is 1 nM and 100 μM, respectively). Cellular phenotype is determined in HCT-116 cells treated for 24 h.

another mitotic kinase, such as PLK or AURs. The screening data for NU6140 against a panel of 300 kinases suggest a possible explanation (Supporting Information, File S2).<sup>12</sup> While CDK2 was only weakly inhibited by this compound (CDK2 ranked 54th out of 300; 500 nM NU6140 caused 44% inhibition), all three Aurora kinases were substantially more sensitive (2nd, 16th, and 23rd ranks).<sup>12</sup> We therefore determined the IC<sub>50</sub> for AURs and found that the values were approximately 6–10 times lower than that for CDK2 (Figure 5B). To further confirm cellular inhibition of AURB, we performed immunoblotting analysis to examine phosphorylated histone H3, a direct substrate of AURB. NU6140 indeed decreased phosphorylation of H3-S10 in HCT-116 cells in a dose-dependent manner (Figure 5C). In addition, the structurally related 2,6-disubstituted purine reversine was described recently as an inhibitor of AURs.<sup>47</sup> Our findings thus provide novel insight into the possible mechanism of action of NU6140.

Indolinone derivatives GW8510 and "CDK2 inhibitor II" exhibit nanomolar potency for CDK2 (published IC<sub>50</sub> = 10–60 nM).<sup>48</sup> We found here that "CDK2 inhibitor II" has higher selectivity for CDK2 than for other members of the CDK family, whereas GW8510 showed strong activity against CDK5 and CDK1 (IC<sub>50</sub> ≈ 7 and 49 nM, respectively) (Figure 4) that was confirmed by dephosphorylation of FAK at S732 (CDK5 substrate) and durable G2/M arrest in treated CDK2-knockout HCT-116 cells (Supporting Information, Figure

S3). Both inhibitors increased the G2/M-arrested population of HCT-116 cells (Supporting Information, Figure S3). Unfortunately, usage of the more selective "CDK2 inhibitor II" as a chemical probe is limited due to its poor solubility (our own experience). Despite this limitation, in recent articles, "CDK2 inhibitor II" was used as a tool to highlight the role of CDK2 in the promotion of tumor proliferation and induction of radioresistance in glioblastomas<sup>49</sup> and in the phosphorylation of ligand-dependent progesterone receptor at S400,<sup>50</sup> histone methyltransferase Suv39H1 at S391,<sup>51</sup> and enhancer of zeste 2 (EZH2) at T416.<sup>52</sup> However, results of these studies should be interpreted with caution. First, the concentration range of inhibitor that was used to determine these effects was broad (70 nM to 4 μM). Second, profiling of a broader panel of kinases has not been reported. Lastly, many related indolinone derivatives are less selective.<sup>53</sup>

The indolinone SU9516 is one of a few inhibitors that have been well-profiled, including against different CDKs.<sup>12,54–56</sup> However, the preference of this inhibitor for CDK2 is not robust; our data revealed similar activity against CDK5/p25 (Figure 4) that was confirmed also in cells by dephosphorylation of pFAK(S732) (Supporting Information, Figure S3). This finding is in agreement with reported profiling, where CDK5 was seen to be the most sensitive out of 300 tested kinases (Supporting Information, File S2).<sup>12</sup> Cell cycle analysis of inhibitor-treated HCT-116 cells indicated G2/M arrest (Supporting Information, Figure S3), which is consistent with



**Figure 7.** Cellular effects of commercially available CDK inhibitors marketed as “CDK4 selective” or “dual” do not always correspond to expected phenotype. Shown are cell cycle analyses of HCT-116 cells treated for 24 h with CDK inhibitors from the same group (panel A, marketed as CDK4 selective; panel B, designated dual inhibitors). Shown is flow cytometric analysis (10 000 counts) of DNA stained with propidium iodide.

data on other cell lines, namely, T24, SPC-A1, or RKO.<sup>54,56</sup> Moreover, significant G2/M block in SU9516-treated HCT-116 cell lacking CDK2 showed that SU9516 also targets CDK1 in cells (Supporting Information, Figure S3).

Milciclib (PHA848125) was reported to uniquely inhibit CDK2/A with 10-fold higher potency than for CDK2/E (published  $\text{IC}_{50}$  = 45 nM and 363 nM, respectively);<sup>57</sup> however, due to nanomolar inhibition of tropomyosin receptor kinases (TRKs), milciclib has also been designated a dual CDK-TRK inhibitor.<sup>58</sup> Our measurements confirmed the published data but revealed that milciclib can also moderately inhibit CDK4 (Figure 4). This finding is probably associated with the structural similarity of this compound to the CDK4-selective palbociclib (PD0332991) and ribociclib (LEE011) (Figure 6; Supporting Information, Figure S8). Cellular inhibition of CDK4 is evident from the analysis of the cell cycle, especially at low inhibitor concentrations, which arrest HCT-116 cells in the G1 phase. Conversely, higher doses lead to G2/M arrest, probably due to effective inhibition of CDK2 (Supporting Information, Figure S4). Similar effects were also reported with ovarian cell lines.<sup>58</sup>

Our evaluation showed that no commercially available inhibitor designated as CDK2 selective should be used as a CDK2 probe in cellular experiments. The compounds have either low solubility (“CDK2 inhibitor II”), low CDK selectivity (GW8510, SU9516, CVT313), or heterogeneous cellular effect (milciclib and NU6140).

**Clinical CDK4/6 Inhibitors Are Selective Chemical Tools.** CDK4 and CDK6 exhibit certain structural differences in comparison with other CDKs, and inhibitors of these kinases are usually much more selective than other CDKi.<sup>59</sup> This selectivity probably contributed to the successful approval of palbociclib (PD0332991),<sup>60,61</sup> ribociclib (LEE011),<sup>62</sup> and abemaciclib (LY2835219)<sup>63</sup> for the treatment of advanced breast cancer. Although these drugs share some pharmacophores (Figure 6), recent data pointed at some distinctions that confirmed their differences related to their off-targets.<sup>13,18,64–67</sup> Palbociclib, but not ribociclib, has been shown to specifically interact with several lipid kinases PIP4K2A/B/C and to increase the number of autophagic

vesicles via inhibition of AKT signaling in lung cancer.<sup>67</sup> Autophagy induced by palbociclib was observed also in hepatocellular carcinoma via the PP5/AMPK axis, while ribociclib and abemaciclib had minimal effects in this model.<sup>68</sup> Further study revealed that in contrast to palbociclib and ribociclib, abemaciclib directly inhibits GSK3 $\alpha/\beta$  and CAMKII $\gamma/\delta$  kinase activity and potently activates  $\beta$ -catenin-dependent WNT signaling.<sup>64</sup> Non-kinase binding studies and kinome interaction analyses revealed that abemaciclib inhibits also CDK9,<sup>13</sup> but cellular studies did not find any changes in phosphorylation of CTD RNA polymerase II (a CDK9-dependent process) in different cell lines.<sup>69,70</sup> And importantly, unlike palbociclib and ribociclib, abemaciclib exhibits cellular toxicity also in Rb-deficient cell lines in vitro, highlighting the possibility of having different targets.<sup>66,71</sup>

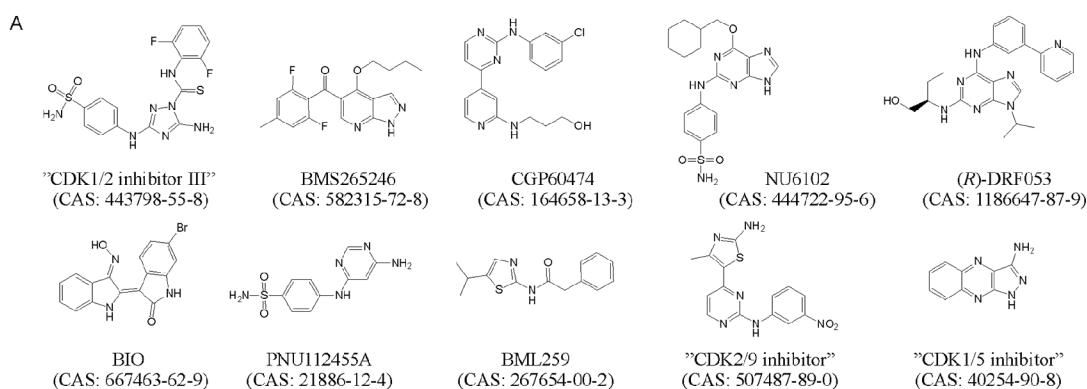
We also performed the cell cycle analysis of inhibitor-treated HCT-116 to confirm the selectivity of these CDK4/6 inhibitors and expected phenotype (G1 block without significant apoptosis in Rb-positive cell lines). As we supposed, palbociclib and ribociclib arrested the cell cycle in G1 phase in nanomolar concentrations (Figure 7; Supporting Information, Figure S4).

Micromolar concentrations of palbociclib and abemaciclib, but not ribociclib increased G2/M population (Supporting Information, Figure S5), which is in agreement with previous reports.<sup>71,72</sup> Nevertheless, micromolar concentrations of these drugs do not fall within therapeutically relevant doses, and therefore only concentration of  $<1 \mu\text{M}$  should be used when targeting CDK4/6 probe.<sup>73–75</sup>

Mostly palbociclib and ribociclib have frequently been used as chemical probes in numerous biological studies; however, other “CDK4/6-selective” inhibitors are also commercially available.

NSC625987 (sold as “CDK4 inhibitor II”)<sup>76</sup> is a thioacridone derivative of 3-amino-9-thio(10*H*)-acridone (3-ATA), one of the first inhibitor published as having a preference for CDK4 over CDK1/2. Nevertheless, our measurements did not reveal any affinity to the assayed CDKs at concentrations up to  $20 \mu\text{M}$  (Figure 6). Our findings are consistent with published kinase profiling data (Supporting



**B**

Published preference	Inhibitor	IC <sub>50</sub> for CDK/cyclin complexes (μM) <sup>a</sup>							Cell cycle effect
		1/B	2/E	2/A	4/D	5/p25	7/H	9/T	
1/2	"CDK1/2 inhibitor III"	0.002	0.003	0.002	0.059	0.0002	0.066	0.030	G2/M <sup>1</sup>
1/2	BMS265246	0.014	0.006	0.071	0.222	0.258	1.6	1.8	G2/M <sup>2</sup>
1/2	CGP60474	0.026	0.003	0.004	0.216	0.010	0.200	0.013	G2/M <sup>3</sup>
1/2	NU6102	0.146	0.022	0.014	0.184	0.117	2.5	4.1	G2/M <sup>2</sup>
1/5	"CDK1/5 inhibitor"	9.7	5.6	4.4	>20	13.7	>20	14.1	no effect
1/5	( <i>R</i> )-DRF053	3.7	0.093	0.290	>20	0.215	0.822	8.0	G2/M <sup>3</sup>
2/5	BIO	0.274	0.014	0.069	0.527	0.041	3.5	0.450	G2/M <sup>3</sup>
2/5	PNU12455A	5.3	1.9	0.946	>20	4.4	>20	>20	no effect
2/5	BML259	1.7	0.195	0.353	20.4	0.458	0.637	3.4	G2/M <sup>3</sup>
2/9	"CDK2/9 inhibitor"	0.145	0.010	0.010	0.655	0.188	0.168	0.051	G2/M <sup>3</sup>

<sup>a</sup> Tested at least in triplicate; <sup>1</sup> ≥ 60% arrested cells compared to control; <sup>2</sup> 30% - 60% arrested cells compared to control; <sup>3</sup> ≤ 30% arrested cells compared to control; no effect, ≤ 10% arrested cells compared to control. Data for CDK7 and CDK9 inhibitors assayed as control are included in Supplementary Figure S1.

**Figure 8.** (A) Structures of inhibitors showing preference for two CDKs (designated as dual). (B) Kinase inhibition data expressed as IC<sub>50</sub> values complemented by graphic illustration of the selectivity for certain CDK. Red and green bars indicate CDK activity on a log<sub>10</sub> scale (midpoint corresponds to 1 μM; maximum for red and green is 1 nM and 100 μM, respectively). Cellular phenotype is determined in HCT-116 cells treated for 24 h.

Information, File S2), in which none of the 234 tested kinases were inhibited with more than 50% efficacy by 10 μM NSC625987.<sup>16</sup> In addition, our cell cycle analysis in inhibitor-treated cells reveal only moderate G1 phase arrest accompanied by massive apoptosis (Supporting Information, Figure S4), further disqualifying NSC625987 from being a suitable chemical probe for CDK4.

Ryuvidine ("CDK4 inhibitor III"), a derivative of benzothiazole, was reported to weakly but selectively inhibit CDK4 (published IC<sub>50</sub> = 6 μM);<sup>77</sup> however, there are no published results that show cellular inhibition of CDK4 by this compound. Our measurement confirmed micromolar activity toward CDK4, but due to the limited solubility of this inhibitor, we could not record IC<sub>50</sub> value with other CDKs (IC<sub>50</sub> > 20 μM) (Figure 6). Published kinase profiling of ryuvidine (Supporting Information, File S2) revealed that none of the 300 kinases tested were inhibited with more than 40% efficacy.<sup>12,16</sup> Our cell cycle analysis did not show G1 arrest in inhibitor-treated HCT-116 cells (Figure 7); however, a rather unexpected accumulation of cells in the S phase was observed (increased by 15% compared to the control), which is not typical of CDKi and therefore suggests inhibition of other targets. Consistent with this finding, recent work has shown that ryuvidine strongly inhibits the lysine methyltransferase protein SETD8 (IC<sub>50</sub> = 0.5 μM),<sup>78</sup> inhibition of which results in cell cycle defects in the S and G2/M phases.<sup>79</sup>

The compound CINK4 (available as "CDK4/6 inhibitor IV") was reported to inhibit CDK4 in micromolar ranges;<sup>80</sup>

however, our data also revealed measurable inhibition of CDK1 and CDK2 (Figure 6), discouraging its use as a specific probe. Broader selectivity toward CDKs was further confirmed by flow cytometric analysis of inhibitor-treated HCT-116 cells; we documented significant G1 arrest upon treatment with lower doses of this compound but clear G2/M arrest with higher doses (>10 μM) (Figure 7).

Indolocarbazoles acryiaflavin A<sup>81</sup> and its brominated derivative sold as "CDK4 inhibitor"<sup>82</sup> are structurally related to the multikinase inhibitor staurosporine. Our data confirmed the preference of acryiaflavin A and "CDK4 inhibitor" for CDK4 (Figure 6), but both compounds also inhibited CDK2 and CDK5 at nanomolar levels (Figure 6). Published results for "CDK4 inhibitor" from broad-spectrum kinase profiling (Supporting Information, File S2) showed targeting of CDK4 and CDK6 (9th and 5th rank, respectively, among the 300 kinases tested) but also confirmed nonspecificity throughout the kinome.<sup>12</sup>

Cell cycle analyses confirmed the pan-selectivity of both compounds; while low doses of inhibitor lead to G1 arrest of HCT-116 cells, higher doses cause accumulation of cells in G2/M phases (Supporting Information, Figure S4). This finding has also been documented for other indolocarbazole derivatives.<sup>81</sup> On the basis of our investigation, we cannot recommend the use of these two inhibitors as specific chemical tools.

Isoquinolinone-based "CDK4 inhibitor V" is described as a selective nanomolar inhibitor of CDK4;<sup>83</sup> however, this

description is not consistent with our measurements. While we indeed confirmed nanomolar inhibition of CDK4 ( $IC_{50} = 38$  nM), we found that this compound also inhibits CDK1 and CDK2 at a submicromolar range (Figure 6). Analysis of the effects of this compound on the cell cycle further confirmed our findings; treatment of HCT-116 cells with this inhibitor resulted in G2/M arrest of cell cycle (Figure 7).

ON123300, which is structurally related to palbociclib, is known for its preference for not only CDK4 (published  $IC_{50} = 4$  nM) but also AMPK-related protein kinase 5 (ARKS) (published  $IC_{50} = 4$  nM).<sup>84</sup> Our data revealed that ON123300 is also able to strongly inhibit CDK2 (Figure 6). An additional biochemical screening revealed that ON123300 is a nanomolar inhibitor of other kinases such as FLT3, FYN, Abl, and PDGFR $\beta$ .<sup>84</sup> When used at nanomolar doses, the effect of this compound on HCT-116 cells is associated with the inhibition of CDK4; however, using higher doses ( $>1$   $\mu$ M) leads to the accumulation of cells in the G2/M phases (Supporting Information, Figure S4), which was also independently reported in lymphoma cells.<sup>85</sup>

Taken together, our analysis revealed that only few compounds (palbociclib, ribociclib, and abemaciclib) cause typical CDK4-specific cellular phenotype (G1 block without induction of apoptosis) in treated cells in a dose-response manner, whereas others display lower CDK4/6 selectivity (ON123300, “CDK4 inhibitor”, CINK4, arcyriaflavin A, and “CDK4 inhibitor V”) or probably another mechanism of action (NSC625987 and ryuidine).

**Dual Inhibitors: More than Just Two Targets.** We were further interested in CDKi that were classified as dual inhibitors, suggesting lower selectivity; such compounds should be avoided by researchers who need a selective chemical tool. Our results actually provide evidence that none of the studied compounds selectively inhibit only two CDKs in biochemical assays (Figure 8). Moreover, only three of them, namely, BMS265246,<sup>86</sup> “CDK2/9 inhibitor”,<sup>87</sup> and BML259,<sup>88</sup> exhibit the highest potency for the two CDKs that are designated as the major targets of these inhibitors. We found that some other CDKs are inhibited nearly to the same extent (e.g., the “CDK2/9 inhibitor” also inhibits CDK5). All these compounds, together with “CDK1/2 inhibitor III”<sup>89</sup> and CGP60474,<sup>90</sup> should be reclassified as pan-selective.

Several other inhibitors were reported to effectively inhibit not only CDKs but also other kinases, which therefore raises concerns regarding their use as selective CDK probes. For example, the indirubin derivative BIO (6-BIO)<sup>91,92</sup> inhibits glycogen synthase kinase-3 $\beta$ , while the purine (R)-DRF053 exhibits potent activity toward casein kinase CK1 $\delta$ .<sup>93</sup> “CDK1/5 inhibitor”<sup>94</sup> and PNU112455A<sup>95</sup> exhibit limited activity against CDKs.

To further verify the selectivity of investigated inhibitors, we performed immunoblot analysis of different CDK substrates (namely, pFAK-S732 and pRNA polymerase II as substrates of CDK5 and CDK7/9, respectively) in treated HCT-116 cells. Our results clearly showed that “CDK1/2 inhibitor III”, BMS265246, and CGP60474 (all designated as CDK1/2 inhibitors) also inhibit CDK5 in cells (Supporting Information, Figure S6) and confirmed results from biochemical assays. Oppositely, relatively high affinity of “CDK1/2 inhibitor III” and CGP60474 for transcriptional CDKs from kinase assays did not express significantly in the dephosphorylation of RNA polymerase II.

Further, we confirmed the preference of these inhibitors for CDK1 and CDK2 in cells; our data from flow cytometry on treated HCT-116<sup>CDK2-/-</sup> cells corresponded with expected phenotype that co-depletion of CDK1/2 together causes the greatest increases in G2/M cell cycle (Supporting Information, Figure S7).<sup>96</sup> In the same experiment we also revealed that CDK inhibitors declared to not inhibit other CDKs (“CDK2/9 inhibitor” and BML259) potentially inhibit CDK1 and CDK5 in cells (Supporting Information, Figures S6 and S7).

NU6102 is a purine-based compound bearing an O<sup>6</sup>-cyclohexylmethyl moiety and was developed by the optimization of NU6027 and NU2058 (also commercially available).<sup>97,98</sup> NU6102 shows a binding mode different from other CDK inhibitors with a purine scaffold (such as roscovitine, CR8, or H717); one can therefore expect this compound to also exhibit substantially different potency and selectivity. NU6102 was formerly described as a nanomolar inhibitor of CDK1/2 (published  $IC_{50} = 9$  and 6 nM),<sup>98,99</sup> but additional studies revealed that NU6102 exhibits high selectivity for CDK2 over other CDK-family members, including CDK1.<sup>34,35,37,100</sup> In addition, the selectivity of NU6102 in cells was confirmed by the differences observed in the cytotoxicity of NU6102 toward cells lacking CDK2 compared to wild-type cells,<sup>101,102</sup> and further study showed that NU6102's specificity over CDK1 in the *Xenopus* homologs of these kinases.<sup>34</sup>

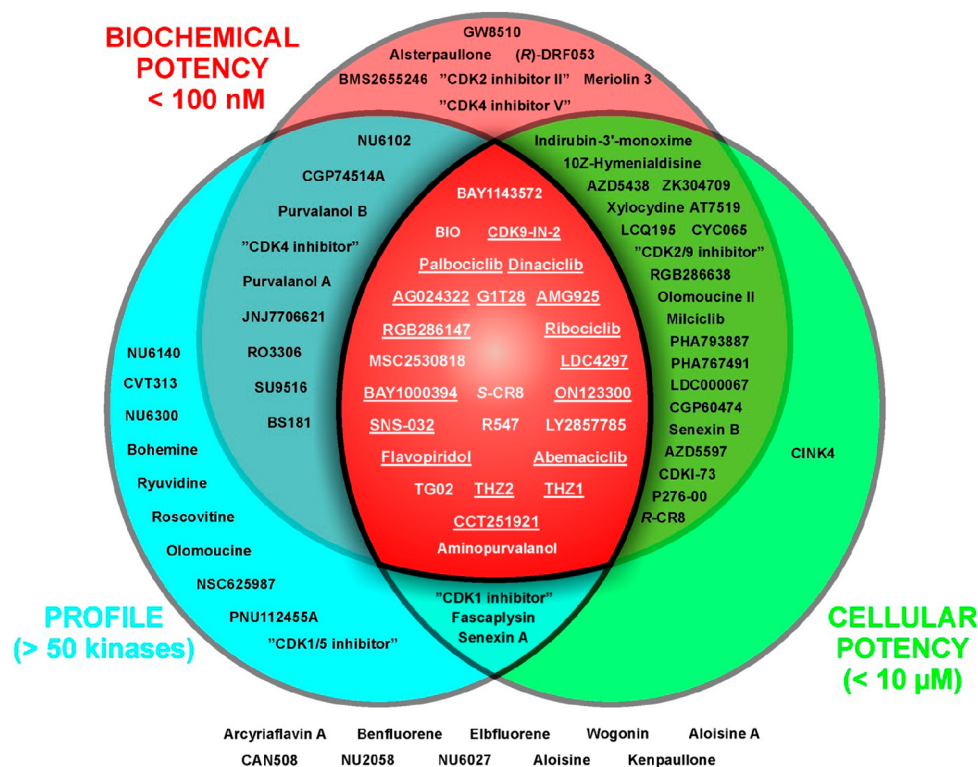
Our data confirmed the reported preference for CDK2 and the weak activity against transcriptional CDKs (Figure 8). Treatment of HCT-116 cells resulted in rapid G2/M arrest (Supporting Information, Figure S4), as reported previously in other cell lines.<sup>34,103</sup> Nevertheless, flow cytometric analysis of NU6102-treated HCT-116 cells lacking CDK2 revealed significant G2/M block suggesting CDK1 inhibition (see Supporting Information, Figure S7).

Interestingly, HCT-116 cells with acquired resistance to NU6102 exhibit upregulated CDK6 activity, suggesting functional compensation between these two slightly divergent kinases.<sup>101</sup> NU6102 has been further optimized to develop inhibitor 73, which is 2000-fold less active toward CDK1 (published  $IC_{50} = 86$   $\mu$ M) while retaining high potency against CDK2 (published  $IC_{50} = 0.044$   $\mu$ M).<sup>100</sup> Unfortunately, this compound, which is the most CDK2-selective inhibitor to date, is not commercially available yet, and we could not include it in our study. Another structurally related and commercially available compound, NU6300, has been described as the first covalent CDK2 inhibitor.<sup>104</sup>

To sum up, results from cellular experiments and biochemical profiling clearly discriminate the use of most dual CDKi as selective probes. Some of these CDKi indeed inhibit CDKs reported as main targets in nanomolar doses; nevertheless other CDK complexes are often inhibited to the same extent. Further, some inhibitors have preference for another cellular target (BIO and (R)-DRF053) or display poor potency (“CDK1/5 inhibitor”, PNU112455A) and one should avoid their application because it would be unreliable to confidently address CDK inhibition in cells.

**Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor Database.** In order to facilitate access to critical information about the utility of commercial CDK inhibitors as molecular probes, we created the cyclin-dependent kinase inhibitor database (CDKiDB) (<http://rustreg.upol.cz/CDKiDB>). At present, it comprises 101 compounds identified by a survey of vendors' catalogues. The following information about the individual inhibitors was





**Figure 9.** Distribution of commercially available CDK inhibitors according to their fitness factors,<sup>4</sup> including biochemical potency (availability of  $IC_{50}$ ,  $K_i$ , or  $K_d$  values for at least one CDK), cellular potency related to direct inhibition of CDK/s in cells (e.g., dephosphorylation of retinoblastoma protein or RNA polymerase II (for CDK7 and CDK9 inhibitors), cell cycle arrest, BrdU incorporation or 7dF3 cell based assay (for CDK8/19 inhibitors), and selectivity profiling across the kinome. Underlined inhibitors also meet stricter criteria of cellular potency (<500 nM) and profiling on the panel of at least 125 kinases.<sup>106</sup> Inhibitors K03861, CDK-IN-2, CDK9-IN-6, butyrolactone I, PHA690509, 3-ATA, "CDK1/2 inhibitor III", BML259, WHIP180, CDK9-IN-2, indirubin, indirubin-5-sulfonic acid, 6-iodoindirubin-3'-monoxime, alosine B, and hymenidin are not included due to lack of information in one of the categories. Additional information about compounds, their alternative names, CAS numbers, kinase inhibition data, and references are available in the [Supporting Information, File S1](#).

compiled from original articles or reviews: chemical structure, CAS numbers and synonyms, SMILES, activities against the individual CDKs, total number of studied kinases, and references. The inhibitors are classified according to their CDK preference(s) given in literature and/or by vendors. We provide a critical comment on this classification for 31 inhibitors evaluated in this study. We encourage readers to join our effort to compile such information from both literature and unpublished data.

## DISCUSSION AND CONCLUSION

Currently, about 100 CDK inhibitors of rather diverse chemical structures (for a dendrogram see [Supporting Information, Figure S8](#)) are commercially available, apparently providing a plethora of tools for chemical biology; however the quality of these compounds, with respect to biochemical potency, selectivity, and expected cellular effects, can differ substantially. A useful chemical tool should meet several criteria, including a sufficient selectivity profile (>50-fold in biochemical assays of at least 125 kinases) and biochemical (<100 nM) and cellular (<500 nM) potency. These features have been defined as important "fitness factors" of chemical tools as defined recently.<sup>4,105,106</sup> Unfortunately, many CDK inhibitors do not meet at least one of these factors ([Figure 9](#)). We have measured the inhibitory profile of 41 compounds (31 studied + 10 control CDK inhibitors) to gain information

about their potency and selectivity of these compounds toward CDKs 1, 2, 4, 5, 7, and 9 (for summary heatmap see [Supporting Information, Figure S1](#)), and these results were further compared with data available in the literature. Furthermore, we analyzed the effects of inhibitors on the cell cycle in the HCT-116 cell line and attempted to link these effects to the biochemical profile.

We found that out of the 31 inhibitors studied, only palbociclib, ribociclib, and abemaciclib meet the above fitness factors and can be used as CDK4-selective probes; application of the other studied CDK4 inhibitors could be problematic. These results clearly reflect the clustering of CDK inhibitors according to CATDS (concentration- and target-dependent) score reported recently by Klaeger et al.<sup>18</sup> Other candidates from different classes, namely, NU6102 and "CDK2 inhibitor II", also showed good performance across two fitness factors, but the cellular potency was poor or limited. Nevertheless, only these two inhibitors exhibited reasonable selectivity for CDK2 and can be used as CDK2 probes. Alternatively, the irreversible CDK2 inhibitor NU6300 is available for studies. Although biochemical assays have revealed additional interactions with other kinases, there is little evidence of significant off-target activity of NU6300 in cells.<sup>104</sup> Our comparison of the selectivity profiles of the tested CDK1 inhibitors clearly shows that RO3306 is the most suitable chemical tool; no other compound exhibited such high selectivity for CDK1

(~4-fold). Furthermore, our results provide evidence that no dual inhibitor selectively inhibits only two of the assayed CDK complexes; they usually exhibit broader spectra of inhibition. We also showed that CVT313 and GW8510, both designated as CDK2 inhibitors, also exhibit high potency toward CDK5. The use of other compounds, such as “CDK1/5 inhibitor”, CINK4, benfluorene, elbfluorene, PNU112455A, and NSC625987, to study processes linked with CDKs should be strictly avoided due to the poor inhibition of CDKs by these compounds. Our CDK profiling has identified inhibitors that should be reclassified as pan-selective (e.g., CGP74514A, SU9516, and “CDK4 inhibitor V”). Moreover, some compounds did not inhibit CDKs as a main cellular target, despite original reports (e.g., “CDK1 inhibitor” and NU6140). While the major target of “CDK1 inhibitor” remains to be identified, our results provide evidence that NU6140 is a potent inhibitor of Aurora kinases (Figure 5).

Most CDKi also inhibit other protein kinases; in many cases, the compounds exhibit even higher affinity for these nonselective targets. Typical examples are BIO, ON123300, and milciclib, which are also potent inhibitors of GSK3, ARKS, and TRK, respectively.<sup>58,84,91</sup> Kinome-wide selectivity data are unavailable for most compounds, and the lack of these data could be a factor that limits the use of these compounds in chemical biology. While some CDKi have indeed been profiled, the results are often buried in supplementary files of articles that do not focus directly on CDKs and are therefore hard to find.<sup>12–17,19</sup> The available selectivity profiles could reveal potential nonspecific targets and thus improve the interpretation of obtained results; however, a lack of general awareness of the existence of these selectivity profiles seems to be a limiting factor. Additionally, these inhibitors are often assayed in single, sometimes suboptimal dose, which does not provide enough information and could limit the use of these compounds. For example, profiling of “CDK1/2 inhibitor III” was conducted at a 500 nM concentration, at which concentration more than half of the 300 kinases tested were inhibited with efficacy of >50%.<sup>12</sup> With respect to the strong cellular potency, a lower concentration would be more suitable and would filter out weakly targeted kinases.

A literature survey revealed that at least 47 CDKi have been profiled against more than 50 kinases (Figure 9 and Supporting Information, File S1). These data revealed information about additional kinases that might also be inhibited in cells, which could therefore interfere with the interpretation of the results of cellular experiments. Typical examples include p21-activated kinases (PAKs) or casein kinases (CK1), which are inhibited by purine-based CDKi such as CGP74514A and (R)-DRF053 (Supporting Information, Files S2 and S3).<sup>107</sup> Notably, roscovitine and CR8 were initially believed to be pan-CDK inhibitors;<sup>108</sup> however, subsequent studies have demonstrated that both these compounds also effectively inhibit CK1 and have been referred to as dual CDK/CK1 inhibitors.<sup>17,109,110</sup>

In addition to nonspecific kinase targets, unrelated targets can also complicate the delineation of observed cellular effects.<sup>111</sup> Non-protein kinase targets can be isolated, for example, using affinity chromatography on immobilized inhibitors; this approach led to the identification of pyridoxal kinase as a nonspecific target of roscovitine.<sup>112</sup> Dinaciclib was found to interact with the bromodomain testis-specific protein BRDT, a member of the BET family of bromodomains, via a hinge-binding scaffold;<sup>113</sup> however, this binding occurred at clinically irrelevant doses. Bromodomain-containing proteins

might therefore be general targets of kinase inhibitors, as also shown recently for some clinically tested drugs, such as fedratinib and volasertib.<sup>114</sup> Ruvudine (“CDK4 inhibitor III”), one of the compounds studied in this paper, was shown in 2014 to inhibit the lysine methyltransferase SETD8 at clinically relevant doses.<sup>78</sup> These examples highlight the possibility of obtaining misleading conclusions with nonselective inhibitors, as previously discussed. For example, SB203508 was originally developed as a p38 $\alpha$  kinase inhibitor but was found to interact also with CKI.<sup>115</sup>

Since most CDKs in our biochemical panel regulate the cell cycle, their selective inhibition should influence the distribution of cell populations in different phases. We therefore analyzed cell cycle effects in inhibitor-treated HCT-116 cells. A sharp G2/M arrest can indicate interactions with cell cycle-regulated kinases;<sup>20</sup> however, such a finding can sometimes be wrongly interpreted as a result of CDK1 inhibition. Only four of the studied compounds, including RO3306 and “CDK1/2 inhibitor III”, which are potent CDK1 inhibitors, were able to strongly (>80%) induce G2/M arrest (Figures 2, 5 and 7). In contrast, G2/M arrest caused by CDK1 inhibitors is probably not linked to CDK1 as the cellular effects were observed at doses much lower than the biochemical IC<sub>50</sub> value of this compound. Surprisingly, the cellular effect of NU6140 seems to be related to the inhibition of Aurora kinases but not of CDK1 (Figure 5).

A majority of the tested inhibitors caused slight, but dose-dependent, accumulation of cells in the G2/M phases, suggesting more complex cellular effects. Surprisingly, this observation was made not only for CDK2 or dual inhibitors but also for “CDK4 inhibitor V” and CGP74514A (a CDK1 inhibitor). Interestingly, some compounds induce dose-dependent accumulation of cells in the G1 phase (up to a certain concentration), which is converted to a G2/M arrest upon treatment with higher doses. We assume that this effect is caused by strong cellular inhibition of CDK4 with low doses of compound, while higher doses also effectively inhibit CDK1 or CDK2. This phenomenon is observed for those CDKi that exhibit nanomolar affinity for CDK4 but do not have a high selectivity index, namely, ON123300, “CDK4 inhibitor”, CINK4, and milciclib.

It is evident that information about selectivity is crucial when choosing high-quality chemical tools, and it is important to avoid using nonoptimized and poorly profiled probes. Biochemical profiling assays with purified kinases should be complemented with *in vitro* phenotypic assays. Further profiling by different techniques, such as surface plasmon resonance, isothermal calorimetry, thermal denaturation assays, cellular thermal shift assays, microscale thermophoresis, mobility shift assays, and affinity chromatography coupled with proteomics, will contribute to the correct validation of these inhibitors as chemical tools and to the identification of possible nonspecific targets among unrelated proteins.

Last, but not least, instability of some (especially less explored) compounds may be another critical issue, which should be also considered. Some compounds could be chemically unstable in the assay media; possible modifications include redox reactions, hydrolysis, hydration, and isomerization.<sup>116</sup> We could highlight for example benfluorene (an ethyl ester) and “CDK inhibitor II” (a hydrazone), both susceptible to hydrolysis, or ruvidine (1,4-quinone derivative), which may undergo redox reactions and serve as a dienophile for various Diels–Alder reactions. Consideration of



chemical stability is therefore recommended to select reliable tool compounds and to produce high-quality data.

In conclusion, we created CDKiDB, an online resource for critical evaluation of commercial CDK inhibitors. It contains our commentary on the utility of the inhibitors based on the results presented in this paper. We plan to update and extend the evaluation by the results of follow-up studies. We would also like to encourage other researchers to contribute their data to the database.

## EXPERIMENTAL SECTION

**1. Cell Lines.** The HCT-116 cell line (colorectal carcinoma) was obtained from the European Collection of Authenticated Cell Cultures. Briefly, cells were cultured in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum, penicillin (100 U/ml), and streptomycin (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). MDA-MB-468 and HCT-116 (CDK2<sup>-/-</sup>) cells were kindly provided by Dr. Jan Bouchal from Department of Clinical and Molecular Pathology, Palacký University, in Olomouc, and Dr. Daniel Fisher from IGMM, CNRS, University of Montpellier, respectively. These cell lines were cultured in DMEM–high glucose medium supplemented with 10% fetal bovine serum and antibiotics. Cells were maintained in a humidified CO<sub>2</sub> incubator at 37 °C.

**2. Reagents.** The collection of CDK inhibitors was purchased from Sigma-Aldrich, MedChemExpress, Santa Cruz Biotechnology, Enzo Life Sciences, Tocris Bioscience, Calbiochem, Merck, or Selleck Chemicals. Tozasertib was purchased from LC Laboratories. The purity of studied compounds was >95% as determined by HPLC-MS analysis. See Supporting Information Table S1 for specific vendors for each inhibitor, exact purity, and method used for purity determination.

**3. Immunoblotting.** Briefly, the inhibitor-treated cells were harvested and then lysed in RIPA buffer. Proteins were separated on SDS–polyacrylamide gels and electrotransferred onto nitrocellulose membranes. After blocking, the membranes were incubated with specific primary antibodies overnight, washed, and then incubated with peroxidase-conjugated secondary antibodies. Finally, peroxidase activity was detected using Pierce ECL Western blotting substrates and a CCD camera LAS-4000 (Fujifilm). Specific antibodies were purchased from Cell Signaling (anti-FAK; anti-Aurora A, clone 1G4; anti-CDK1, clone POH1; anti-CDK2, clone 78B2), Thermo Fisher Scientific (anti-pFAK, serine 732), Santa Cruz Biotechnology (anti- $\beta$ -actin, clone C4; anti-Aurora B, clone E-15), or Merck Millipore (anti-pHistone H3, serine 10; anti-RNA polymerase II, clone ARNA3; anti-pRNA polymerase II, serine 2, clone 3E10; anti-pRNA polymerase II, serine 5, clone 3E8).

**4. Cell Cycle Analysis.** Subconfluent cells were treated with different concentrations of each test compound for 24 h. The cells were trypsinized, washed with PBS, fixed with 70% ethanol, and denatured with 2 M HCl. Following neutralization, the cells were stained with propidium iodide and analyzed by flow cytometry using a 488 nm laser (BD FACS Verse with BD FACSuite software, version 1.0.6). Cell cycle distribution was analyzed using ModFit LT (Verity Software House, version 4.1.7).

**5. Kinase Inhibition Assay.** CDK/cyclin complexes were assayed as previously described.<sup>37,117–120</sup> All kinases were tested with appropriate substrates in the presence of ATP, 0.05  $\mu\text{Ci}$  of [ $\gamma$ -<sup>33</sup>P]ATP and the test compound in a reaction buffer to a total volume of 10  $\mu\text{L}$  (the concentration of DMSO in the reaction never exceeded 0.2%) (see Supporting Information Table S2 for details of individual kinase reaction conditions). The reactions were stopped by the addition of 5  $\mu\text{L}$  of 3% aq H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Aliquots were spotted onto P-81 phosphocellulose (Whatman), washed 3 $\times$  with 0.5% aq H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, and air-dried. Kinase inhibition was quantified using an FLA-7000 digital image analyzer (Fujifilm). The concentration of the test compounds required to reduce CDK activity by 50% was determined from the dose–response curves and reported as the IC<sub>50</sub> value. The concentration of ATP used in the kinase assay was determined based on the K<sub>m</sub> value for ATP of each enzyme, which was determined for

each kinase using a standard assay over an appropriate range of ATP concentrations. All assays were linear with respect to time and enzyme concentration under the conditions used. All assays were performed at least in triplicate for the indicated time using an Eppendorf ThermoMixer (350 rpm, 30 °C) in a 96-well format.

**6. Cellular Thermal Shift Assay.** HCT-116 cells were treated with test compounds at different concentrations for 3 h, harvested, and then lysed in RIPA buffer. The soluble fraction was separated from the cell debris by centrifugation, and protein concentration was determined. Then, the samples (50  $\mu\text{L}$ ) were distributed into PCR tubes, preheated (rt, 1 min), and heated at a thermal gradient for 3 min in an MJ Mini thermal cycler (Bio-Rad) followed by cooling. The appropriate thermal gradient was determined from preliminary CeTSA experiments. Then, the samples were centrifuged to remove precipitated and aggregated proteins, denatured in Laemmli sample buffer, and analyzed by immunoblotting for appropriate proteins.

## ASSOCIATED CONTENT

### Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.jmedchem.8b00049.

Immunoblotting analysis of different CDK substrates in HCT-116 cells treated with CDK inhibitors with different selectivity; cell cycle analysis of HCT-116<sup>WT</sup> and HCT-116<sup>CDK2<sup>-/-</sup></sup> cells treated with CDK inhibitors with different selectivity; dose-dependent effect of abemaciclib, palbociclib, and ribociclib on the cell cycle of different cell lines; heatmap overview of the selectivity of the studied inhibitors; dendrogram of the structural diversity of the commercial CDK inhibitors; list of commercially available CDK inhibitors; reaction conditions for all kinase assays (PDF)

List of commercially available inhibitors of cyclin-dependent kinases (ZIP)

Selectivity profiling of selective and dual CDK inhibitors extracted from literature (ZIP)

Selectivity profiling of pan-selective CDK inhibitors extracted from literature (ZIP)

Molecular formula strings and some data (CSV)

## AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

\*E-mail: radekjorda@upol.cz. Phone: +420585634854.

### ORCID

Radek Jorda: 0000-0002-4905-7126

Vladimír Kryštof: 0000-0001-5838-2118

### Author Contributions

#R.J. and D.H. contributed equally. R.J., D.H., T.G., and E.Ř. performed biochemical and cellular experiments. J.V. performed computational experiments. R.J. and V.K. designed the study and drafted the manuscript.

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (the National Program of Sustainability I, Grant LO1204; OP VVV Excellent research ENOCH, CZ.02.1.01/0.0/0.0/16\_019/0000868) and by the Czech Science Foundation (Grants 15-17282Y and 17-14007S). The authors also thank Dr. Daniel Fisher (IGMM, CNRS, France) for critically reading the manuscript, Ota

Blahoušek for help during figures preparation, and Jana Hudcová for technical assistance.

## ■ ABBREVIATIONS USED

CDK, cyclin-dependent kinase; ARKS, AMPK-related protein kinase 5; MLCK, myosin light-chain kinase; CeTSA, cellular thermal shift assay; DYRK, dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase; PLK, polo-like kinase; AUR, Aurora kinase; EZH2, enhancer of zeste 2; TRK, tropomyosin receptor kinase; GSK, glycogen synthase kinase; CK, casein kinase; PDGFR $\beta$ ,  $\beta$ -type platelet-derived growth factor receptor; FLT, fms related tyrosine kinase; PAK, p21-activated kinases; BRDT, bromodomain testis-specific protein; CDKi, CDK inhibitor(s); CDKiDB, cyclin-dependent kinase inhibitor database

## ■ REFERENCES

- (1) Zhang, H.; Zha, X.; Tan, Y.; Hornbeck, P. V.; Mastrangelo, A. J.; Alessi, D. R.; Polakiewicz, R. D.; Comb, M. J. Phosphoprotein analysis using antibodies broadly reactive against phosphorylated motifs. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 39379–39387.
- (2) Blagg, J.; Workman, P. Chemical biology approaches to target validation in cancer. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2014**, *17*, 87–100.
- (3) Skuta, C.; Popr, M.; Muller, T.; Jindrich, J.; Kahle, M.; Sedlak, D.; Svozil, D.; Bartunek, P. Probes & Drugs portal: an interactive, open data resource for chemical biology. *Nat. Methods* **2017**, *14*, 759–760.
- (4) Workman, P.; Collins, I. Probing the probes: fitness factors for small molecule tools. *Chem. Biol.* **2010**, *17*, 561–577.
- (5) Arrowsmith, C. H.; Audia, J. E.; Austin, C.; Baell, J.; Bennett, J.; Blagg, J.; Bountra, C.; Brennan, P. E.; Brown, P. J.; Bunnage, M. E.; Buser-Doepner, C.; Campbell, R. M.; Carter, A. J.; Cohen, P.; Copeland, R. A.; Cravatt, B.; Dahlin, J. L.; Dhanak, D.; Edwards, A. M.; Frederiksen, M.; Frye, S. V.; Gray, N.; Grimshaw, C. E.; Hepworth, D.; Howe, T.; Huber, K. V.; Jin, J.; Knapp, S.; Kotz, J. D.; Kruger, R. G.; Lowe, D.; Mader, M. M.; Marsden, B.; Mueller-Fahrmow, A.; Muller, S.; O'Hagan, R. C.; Overington, J. P.; Owen, D. R.; Rosenberg, S. H.; Roth, B.; Ross, R.; Schapira, M.; Schreiber, S. L.; Shoichet, B.; Sundstrom, M.; Superti-Furga, G.; Taunton, J.; Toledo-Sherman, L.; Walpole, C.; Walters, M. A.; Willson, T. M.; Workman, P.; Young, R. N.; Zuercher, W. J. The promise and peril of chemical probes. *Nat. Chem. Biol.* **2015**, *11*, 536–541.
- (6) Otto, T.; Sicinski, P. Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **2017**, *17*, 93–115.
- (7) Blazek, D.; Kohoutek, J.; Bartholomeeusen, K.; Johansen, E.; Hulinkova, P.; Luo, Z.; Cimermancic, P.; Ule, J.; Peterlin, B. M. The Cyclin K/Cdk12 complex maintains genomic stability via regulation of expression of DNA damage response genes. *Genes Dev.* **2011**, *25*, 2158–2172.
- (8) Lim, S.; Kaldis, P. Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Development* **2013**, *140*, 3079–3093.
- (9) Malumbres, M. Cyclin-dependent kinases. *Genome Biol.* **2014**, *15*, 122.
- (10) Otto, T.; Sicinski, P. The kinase-independent, second life of CDK6 in transcription. *Cancer Cell* **2013**, *24*, 141–143.
- (11) Trovesi, C.; Manfrini, N.; Falcattoni, M.; Longhese, M. P. Regulation of the DNA damage response by cyclin-dependent kinases. *J. Mol. Biol.* **2013**, *425*, 4756–4766.
- (12) Anastassiadis, T.; Deacon, S. W.; Devarajan, K.; Ma, H.; Peterson, J. R. Comprehensive assay of kinase catalytic activity reveals features of kinase inhibitor selectivity. *Nat. Biotechnol.* **2011**, *29*, 1039–1045.
- (13) Chen, P.; Lee, N. V.; Hu, W.; Xu, M.; Ferre, R. A.; Lam, H.; Bergqvist, S.; Solowiej, J.; Diehl, W.; He, Y. A.; Yu, X.; Nagata, A.; VanArsdale, T.; Murray, B. W. Spectrum and degree of CDK drug interactions predicts clinical performance. *Mol. Cancer Ther.* **2016**, *15*, 2273–2281.

- (14) Davis, M. I.; Hunt, J. P.; Herrgard, S.; Ciceri, P.; Wodicka, L. M.; Pallares, G.; Hocker, M.; Treiber, D. K.; Zarrinkar, P. P. Comprehensive analysis of kinase inhibitor selectivity. *Nat. Biotechnol.* **2011**, *29*, 1046–1051.
- (15) Fedorov, O.; Marsden, B.; Pogacic, V.; Rellos, P.; Muller, S.; Bullock, A. N.; Schwaller, J.; Sundstrom, M.; Knapp, S. A systematic interaction map of validated kinase inhibitors with Ser/Thr kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 20523–20528.
- (16) Gao, Y.; Davies, S. P.; Augustin, M.; Woodward, A.; Patel, U. A.; Kovelman, R.; Harvey, K. J. A broad activity screen in support of a chemogenomic map for kinase signalling research and drug discovery. *Biochem. J.* **2013**, *451*, 313–328.
- (17) Karaman, M. W.; Herrgard, S.; Treiber, D. K.; Gallant, P.; Atteridge, C. E.; Campbell, B. T.; Chan, K. W.; Ciceri, P.; Davis, M. I.; Edeen, P. T.; Faraoni, R.; Floyd, M.; Hunt, J. P.; Lockhart, D. J.; Milanov, Z. V.; Morrison, M. J.; Pallares, G.; Patel, H. K.; Pritchard, S.; Wodicka, L. M.; Zarrinkar, P. P. A quantitative analysis of kinase inhibitor selectivity. *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 127–132.
- (18) Klaeger, S.; Heinzlmeir, S.; Wilhelm, M.; Polzer, H.; Vick, B.; Koenig, P. A.; Reinecke, M.; Ruprecht, B.; Petzoldt, S.; Meng, C.; Zecha, J.; Reiter, K.; Qiao, H.; Helm, D.; Koch, H.; Schoof, M.; Canevari, G.; Casale, E.; Depaolini, S. R.; Feuchtinger, A.; Wu, Z.; Schmidt, T.; Rueckert, L.; Becker, W.; Huenges, J.; Garz, A. K.; Gohlke, B. O.; Zolg, D. P.; Kayser, G.; Voeder, T.; Preissner, R.; Hahne, H.; Tonisson, N.; Kramer, K.; Gotze, K.; Bassermann, F.; Schlegl, J.; Ehrlich, H. C.; Aiche, S.; Walch, A.; Greif, P. A.; Schneider, S.; Felder, E. R.; Ruland, J.; Medard, G.; Jeremias, I.; Spiekermann, K.; Kuster, B. The target landscape of clinical kinase drugs. *Science* **2017**, *358*, eaan4368.
- (19) Medard, G.; Pacht, F.; Ruprecht, B.; Klaeger, S.; Heinzlmeir, S.; Helm, D.; Qiao, H.; Ku, X.; Wilhelm, M.; Kuehne, T.; Wu, Z.; Dittmann, A.; Hopf, C.; Kramer, K.; Kuster, B. Optimized chemical proteomics assay for kinase inhibitor profiling. *J. Proteome Res.* **2015**, *14*, 1574–1586.
- (20) Sutherland, J. J.; Low, J.; Blosser, W.; Dowless, M.; Engler, T. A.; Stancato, L. F. A robust high-content imaging approach for probing the mechanism of action and phenotypic outcomes of cell-cycle modulators. *Mol. Cancer Ther.* **2011**, *10*, 242–254.
- (21) Imbach, P.; Capraro, H. G.; Furet, P.; Mett, H.; Meyer, T.; Zimmermann, J. 2,6,9-trisubstituted purines: optimization towards highly potent and selective CDK1 inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 91–96.
- (22) Jorda, R.; Schutznerova, E.; Cankar, P.; Brychtova, V.; Navratilova, J.; Krystof, V. Novel arylazopyrazole inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23*, 1975–1981.
- (23) Kang, J.; Sergio, C. M.; Sutherland, R. L.; Musgrove, E. A. Targeting cyclin-dependent kinase 1 (CDK1) but not CDK4/6 or CDK2 is selectively lethal to MYC-dependent human breast cancer cells. *BMC Cancer* **2014**, *14*, 32.
- (24) Pernicova, Z.; Slabakova, E.; Fedr, R.; Simeckova, S.; Jaros, J.; Suchankova, T.; Bouchal, J.; Kharaisvili, G.; Kral, M.; Kozubik, A.; Soucek, K. The role of high cell density in the promotion of neuroendocrine transdifferentiation of prostate cancer cells. *Mol. Cancer* **2014**, *13*, 113.
- (25) Eswaran, J.; Lee, W. H.; Debreczeni, J. E.; Filippakopoulos, P.; Turnbull, A.; Fedorov, O.; Deacon, S. W.; Peterson, J. R.; Knapp, S. Crystal Structures of the p21-activated kinases PAK4, PAK5, and PAK6 reveal catalytic domain plasticity of active group II PAKs. *Structure* **2007**, *15*, 201–213.
- (26) Chen, S.; Xu, Y.; Yuan, X.; Buble, G. J.; Balk, S. P. Androgen receptor phosphorylation and stabilization in prostate cancer by cyclin-dependent kinase 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 15969–15974.
- (27) Chen, S.; Gulla, S.; Cai, C.; Balk, S. P. Androgen receptor serine 81 phosphorylation mediates chromatin binding and transcriptional activation. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 8571–8583.
- (28) Andreani, A.; Cavalli, A.; Graniola, M.; Leoni, A.; Locatelli, A.; Morigi, R.; Rambaldi, M.; Recanatini, M.; Garnier, M.; Meijer, L. Imidazo[2,1-b]thiazolylmethylene- and indolylmethylene-2-indoli-



- nonones: a new class of cyclin-dependent kinase inhibitors. Design, synthesis, and CDK1/cyclin B inhibition. *Anticancer Drug Des.* **2000**, *15*, 447–452.
- (29) Wu, Q.; Sahasrabudhe, R. M.; Luo, L. Z.; Lewis, D. W.; Gollin, S. M.; Saunders, W. S. Deficiency in myosin light-chain phosphorylation causes cytokinesis failure and multipolarity in cancer cells. *Oncogene* **2010**, *29*, 4183–4193.
- (30) Brachwitz, K.; Voigt, B.; Meijer, L.; Lozach, O.; Schachtele, C.; Molnar, J.; Hilgeroth, A. Evaluation of the first cytostatically active 1-aza-9-oxafluorenes as novel selective CDK1 inhibitors with P-glycoprotein modulating properties. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 876–879.
- (31) Voigt, B.; Meijer, L.; Lozach, O.; Schachtele, C.; Totzke, F.; Hilgeroth, A. Novel CDK inhibition profiles of structurally varied 1-aza-9-oxafluorenes. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 823–825.
- (32) Vassilev, L. T.; Tovar, C.; Chen, S.; Knezevic, D.; Zhao, X.; Sun, H.; Heimbrook, D. C.; Chen, L. Selective small-molecule inhibitor reveals critical mitotic functions of human CDK1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 10660–10665.
- (33) Jang, W. I.; Lin, Z. L.; Lee, S. H.; Namgoong, S.; Kim, N. H. A specific inhibitor of CDK1, RO-3306, reversibly arrests meiosis during in vitro maturation of porcine oocytes. *Anim. Reprod. Sci.* **2014**, *144*, 102–108.
- (34) Krasinska, L.; Cot, E.; Fisher, D. Selective chemical inhibition as a tool to study Cdk1 and Cdk2 functions in the cell cycle. *Cell Cycle* **2008**, *7*, 1702–1708.
- (35) Echaliier, A.; Cot, E.; Camasses, A.; Hodimont, E.; Hoh, F.; Jay, P.; Sheinerman, F.; Krasinska, L.; Fisher, D. An integrated chemical biology approach provides insight into Cdk2 functional redundancy and inhibitor sensitivity. *Chem. Biol.* **2012**, *19*, 1028–1040.
- (36) Kinase Profiling Inhibitor Database. <http://www.kinase-screen.mrc.ac.uk/screening-compounds/608458> (accessed Sep 11, 2017).
- (37) Jorda, R.; Buckova, Z.; Reznickova, E.; Bouchal, J.; Krystof, V. Selective inhibition reveals cyclin-dependent kinase 2 as another kinase that phosphorylates the androgen receptor at serine 81. *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Res.* **2018**, *1865*, 354–363.
- (38) Kojima, K.; Shimanuki, M.; Shikami, M.; Andreoff, M.; Nakakuma, H. Cyclin-dependent kinase 1 inhibitor RO-3306 enhances p53-mediated Bax activation and mitochondrial apoptosis in AML. *Cancer Sci.* **2009**, *100*, 1128–1136.
- (39) Ly, T.; Endo, A.; Lamond, A. I. Proteomic analysis of the response to cell cycle arrests in human myeloid leukemia cells. *eLife* **2015**, *4*, e04534.
- (40) Jafari, R.; Almqvist, H.; Axelsson, H.; Ignatushchenko, M.; Lundback, T.; Nordlund, P.; Martinez Molina, D. The cellular thermal shift assay for evaluating drug target interactions in cells. *Nat. Protoc.* **2014**, *9*, 2100–2122.
- (41) Martinez Molina, D.; Jafari, R.; Ignatushchenko, M.; Seki, T.; Larsson, E. A.; Dan, C.; Sreekumar, L.; Cao, Y.; Nordlund, P. Monitoring drug target engagement in cells and tissues using the cellular thermal shift assay. *Science* **2013**, *341*, 84–87.
- (42) Brooks, E. E.; Gray, N. S.; Joly, A.; Kerwar, S. S.; Lum, R.; Mackman, R. L.; Norman, T. C.; Rosete, J.; Rowe, M.; Schow, S. R.; Schultz, P. G.; Wang, X.; Wick, M. M.; Shiffman, D. CVT-313, a specific and potent inhibitor of CDK2 that prevents neointimal proliferation. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 29207–29211.
- (43) Pennati, M.; Campbell, A. J.; Curto, M.; Binda, M.; Cheng, Y.; Wang, L. Z.; Curtin, N.; Golding, B. T.; Griffin, R. J.; Hardcastle, I. R.; Henderson, A.; Zaffaroni, N.; Newell, D. R. Potentiation of paclitaxel-induced apoptosis by the novel cyclin-dependent kinase inhibitor NU6140: a possible role for survivin down-regulation. *Mol. Cancer Ther.* **2005**, *4*, 1328–1337.
- (44) Daval, M.; Gurlo, T.; Costes, S.; Huang, C. J.; Butler, P. C. Cyclin-dependent kinase 5 promotes pancreatic beta-cell survival via Fak-Akt signaling pathways. *Diabetes* **2011**, *60*, 1186–1197.
- (45) Liang, Q.; Li, L.; Zhang, J.; Lei, Y.; Wang, L.; Liu, D. X.; Feng, J.; Hou, P.; Yao, R.; Zhang, Y.; Huang, B.; Lu, J. CDK5 is essential for TGF-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition and breast cancer progression. *Sci. Rep.* **2013**, *3*, 2932.
- (46) Zhou, X.; Gu, R.; Han, X.; Wu, G.; Liu, J. Cyclin-dependent kinase 5 controls vasculogenic mimicry formation in non-small cell lung cancer via the FAK-AKT signaling pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2017**, *492*, 447–452.
- (47) D'Alise, A. M.; Amabile, G.; Iovino, M.; Di Giorgio, F. P.; Bartiromo, M.; Sessa, F.; Villa, F.; Musacchio, A.; Cortese, R. Reversine, a novel Aurora kinases inhibitor, inhibits colony formation of human acute myeloid leukemia cells. *Mol. Cancer Ther.* **2008**, *7*, 1140–1149.
- (48) Davis, S. T.; Benson, B. G.; Bramson, H. N.; Chapman, D. E.; Dickerson, S. H.; Dold, K. M.; Eberwein, D. J.; Edelstein, M.; Frye, S. V.; Gampe, R. T., Jr; Griffin, R. J.; Harris, P. A.; Hassell, A. M.; Holmes, W. D.; Hunter, R. N.; Knick, V. B.; Lackey, K.; Lovejoy, B.; Luzzio, M. J.; Murray, D.; Parker, P.; Rocque, W. J.; Shewchuk, L.; Veal, J. M.; Walker, D. H.; Kuyper, L. F. Prevention of chemotherapy-induced alopecia in rats by CDK inhibitors. *Science* **2001**, *291*, 134–137.
- (49) Wang, J.; Yang, T.; Xu, G.; Liu, H.; Ren, C.; Xie, W.; Wang, M. Cyclin-dependent kinase 2 promotes tumor proliferation and induces radio resistance in glioblastoma. *Transl. Oncol.* **2016**, *9*, 548–556.
- (50) Pierson-Mullany, L. K.; Lange, C. A. Phosphorylation of progesterone receptor serine 400 mediates ligand-independent transcriptional activity in response to activation of cyclin-dependent protein kinase 2. *Mol. Cell. Biol.* **2004**, *24*, 10542–10557.
- (51) Park, S. H.; Yu, S. E.; Chai, Y. G.; Jang, Y. K. CDK2-dependent phosphorylation of Suv39H1 is involved in control of heterochromatin replication during cell cycle progression. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, 6196–6207.
- (52) Yang, C. C.; LaBaff, A.; Wei, Y.; Nie, L.; Xia, W.; Huo, L.; Yamaguchi, H.; Hsu, Y. H.; Hsu, J. L.; Liu, D.; Lang, J.; Du, Y.; Lien, H. C.; Li, L. Y.; Deng, R.; Chan, L. C.; Yao, J.; Kleer, C. G.; Hortobagyi, G. N.; Hung, M. C. Phosphorylation of EZH2 at T416 by CDK2 contributes to the malignancy of triple negative breast cancers. *Am. J. Transl. Res.* **2015**, *7*, 1009–1020.
- (53) Hu, Y.; Kunimoto, R.; Bajorath, J. Mapping of inhibitors and activity data to the human kinome and exploring promiscuity from a ligand and target perspective. *Chem. Biol. Drug Des.* **2017**, *89*, 834–845.
- (54) Lane, M. E.; Yu, B.; Rice, A.; Lipson, K. E.; Liang, C.; Sun, L.; Tang, C.; McMahon, G.; Pestell, R. G.; Wadler, S. A novel cdk2-selective inhibitor, SU9516, induces apoptosis in colon carcinoma cells. *Cancer Res.* **2001**, *61*, 6170–6177.
- (55) Moshinsky, D. J.; Bellamacina, C. R.; Boisvert, D. C.; Huang, P.; Hui, T.; Jancarik, J.; Kim, S. H.; Rice, A. G. SU9516: biochemical analysis of cdk inhibition and crystal structure in complex with cdk2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *310*, 1026–1031.
- (56) Xiong, X.; Zhang, Y.; Gao, X.; Dong, Z.; Li, L.; Ji, C.; Fu, L.; Luo, X.; Liu, H.; Mei, C. B5, a novel pyrrole-substituted indolinone, exerts potent antitumor efficacy through G2/M cell cycle arrest. *Invest. New Drugs* **2010**, *28*, 26–34.
- (57) Brasca, M. G.; Amboldi, N.; Ballinari, D.; Cameron, A.; Casale, E.; Cervi, G.; Colombo, M.; Colotta, F.; Croci, V.; D'Alessio, R.; Fiorentini, F.; Isacchi, A.; Mercurio, C.; Moretti, W.; Panzeri, A.; Pastori, W.; Pevarello, P.; Quartieri, F.; Roletto, F.; Traquandi, G.; Vianello, P.; Vulpetti, A.; Ciomei, M. Identification of N,1,4,4-tetramethyl-8-[[4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl]amino]-4,5-dihydro-1H-pyrazolo[4,3-h]quinazoline-3-carboxamide (PHA-848125), a potent, orally available cyclin dependent kinase inhibitor. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 5152–5163.
- (58) Albanese, C.; Alzani, R.; Amboldi, N.; Avanzi, N.; Ballinari, D.; Brasca, M. G.; Festuccia, C.; Fiorentini, F.; Locatelli, G.; Pastori, W.; Patton, V.; Roletto, F.; Colotta, F.; Galvani, A.; Isacchi, A.; Moll, J.; Pesenti, E.; Mercurio, C.; Ciomei, M. Dual targeting of CDK and tropomyosin receptor kinase families by the oral inhibitor PHA-848125, an agent with broad-spectrum antitumor efficacy. *Mol. Cancer Ther.* **2010**, *9*, 2243–2254.
- (59) Echaliier, A.; Hole, A. J.; Lolli, G.; Endicott, J. A.; Noble, M. E. An inhibitor's-eye view of the ATP-binding site of CDKs in different regulatory states. *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 1251–1256.

- (60) Beaver, J. A.; Amiri-Kordestani, L.; Charlab, R.; Chen, W.; Palmby, T.; Tilley, A.; Zirkelbach, J. F.; Yu, J.; Liu, Q.; Zhao, L.; Crich, J.; Chen, X. H.; Hughes, M.; Bloomquist, E.; Tang, S.; Sridhara, R.; Kluetz, P. G.; Kim, G.; Ibrahim, A.; Pazdur, R.; Cortazar, P. FDA approval: palbociclib for the treatment of postmenopausal patients with estrogen receptor-positive, HER2-negative metastatic breast cancer. *Clin. Cancer Res.* **2015**, *21*, 4760–4766.
- (61) Walker, A. J.; Wedam, S.; Amiri-Kordestani, L.; Bloomquist, E.; Tang, S.; Sridhara, R.; Chen, W.; Palmby, T. R.; Fourie Zirkelbach, J.; Fu, W.; Liu, Q.; Tilley, A.; Kim, G.; Kluetz, P. G.; McKee, A. E.; Pazdur, R. FDA approval of palbociclib in combination with fulvestrant for the treatment of hormone receptor-positive, HER2-negative metastatic breast cancer. *Clin. Cancer Res.* **2016**, *22*, 4968–4972.
- (62) Syed, Y. Y. Ribociclib: first global approval. *Drugs* **2017**, *77*, 799–807.
- (63) Kim, E. S. Abemaciclib: first global approval. *Drugs* **2017**, *77*, 2063–2070.
- (64) Cousins, E. M.; Goldfarb, D.; Yan, F.; Roques, J.; Darr, D.; Johnson, G. L.; Major, M. B. Competitive kinase enrichment proteomics reveals that abemaciclib inhibits GSK3beta and activates WNT signaling. *Mol. Cancer Res.* **2018**, *16*, 333–344.
- (65) Klein, M. E.; Kovatcheva, M.; Davis, L. E.; Tap, W. D.; Koff, A. CDK4/6 inhibitors: the mechanism of action may not be as simple as once thought. *Cancer Cell* **2018**, *34*, 9–20.
- (66) Knudsen, E. S.; Hutcheson, J.; Vail, P.; Witkiewicz, A. K. Biological specificity of CDK4/6 inhibitors: dose response relationship, in vivo signaling, and composite response signature. *Oncotarget* **2017**, *8*, 43678–43691.
- (67) Sumi, N. J.; Kuenzi, B. M.; Knezevic, C. E.; Remsing Rix, L. L.; Rix, U. Chemoproteomics reveals novel protein and lipid kinase targets of clinical CDK4/6 inhibitors in lung cancer. *ACS Chem. Biol.* **2015**, *10*, 2680–2686.
- (68) Hsieh, F. S.; Chen, Y. L.; Hung, M. H.; Chu, P. Y.; Tsai, M. H.; Chen, L. J.; Hsiao, Y. J.; Shih, C. T.; Chang, M. J.; Chao, T. I.; Shiau, C. W.; Chen, K. F. Palbociclib induces activation of AMPK and inhibits hepatocellular carcinoma in a CDK4/6-independent manner. *Mol. Oncol.* **2017**, *11*, 1035–1049.
- (69) Gelbert, L. M.; Cai, S.; Lin, X.; Sanchez-Martinez, C.; del Prado, M.; Lallena, M. J.; Torres, R.; Ajamie, R. T.; Wishart, G. N.; Flack, R. S.; Neubauer, B. L.; Young, J.; Chan, E. M.; Iversen, P.; Cronier, D.; Kreklau, E.; de Dios, A. Preclinical characterization of the CDK4/6 inhibitor LY2835219: in-vivo cell cycle-dependent/independent anti-tumor activities alone/in combination with gemcitabine. *Invest. New Drugs* **2014**, *32*, 825–837.
- (70) Torres-Guzman, R.; Calsina, B.; Hermoso, A.; Baquero, C.; Alvarez, B.; Amat, J.; McNulty, A. M.; Gong, X.; Boehnke, K.; Du, J.; de Dios, A.; Beckmann, R. P.; Buchanan, S.; Lallena, M. J. Preclinical characterization of abemaciclib in hormone receptor positive breast cancer. *Oncotarget* **2017**, *8*, 69493–69507.
- (71) Hafner, M.; Mills, C. E.; Subramanian, K.; Chen, C.; Chung, M.; Boswell, S. A.; Everley, R. A.; Walmsley, C. S.; Juric, D.; Sorger, P. K. Therapeutically advantageous secondary targets of abemaciclib identified by multi-omics profiling of CDK4/6 inhibitors. *BioRxiv* **2017**, DOI: 10.1101/211680.
- (72) Liu, F.; Korc, M. Cdk4/6 inhibition induces epithelial-mesenchymal transition and enhances invasiveness in pancreatic cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* **2012**, *11*, 2138–2148.
- (73) Flaherty, K. T.; Lorusso, P. M.; DeMichele, A.; Abramson, V. G.; Courtney, R.; Randolph, S. S.; Shaik, M. N.; Wilner, K. D.; O'Dwyer, P. J.; Schwartz, G. K. Phase I, dose-escalation trial of the oral cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor PD 0332991, administered using a 21-day schedule in patients with advanced cancer. *Clin. Cancer Res.* **2012**, *18*, 568–576.
- (74) Infante, J. R.; Cassier, P. A.; Gerecitano, J. F.; Witteveen, P. O.; Chugh, R.; Ribrag, V.; Chakraborty, A.; Matano, A.; Dobson, J. R.; Crystal, A. S.; Parasuraman, S.; Shapiro, G. I. A phase I study of the cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor ribociclib (LEE011) in patients with advanced solid tumors and lymphomas. *Clin. Cancer Res.* **2016**, *22*, 5696–5705.
- (75) Patnaik, A.; Rosen, L. S.; Tolaney, S. M.; Tolcher, A. W.; Goldman, J. W.; Gandhi, L.; Papadopoulos, K. P.; Beeram, M.; Rasco, D. W.; Hilton, J. F.; Nasir, A.; Beckmann, R. P.; Schade, A. E.; Fulford, A. D.; Nguyen, T. S.; Martinez, R.; Kulanthaivel, P.; Li, L. Q.; Frenzel, M.; Cronier, D. M.; Chan, E. M.; Flaherty, K. T.; Wen, P. Y.; Shapiro, G. I. Efficacy and safety of abemaciclib, an inhibitor of CDK4 and CDK6, for patients with breast cancer, non-small cell lung cancer, and other solid tumors. *Cancer Discov.* **2016**, *6*, 740–753.
- (76) Kubo, A.; Nakagawa, K.; Varma, R. K.; Conrad, N. K.; Cheng, J. Q.; Lee, W. C.; Testa, J. R.; Johnson, B. E.; Kaye, F. J.; Kelley, M. J. The p16 status of tumor cell lines identifies small molecule inhibitors specific for cyclin-dependent kinase 4. *Clin. Cancer Res.* **1999**, *5*, 4279–4286.
- (77) Ryu, C. K.; Kang, H. Y.; Lee, S. K.; Nam, K. A.; Hong, C. Y.; Ko, W. G.; Lee, B. H. 5-Arylamino-2-methyl-4,7-dioxobenzothiazoles as inhibitors of cyclin-dependent kinase 4 and cytotoxic agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 461–464.
- (78) Blum, G.; Ibanez, G.; Rao, X.; Shum, D.; Radu, C.; Djaballah, H.; Rice, J. C.; Luo, M. Small-molecule inhibitors of SETD8 with cellular activity. *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 2471–2478.
- (79) Houston, S. I.; McManus, K. J.; Adams, M. M.; Sims, J. K.; Carpenter, P. B.; Hendzel, M. J.; Rice, J. C. Catalytic function of the PR-Set7 histone H4 lysine 20 monomethyltransferase is essential for mitotic entry and genomic stability. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 19478–19488.
- (80) Soni, R.; O'Reilly, T.; Furet, P.; Muller, L.; Stephan, C.; Zumbstein-Mecker, S.; Fretz, H.; Fabbro, D.; Chaudhuri, B. Selective in vivo and in vitro effects of a small molecule inhibitor of cyclin-dependent kinase 4. *J. Natl. Cancer Inst.* **2001**, *93*, 436–446.
- (81) Sanchez-Martinez, C.; Shih, C.; Faul, M. M.; Zhu, G.; Paal, M.; Somoza, C.; Li, T.; Kumrich, C. A.; Winneroski, L. L.; Xun, Z.; Brooks, H. B.; Patel, B. K.; Schultz, R. M.; DeHahn, T. B.; Spencer, C. D.; Watkins, S. A.; Considine, E.; Dempsey, J. A.; Ogg, C. A.; Campbell, R. M.; Anderson, B. A.; Wagner, J. Aryl[a]pyrrolo[3,4-c]carbazoles as selective cyclin D1-CDK4 inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 3835–3839.
- (82) Zhu, G.; Conner, S. E.; Zhou, X.; Shih, C.; Li, T.; Anderson, B. D.; Brooks, H. B.; Campbell, R. M.; Considine, E.; Dempsey, J. A.; Faul, M. M.; Ogg, C.; Patel, B.; Schultz, R. M.; Spencer, C. D.; Teicher, B.; Watkins, S. A. Synthesis, structure-activity relationship, and biological studies of indolocarbazoles as potent cyclin D1-CDK4 inhibitors. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 2027–2030.
- (83) Tsou, H. R.; Liu, X.; Birnberg, G.; Kaplan, J.; Otteng, M.; Tran, T.; Kutterer, K.; Tang, Z.; Suayan, R.; Zask, A.; Ravi, M.; Bretz, A.; Grillo, M.; McGinnis, J. P.; Rabindran, S. K.; Ayral-Kaloustian, S.; Mansour, T. S. Discovery of 4-(benzylaminomethylene)isoquinoline-1,3-(2H,4H)-diones and 4-[(pyridylmethyl)aminomethylene]-isoquinoline-1,3-(2H,4H)-diones as potent and selective inhibitors of the cyclin-dependent kinase 4. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 2289–2310.
- (84) Reddy, M. V.; Akula, B.; Cosenza, S. C.; Athuluridivakar, S.; Mallireddigari, M. R.; Pallela, V. R.; Billa, V. K.; Subbaiah, D. R.; Bharathi, E. V.; Vasquez-Del Carprio, R.; Padgaonkar, A.; Baker, S. J.; Reddy, E. P. Discovery of 8-cyclopentyl-2-[4-(4-methyl-piperazin-1-yl)-phenylamino]-7-oxo-7,8-dihydro-pyridine [2,3-d]pyrimidine-6-carbonitrile (7x) as a potent inhibitor of cyclin-dependent kinase 4 (CDK4) and AMPK-related kinase 5 (ARK5). *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 578–599.
- (85) Divakar, S. K.; Ramana Reddy, M. V.; Cosenza, S. C.; Baker, S. J.; Perumal, D.; Antonelli, A. C.; Brody, J.; Akula, B.; Parekh, S.; Reddy, E. P. Dual inhibition of CDK4/Rb and PI3K/AKT/mTOR pathways by ON123300 induces synthetic lethality in mantle cell lymphomas. *Leukemia* **2016**, *30*, 86–93.
- (86) Misra, R. N.; Xiao, H.; Rawlins, D. B.; Shan, W.; Kellar, K. A.; Mulheron, J. G.; Sack, J. S.; Tokarski, J. S.; Kimball, S. D.; Webster, K. R. 1H-Pyrazolo[3,4-b]pyridine inhibitors of cyclin-dependent kinases: highly potent 2,6-difluorophenacyl analogues. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 2405–2408.



- (87) Wang, S.; Meades, C.; Wood, G.; Osnowski, A.; Anderson, S.; Yuill, R.; Thomas, M.; Mezna, M.; Jackson, W.; Midgley, C.; Griffiths, G.; Fleming, I.; Green, S.; McNae, I.; Wu, S. Y.; McInnes, C.; Zheleva, D.; Walkinshaw, M. D.; Fischer, P. M. 2-Anilino-4-(thiazol-5-yl)pyrimidine CDK inhibitors: synthesis, SAR analysis, X-ray crystallography, and biological activity. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1662–1675.
- (88) Helal, C. J.; Sanner, M. A.; Cooper, C. B.; Gant, T.; Adam, M.; Lucas, J. C.; Kang, Z.; Kupchinsky, S.; Ahlijanian, M. K.; Tate, B.; Menniti, F. S.; Kelly, K.; Peterson, M. Discovery and SAR of 2-aminothiazole inhibitors of cyclin-dependent kinase 5/p25 as a potential treatment for Alzheimer's disease. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 5521–5525.
- (89) Lin, R.; Connolly, P. J.; Huang, S.; Wetter, S. K.; Lu, Y.; Murray, W. V.; Emanuel, S. L.; Gruninger, R. H.; Fuentes-Pesquera, A. R.; Rugg, C. A.; Middleton, S. A.; Jolliffe, L. K. 1-Acyl-1H-[1,2,4]triazole-3,5-diamine analogues as novel and potent anticancer cyclin-dependent kinase inhibitors: synthesis and evaluation of biological activities. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 4208–4211.
- (90) Ruetz, S.; Fabbro, D.; Zimmermann, J.; Meyer, T.; Gray, N. Chemical and biological profile of dual Cdk1 and Cdk2 inhibitors. *Curr. Med. Chem.: Anti-Cancer Agents* **2003**, *3*, 1–14.
- (91) Meijer, L.; Skaltsounis, A. L.; Magiatis, P.; Polychronopoulos, P.; Knockaert, M.; Leost, M.; Ryan, X. P.; Vonica, C. A.; Brivanlou, A.; Dajani, R.; Crovace, C.; Tarricone, C.; Musacchio, A.; Roe, S. M.; Pearl, L.; Greengard, P. GSK-3-selective inhibitors derived from Tyrian purple indirubins. *Chem. Biol.* **2003**, *10*, 1255–1266.
- (92) Polychronopoulos, P.; Magiatis, P.; Skaltsounis, A. L.; Myrianthopoulos, V.; Mikros, E.; Tarricone, A.; Musacchio, A.; Roe, S. M.; Pearl, L.; Leost, M.; Greengard, P.; Meijer, L. Structural basis for the synthesis of indirubins as potent and selective inhibitors of glycogen synthase kinase-3 and cyclin-dependent kinases. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 935–946.
- (93) Oumata, N.; Bettayeb, K.; Ferandin, Y.; Demange, L.; Lopez-Giral, A.; Goddard, M. L.; Myrianthopoulos, V.; Mikros, E.; Flajolet, M.; Greengard, P.; Meijer, L.; Galons, H. Roscovitine-derived, dual-specificity inhibitors of cyclin-dependent kinases and casein kinases 1. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 5229–5242.
- (94) Ortega, M. A.; Montoya, M. E.; Zarranz, B.; Jaso, A.; Aldana, I.; LeClerc, S.; Meijer, L.; Monge, A. Pyrazolo[3,4-b]quinoxalines. A new class of cyclin-dependent kinases inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 2177–2184.
- (95) Clare, P. M.; Poonman, R. A.; Kelley, L. C.; Watenpaugh, K. D.; Bannow, C. A.; Leach, K. L. The cyclin-dependent kinases cdk2 and cdk5 act by a random, anticooperative kinetic mechanism. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 48292–48299.
- (96) Cai, D.; Latham, V. M., Jr.; Zhang, X.; Shapiro, G. I. Combined depletion of cell cycle and transcriptional cyclin-dependent kinase activities induces apoptosis in cancer cells. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 9270–9280.
- (97) Arris, C. E.; Boyle, F. T.; Calvert, A. H.; Curtin, N. J.; Endicott, J. A.; Garman, E. F.; Gibson, A. E.; Golding, B. T.; Grant, S.; Griffin, R. J.; Jewsbury, P.; Johnson, L. N.; Lawrie, A. M.; Newell, D. R.; Noble, M. E.; Sausville, E. A.; Schultz, R.; Yu, W. Identification of novel purine and pyrimidine cyclin-dependent kinase inhibitors with distinct molecular interactions and tumor cell growth inhibition profiles. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 2797–2804.
- (98) Davies, T. G.; Pratt, D. J.; Endicott, J. A.; Johnson, L. N.; Noble, M. E. Structure-based design of cyclin-dependent kinase inhibitors. *Pharmacol. Ther.* **2002**, *93*, 125–133.
- (99) Hardcastle, I. R.; Arris, C. E.; Bentley, J.; Boyle, F. T.; Chen, Y.; Curtin, N. J.; Endicott, J. A.; Gibson, A. E.; Golding, B. T.; Griffin, R. J.; Jewsbury, P.; Menyerol, J.; Mesguiche, V.; Newell, D. R.; Noble, M. E.; Pratt, D. J.; Wang, L. Z.; Whitfield, H. J. N2-substituted O6-cyclohexylmethylguanidine derivatives: potent inhibitors of cyclin-dependent kinases 1 and 2. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 3710–3722.
- (100) Coxon, C. R.; Anscombe, E.; Harnor, S. J.; Martin, M. P.; Carbain, B.; Golding, B. T.; Hardcastle, I. R.; Harlow, L. K.; Korolchuk, S.; Matheson, C. J.; Newell, D. R.; Noble, M. E.; Sivaprakasam, M.; Tudhope, S. J.; Turner, D. M.; Wang, L. Z.; Wedge, S. R.; Wong, C.; Griffin, R. J.; Endicott, J. A.; Cano, C. Cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitors: structure-activity relationships and insights into the CDK-2 selectivity of 6-substituted 2-arylamino-purines. *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 1746–1767.
- (101) Bacevic, K.; Noble, R.; Soffar, A.; Wael Ammar, O.; Boszonyik, B.; Prieto, S.; Vincent, C.; Hochberg, M. E.; Krasinska, L.; Fisher, D. Spatial competition constrains resistance to targeted cancer therapy. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 1995.
- (102) Thomas, H. D.; Wang, L. Z.; Roche, C.; Bentley, J.; Cheng, Y.; Hardcastle, I. R.; Golding, B. T.; Griffin, R. J.; Curtin, N. J.; Newell, D. R. Preclinical in vitro and in vivo evaluation of the potent and specific cyclin-dependent kinase 2 inhibitor NU6102 and a water soluble prodrug NU6301. *Eur. J. Cancer* **2011**, *47*, 2052–2059.
- (103) Johnson, N.; Bentley, J.; Wang, L. Z.; Newell, D. R.; Robson, C. N.; Shapiro, G. I.; Curtin, N. J. Pre-clinical evaluation of cyclin-dependent kinase 2 and 1 inhibition in anti-estrogen-sensitive and resistant breast cancer cells. *Br. J. Cancer* **2010**, *102*, 342–350.
- (104) Anscombe, E.; Meschini, E.; Mora-Vidal, R.; Martin, M. P.; Staunton, D.; Geitmann, M.; Danielson, U. H.; Stanley, W. A.; Wang, L. Z.; Reuillon, T.; Golding, B. T.; Cano, C.; Newell, D. R.; Noble, M. E.; Wedge, S. R.; Endicott, J. A.; Griffin, R. J. Identification and characterization of an irreversible inhibitor of CDK2. *Chem. Biol.* **2015**, *22*, 1159–1164.
- (105) Frye, S. V. The art of the chemical probe. *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6*, 159–161.
- (106) Knapp, S.; Arruda, P.; Blagg, J.; Burley, S.; Drewry, D. H.; Edwards, A.; Fabbro, D.; Gillespie, P.; Gray, N. S.; Kuster, B.; Lackey, K. E.; Mazzafera, P.; Tomkinson, N. C.; Willson, T. M.; Workman, P.; Zuercher, W. J. A public-private partnership to unlock the untargeted kinome. *Nat. Chem. Biol.* **2013**, *9*, 3–6.
- (107) Sharma, S.; Singh, J.; Ojha, R.; Singh, H.; Kaur, M.; Bedi, P. M. S.; Nepali, K. Design strategies, structure activity relationship and mechanistic insights for purines as kinase inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *112*, 298–346.
- (108) Bettayeb, K.; Oumata, N.; Echalié, A.; Ferandin, Y.; Endicott, J. A.; Galons, H.; Meijer, L. CR8, a potent and selective, roscovitine-derived inhibitor of cyclin-dependent kinases. *Oncogene* **2008**, *27*, 5797–5807.
- (109) Delehouze, C.; Godl, K.; Loac, N.; Bruyere, C.; Desban, N.; Oumata, N.; Galons, H.; Roumeliotis, T. I.; Giannopoulou, E. G.; Grenet, J.; Twitchell, D.; Lahti, J.; Mouchet, N.; Galibert, M. D.; Garbis, S. D.; Meijer, L. CDK/CK1 inhibitors roscovitine and CR8 downregulate amplified MYCN in neuroblastoma cells. *Oncogene* **2014**, *33*, 5675–5687.
- (110) Fabian, M. A.; Biggs, W. H., III; Treiber, D. K.; Atteridge, C. E.; Azimioara, M. D.; Benedetti, M. G.; Carter, T. A.; Ciceri, P.; Edeen, P. T.; Floyd, M.; Ford, J. M.; Galvin, M.; Gerlach, J. L.; Grotzfeld, R. M.; Herrgard, S.; Insko, D. E.; Insko, M. A.; Lai, A. G.; Lelias, J. M.; Mehta, S. A.; Milanov, Z. V.; Velasco, A. M.; Wodicka, L. M.; Patel, H. K.; Zarrinkar, P. P.; Lockhart, D. J. A small molecule-kinase interaction map for clinical kinase inhibitors. *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 329–336.
- (111) Munoz, L. Non-kinase targets of protein kinase inhibitors. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2017**, *16*, 424–440.
- (112) Bach, S.; Knockaert, M.; Reinhardt, J.; Lozach, O.; Schmitt, S.; Baratte, B.; Koken, M.; Coburn, S. P.; Tang, L.; Jiang, T.; Liang, D. C.; Galons, H.; Dierick, J. F.; Pinna, L. A.; Meggio, F.; Totzke, F.; Schachtele, C.; Lerman, A. S.; Camero, A.; Wan, Y.; Gray, N.; Meijer, L. Roscovitine targets, protein kinases and pyridoxal kinase. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 31208–31219.
- (113) Martin, M. P.; Olesen, S. H.; Georg, G. I.; Schonbrunn, E. Cyclin-dependent kinase inhibitor dinaciclib interacts with the acetyllysine recognition site of bromodomains. *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 2360–2365.
- (114) Ciceri, P.; Muller, S.; O'Mahony, A.; Fedorov, O.; Filippakopoulos, P.; Hunt, J. P.; Lasater, E. A.; Pallares, G.; Picaud, S.; Wells, C.; Martin, S.; Wodicka, L. M.; Shah, N. P.; Treiber, D. K.

Knapp, S. Dual kinase-bromodomain inhibitors for rationally designed polypharmacology. *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *10*, 305–312.

(115) Uitdehaag, J. C.; Verkaar, F.; Alwan, H.; de Man, J.; Buijsman, R. C.; Zaman, G. J. A guide to picking the most selective kinase inhibitor tool compounds for pharmacological validation of drug targets. *Br. J. Pharmacol.* **2012**, *166*, 858–876.

(116) Kerns, E. H.; Di, L. Chemical stability. In *Comprehensive Medicinal Chemistry II*, 2nd ed.; Taylor, J. B., Triggle, D. J., Eds.; Elsevier Science, 2007; pp 489–507.

(117) Baltus, C. B.; Jorda, R.; Marot, C.; Berka, K.; Bazgier, V.; Krystof, V.; Prie, G.; Viaud-Massuard, M. C. Synthesis, biological evaluation and molecular modeling of a novel series of 7-azaindole based tri-heterocyclic compounds as potent CDK2/Cyclin E inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *108*, 701–719.

(118) Gucky, T.; Jorda, R.; Zatloukal, M.; Bazgier, V.; Berka, K.; Reznickova, E.; Beres, T.; Strnad, M.; Krystof, V. A novel series of highly potent 2,6,9-trisubstituted purine cyclin-dependent kinase inhibitors. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 6234–6247.

(119) Vymetalova, L.; Havlicek, L.; Sturc, A.; Skraskova, Z.; Jorda, R.; Pospisil, T.; Strnad, M.; Krystof, V. 5-Substituted 3-isopropyl-7-[4-(2-pyridyl)benzyl]amino-1(2H)-pyrazolo[4,3-d]pyrimidines with anti-proliferative activity as potent and selective inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *110*, 291–301.

(120) Zatloukal, M.; Jorda, R.; Gucky, T.; Reznickova, E.; Voller, J.; Pospisil, T.; Malinkova, V.; Adamcova, H.; Krystof, V.; Strnad, M. Synthesis and in vitro biological evaluation of 2,6,9-trisubstituted purines targeting multiple cyclin-dependent kinases. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *61*, 61–72.

## Supporting Information

### How selective are pharmacological inhibitors of cell cycle-regulating cyclin-dependent kinases?

Radek Jorda<sup>1,\*,#</sup>, Denisa Hendrychová<sup>1,#</sup>, Jiří Voller<sup>1</sup>, Eva Řezníčková<sup>1</sup>, Tomáš Gucký<sup>1</sup>,  
Vladimír Kryštof<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Growth Regulators, Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Palacký University & Institute of Experimental Botany ASCR, Šlechtitelů 27, 78371 Olomouc, Czech Republic

#### Content

**Supplementary File S1.** The list of commercially available inhibitors of cyclin-dependent kinases.

**Supplementary File S2.** The selectivity profiling of selective and dual CDK inhibitors extracted from literature.

**Supplementary File S3.** The selectivity profiling of pan-selective CDK inhibitors extracted from literature.

**Supplementary Figure S1.** An overview of the selectivity of the inhibitors studied in this paper. The numbers are IC<sub>50</sub> values in micromoles. The heatmap colours are based on log(IC<sub>50</sub>) that were scaled to interval [0,1] for each inhibitor. The log transformation allows a better visual inspection in the high activity range. The colour sidebar shows the selectivity according to the vendor/literature.

**Supplementary Figure S2.** Effect of inhibitors designated CDK1-selective on thermal stabilization of CDK1 protein levels in HCT-116 cells after 4 hours of treatment.

**Supplementary Figure S3.** (A) Immunoblotting analysis of phospho FAK and FAK expression in HCT-116 cells treated with different CDK2 inhibitors for 16 hours.  $\beta$ -Actin was used as a loading control. (B) Effect of CDK2 inhibitors on the cell cycle of HCT-116<sup>WT</sup> and HCT-116<sup>CDK2<sup>-/-</sup></sup> cells treated for 24 hours. Flow cytometric analysis (10 000 counts) of DNA stained by propidium iodide.

**Supplementary Figure S4.** Effect of CDK inhibitors with different selectivity on the cell cycle of HCT-116 cells treated for 24 hours. Flow cytometric analysis (10 000 counts) of DNA stained by propidium iodide.

**Supplementary Figure S5.** Dose-dependent effect of palbociclib, ribociclib and abemaciclib on the cell cycle of different cell lines treated for 24 hours. Flow cytometric analysis (10 000 counts) of DNA stained by propidium iodide.

**Supplementary Figure S6.** Immunoblotting analysis of expression of different CDK substrates in HCT-116 cells treated with “dual” CDK inhibitors for 16 hours.  $\beta$ -Actin was used as a loading control.

**Supplementary Figure S7.** Effect of “dual” CDK inhibitors on the cell cycle of HCT-116<sup>WT</sup> and HCT-116<sup>CDK2<sup>-/-</sup></sup> cells treated for 24 hours. Flow cytometric analysis (10 000 counts) of DNA stained by propidium iodide.

**Supplementary Figure S8.** A dendrogram of the structural diversity (RDKit's Morgan fingerprint with radius 2, distance = 1- Tanimoto score, average linkage clustering) of the commercial CDK inhibitors. The colour squares show the selectivity according to the vendors/literature. The legend text colour: blue/red - experiments in this paper support/do not support the selectivity information, black - not studied in this paper.

**Supplementary Table S1.** The list of commercially available CDK inhibitors.

**Supplementary Table S2.** The reaction conditions for all kinase assays.

## **Methods**

### **Cheminformatics, database construction**

A list of the commercial CDK inhibitors was compiled from vendor's online catalogues. Their SMILES and synonyms were obtained by PubChem search using PubChemPy Python package (<https://github.com/mcs07/PubC>). HTML code of the CDKiDB was generated in R ([www.cran.org](http://www.cran.org)) and Python. Structure images were generated by RDKit (<https://github.com/rdkit>). The dendrogram showing the structural diversity of the inhibitors was produced as follows. The molecules (loaded as SMILES) were desalted and their Morgan fingerprints (radius 2) calculated in RDKit. RDKit was also used for calculation of Tanimoto similarity. Clustering and other data manipulation was done in R.

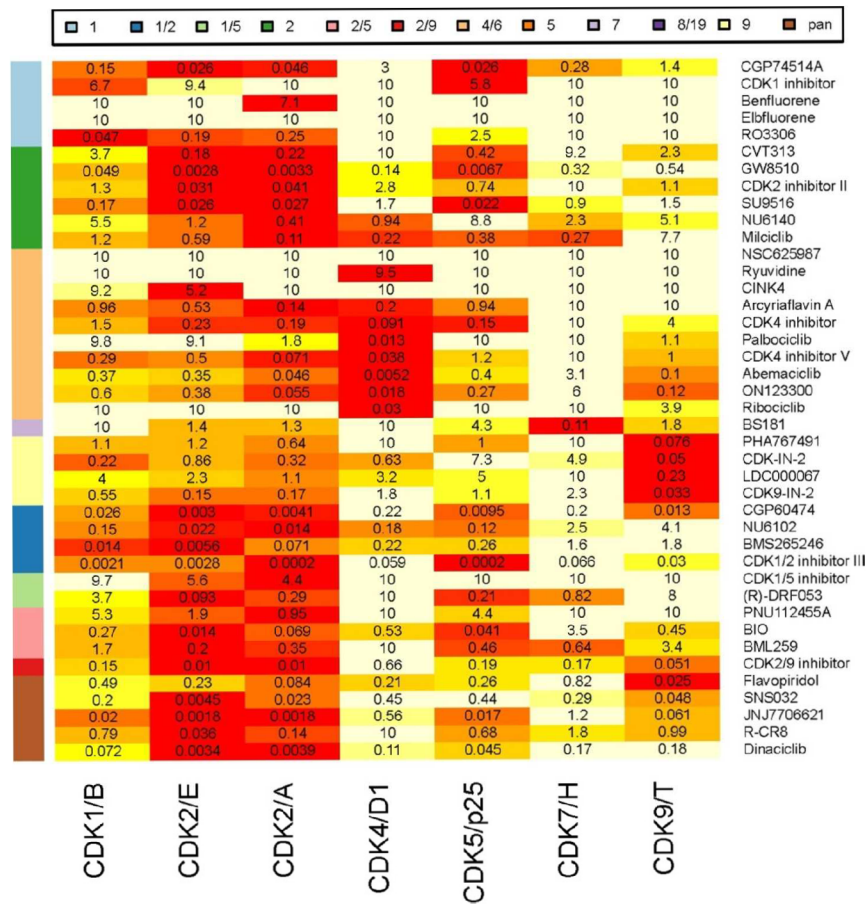
### **HPLC-DAD-MS analyse**

An Alliance 2695 separations module (Waters) linked simultaneously to a PDA 996 (Waters) and a Q-ToF micro (Waters) benchtop quadrupole orthogonal acceleration time-of-flight tandem mass spectrometer were used. Samples were dissolved in methanol and diluted to a concentration of  $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  in the mobile phase (initial conditions). Then,  $10 \mu\text{L}$  of the solution were injected on a RP-column ( $150 \text{ mm} \times 2.1 \text{ mm}$ ;  $3.5 \mu\text{m}$ ; Symmetry C18, Waters). The column was kept in a thermostat at  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Solvent (A) consisted of  $15 \text{ mM}$  formic acid adjusted to pH 4.0 with ammonium hydroxide. Methanol was used as the organic modifier (solvent B). At flow rate of  $0.2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , the following binary gradient was used: 0 min, 10% B; 0–24 min, a linear gradient to 90% B, followed by 10 min isocratic elution of 90% B. At the end of the gradient, the column was re-equilibrated to the initial conditions for 10 min.

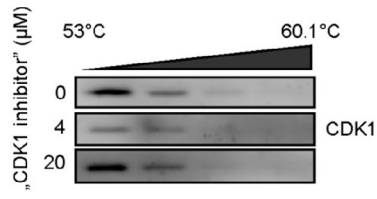
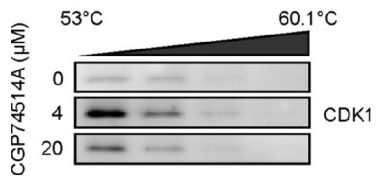
The effluent was introduced into the DAD (scanning range 210–400 nm, with 1.2 nm resolution) and an electrospray source was applied (source temperature 110 °C, capillary voltage +3.0 kV, cone voltage +20 V, desolvation temperature 250 °C). Nitrogen was used as both the desolvation gas (500 L·h<sup>-1</sup>) and the cone gas (50 L·h<sup>-1</sup>). The mass spectrometer was operated in positive (ESI+) ionization mode, and data were acquired in the 50–1000 m/z range.



Supplementary Figure S1.



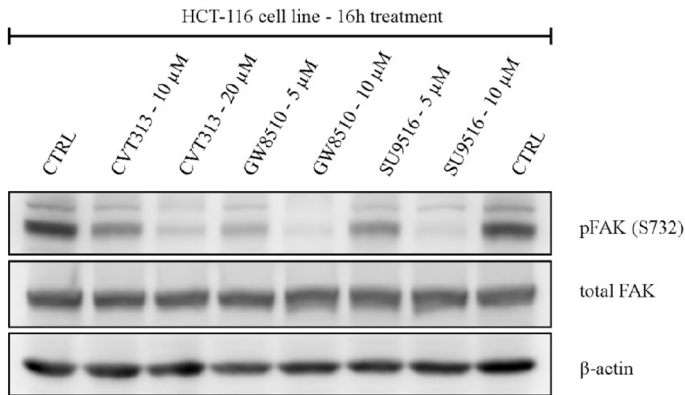
**Supplementary Figure S2.**



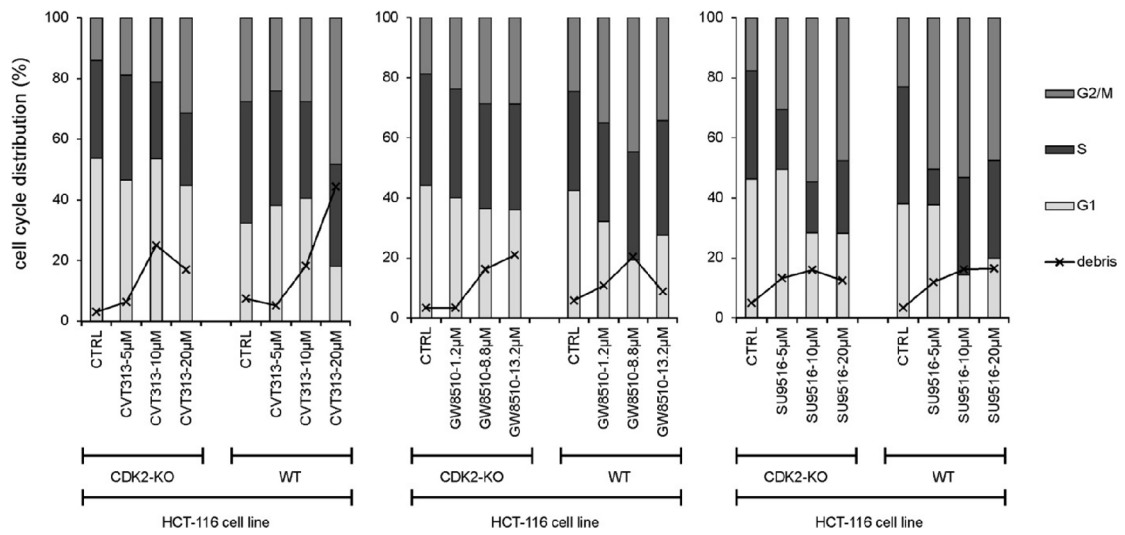


### Supplementary Figure S3.

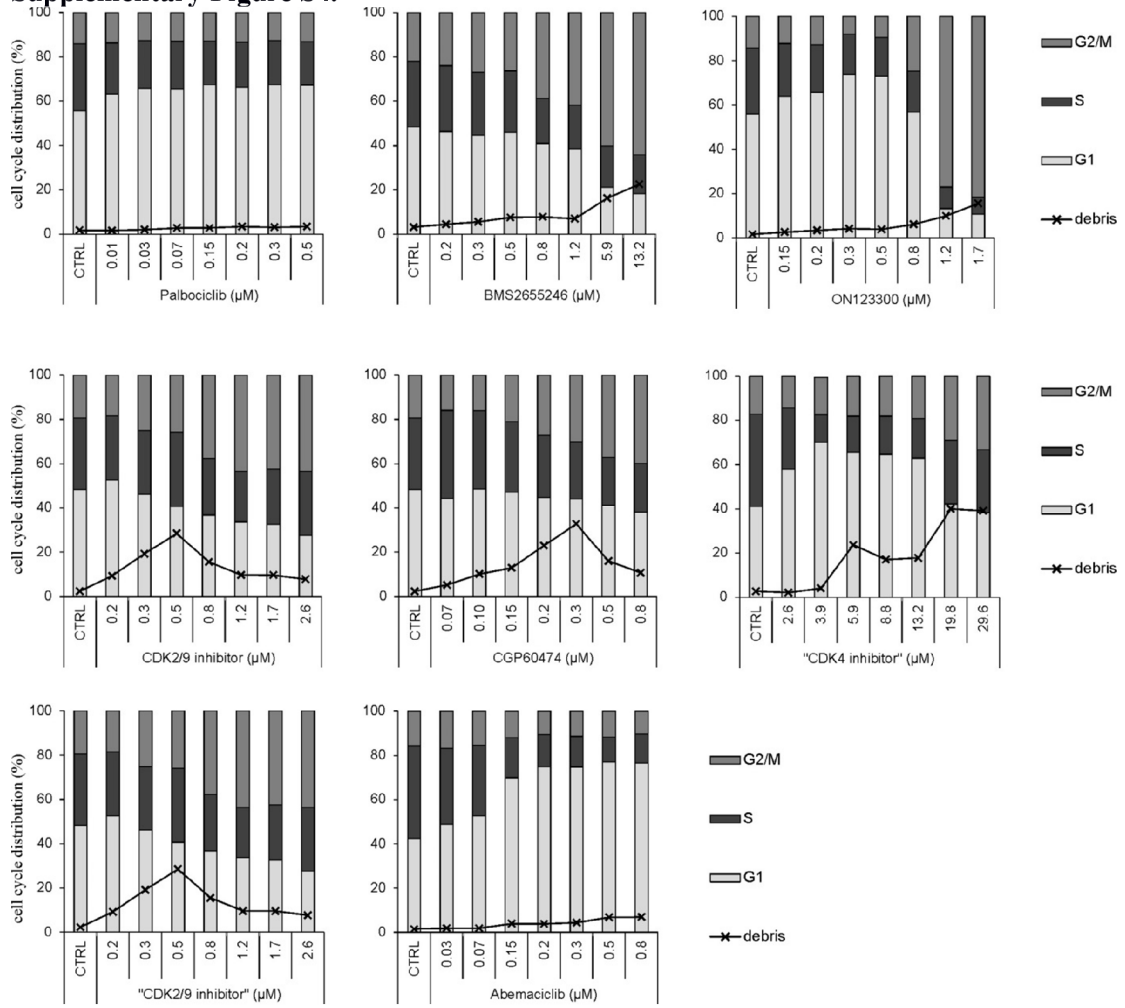
A



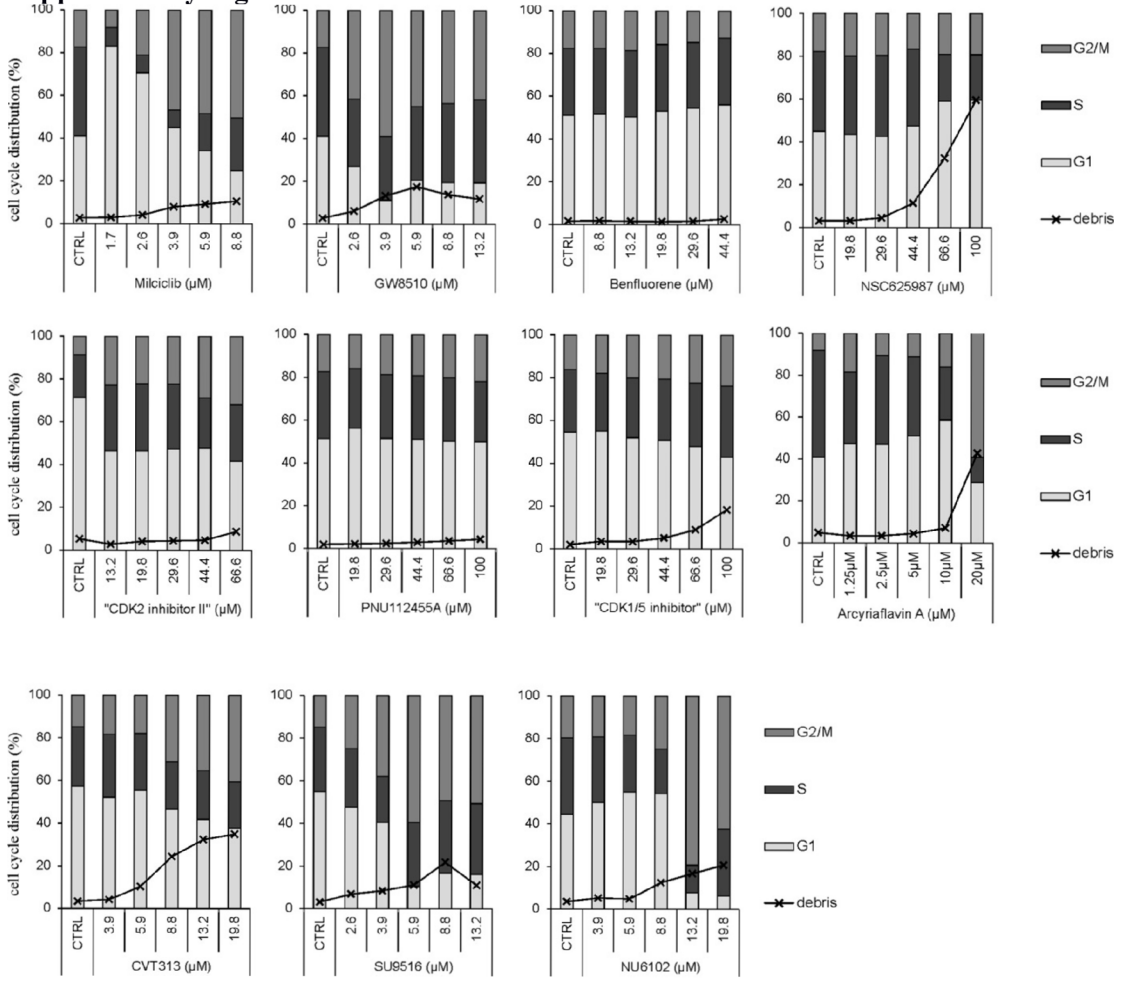
B



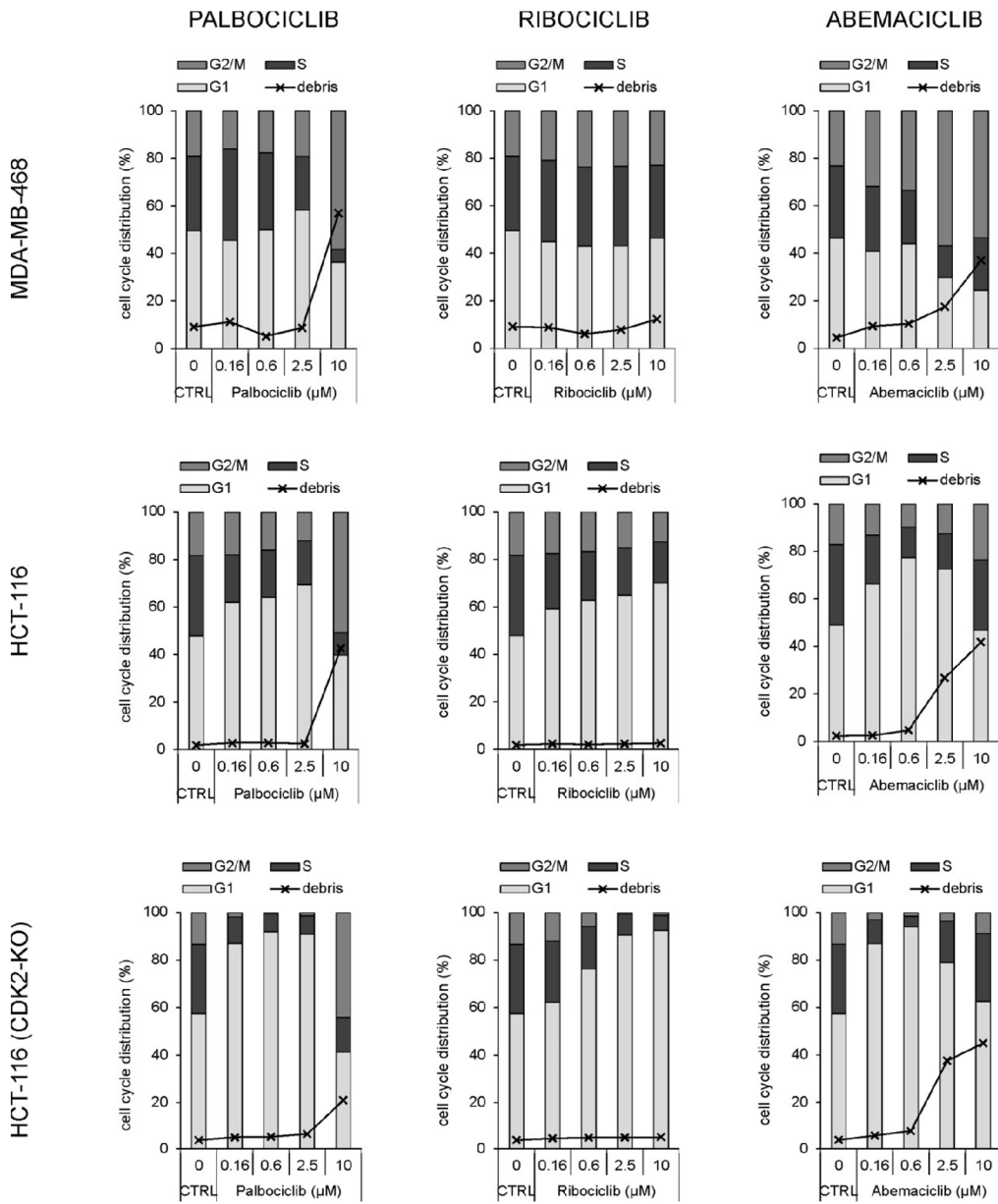
**Supplementary Figure S4.**



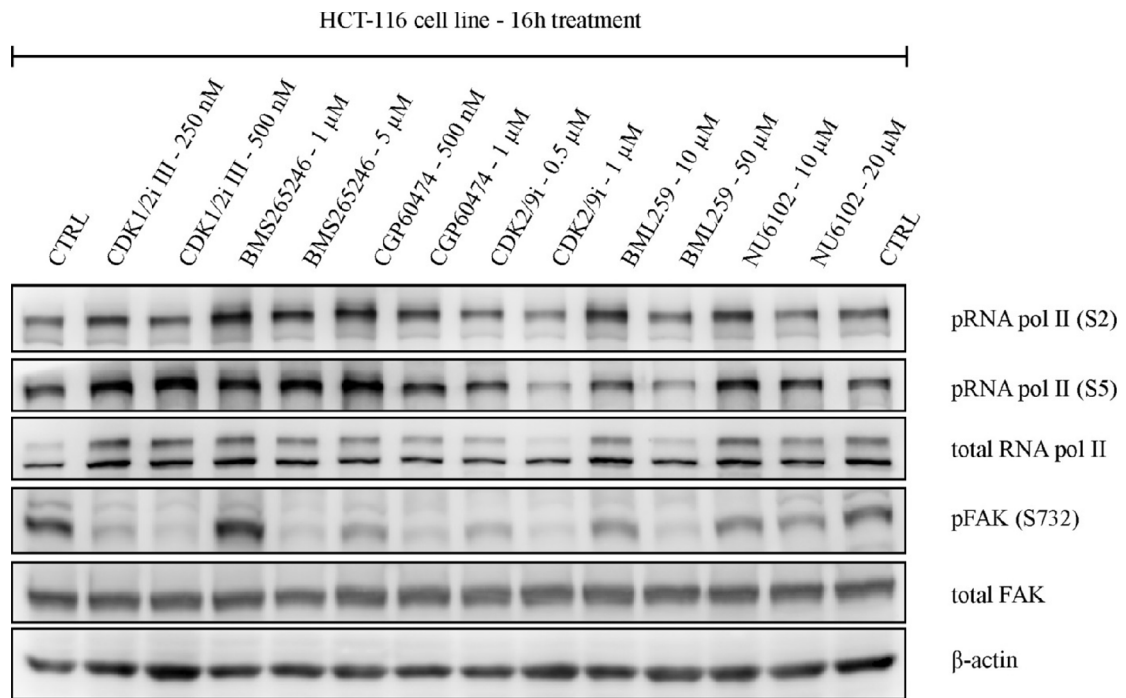
**Supplementary Figure S4 - continued.**



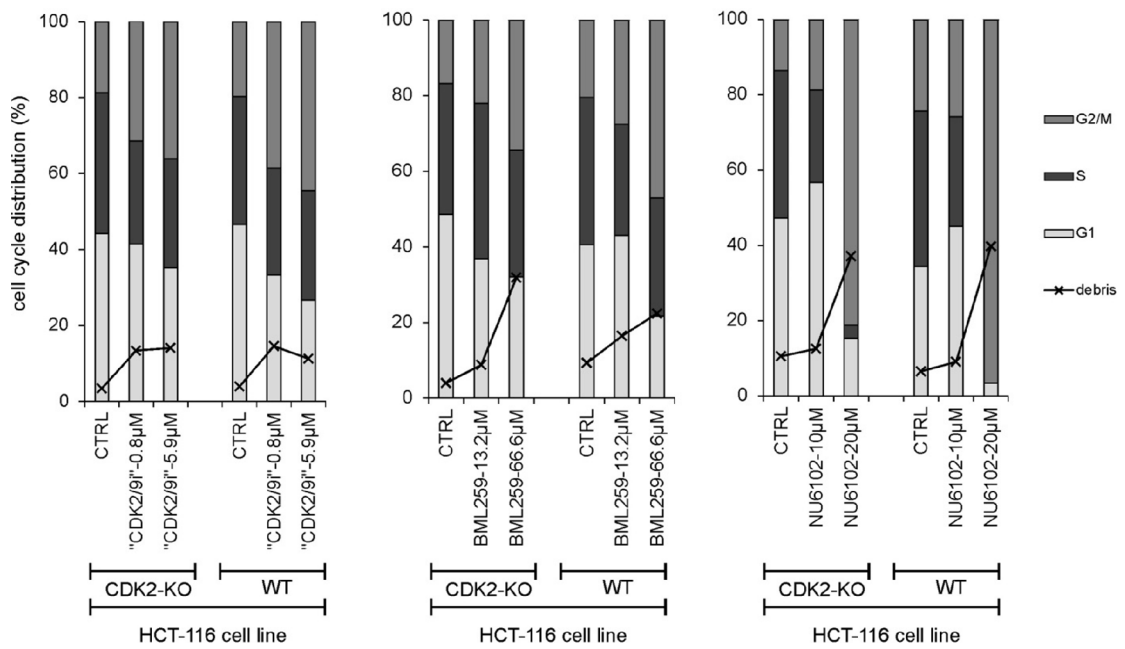
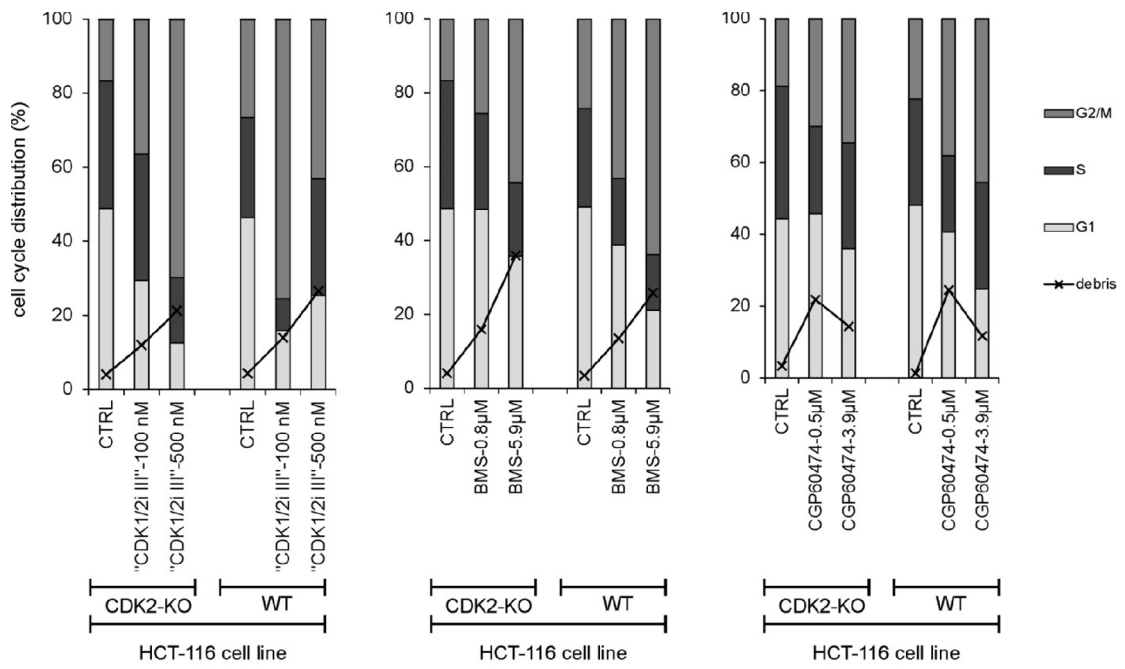
Supplementary Figure S5.

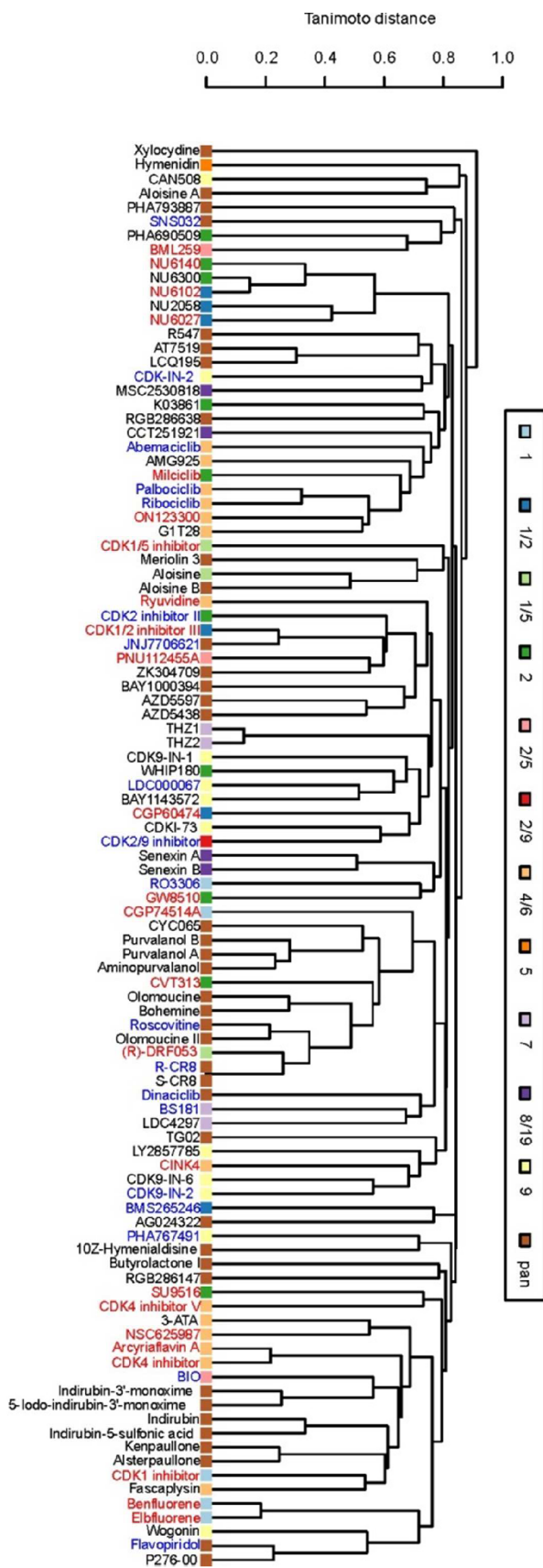


Supplementary Figure S6.



Supplementary Figure S7.





Supplementary Table S1

Compound	CAS number	Vendor	Purity (%)	Method for purity determination
RO-3306	872573-93-8	Santa Cruz Biotechnology	99.1	HPLC
CGP74514A	190654-01-4	Enzo Life Science	95	LCMS
CDK1 inhibitor	220749-41-7	Santa Cruz Biotechnology	>97	HPLC
Elbfluorene	n.a.	Enzo Life Science	≥95	HPLC
Benfluorene	440362-74-3	Santa Cruz Biotechnology	95	HPLC
Milciclib	802539-81-7	MedChemExpress	98.61	LCMS
CVT313	199986-75-9	MedChemExpress	99.47	LCMS
NU6140	444723-13-1	Santa Cruz Biotechnology	95	HPLC
GW8510	222036-17-1	Santa Cruz Biotechnology	97.9	HPLC
CDK2 inhibitor II	222035-13-4	Santa Cruz Biotechnology	≥95	HPLC
SU9516	377090-84-1	Merck - Calbiochem	96	HPLC
Palbociclib	571190-30-2	MedChemExpress	99.94	LCMS
Ribociclib	1211441-98-3	MedChemExpress	99.82	LCMS
ON123300	1357470-29-1	MedChemExpress	98.29	LCMS
Abemaciclib	1231930-82-7	MedChemExpress	99.87	LCMS
Arcyriaflavin A	118458-54-1	Santa Cruz Biotechnology	≥95	LCMS



CDK4 inhibitor	546102-60-7	Santa Cruz Biotechnology	$\geq 97$	LCMS
NSC625987	141992-47-4	Santa Cruz Biotechnology	98.5	LCMS
Ryuvidine	265312-55-8	Santa Cruz Biotechnology	$\geq 98$	HPLC
CINK4	359886-84-3	Santa Cruz Biotechnology	>96	HPLC
CDK4 inhibitor V	943746-57-4	Merck - Calbiochem	$\geq 98$	HPLC
CDK1/2 inhibitor III	443798-55-8	Santa Cruz Biotechnology	>98.9	HPLC
BMS265246	582315-72-8	MedChemExpress	97.47	LCMS
CGP 60474	164658-13-3	Tocris Bioscience	99.5	HPLC
NU6102	444722-95-6	Santa Cruz Biotechnology	95	HPLC
CDK1/5 inhibitor	40254-90-8	Santa Cruz Biotechnology	>99.1	HPLC
(R)-DRF053	1186647-87-9	Santa Cruz Biotechnology	98.8	HPLC
BIO	667463-62-9	MedChemExpress	98.37	LCMS
PNU112455A	21886-12-4	Santa Cruz Biotechnology	99.6	HPLC
BML259	267654-00-2	Enzo Life Science	98	LCMS
CDK2/9 inhibitor	507487-89-0	Merck - Calbiochem	$\geq 95$	HPLC
JNJ-7706621	443797-96-4	MedChemExpress	99.82	LCMS
Dinaciclib	779353-01-4	MedChemExpress	99.10	LCMS
Flavopiridol	146426-40-6	Sigma Aldrich	$\geq 98$	HPLC
SNS-032	345627-80-7	Selleck Chemicals	99.62	HPLC

BS181	1092443-52-1	Selleck Chemicals	99.79	HPLC
CDK9-IN-2	1263369-28-3	MedChemExpress	99.83	LCMS
CDK-IN-2	1269815-17-9	MedChemExpress	97.54	LCMS
LDC000067	1073485-20-7	MedChemExpress	98.14	LCMS
PHA767491	845714-00-3	Sigma Aldrich	100	HPLC
Tozasertib	639089-54-6	LC Laboratories	≥99	HPLC, TLC
R-CR8	294646-77-8	Eur J Med Chem. 2016 Mar 3;110:291-301	98.7	HPLC

**Supplementary Table S2**

CDK/cyclin complexes	Source	Substrate, 1 mg/ml (source)	ATP ( $\mu$ M)	Buffer	Enzyme Tag	Expression system
CDK1/B1	own	histone H1 (Sigma Aldrich)	15	100 mM HEPES-NaOH, pH 7.4	His-tag	Baculovirus infected Sf9 cells
CDK2/E1	own	histone H1 (Sigma Aldrich)	15	100 mM HEPES-NaOH, pH 7.4	His-tag	Baculovirus infected Sf9 cells
CDK2/A2	own	histone H1 (Sigma Aldrich)	15	100 mM HEPES-NaOH, pH 7.4	GST-tag	E.Coli
CDK4/D1	Proqinase	RPPTLSPIPHIPR peptide (Clonestar)	15	60 mM HEPES-NaOH, pH 7.5	GST-tag	Baculovirus infected Sf9 cells
CDK5/p25	Proqinase	histone H1 (Sigma Aldrich)	0.15	60 mM HEPES-NaOH, pH 7.5	GST-tag	Baculovirus infected Sf9 cells
CDK7/H/MAT1	Proqinase	(YSPTSPS) <sub>2</sub> KK peptide (Apronex)	1.5	60 mM HEPES-NaOH, pH 7.5	GST-tag	Baculovirus infected Sf9 cells
CDK9/T1	Proqinase	(YSPTSPS) <sub>2</sub> KK peptide (Apronex)	1.5	60 mM HEPES-NaOH, pH 7.5	GST-tag	Baculovirus infected Sf9 cells
AURORA A	Sigma	MBP (Sigma Aldrich)	0.3	50 mM MOPS, pH 7.2	GST-tag	Baculovirus infected Sf9 cells
AURORA B	Sigma	MBP (Sigma Aldrich)	3	50 mM MOPS, pH 7.2	GST-tag	Baculovirus infected Sf9 cells

## **PŘÍLOHA II**

**Hendrychová, D.**, Jorda, R., Kryštof, V. (2021): How selective are clinical CDK4/6 inhibitors? *Med Res Rev* 41, 1578-1598.

# How selective are clinical CDK4/6 inhibitors?

Denisa Hendrychová  | Radek Jorda  | Vladimír Kryštof 

Department of Experimental Biology, Faculty of Science, Palacký University, Olomouc, Czech Republic

## Correspondence

Vladimír Kryštof, Department of Experimental Biology, Faculty of Science, Palacký University, Šlechtitelů 27, 78371 Olomouc, Czech Republic.  
Email: [vladimir.krystof@upol.cz](mailto:vladimir.krystof@upol.cz)

## Funding information

Czech Science Foundation, Grant/Award Number: GA 19-08410S; Palacký University Olomouc, Grant/Award Number: IGA\_PrF\_2020\_021

## Abstract

Pharmacological inhibition of cyclin-dependent kinase 4/6 (CDK4/6) has emerged as an efficient approach for treating breast cancer, and its clinical potential is expanding to other cancers. CDK4/6 inhibitors were originally believed to act by arresting proliferation in the G1 phase, but it is gradually becoming clear that the cellular response to these compounds is far more complex than this. Multiple context-dependent mechanisms of action are emerging, involving modulation of quiescence, senescence, autophagy, cellular metabolism, and enhanced tumor cell immunogenicity. These mechanisms may be driven by interactions with unexpected targets. We review cellular responses to the Food and Drug Administration-approved CDK4/6 inhibitors palbociclib, ribociclib, and abemaciclib, and summarize available knowledge of other drugs undergoing clinical trials, including data on their off-target landscapes. We emphasize the importance of comprehensively characterizing drugs' selectivity profiles to maximize their clinical efficacy and safety and to facilitate their repurposing to treat additional diseases based on their target spectrum.

## KEYWORDS

cancer, cyclin-dependent kinase 4/6, inhibitor, off-target, polypharmacology, selectivity

## 1 | CLEAR INSIGHT IN DRUG TARGET SPECTRUM OFFERS NEW OPPORTUNITIES

Despite great efforts and remarkable advances in modern medicine, cancer remains a major cause of death worldwide, highlighting an urgent need for more effective therapies. To maximize the clinical efficacy of any

anticancer drug, its potency and selectivity spectrum must be well understood, because polypharmacology (i.e. a drug's propensity to interact with multiple targets) may have both advantageous and undesirable consequences. Misunderstanding a drug's mechanism of action may hamper efforts to predict therapeutic responses and thereby reduces clinical success. In particular, off-target activities can cause dangerous side effects, leading to failures in patient treatment. However, in many cases, rather than causing only undesired effects, off-target interactions are essential for anticancer activity.<sup>1</sup> They also offer opportunities to repurpose drugs towards more specified cohorts or new indications.<sup>2</sup> It is therefore important to investigate the selectivity profile of drugs; this is particularly true for kinase inhibitors targeting structurally conserved ATP-binding sites, where polypharmacology is expected.<sup>3</sup>

Kinase inhibitors are often claimed to be potent and selective in the first stages of discovery, but this has proven to be untrue in many cases.<sup>4</sup> Inhibitor potencies and selectivity profiles based on large panels of cell lines and kinases are missing or unavailable to the public for many compounds. Kinase inhibitors may have also non-kinase off-targets, whose discovery would require robust cellome-wide screening, which can be challenging.<sup>5,6</sup> Selectivity screening assays are usually performed with recombinant proteins, which typically lack certain features of native full-length proteins in the cellular context, such as variable posttranslational modifications or interactions with other proteins (which are often tissue- or cell type-dependent).<sup>3</sup> Presumptive targets are rarely validated genetically; in fact, a recent study showed that many targets of clinical drugs are nonessential and the drugs act independently of their putative target.<sup>1</sup> These findings raise important questions about the relevance of cellular assays and xenograft models using immunodeficient mice.<sup>5</sup> As a result, the precise mechanisms of action of most kinase inhibitors are not well understood.

Here we summarize current knowledge about the cellular responses and selectivity landscapes of the most promising cyclin-dependent kinase 4/6 (CDK4/6) inhibitors at this time including the three compounds of this class with Food and Drug Administration (FDA) approval: ribociclib, palbociclib, and abemaciclib. Evidence of substantial differences between these compounds is emerging; we provide a comprehensive overview of their target spectra.

## 2 | BIOLOGY OF THE CANONICAL CDK4/6–RETINOBLASTOMA PATHWAY

CDKs are crucial regulatory enzymes whose best-characterized members are implicated in the control of orderly progression through the cell cycle and transcription.<sup>7</sup> Tight control over the timing of CDK activation is essential for the maintenance of normal physiological cell functions, and aberrant activation of cell cycle proteins is one of the main hallmarks of cancer.<sup>8–10</sup> CDK4/6, as the key regulators of the G1/S transition, are currently the most well-established therapeutic targets for CDK inhibitors. In the early G1 phase of the cell cycle, activation of CDK4/6 is driven by multiple factors, especially interactions with D-type cyclins expressed in response to changes in the overall mitogenic signaling balance. The catalytic activity of CDK complexes is also regulated by endogenous inhibitors, which are divided into two families called Cip/Kip (p21, p27, p57) and INK4 (p16, p15, p18). Once activated, CDK4/6 initiate phosphorylation of the retinoblastoma (Rb) protein and the related Rb-like family proteins p107 and p130, which are their best-characterized substrates.<sup>10–14</sup> CDK4/6 have been proposed to add only one phosphate during the G1 phase, which primes Rb for hyperphosphorylation by other CDKs.<sup>15</sup> Hyperphosphorylation of Rb reduces its inhibitory activity towards E2 factor (E2F) transcription factors, enabling them to drive the expression of genes necessary for promoting entry into the S-phase and DNA replication.<sup>11,16,17</sup>

However, a growing body of evidence indicates that CDK4/6 also phosphorylate other substrates including FOXM1, SMAD3, and nuclear factor of activated T cells (NFAT).<sup>18–20</sup> Phosphorylation of the FOXM1 transcription factor leads to its stabilization and activation, which is required for progression in both S phase and mitosis. Interestingly, it also suppresses senescence.<sup>18,21</sup> SMAD3 is a transcription factor that mediates the transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) antiproliferative response under physiological conditions and provides an additional level of regulatory control over the cell cycle network. Phosphorylation induced by CDK4 or CDK2 inhibits the

transcriptional activity and antiproliferative effects of SMAD3; this reduces levels of p15 and increases those of c-Myc, thereby facilitating the G1/S transition. Inhibition of CDK4/6 and CDK2, thus, leads to cell cycle blockage induced by TGF- $\beta$ .<sup>19,22</sup> It should be noted that not all functions of CDK4/6 are directly related to the cell cycle. For example, these CDKs negatively modulate the activity of NFAT transcription factors, crucial regulators of T-cell function.<sup>20</sup> CDK4/6 also phosphorylate substrates affecting metabolic processes, cell differentiation, apoptosis, and mitochondrial activity.<sup>23–26</sup> In addition, CDK4/6-cyclin D complexes perform noncatalytic functions such as sequestering endogenous CDK inhibitors of the Cip/Kip family, including p21 and p27, that would otherwise bind to CDK2.<sup>27,28</sup> Interestingly, a recent study revealed that in addition to its inhibitory function, p27 allosterically activates CDK4 in complex with cyclin D to increase catalytic activity. This is another avenue by which it influences sensitivity to pharmacological CDK4/6 inhibitors.<sup>29</sup>

### 3 | IMPLICATION IN CANCER

The Cancer Dependency Map Portal of clustered regularly interspaced short palindromic repeats screening data from project Achilles indicates that 352 out of 739 genomically characterized cancer cell lines have an essential requirement for CDK4, 390 for CDK6, 579 for cyclin D1, 54 for cyclin D2, and 119 for cyclin D3.<sup>30,31</sup> The CDK4/6–Rb–p16 pathway is commonly altered by amplification or overexpression of D-type cyclins or deletion of endogenous CDK inhibitors, or more rarely by activating mutations or amplification of CDKs. It can be also evaded by the upregulation of upstream pathways, which leads to Rb hyperphosphorylation.<sup>13,32</sup> Because of the multifunctional nature of Rb, which in complex with E2F transcription factors represses hundreds of genes involved in several cellular functions, the CDK4/6–Rb–p16 pathway influences several fundamental properties of cancer cells.<sup>12</sup> Although further research is needed, preclinical and clinical data demonstrate that CDK4/6 inhibition is an efficient strategy for treating various malignancies. Most clinical applications of this strategy relate to hormone-positive breast cancer,<sup>33</sup> but it is also effective for other diseases with poor prognosis including glioblastoma multiforme, metastatic melanoma, mantle cell lymphoma, and other hematologic malignancies. Clinical trials using CDK4/6 inhibition against these cancers are currently underway.<sup>34–36</sup>

### 4 | FROM PAN-SELECTIVE COMPOUNDS TO SELECTIVE CDK4/6 INHIBITORS

Several CDK inhibitors have been developed in the last 20 years. The first generation of compounds in this class such as flavopiridol<sup>37</sup> and roscovitine<sup>38</sup> was relatively nonspecific and targeted multiple CDKs. These compounds suffered from certain limitations associated with cytotoxicity, giving rise to narrow therapeutic windows. Because of the limited understanding of their mechanisms of action and inappropriate patient selection, they displayed poor results in clinical trials. Consequently, efforts were made to discover drugs with higher selectivity and greater overall potency.<sup>13,39</sup>

On the basis of the central role of CDK4/6–Rb–p16 in controlling proliferation and the fact that genetic alteration or overexpression of CDK4 and cyclin D1 are observed in several tumor types, CDK4/6 kinases were identified as promising therapeutic targets. 3-ATA and its derivative NSC625987 were among the first compounds described as selective for CDK4 over CDK1/2<sup>40</sup>; other selective CDK4/6 compounds were subsequently discovered, including ryuvidine,<sup>41</sup> CINK4,<sup>42</sup> and arcyriaflavin A.<sup>43</sup> While all these compounds were described as selective, their CDK4/6 selectivity is limited and they often produce distinct cellular outcomes.<sup>4</sup> It was later shown that certain pyridopyrimidines exhibit high selectivity for CDK4/6 over other CDKs,<sup>44</sup> and subsequent optimization led to a discovery of palbociclib (Ibrance, PD0332991),<sup>45</sup> which was finally approved by the FDA for treatment of breast cancer in 2015.<sup>46,47</sup> Its approval was shortly followed by approval for ribociclib (Kisqali, LEE011)<sup>48</sup> and



abemaciclib (Verzenio™, LY2835219).<sup>49</sup> Since selective inhibition of the CDK4/6 pathway has emerged as a beneficial approach, at least 14 CDK4/6 inhibitors have been entered into clinical trials, including trilaciclib (G1T28),<sup>50</sup> lerociclib (G1T38),<sup>51</sup> and SHR6390<sup>52</sup> (Table 1; Figure 1).

## 5 | FDA-APPROVED CDK4/6 INHIBITORS

Palbociclib, ribociclib, and abemaciclib have been described as potent orally bioavailable small-molecule inhibitors.<sup>13,45,54</sup> They exhibit strong inhibitory potency towards CDK4/6, with low nanomolar half-maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) values (see Figure 2). Their chief mechanism of action is thought to be based on preventing Rb phosphorylation by inhibiting CDK4/6 and consequently inducing G1 cell cycle arrest.<sup>12,13,45,54,59</sup> Unlike less selective drugs exhibiting cytotoxic effects, they tend to have cytostatic effects without substantial induction of cell death, which is probably linked to their reduced clinical toxicity.

However, recent studies have revealed other cellular effects that accompany CDK4/6 inhibition induced by all three compounds or by knockdown. These effects may be due to the impact of inhibition on other CDK4/6 kinase substrates or to the noncatalytic functions of these CDKs, either of which could influence cellular phenotype. Moreover, these effects could potentially alter tumor progression by mechanisms other than prevention of Rb phosphorylation. This could offer opportunities to increase the clinical efficacy of these drugs by developing new therapeutic approaches such as combining CDK4/6 inhibition with immunotherapy. To do this, it is crucial to understand common mechanisms by which CDK4/6 inhibitors exert their effects.<sup>24</sup>

**TABLE 1** CDK4/6 inhibitors under clinical development

CDK4/6 inhibitor	Company	Stage	Reference
Palbociclib (PD033291)	Pfizer	Approved, Phase I/II	[45]
Ribociclib (LEE11)	Novartis	Approved, Phase I/II	[53]
Abemaciclib (LY283519)	Eli Lilly	Approved, Phase I/II/III	[54]
SHR6390	Hengrui Medicine	Phase I/II/III	[52]
Trilaciclib (G1T28)	G1 Therapeutics	Phase II	[50]
Lerociclib (G1T38)	G1 Therapeutics	Phase I/II	[51]
MM-D37K <sup>a</sup>	MetaMax	Phase I/II	[55]
BPI-16350	Betta Pharmaceuticals	Phase I	<sup>b</sup>
TQB3616	CTTQ Pharma	Phase I	[56]
FCN-437	Fochon Pharmaceutical	Phase I	[57]
Birociclib (XZP-3287)	Sihuan Pharmaceutical/XuanZhu Pharma	Phase I	[58]
HS-10342	Jiangsu Hansoh Pharmaceutical Group	Phase I	<sup>c</sup>
CS3002	CStone Pharmaceuticals	Phase I	<sup>d</sup>
BEET-209	Guangzhou BeBetter Medicine Technology	Phase I	<sup>e</sup>

Note: Information obtained from [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov) and [apps.who.int/trialsearch/in](https://apps.who.int/trialsearch/in) in June 2020.

<sup>a</sup>Peptide-based inhibitor.

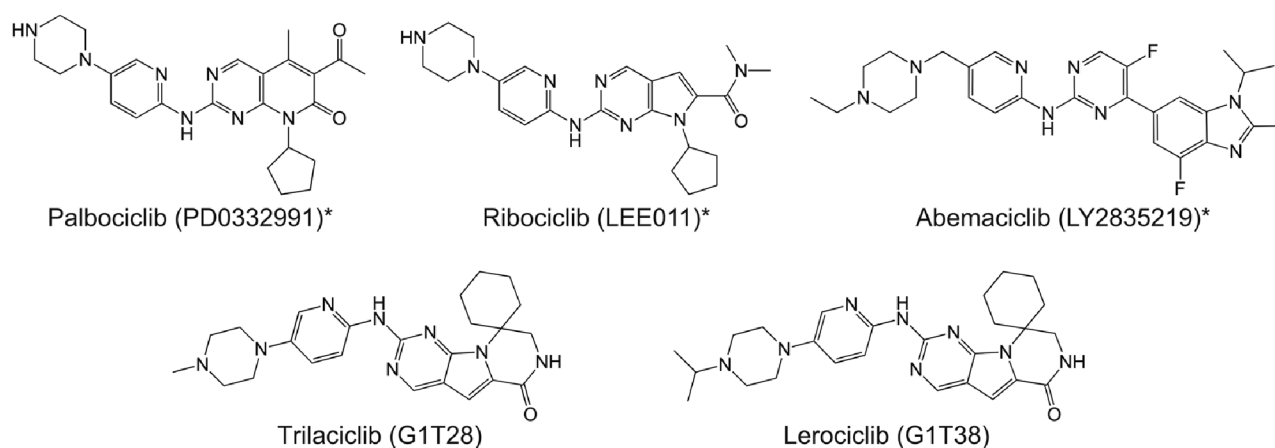
<sup>b</sup>[bettapharma.com](https://bettapharma.com).

<sup>c</sup>[hspharm.com](https://hspharm.com).

<sup>d</sup>[cstonepharma.com](https://cstonepharma.com).

<sup>e</sup>[bebettermed.cn](https://bebettermed.cn).





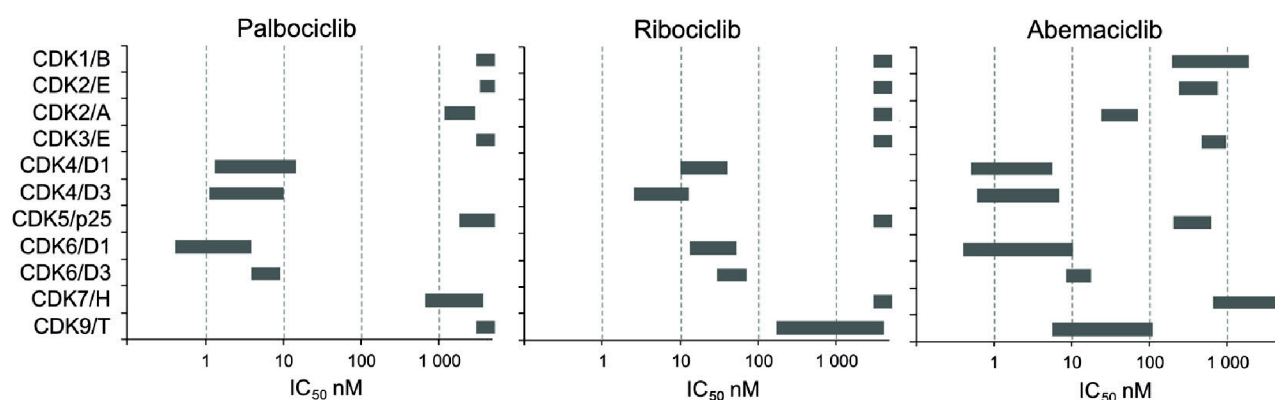
**FIGURE 1** Chemical structures of the most advanced cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitors. Asterisks indicate Food and Drug Administration approval

The cellular responses to CDK4/6 inhibitors beyond simple cytostatic growth arrest are discussed at length below and briefly summarized in Figure 3.

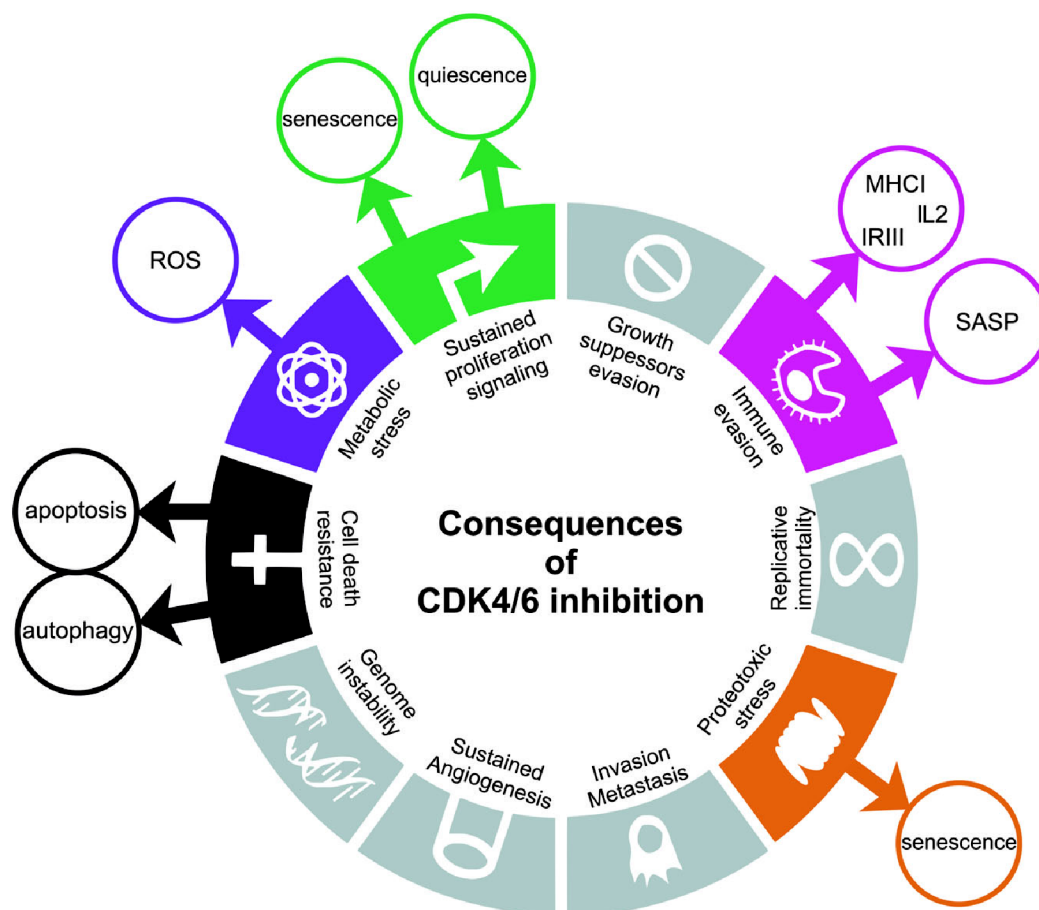
## 6 | BIOLOGICAL CONSEQUENCES OF PHARMACOLOGICAL CDK4/6 INHIBITION

### 6.1 | Decision point: Quiescence or senescence?

The cell cycle inhibition induced by CDK4/6 inhibition is accompanied by phenotypic changes characteristic of quiescence or senescence. Unlike quiescence, which is reversible, senescence is defined as irreversible cell cycle arrest and is characterized by a senescence-associated secretory phenotype.<sup>12</sup> Progression from quiescence to senescence has been termed geroconversion.<sup>66</sup> CDK4/6 inhibitors cause reversible cell cycle arrest in lower doses and irreversible arrest in higher doses (especially upon prolonged treatment) in diverse cell lines.<sup>53,67–70</sup> In several cases, the cellular response is dose-dependent and predetermined by the intrinsic programs of specific tumor cell types, which are activated following the cell's withdrawal from the cell cycle.<sup>24,71,72</sup> Induction of senescence or quiescence may be coupled with the assembly of the dimerization partner, RB-like, E2F, and multivalvul class B



**FIGURE 2** Ranges of published half-maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) values for Food and Drug Administration-approved cyclin-dependent kinase 4/6 (CDK4/6) inhibitors, showing their differing degrees of selectivity<sup>4,45,54,60–64</sup>



**FIGURE 3** Impact of cyclin-dependent kinase 4/6 (CDK4/6) inhibitors on the hallmarks of cancer defined by Hanahan and Weinberg<sup>8</sup> and Luo et al.<sup>65</sup> CDK4/6 inhibitors primarily block sustained proliferation of cancer cells in the G1 phase by suppressing Rb/E2F-regulated gene transcription and the phosphorylation of other CDK4/6 substrates. When arrested cells exit the G1 phase, they may undergo reversible quiescence or progress into an irreversible senescence state. Altered metabolism could increase ROS levels, which may lead to apoptosis. In some cells, autophagy occurs as an adaptive mechanism promoting survival. G1 cell cycle arrest is also associated with a higher proteasomal activity, which may be critical for the induction of senescence. CDK4/6 inhibition enhances antitumor immunity via multiple mechanisms including increasing levels of MHC I class proteins, type III interferons (IRIII), or IL2, promoting T effector cell activation, and improving recognition and clearance of tumor cells. In addition, the senescence state is accompanied by SASP involving cytokines, chemokines, promigratory factors, and T cell chemoattractants, possibly enhancing tumor clearance. E2F, E2 factor; IL2, interleukin-2; MHC I, major histocompatibility complex class I; Rb, retinoblastoma; ROS, reactive oxygen species; SASP, senescence-associated secretory phenotype [Color figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]

(DREAM) complex, which was shown to repress the expression of most, if not all, cell cycle genes during quiescence. This multisubunit complex includes the Rb paralog p130 and the MuvB protein, which scaffold with E2F4/5 transcription factors. Active CDK4/6 phosphorylate p130, leading to disruption of DREAM and shifting the balance from quiescence to proliferation. The released MuvB core component then interacts with BMYB and FOXM1 and coordinates gene expression during the S and G2/M phases.<sup>73,74</sup> Inhibition of CDK4/6 activity blocks DREAM complex disassembly and prevents cell cycle entry.<sup>75</sup> FOXM1 is itself a CDK4/6 substrate, and its phosphorylation was found to prevent senescence.<sup>18</sup> Inhibition or small interfering RNA (siRNA) knockdown of CDK4/6 led to the loss of multisite phosphorylation and destabilization of FOXM1 together with a reduction in cellular self-renewal capacity.<sup>70</sup> However, siRNA depletion of FOXM1 led to a weaker induction of senescence in melanoma cells, indicating that some other function of CDK4/6 inhibitors may have contributed to the response observed initially.<sup>18</sup> The nature of the decision point that determines whether or not a cell progresses to permanent senescence is not

entirely clear at present. Other proteins such as MDM2, ATRX, HRAS, and mTOR have been shown to arbitrate in the transition to senescence in a cell type-specific way.<sup>71,72,76</sup> In addition, in breast cancer cell lines, only higher doses (5  $\mu$ M) of palbociclib induced irreversible cell cycle inhibition and CDK4/6 knockdown did not recapitulate this irreversible effect, suggesting that the inhibition of other targets by high doses of palbociclib may be required for the irreversible transition.<sup>70</sup>

## 6.2 | Cellular metabolism

The process of cell division is tightly coordinated with the activity of the metabolic machinery. Cell cycle entry is accompanied by increased production of metabolites required for cell division, and enzymes of cellular metabolism have been identified as CDK4/6 kinase targets.<sup>26,77</sup> In pancreatic ductal adenocarcinoma, CDK4/6 inhibition by all three approved inhibitors increases cellular complexity, leads to accumulation of mitochondria and ATP, and stimulates glycolytic and oxidative metabolic pathways, which also increase the production of reactive oxygen species (ROS). Such enhanced metabolic activity was associated with increased mTORC1 activity.<sup>26</sup> In keeping with previous studies, siRNA depletion of CDK4/6 increased ROS levels, indicating that this is an on-target effect of CDK4/6 inhibitors.<sup>70</sup> Two key enzymes in glycolytic metabolism, 6-phosphofructokinase 1 (PFK1) and pyruvate kinase M2 (PKM2), were subsequently identified as important CDK6 substrates that are inhibited by CDK6-mediated phosphorylation. PFK1 and PKM2 are rate-limiting enzymes in glycolysis; the reduction in their catalytic activity redirected glycolytic intermediates into the pentose phosphate and serine pathways that produce NADPH and glutathione.<sup>25</sup> In T-cell acute lymphoblastic leukemia lines with high expression of CDK6 and cyclin D3, pharmacological inhibition of CDK4/6 or knockdown of CDK6 reduced carbon flow through the pentose phosphate and serine pathways. This led to the depletion of the antioxidants NADPH and glutathione together with increased ROS production, making the cells susceptible to ROS-dependent apoptosis upon CDK4/6 inhibition. Conversely, in cell lines not expressing appreciable levels of CDK6 and cyclin D3, such as breast cancer cells, CDK4/6 inhibition did not reduce the catalytic activity of PFK1 and PKM2 and the cells only underwent cell cycle arrest.<sup>25,78,79</sup>

## 6.3 | Impact on proteasome activity

A recent study showed that G1 cell cycle arrest induced by the CDK4/6 inhibitors palbociclib and ribociclib (abemaciclib was not included in the study), is associated with a high proteasomal activity, which may be also critical for the induction of senescence.<sup>80</sup> Interestingly, proteasomal activation increased proteolysis and levels of endogenous proliferation-related proteins in a breast cancer cell line but was not associated with increased protein ubiquitylation. Thermal proteome profiling revealed that the increase in proteasome activity was mediated at least partly by reducing the proteasomal association of EMC29, which normally suppresses proteasome activity. Further analysis showed that the palbociclib- and ribociclib-mediated increase in proteasomal activity may be an additional mechanism required for complete G1 arrest. However, knockdown studies showed that proteasomal activation was CDK4/6- and cell cycle-independent. Further studies are required to identify the direct target driving these outcomes, which may be a common off-target contributing to the mode of action of these drugs.<sup>80</sup>

## 6.4 | Tumor immune microenvironment

Interestingly, CDK4/6 inhibitors also enhance antitumor immunity via effects on both tumor cells and immune cells. Palbociclib and abemaciclib suppressed the proliferation of regulatory T cells, reducing their immunosuppressive function, and enabling recognition of tumor cells by cytotoxic T cells.<sup>81</sup> This effect was proposed to be a

consequence of suppressed E2F transcription activity and subsequent downregulation of its target, DNA methyltransferase 1 (DNMT1). Downregulation of DNMT1 is believed to reduce methylation of endogenous retroviral genes in tumor cells, increasing levels of double-stranded RNA. CDK4/6 inhibition mediates the production of type III interferons in tumor cells, which induce expression of responsive transcription factors such as signal transducer and activator of transcription 1 and enhance tumor antigen presentation.<sup>81,82</sup> CDK4/6 kinase inhibition also derepressed NFAT family transcription factors and their target genes, which are crucial for promoting T cell activation and function.<sup>20,82</sup> Heightened NFAT signaling increased secretion of interleukin-2, a marker of T cell activation, and levels of tumor-infiltrating T cells.<sup>20</sup> Moreover, senescence induced by CDK4/6 inhibitors was accompanied by a senescence-associated secretory phenotype (SASP), which involves upregulation of various cytokines, chemokines, promigratory factors, and possibly also T cell chemoattractants, suggesting that SASP may enhance tumor clearance.<sup>83</sup> However, although abemaciclib treatment increased  $\beta$ -galactosidase activity, which is a marker of cellular senescence, no increased expression of SASP factors was observed.<sup>18,81</sup> CDK4/6 inhibition also increased expression of antigen processing and presentation proteins including MHC class I molecules, enabling recognition of tumor cells by cytotoxic T cells.<sup>81</sup> These results indicate that pharmacological CDK4/6 inhibitors have a strong impact on the tumor immune microenvironment via multiple pathways that collectively enhance immune cell activity and tumor clearance. On the other hand, CDK4/6 inhibitors may also suppress immune responses. CDK4/6 inhibition elevated PD-L1 levels by preventing CDK4-mediated phosphorylation of the SPOP adaptor of E3 ubiquitin ligase, which regulates PD-L1 stability. Elevated PD-L1 levels may facilitate evasion of immune surveillance checkpoints.<sup>84</sup> However, pharmacological CDK4/6 inhibitors enhance the efficacy of immune checkpoint blockade; accordingly, combinatorial treatment using pharmacological CDK4/6 inhibitors with anti-PD-1 immunotherapy enhanced tumor regression and improved overall survival in preclinical tumor models.<sup>20,81,84</sup>

## 6.5 | Responses independent of Rb status

Although CDK4/6 inhibitors are reported to be mostly inactive in Rb-deficient cell lines,<sup>12</sup> recent studies suggest that they can affect Rb-deficient cell lines. For example, bladder cancer cells were sensitive to CDK4/6 inhibitors regardless of their Rb status: Rb wild-type cells were arrested in the G1 phase, while Rb-deficient cell lines displayed reduced mitotic entry and induction of apoptosis. This seems to be a consequence of decreased phosphorylation of FOXM1 upon CDK4/6 inhibition, which downregulates its transcriptional targets involved in the G2/M phase of the cell cycle. Levels of FOXM1 correlated with sensitivity to CDK4/6 inhibitors in Rb-deficient bladder and small-cell lung cancer cell lines. This observation led to a breakthrough in the treatment of advanced bladder cancer, which was previously considered unfit for treatment using existing drugs.<sup>85</sup>

## 6.6 | Cell cycle dynamics

Cellular responses to CDK4/6 inhibition also involve tissue-specific alternative cell cycle regulation mechanisms.<sup>86</sup> The discovery of functional redundancy between CDKs has changed the classical view of orderly cell cycle regulation, and the supposedly essential role of CDK4/6 has been challenged by the finding that CDK1 or CDK2 can facilitate the G1/S transition alone in some cases.<sup>87,88</sup> For example, triple-negative breast cancer luminal androgen receptor subtype cells were considerably more sensitive to CDK4/6 inhibition by palbociclib than basal-like cells.<sup>86</sup> Luminal cells exited mitosis with low levels of CDK2, and, therefore, required CDK4/6 activity to re-enter the cell cycle following quiescence. Conversely, basal-like cells could proceed directly into mitosis because they exhibited persistently high levels of CDK2, bypassing the requirement for CDK4/6 activity; consequently, they were not responsive to CDK4/6 inhibitors. This may explain why some tumor types resist CDK4/6 inhibition therapy.<sup>86</sup>



## 7 | SUBSTANTIAL DIFFERENCES AMONG TRIO OF APPROVED COMPOUNDS

Although all three approved compounds are reported to be CDK4/6-selective, emerging profiling data have demonstrated clear differences in their overall selectivity both within and outside the CDK family (Figure 4). These off-target activities lead to significant differences in the drugs' phenotypic effects, making their molecular and clinical behavior even more complex. Abemaciclib, in particular, elicits biochemical and phenotypic responses that are not induced by ribociclib and only weakly by palbociclib.<sup>64</sup> These drugs also have quite different cellular potencies with respect to cytostasis induction, partly because of their different CDK inhibition profiles. Abemaciclib is approximately 5.5-fold more potent on average than palbociclib as an inducer of cytostasis in breast cancer cell lines.<sup>64</sup> Abemaciclib also induces distinct cellular effects in higher doses, including cell cycle blockage in the G2 phase as well as G1, and cytotoxicity even in the absence of Rb. Exposure to ribociclib has little or no impact on cell death, while palbociclib exhibits only weak cellular toxicity at lower doses.<sup>64</sup> However, in pancreatic cell lines, palbociclib elicits cytotoxic effects upon high or prolonged dosing, and surviving cells exhibit G2/M cell cycle arrest, indicating inhibition of other kinases.<sup>89</sup>

The drugs also have significantly different clinical profiles. They all are approved for estrogen receptor positive (ER<sup>+</sup>)/human epidermal growth factor receptor-2 negative (HER2<sup>-</sup>) breast cancer and cause similar improvements in progression-free survival, but their dose-limiting toxicities differ significantly. Palbociclib and ribociclib elicit myelosuppression and high-grade neutropenia as the main dose-limiting toxicities, and, thus, require discontinuous dosing, whereas abemaciclib is dosed continuously.<sup>33,59,91</sup> Abemaciclib also exhibits higher single-agent activity, whereas palbociclib and ribociclib are most effective in combination with other drugs, namely letrozole fulvestrant.<sup>92-97</sup>

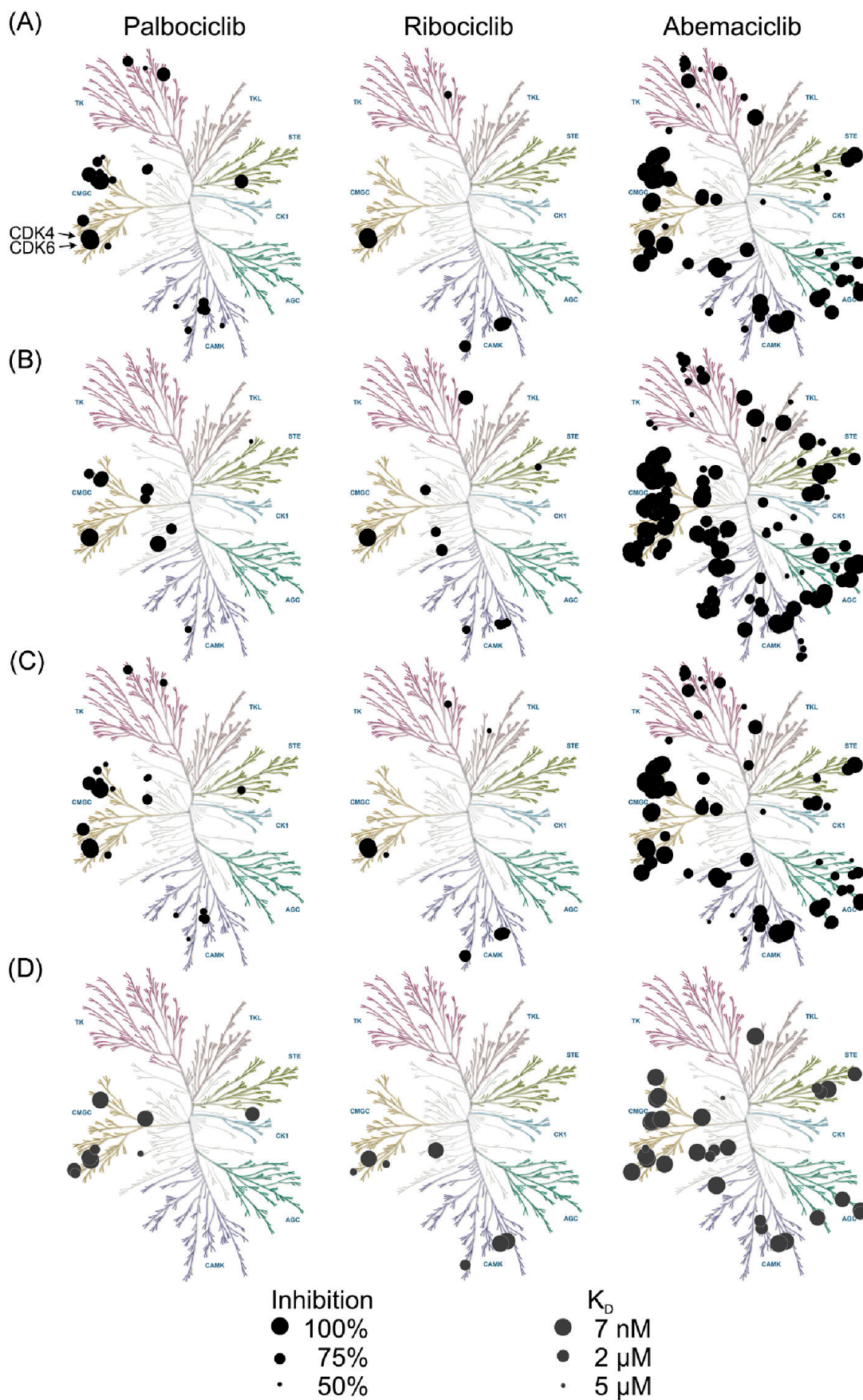
These data collectively suggest the drugs have distinct and complex pharmacology, especially abemaciclib, leading to differences in their cellular effects *in vitro* and in the clinic. Each drug, thus, has distinct advantages and drawbacks. Further research on their polypharmacology could improve understanding of their mechanisms of action and expand their clinical applications. Polypharmacology could enable the repurposing of drugs to treat different diseases and because inhibiting multiple signaling pathways may slow or even prevent the development of drug resistance. The off-target activities of FDA-approved CDK4/6 inhibitors are discussed below in more detail.

### 7.1 | Palbociclib

Palbociclib was developed by elaborating on the pyrido[2,3-*d*]pyrimidine-7-one scaffold<sup>45</sup> and was the first CDK4/6 inhibitor approved by the FDA for the treatment of metastatic breast cancer.<sup>35,46,47</sup> It has high potency towards CDK4 and CDK6, with nanomolar IC<sub>50</sub> values. On the basis of kinetic assays, palbociclib is the most potent inhibitor of CDK6 among the approved compounds discussed herein.<sup>3,63</sup> It was found to inhibit CDK6 more strongly than CDK4 in a dose-response cellular thermal shift assay.<sup>98</sup>

Early tests using a panel of 36 kinases suggested that palbociclib was exquisitely selective for CDK4/6,<sup>45</sup> but more comprehensive studies revealed possible off-targets.<sup>3,60-64</sup> A chemoproteomic study and thermal proteome profiling indicated that palbociclib also interacts with CDK9,<sup>80,99</sup> but this was not confirmed by other assays in which palbociclib did not exhibit appreciable inhibition of or affinity for CDK9.<sup>3,60,62-64,98</sup> A subsequent binding competition assay identified CDK16/17 as possible targets with affinities comparable to CDK4/6,<sup>62</sup> but the *K<sub>d</sub>* values for these proteins determined in other studies were over twice those for CDK4/6.<sup>3</sup> Further comprehensive investigations are needed to confirm the relevance of these proteins.

Palbociclib has also been convincingly demonstrated to interact with several lipid kinases such as PIK3R4, PIK3CD, PIP4K2A/B/C, and PIP5K2C.<sup>3,62,80,99</sup> All these lipid kinases are involved in the phosphatidylinositol signaling pathway, which produces phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate, a compound critical for activation of



the protein kinase B (AKT) signaling cascade.<sup>100</sup> Palbociclib was shown to dose-dependently inhibit phosphorylation of AKT and its downstream target GSK3 $\beta$  in squamous cell lung carcinoma and melanoma models.<sup>69,80,99</sup> In contrast to previous studies, palbociclib mediated activation of AKT in malignant pleural mesothelioma, osteosarcoma, and breast cancer cells.<sup>67,101</sup> Biochemical assays indicated that palbociclib did not appreciably inhibit GSK3 $\beta$  or CAMKII $\gamma/\delta$ .<sup>62-64</sup> Combinatorial treatment with PI3K/AKT/mTOR inhibitors gave promising synergistic results against triple-negative breast cancer in preclinical trials.<sup>102</sup>

Subsequently, members of the CSNK2 family and AMP-activated protein kinase  $\alpha$ 1 (AMPK $\alpha$ 1) were shown to interact specifically with palbociclib; CSNK2 $\alpha$ 1/2 were highlighted as the most prominent targets.<sup>80,99</sup> Inhibition of AMPK and CSNK2 kinases together with lipid kinases in the PI3K/AKT pathway were considered to be responsible for modulation of autophagy, which was observed in lung squamous carcinoma in response to dosing with palbociclib in the micromolar range.<sup>99</sup> Inhibition of CSNK2 $\alpha$ 1/2/3 kinases was confirmed in other profiling studies,<sup>3,61</sup> and the  $K_d$  values determined towards CSNK2 $\beta$  and CSNK2 $\alpha$ 2 were even lower than that for CDK4.<sup>3</sup> However, AMPK kinases were not inhibited sufficiently,<sup>61,63,64</sup> and the IC<sub>50</sub> values determined for CSNK2 $\alpha$ 1/2 were above 8  $\mu$ M.<sup>64</sup> Conversely, Hsieh et al.<sup>103</sup> reported that palbociclib treatment activates AMPK and inhibits PP5 at micromolar concentrations, inducing both apoptosis and autophagy in hepatocellular carcinoma. These effects were not reproduced upon CDK4/6 depletion. Induction of autophagy was also observed in breast and gastric cancer cells as well as fibroblasts and leukemic cells.<sup>70,104-106</sup> In breast cancer cell lines, only low (1  $\mu$ M) concentrations of palbociclib induced autophagy accompanied by reversible G1 cell cycle arrest; higher doses (> 2.5  $\mu$ M) induced senescence. The induction of a similar phenotype at a dose of 1  $\mu$ M was confirmed in cells with siRNA-silenced CDK4/6. Inhibition of CDK4/6 increased cellular ROS levels, which, in turn, triggered autophagy, which may degrade ROS and mediate reversal of cell cycle arrest. Induction of autophagy can, thus, be seen as an adaptive mechanism that promotes cancer cells' survival and prevents the induction of senescence.<sup>70</sup> However, it is not clear whether the induction of autophagy is due to CDK4/6 inhibition or other off-targets. Simultaneous inhibition of autophagy significantly enhances the efficacy of palbociclib in cancers with intact G1/S transition.<sup>70</sup>

Mass spectrometry (MS)-based drug affinity screening and thermal proteome profiling indicated that c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1) also interacts with palbociclib.<sup>80,99</sup> Accordingly, JNKs were downregulated in palbociclib-treated breast cancer cells. These kinases have been shown to suppress cell migration and invasion via the modulation of the c-Jun/COX-2 axis. Together with enzymes of the extracellular-signal-regulated kinase (ERK) pathway, JNK phosphorylates and stabilizes the c-Jun transcription factor, which promotes transcription of COX-2, an enzyme that is involved in the epithelial-mesenchymal transition (EMT) and is, thus, critical for migration and metastasis.<sup>107</sup> However, other profiling studies provided no convincing evidence of JNK inhibition by palbociclib.<sup>3,61,62,64</sup> In pancreatic cancer cells, palbociclib surprisingly upregulated several genes implicated in EMT, thereby enhancing invasiveness and metastasis. Moreover, silencing CDK4/6 with short hairpin RNA also led to EMT induction, increased SMAD3 transcriptional activity, elevated p15 levels, and activation of TGF- $\beta$  signaling, suggesting that these outcomes are due to an on-target effect.<sup>89</sup> The inconsistent reported findings concerning the effects of palbociclib on EMT suggest that further research is needed to clarify the involvement of CDK4/6 kinases or other off-targets in EMT modulation.

Other kinases sensitive to palbociclib that repeatedly appear with high ranks in profiling datasets include HIPK, CLK, TTK, ULK, and FLT3.<sup>3,60,61,63,64</sup> However, no follow-up studies targeting these enzymes have been reported.

**FIGURE 4** Kinome tree views showing the selectivity of approved CDK4/6 inhibitors. Processed profiling data were adapted from published (A) mobility shift assays using 1  $\mu$ M compounds with 274 kinases<sup>60</sup>; (B) KinomeScan® assays using 1  $\mu$ M concentration with 465 kinases<sup>61</sup>; (C) mobility shift, enzyme-linked immunosorbent assay and IMAP assays using 1  $\mu$ M concentration with 280 kinases<sup>63</sup>; and (D) mass spectrometry-based chemoproteomic kinobead assays using 0.003–3  $\mu$ M concentration, originally performed with 587 proteins.<sup>3</sup> Kinome trees were generated by the web-based tool KinMap.<sup>90</sup> Illustration reproduced courtesy of Cell Signaling Technology, Inc. ([www.cellsignal.com](http://www.cellsignal.com)). TK, tyrosine kinase; TKL, tyrosine kinase-like [Color figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]



Palbociclib also exhibited considerable activity against MPSK1/STK16 in KinomeScan and cell-based assays.<sup>60,64</sup> In addition, there are several kinases exhibiting inconsistent results. For example, palbociclib exhibited an  $IC_{50}$  of 191 nM towards CAMK2 $\delta$  in one assay<sup>64</sup> but did not appreciably inhibit this kinase in other assays.<sup>60,63</sup>

## 7.2 | Ribociclib

Ribociclib was developed from the same pyrido[2,3-*d*]pyrimidine-7-one scaffold as palbociclib.<sup>53</sup> It is the most selective CDK4/6 inhibitor but less potent than palbociclib and ribociclib in a biochemical assay.<sup>63</sup> At a concentration of 0.1  $\mu$ M, it was exclusively selective for CDK4 in addition to CDK6 (which was not included in the assay)<sup>61,64</sup> and even at higher concentrations, only a few other kinases were inhibited.<sup>60–64</sup>

Comprehensive profiling studies clearly showed that CAMK2 $\alpha/\beta/\gamma/\delta$  isoforms are among these additional ribociclib targets.<sup>3,60,61,63,64</sup> The  $IC_{50}$  value for CAMK2 $\delta$  was 58.9 nM, which is comparable to the values obtained for CDK4/6 in the same assay<sup>64</sup>; in fact, the binding affinities for CAMK2 $\gamma$  and CAMK2 $\delta$  exceeded that for CDK6.<sup>3</sup>

Another notable kinase involved in cell cycle proliferation identified as a target of ribociclib when applied at a dose of 1  $\mu$ M is cyclin G-associated kinase (GAK).<sup>99</sup> Slight inhibition of GAK was also observed in other selectivity screenings<sup>61,64</sup> and the binding affinity ( $K_d$ ) of ribociclib for GAK was determined to be 658 nM.<sup>3</sup> GAK is involved in several biological processes including cell proliferation and membrane trafficking.<sup>108</sup> Aurora kinase A was also found to interact with ribociclib in a chemoproteomic study,<sup>99</sup> but this drug did not exhibit even moderate  $IC_{50}$  values towards aurora kinases in a kinase assay. Therefore, the changes in aurora expression observed in the proteomic analysis probably reflect an indirect effect on the cell cycle related to the arrest of cells in the G1 phase, which would reduce the level of aurora phosphorylation in the G2 phase.<sup>64</sup> Ribociclib also induced similarly modest inhibition of another cell cycle-related protein, TTK (MPS1).<sup>61,64</sup> TTK plays a key role in the spindle checkpoint, and in a biochemical assay, it exhibited an  $IC_{50}$  value of 92 nM.<sup>64</sup> It is also weakly inhibited by palbociclib and abemaciclib.<sup>61,64</sup>

## 7.3 | Abemaciclib

The benzimidazolylpyrimidine derivative abemaciclib is the only CDK4/6 inhibitor approved by the FDA for use as a single agent in breast cancer treatment.<sup>92,93</sup> Of the compounds discussed herein, it is the strongest inhibitor of CDK4, with  $IC_{50}$  values 2–5 times lower than those for palbociclib or ribociclib in kinase assays. It also had higher affinities for CDK4 and CDK6 in binding assays compared to palbociclib and ribociclib.<sup>3,61</sup>

Although abemaciclib seemed far less active against other cells cycle-related CDKs in early selectivity screening assays,<sup>54</sup> later profiling studies revealed several additional targets in the CDK family.<sup>3,60–64</sup> Multiplexed inhibitor bead/MS competition experiments indicated that abemaciclib inhibits CDK1/2/9/16/17 with potencies comparable to those for CDK4/6, and is a slightly less potent inhibitor of CDK5/7/8/12/13/14/15/19.<sup>62</sup> However, other studies yielded different results. For instance, an assay using kinobeads did not confirm these additional targets; aside from CDK4/6, only CDK9/16 exhibited  $K_d$  values in the nanomolar range.<sup>3</sup> Potent targeting of CDK9 by abemaciclib was subsequently confirmed in three independent studies.<sup>54,60,64</sup> Interestingly, however, CDK9 inhibition was not confirmed in cellular assays and was, therefore, considered to be inconsequential.<sup>54,109</sup> Abemaciclib also exhibited significant potency towards atypical CDK5 in a biochemical assay, with an  $IC_{50}$  value of 200 nM,<sup>60</sup> which was consistent with other reports.<sup>54,62,63</sup> Although abemaciclib was less potent against CDK1/2 (for which it has  $IC_{50}$  values of 194 and 238 nM, respectively) than against CDK4/6,<sup>54,64</sup> combined inhibition of these kinases probably contributes to the drug's effects on the cell cycle in higher doses.<sup>64</sup> As expected, nanomolar doses of abemaciclib reduce Rb phosphorylation, leading to G1 cell cycle arrest.<sup>54,109</sup> However, at doses above 0.3  $\mu$ M and depending on the cell type, a subset of cells is also arrested in the G2 phase and abemaciclib treatment elicits cytotoxic effects.<sup>12,64</sup> Given the inconsistent results that have been reported, further assessments of abemaciclib's activity against other CDKs are needed.

The cellular cytotoxicity induced by higher doses of abemaciclib has also been attributed to inhibition of the CSNK2, DYRK, and HIPK kinase families,<sup>59</sup> which were found to be sensitive to this drug in profiling studies.<sup>54,60,61,63,64</sup> Interestingly, HIPK2/3 were also identified to bind strongly to abemaciclib based on KinomeScan profiling data.<sup>61,64</sup> The cytotoxic effects of abemaciclib were accompanied by the formation of multiple large vacuoles,<sup>59,110,111</sup> which were also observed in a control experiment using CX-4945, a CSNK2 inhibitor with a similar off-target spectrum including DYRK and HIPK kinases.<sup>59</sup> Other studies have found that increases in overall cellular complexity are associated with senescence phenotypes, suggesting that the multivacuolar phenotype is a consequence of CDK4/6 inhibition rather than off-target activity of abemaciclib.<sup>109,110</sup> However, in renal cell carcinoma, enhanced vacuolization was accompanied by cleavage of LC3, an increased presence of autophagosomes, and elevated beclin-1 levels, which were attributed to changes in autophagy.<sup>111</sup> On the other hand, in non-small-cell lung cancer cells, abemaciclib induced vacuole formation and cell death independently of autophagy.<sup>112</sup> Palbociclib was also shown to inhibit CSNK2 and HIPK kinases but to a lesser degree than abemaciclib.<sup>3,61,63</sup> CSNK2 together with lipid kinases has been suggested to modulate autophagy induced by palbociclib,<sup>99</sup> so abemaciclib and palbociclib may have common off-targets whose inhibition modulates autophagy. However, there are still considerable differences between them, such as abemaciclib's cytotoxic effect, which is induced by inhibition of other unique off-targets.

PIM kinases have also been identified as interesting targets of abemaciclib that are insensitive to palbociclib and ribociclib. Abemaciclib inhibits PIM1 ( $IC_{50}$  = 50 nM) and PIM3<sup>3,54,60,61,63</sup> but is less potent against PIM2 ( $IC_{50}$  = 3.4  $\mu$ M).<sup>54</sup> Interestingly, the binding affinity of abemaciclib towards PIM1 ( $K_d$  = 7 nM) measured using a kinobeads assay was even higher than those for CDK4 and CDK6 ( $K_d$  = 97 nM and 59 nM, respectively).<sup>3</sup> PIM1 inhibition was also mentioned in Eli Lilly's original abemaciclib patent<sup>113</sup> and was confirmed by the observation of reduced phosphorylation of two known PIM1 substrates, BAD and 4EBP1.<sup>54</sup> PIM kinases are overexpressed in various hematological and solid tumors, where they support malignant proliferation via their effects on cell cycle regulation and inhibition of apoptosis. Consequently, they have become potential targets in cancer research and inhibitors of PIM kinases have been developed such as SGI-1776 and LGH447.<sup>114–117</sup> Knowledge of this off-target activity has made abemaciclib an attractive drug for treating renal cell carcinoma, in which CDK4/6 and PIM1 kinases were identified as potentially effective targets. Dual inhibition of those kinases proved to be beneficial in vitro and in vivo for treating this type of cancer.<sup>111</sup>

Cell-based and in vitro kinase assays revealed GSK3 $\alpha/\beta$  to be very potent targets of abemaciclib,<sup>62</sup> which were also confirmed by other profiling studies.<sup>3,60,63,64</sup> Abemaciclib was shown to inhibit GSK3 $\alpha/\beta$  with  $IC_{50}$  values of 5.8 nM and 10.4 nM, respectively.<sup>64</sup> By inhibiting GSK3 $\beta$ , abemaciclib induces  $\beta$ -catenin stabilization, which increases its transcriptional activity, and, thus, activates WNT signaling.<sup>62</sup> Among other things, activation of WNT signaling enhances neutrophil production; this may explain why the clinical profile of abemaciclib differs from those of palbociclib and ribociclib, for which neutropenia is the main dose-limiting factor.<sup>62,63,118</sup>

Profiling studies indicated that all three approved CDK4/6 inhibitors also inhibit members of the CAMK2 kinase family, but abemaciclib was found to be their most potent inhibitor.<sup>3,60,62,63</sup> In kinase assays, CAMK2 $\delta$  exhibited an  $IC_{50}$  value of 0.8 nM, which was even lower than that for CDK4/6; low  $IC_{50}$  values were also observed for CAMK2 $\alpha/\beta/\gamma$  (3.3 nM, 3.5 nM, and 14.2 nM, respectively).<sup>62,64</sup> CAMK2 isoforms are multifunctional kinases that are responsive to calcium signaling and modulate proliferation, cell cycle control, invasion, and metastasis. Importantly, they are established as therapeutic targets for the treatment of malignant diseases.<sup>119</sup>

Several other protein kinases have been identified as potential abemaciclib targets. For instance, the CLK family was efficiently inhibited in several profiling studies. The CLK1 isoform exhibited a high binding affinity towards abemaciclib ( $K_d$  = 7 nM)<sup>3</sup> and an  $IC_{50}$  value of 60 nM in a kinase assay.<sup>64</sup> Other kinases assigned high ranks in profiling studies include AAK1, MPSK1/STK16, IRAK1, ERK8, PCTK1, SGK, FLT3 (D835V) and FLT3 (D835V), and NEK10.<sup>54,60–64</sup> AAK1, MPSK1/STK16 belong to the same numb-associated kinase family as GAK.<sup>108</sup> Interestingly, a binding competition assay revealed a lipid kinase, PIP4K2B, to be a possible abemaciclib target<sup>62</sup> that is shared with palbociclib.

To identify nonkinase activities of abemaciclib, 17 diverse functional protein sentinels were probed by ligand displacement analysis. Abemaciclib did not strongly inhibit any of these proteins; the lowest  $IC_{50}$  values determined in this experiment were in the micromolar range.<sup>60</sup>

## 8 | NEW CDK4/6 INHIBITORS DEVELOPED FOLLOWING THE SUCCESS OF APPROVED COMPOUNDS

The clinical success of CDK4/6 inhibitors has prompted the development of additional compounds in this class because while the approved CDK4/6 inhibitors are very promising drugs, their use is limited by drawbacks including dose-limiting toxicity and acquired resistance. The most studied of these compounds are trilaciclib (G1T28),<sup>50</sup> lerociclib (G1T38),<sup>51</sup> and SHR6390.<sup>52</sup> There is very little public information on the properties of other compounds in this class that is currently undergoing clinical trials.

*Trilaciclib (G1T28)* is based on a tricyclic lactam scaffold and was developed to preserve bone marrow and immune system function during chemotherapy.<sup>50</sup> It is currently being tested in phase II clinical trial to investigate its clinical impact on the antitumor effects of chemotherapy.<sup>120</sup> Trilaciclib has high potency against CDK4/6, with the  $IC_{50}$  value for CDK4 being fourfold lower than that for CDK6 in a biochemical assay. It exhibits no appreciable activity against CDK2/5/7, but has a nanomolar  $IC_{50}$  value against CDK9. Additional cell-based assays are needed to confirm this apparent CDK9 inhibition. Trilaciclib was also profiled against a large panel of kinases, of which NEK10 and SNARK exhibited  $K_d$  values comparable to those for CDK4. Other kinases inhibited by over 90% in a profiling assay included FLT3 (D835V), FLT3, PRKD1/3, ULK2, and GAK.<sup>50</sup>

*Lerociclib (G1T38)* was developed from the same scaffold as trilaciclib. It has unique pharmacokinetic and pharmacodynamics properties that minimize undesirable side effects such as myelosuppression. It can, thus, be dosed continuously, unlike some approved CDK4/6 inhibitors. It is currently being evaluated in a phase II clinical trial for the treatment of ER<sup>+</sup>, HER2<sup>-</sup> breast cancer. Lerociclib is highly selective for CDK4/6 over CDK1/2/5/7. It did apparently inhibit CDK9 in a biochemical assay, but this finding was contradicted by the results of a cellular assay. Like trilaciclib, it is highly potent against NEK10, SNARK, ULK2, TTK, PRKD1/3, FLT3 (D835V), and FLT3 (ITD, D835V), but not against wild-type FLT3.<sup>51</sup>

*SHR6390* has been described as a selective CDK4/6 inhibitor that exerts antiproliferative effects against esophageal squamous cell carcinoma cell lines and PDX models by inhibiting Rb phosphorylation and arresting the cell cycle in the G1 phase.<sup>52</sup> It is currently being tested in phase III clinical trial for the treatment of advanced breast cancer and is also being considered for the treatment of other cancer types. However, no profiling studies have yet been published, so its selectivity cannot be evaluated.<sup>52,121</sup>

An emerging approach to modulate CDK4/6 is based on their selective degradation induced by proteolysis targeting chimera (PROTAC) compounds. PROTACs developed from palbociclib, ribociclib, and abemaciclib redirect an E3 ubiquitin ligase to CDK4/6, leading to their proteolysis in the proteasome.<sup>122–127</sup> Interestingly, these PROTACs are still nanomolar kinase inhibitors, but they display various degrees of selectivity towards CDK4 and CDK6, at least partly due to the linker type and length.<sup>124</sup> In comparison with traditional kinase inhibitors, this strategy offers an advantage in targeting not only enzymatic but also enzyme-independent (and inhibitor-insensitive) functions of kinases, which have been recently discovered for CDK6.<sup>128</sup> Nevertheless, further work will be necessary to develop CDK4/6 targeting PROTACs into clinical candidates.

## 9 | CONCLUSION AND FUTURE DIRECTIONS

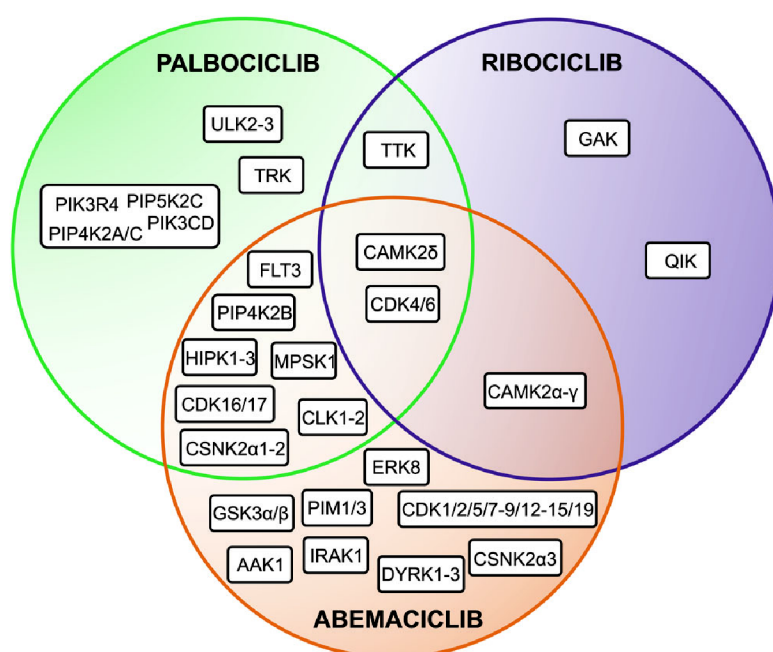
The development of CDK4/6 inhibitors was a major breakthrough in the treatment of breast cancer and their application has been gradually expanding to additional oncological indications. However, the precise mechanism of



action of approved compounds is incompletely understood. Although the main outcome of CDK4/6 inhibition is cytostatic cell cycle arrest, its impact on cellular processes is highly heterogeneous and appears to depend on intrinsic cellular programs and/or cell cycle dynamics. It is, thus, context-specific and involves induction of quiescence, senescence, or autophagy as well as modulation of cellular metabolism and enhanced tumor cell immunogenicity. In addition, substantial differences at the molecular level and even in the clinic have emerged in recent years. It has gradually become clear that these compounds inhibit other proteins beyond CDK4/6, and profiling methods are being used to reveal those secondary targets. However, determining a drug's overall selectivity spectrum remains challenging. There are many ways to measure selectivity including various *in vitro* or cell-based assays, and results obtained using different methods can vary greatly. Disagreements between methods arise from the fact that they measure different quantities under different conditions. Consequently, one method may be more or less suitable than another for a specific kinase and/or drug, leading to controversial results for some targets. Integration of multiple profiling methods is thus needed to obtain accurate selectivity profiles for drugs and understand their mechanisms of action.

Here, we compare published results obtained using a wide range of profiling methods and provide clear evidence that approved CDK4/6 inhibitors have distinct selectivity profiles (Figure 5). We conclude that ribociclib is the most selective CDK4/6 inhibitor; its cellular response is fully consistent with inhibition of CDK4/6 and it exhibits only weak off-target activities towards kinases such as CAMK2 or GAK. Palbociclib has a wider range of targets including several lipid kinases involved in phosphatidylinositol signaling and protein kinases from the CSNK2 family, which are probably linked to the modulation of autophagy induced by this compound. Autophagy is also influenced by abemaciclib, but despite its substantially broader selectivity profile, neither PI3K nor CSNK2 is sensitive to this compound; higher doses arrest a subset of cells in the G2 phase, which may be due to inhibition of CDK1/2, and also induce cytotoxic effects inconsistent with selective inhibition of CDK4/6. It may also target other members of the CDK family, especially CDK16/17, as well as additional kinases including CAMK2, PIM, DYRK, and/or GSK3 $\alpha/\beta$  isoforms. This broad pharmacology probably contributes to its high potency, strong negative effect on viability, and single-agent activity in the clinic.

Differences in selectivity profiles are also supported by the fact that palbociclib-resistant breast cancer cells accustomed to palbociclib were cross-resistant to ribociclib but sensitive to abemaciclib. Similar results were obtained in a cell line established from a patient whose cancer progressed on ribociclib and letrozole treatment. These results suggest that palbociclib and ribociclib have overlapping selectivity landscapes whereas abemaciclib



**FIGURE 5** Targets of palbociclib, ribociclib, and abemaciclib that repeatedly appear with high ranks in kinomic selectivity profiling data. GAK, G-associated kinase [Color figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]

targets additional signaling pathways important for survival and cancer progression and can thus overcome acquired resistance. Patients who become resistant to initially effective treatments may therefore benefit from a change in therapy.<sup>64</sup>

We emphasize the importance of investigating drugs' selectivity profiles and adverse effects to better inform clinical decisions and improve the efficacy and safety of cancer therapy. Thorough characterization of drug selectivity landscapes may also enable repurposing of known drugs to treat additional indications. For example, palbociclib and abemaciclib were shown to be potent against CLK1, which is considered a promising target for the treatment of Duchenne muscular dystrophy.<sup>129</sup> These compounds could thus be repurposed to treat this rare disease.<sup>63</sup> Similarly, CAMK2 kinases are inhibited by abemaciclib (and to a lesser extent, ribociclib), and could, therefore, be repurposed for CAMK2-driven diseases such as colon cancer, myeloid leukemia, or osteosarcoma. However, more research in this area is required<sup>62,119</sup> because off-target activities may be beneficial if therapeutically useful but may also increase the risk of unwanted effects and toxicity.

## ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the Czech Science Foundation (GA 19-08410S) and Palacký University Olomouc (IGA\_PrF\_2020\_021). The authors thank Dr. Daniel Fisher (IGMM, CNRS) for constructive comments on the manuscript.

## ORCID

Denisa Hendrychová  <https://orcid.org/0000-0003-2864-7087>

Radek Jorda  <https://orcid.org/0000-0002-4905-7126>

Vladimír Kryštof  <https://orcid.org/0000-0001-5838-2118>

## REFERENCES

1. Lin A, Giuliano CJ, Palladino A, et al. Off-target toxicity is a common mechanism of action of cancer drugs undergoing clinical trials. *Sci Transl Med*. 2019;11(509):eaaw8412.
2. Sleire L, Førde-Tislevoll HE, Netland IA, Leiss L, Skeie BS, Enger PØ. Drug repurposing in cancer. *Pharmacol Res*. 2017;124:12474-12491.
3. Klaeger S, Heinzlmeir S, Wilhelm M, et al. The target landscape of clinical kinase drugs. *Science*. 2017;358(6367):eaan4368.
4. Jorda R, Hendrychová D, Voller J, Řezníčková E, Gucký T, Kryštof V. How selective are pharmacological inhibitors of cell-cycle-regulating cyclin-dependent kinases? *J Med Chem*. 2018;61(20):9105-9120.
5. Ferguson FM, Gray NS. Kinase inhibitors: the road ahead. *Nat Rev Drug Discovery*. 2018;17(5):353-376.
6. Munoz L. Non-kinase targets of protein kinase inhibitors. *Nat Rev Drug Discovery*. 2017;16(6):424-440.
7. Malumbres M, Barbacid M. Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem Sci*. 2005;30(11):630-641.
8. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-674.
9. Otto T, Sicinski P. Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2017;17(2):93-115.
10. Roskoski R. Cyclin-dependent protein serine/threonine kinase inhibitors as anticancer drugs. *Pharmacol Res*. 2019;139:139471-139488.
11. Malumbres M. Cyclin-dependent kinases. *Genome Biol*. 2014;15(6):122.
12. Knudsen ES, Pruitt SC, Hershberger PA, Witkiewicz AK, Goodrich DW. Cell Cycle and beyond: exploiting new RB1 controlled mechanisms for cancer therapy. *Trends in Cancer*. 2019;5(5):308-324.
13. Asghar U, Witkiewicz AK, Turner NC, Knudsen ES. The history and future of targeting cyclin-dependent kinases in cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov*. 2015;14(2):130-146.
14. Roskoski R. Cyclin-dependent protein kinase inhibitors including palbociclib as anticancer drugs. *Pharmacol Res*. 2016;107:107249-107275.
15. Narasimha AM, Kaulich M, Shapiro GS, Choi YJ, Sicinski P, Dowdy SF. Cyclin D activates the Rb tumor suppressor by mono-phosphorylation. *eLife*. 2014;3:e02872.
16. Lim S, Kaldis P. Cdk, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Dev*. 2013;140(15):3079-3093.
17. O'Leary B, Finn RS, Turner NC. Treating cancer with selective CDK4/6 inhibitors. *Nat Rev Clin Oncol*. 2016;13(7):417-430.

18. Anders L, Ke N, Hydring P, et al. A systematic screen for CDK4/6 substrates links FOXM1 phosphorylation to senescence suppression in cancer cells. *Cancer Cell*. 2011;20(5):620-634.
19. Matsuura I, Denissova NG, Wang G, He D, Long J, Liu F. Cyclin-dependent kinases regulate the antiproliferative function of Smads. *Nature*. 2004;430(6996):226-231.
20. Deng J, Wang ES, Jenkins RW, et al. CDK4/6 inhibition augments antitumor immunity by enhancing T-cell activation. *Cancer Discov*. 2018;8(2):216-233.
21. Sadasivam S, Duan S, DeCaprio JA. The MuvB complex sequentially recruits B-Myb and FoxM1 to promote mitotic gene expression. *Genes Dev*. 2012;26(5):474-489.
22. Liu F, Matsuura I. Inhibition of Smad antiproliferative function by CDK phosphorylation. *Cell Cycle*. 2005;4(1):63-66.
23. Hydring P, Malumbres M, Sicinski P. Non-canonical functions of cell cycle cyclins and cyclin-dependent kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2016;17(5):280-292.
24. Klein ME, Kovatcheva M, Davis LE, Tap WD, Koff A. CDK4/6 inhibitors: the mechanism of action may not be as simple as once thought. *Cancer Cell*. 2018;34(1):9-20.
25. Wang H, Nicolay BN, Chick JM, et al. The metabolic function of cyclin D3-CDK6 kinase in cancer cell survival. *Nature*. 2017;546(7658):426-430.
26. Franco J, Balaji U, Freinkman E, Witkiewicz AK, Knudsen ES. Metabolic reprogramming of pancreatic cancer mediated by CDK4/6 inhibition elicits unique vulnerabilities. *Cell Rep*. 2016;14(5):979-990.
27. Cheng M, Sexl V, Sherr CJ, Roussel MF. Assembly of cyclin D-dependent kinase and titration of p27Kip1 regulated by mitogen-activated protein kinase kinase (MEK1). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(3):1091-1096.
28. Sherr CJ, Roberts JM. Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases. *Genes Dev*. 2004;18(22):2699-2711.
29. Guiley KZ, Stevenson JW, Lou K, et al. P27 allosterically activates cyclin-dependent kinase 4 and antagonizes palbociclib inhibition. *Science*. 2019;366(6471):eaaw2106.
30. *Cancer Dependency Map Portal Project Achilles*. <https://depmap.org/portal/achilles/>. Accessed June 8, 2020.
31. Dempster JM, Rossen J, Kazachkova M, et al. Extracting biological insights from the project Achilles genome-scale CRISPR screens in cancer cell lines. *bioRxiv*. 2019. <https://doi.org/10.1101/720243>
32. Dickson MA. Molecular pathways: CDK4 inhibitors for cancer therapy. *Clin Cancer Res*. 2014;20(13):3379-3383.
33. Patnaik A, Rosen LS, Tolane SM, et al. Efficacy and safety of abemaciclib, an inhibitor of CDK4 and CDK6, for patients with breast cancer, non-small cell lung cancer, and other solid tumors. *Cancer Discov*. 2016;6(7):740-753.
34. Sherr CJ, Beach D, Shapiro GI. Targeting CDK4 and CDK6: from discovery to therapy. *Cancer Discov*. 2016;6(4):353-367.
35. Laderian B, Fojo T. CDK4/6 Inhibition as a therapeutic strategy in breast cancer: palbociclib, ribociclib, and abemaciclib. *Semin Oncol*. 2017;44(6):395-403.
36. Parylo S, Vennepureddy A, Dhar V, Patibandla P, Sokoloff A. Role of cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitors in the current and future eras of cancer treatment. *J Oncol Pharm Pract*. 2019;25(1):110-129.
37. Kaur G, Stetler-Stevenson M, Sebers S, et al. Growth inhibition with reversible cell cycle arrest of carcinoma cells by flavone 186-8275. *J Natl Cancer Inst*. 1992;84(22):1736-1740.
38. Havlíček L, Hanuš J, Veselý J, et al. Cytokinin-derived cyclin-dependent kinase inhibitors: synthesis and cdc2 inhibitory activity of olomoucine and related compounds. *J Med Chem*. 1997;40(4):408-412.
39. Peyressatre M, Prével C, Pellerano M, Morris MC. Targeting cyclin-dependent kinases in human cancers: from small molecules to peptide inhibitors. *Cancers*. 2015;7(1):179-237.
40. Kubo A, Nakagawa K, Varma RK, et al. The p16 status of tumor cell lines identifies small molecule inhibitors specific for cyclin-dependent kinase 4. *Clin Cancer Res*. 1999;5(12):4279-4286.
41. Ryu CK, Kang HY, Lee SK, et al. 5-Arylamino-2-methyl-4,7-dioxobenzothiazoles as inhibitors of cyclin-dependent kinase 4 and cytotoxic agents. *Bioorganic Med Chem Lett*. 2000;10(5):461-464.
42. Soni R, O'Reilly T, Furet P, et al. Selective in vivo and in vitro effects of a small molecule inhibitor of cyclin-dependent kinase 4. *J Natl Cancer Inst*. 2001;93(6):436-446.
43. Sanchez-Martinez C, Shih C, Faul MM, et al. Aryl[a]pyrrolo[3,4-c]carbazoles as selective cyclin D1-CDK4 inhibitors. *Bioorganic Med Chem Lett*. 2003;13(21):3835-3839.
44. VanderWel SN, Harvey PJ, McNamara DJ, et al. Pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-ones as specific inhibitors of cyclin-dependent kinase 4. *J Med Chem*. 2005;48(7):2371-2387.
45. Fry DW, Harvey PJ, Keller PR, et al. Specific inhibition of cyclin-dependent kinase 4/6 by PD 0332991 and associated antitumor activity in human tumor xenografts. *Mol Cancer Ther*. 2004;3(11):1427-1437.
46. Beaver JA, Amiri-Kordestani L, Charlab R, et al. FDA approval: palbociclib for the treatment of postmenopausal patients with estrogen receptor-positive, HER2-negative metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2015;21(21):4760-4766.
47. Walker AJ, Wedam S, Amiri-Kordestani L, et al. FDA approval of palbociclib in combination with fulvestrant for the treatment of hormone receptor-positive, HER2-negative metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2016;22(20):4968-4972.

48. Syed YY. Ribociclib: first global approval. *Drugs*. 2017;77(7):799-807.
49. Kim ES. Abemaciclib: first global approval. *Drugs*. 2017;77(18):2063-2070.
50. Bisi JE, Sorrentino JA, Roberts PJ, Tavares FX, Strum JC. Preclinical characterization of G1T28: A novel CDK4/6 inhibitor for reduction of chemotherapy-induced myelosuppression. *Mol Cancer Ther*. 2016;15(5):783-793.
51. Bisi JE, Sorrentino JA, Jordan JL, et al. Preclinical development of G1T38: a novel, potent and selective inhibitor of cyclin dependent kinases 4/6 for use as an oral antineoplastic in patients with CDK4/6 sensitive tumors. *Oncotarget*. 2017;8(26):42343-42358.
52. Wang J, Li Q, Yuan J, et al. CDK4/6 inhibitor-SHR6390 exerts potent antitumor activity in esophageal squamous cell carcinoma by inhibiting phosphorylated Rb and inducing G1 cell cycle arrest. *J Transl Med*. 2017;15(1):127.
53. Rader J, Russell MR, Hart LS, et al. Dual CDK4/CDK6 inhibition induces cell-cycle arrest and senescence in neuroblastoma. *Clin Cancer Res*. 2013;19(22):6173-6182.
54. Gelbert LM, Cai S, Lin X, et al. Preclinical characterization of the CDK4/6 inhibitor LY2835219: in-vivo cell cycle-dependent/independent anti-tumor activities alone/in combination with gemcitabine. *Invest New Drugs*. 2014;32(5):825-837.
55. Bozhenko VK, Kulinich TM, Kudinova EA, Boldyrev A, Solodkij VA. New targeted anti CDK4/6 peptide MM-D37K. *J Clin Oncol*. 2013;31(15 suppl):e13545.
56. Zhaobing X, Lihong H, Yingchun L, et al. Abstract 5778: preclinical evaluation of TQB3616, a highly potent and selective small-molecule CDK4/6 inhibitor. *Cancer Res*. 2018;78:5778.
57. Lin S, Zhao X, Li T, et al. Abstract 4425: FCN-437: A novel, potent and selective oral inhibitor of CDK4/6 for the treatment of solid tumors. *Cancer Res*. 2019;79(13 suppl):4425.
58. Xu B, Wang J, Liu X, Fang J, Yao Z, Wang J. A phase I study of XZP-3287, a novel oral CDK4/6 Inhibitor, administered on a continuous dosing schedule, in patients with advanced solid tumours. *Ann Oncol*. 2019;30(5 suppl):v123.
59. Knudsen ES, Witkiewicz AK. The strange case of CDK4/6 inhibitors: mechanisms, resistance, and combination strategies. *Trends in Cancer*. 2017;3(1):39-55.
60. Chen P, Lee NV, Hu W, et al. Spectrum and degree of CDK drug interactions predicts clinical performance. *Mol Cancer Ther*. 2016;15(10):2273-2281.
61. Kim S, Tiedt R, Loo A, et al. The potent and selective cyclin-dependent kinases 4 and 6 inhibitor ribociclib (LEE011) is a versatile combination partner in preclinical cancer models. *Oncotarget*. 2018;9(81):35226-35240.
62. Cousins EM, Goldfarb D, Yan F, et al. Competitive kinase enrichment proteomics reveals that abemaciclib inhibits GSK3b and activates WNT signaling. *Mol Cancer Res*. 2018;16(2):333-344.
63. Uitdehaag JCM, Kooijman JJ, de Roos JADM, et al. Combined cellular and biochemical profiling to identify predictive drug response biomarkers for kinase inhibitors approved for clinical use between 2013 and 2017. *Mol Cancer Ther*. 2019;18(2):470-481.
64. Hafner M, Mills CE, Subramanian K, et al. Multiomics profiling establishes the polypharmacology of FDA-approved CDK4/6 inhibitors and the potential for differential clinical activity. *Cell Chem Biol*. 2019;26(8):1067-1080.
65. Luo J, Solimini NL, Elledge SJ. Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. *Cell*. 2009;136(5):823-837.
66. Leontieva OV, Blagosklonny MV. CDK4/6-inhibiting drug substitutes for p21 and p16 in senescence: duration of cell cycle arrest and MTOR activity determine geroconversion. *Cell Cycle*. 2013;12(18):3063-3069.
67. Bonelli MA, Digiacomio G, Fumarola C, et al. Combined inhibition of CDK4/6 and PI3K/AKT/mTOR pathways induces a synergistic anti-tumor effect in malignant pleural mesothelioma cells. *Neoplasia*. 2017;19(8):637-648.
68. Bollard J, Miguela V, Ruiz De Galarreta M, et al. Palbociclib (PD-0332991), a selective CDK4/6 inhibitor, restricts tumour growth in preclinical models of hepatocellular carcinoma. *Gut*. 2017;66(7):1286-1296.
69. Yoshida A, Lee EK, Diehl JA. Induction of therapeutic senescence in vemurafenib-resistant melanoma by extended inhibition of CDK4/6. *Cancer Res*. 2016;76(10):2990-3002.
70. Vijayaraghavan S, Karakas C, Doostan I, et al. CDK4/6 and autophagy inhibitors synergistically induce senescence in Rb positive cytoplasmic cyclin e negative cancers. *Nat Commun*. 2017;8:15916.
71. Kovatcheva M, Liao W, Klein ME, et al. ATRX is a regulator of therapy induced senescence in human cells. *Nat Commun*. 2017;8(1):386.
72. Kovatcheva M, Liu DD, Dickson MA, et al. MDM2 turnover and expression of ATRX determine the choice between quiescence and senescence in response to CDK4 inhibition. *Oncotarget*. 2015;6(10):8226-8243.
73. Engeland K. Cell cycle arrest through indirect transcriptional repression by p53: I have a DREAM. *Cell Death Differ*. 2018;25(1):114-132.
74. Sadasivam S, DeCaprio JA. The DREAM complex: master coordinator of cell cycle-dependent gene expression. *Nat Rev Cancer*. 2013;13(8):585-595.
75. Schade AE, Oser MG, Nicholson HE, DeCaprio JA. Cyclin D-CDK4 relieves cooperative repression of proliferation and cell cycle gene expression by DREAM and RB. *Oncogene*. 2019;38(25):4962-4976.



76. Leontieva OV, Natarajan V, Demidenko ZN, Burdelya LG, Gudkov AV, Blagosklonny MV. Hypoxia suppresses conversion from proliferative arrest to cellular senescence. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(33):13314-13318.
77. Cai L, Tu BP. Driving the cell cycle through metabolism. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2012;28(1):59-87.
78. Choi YJ, Li X, Hydbring P, et al. The requirement for cyclin D function in tumor maintenance. *Cancer Cell*. 2012;22(4):438-451.
79. Sawai CM, Freund J, Oh P, et al. Therapeutic targeting of the cyclin D3:CDK4/6 complex in T Cell leukemia. *Cancer Cell*. 2012;22(4):452-465.
80. Miettinen TP, Peltier J, Härtlova A, et al. Thermal proteome profiling of breast cancer cells reveals proteasomal activation by CDK 4/6 inhibitor palbociclib. *EMBO J*. 2018;37(10):e98359.
81. Goel S, Decristo MJ, Watt AC, et al. CDK4/6 inhibition triggers anti-tumour immunity. *Nature*. 2017;548(7668):471-475.
82. Schaer DA, Beckmann RP, Dempsey JA, et al. The CDK4/6 inhibitor abemaciclib induces a T cell inflamed tumor microenvironment and enhances the efficacy of PD-L1 checkpoint blockade. *Cell Rep*. 2018;22(11):2978-2994.
83. Teh JLF, Aplin AE. Arrested developments: CDK4/6 inhibitor resistance and alterations in the tumor immune microenvironment. *Clin Cancer Res*. 2019;25(3):921-927.
84. Zhang J, Bu X, Wang H, et al. Cyclin D-CDK4 kinase destabilizes PD-L1 via cullin 3-SPOP to control cancer immune surveillance. *Nature*. 2018;553(7686):91-95.
85. Rubio C, Martínez-Fernandez M, Segovia C, et al. CDK4/6 inhibitor as a novel therapeutic approach for advanced bladder cancer independently of RB1 status. *Clin Cancer Res*. 2019;25(1):390-402.
86. Asghar US, Barr AR, Cutts R, et al. Single-cell dynamics determines response to CDK4/6 inhibition in triple-negative breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2017;23(18):5561-5572.
87. Santamaría D, Barrière C, Cerqueira A, et al. Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle. *Nature*. 2007;448(7155):811-815.
88. Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(3):153-166.
89. Liu F, Korc M. Cdk4/6 inhibition induces epithelial-mesenchymal transition and enhances invasiveness in pancreatic cancer cells. *Mol Cancer Ther*. 2012;11(10):2138-2148.
90. Eid S, Turk S, Volkamer A, Rippmann F, Fulle S. Kinmap: a web-based tool for interactive navigation through human kinome data. *BMC Bioinformatics*. 2017;18(1):16.
91. Martin JM, Goldstein LJ. Profile of abemaciclib and its potential in the treatment of breast cancer. *Onco Targets Ther*. 2018;11:115253-115259.
92. Sledge GW, Toi M, Neven P, et al. MONARCH 2: abemaciclib in combination with fulvestrant in women with HR+/HER2- advanced breast cancer who had progressed while receiving endocrine therapy. *J Clin Oncol*. 2017;35(25):2875-2884.
93. Dickler MN, Tolaney SM, Rugo HS, et al. MONARCH 1, a phase II study of abemaciclib, a CDK4 and CDK6 inhibitor, as a single agent, in patients with refractory HR+/HER2- metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2017;23(17):5218-5224.
94. Finn RS, Crown JP, Lang I, et al. The cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor palbociclib in combination with letrozole versus letrozole alone as first-line treatment of oestrogen receptor-positive, HER2-negative, advanced breast cancer (PALOMA-1/TRIO-18): a randomised phase 2 study. *Lancet Oncol*. 2015;16(1):25-35.
95. Finn RS, Martin M, Rugo HS, et al. Palbociclib and letrozole in advanced breast cancer. *N Engl J Med*. 2016;375(20):1925-1936.
96. Turner NC, Ro J, André F, et al. Palbociclib in hormone-receptor-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med*. 2015;373(3):209-219.
97. Hortobagyi GN, Stemmer SM, Burris HA, et al. Ribociclib as first-line therapy for HR-positive, advanced breast cancer. *N Engl J Med*. 2016;375(18):1738-1748.
98. Molina DM, Jafari R, Ignatshchenko M, et al. Monitoring drug target engagement in cells and tissues using the cellular thermal shift assay. *Science*. 2013;341(6141):84-87.
99. Sumi NJ, Kuenzi BM, Knezevic CE, Rensing Rix LL, Rix U. Chemoproteomics reveals novel protein and lipid kinase targets of clinical CDK4/6 inhibitors in lung cancer. *ACS Chem Biol*. 2015;10(12):2680-2686.
100. Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-kinase-AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(7):489-501.
101. Zhang J, Xu K, Liu P, et al. Inhibition of Rb phosphorylation leads to mTORC2-mediated activation of Akt. *Mol Cell*. 2016;62(6):929-942.
102. Cretella D, Ravelli A, Fumarola C, et al. The anti-tumor efficacy of CDK4/6 inhibition is enhanced by the combination with PI3K/AKT/mTOR inhibitors through impairment of glucose metabolism in TNBC cells. *J Exp Clin Cancer Res*. 2018;37(1):72.

103. Hsieh FS, Chen YL, Hung MH, et al. Palbociclib induces activation of AMPK and inhibits hepatocellular carcinoma in a CDK4/6-independent manner. *Mol Oncol*. 2017;11(8):1035-1049.
104. Valenzuela CA, Vargas L, Martinez V, Bravo S, Brown NE. Palbociclib-induced autophagy and senescence in gastric cancer cells. *Exp Cell Res*. 2017;360(2):390-396.
105. Capparelli C, Chiavarina B, Whitaker-Menezes D, et al. CDK inhibitors (p16/p19/p21) induce senescence and autophagy in cancer-associated fibroblasts, "fueling" tumor growth via paracrine interactions, without an increase in neo-angiogenesis. *Cell Cycle*. 2012;11(19):3599-3610.
106. Acevedo M, Vernier M, Mignacca L, et al. A CDK4/6-dependent epigenetic mechanism protects cancer cells from PML-induced senescence. *Cancer Res*. 2016;76(11):3252-3264.
107. Qin G, Xu F, Qin T, et al. Palbociclib inhibits epithelial-mesenchymal transition and metastasis in breast cancer via c-Jun/COX-2 signaling pathway. *Oncotarget*. 2015;6(39):41794-41808.
108. Sorrell FJ, Szklarz M, Abdul Azeez KR, Elkins JM, Knapp S. Family-wide structural analysis of human numb-associated protein kinases. *Structure*. 2016;24(3):401-411.
109. Torres-Guzmán R, Calsina B, Hermoso A, et al. Preclinical characterization of abemaciclib in hormone receptor positive breast cancer. *Oncotarget*. 2017;8(41):69493-69507.
110. Iriyama N, Hino H, Moriya S, et al. The cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor, abemaciclib, exerts dose-dependent cytostatic and cytotoxic effects and induces autophagy in multiple myeloma cells. *Leuk Lymphoma*. 2018;59(6):1439-1450.
111. Small J, Washburn E, Millington K, Zhu J, Holder SL. The addition of abemaciclib to sunitinib induces regression of renal cell carcinoma xenograft tumors. *Oncotarget*. 2017;8(56):95116-95134.
112. Hino H, Iriyama N, Kokuba H, et al. Abemaciclib induces atypical cell death in cancer cells characterized by formation of cytoplasmic vacuoles derived from lysosomes. *Cancer Sci*. 2020;111:2132-2145.
113. Coates DA, De Dios Magana A, De Prado Gonzales A, et al. Protein kinase inhibitors. US patent 7 855 211 B2. December 10, 2010.
114. Asati V, Mahapatra DK, Bharti SK. PIM kinase inhibitors: structural and pharmacological perspectives. *Eur J Med Chem*. 2019;172:17295-108.
115. Jeyapal GP, Chandrasekar MJN, Krishnasamy R, Selvaraj J, Mohammad M, Nanjan MJ. Potential pharmacological inhibitors of Pim kinase under clinical trials. *Anticancer Agents Med Chem*. 2018;18(8):1100-1114.
116. Keane NA, Reidy M, Natoni A, Raab MS, O'Dwyer M. Targeting the Pim kinases in multiple myeloma. *Blood Cancer J*. 2015;5(7):e325.
117. Yang Q, Chen LS, Neelapu SS, Miranda RN, Medeiros LJ, Gandhi V. Transcription and translation are primary targets of Pim kinase inhibitor SGI-1776 in mantle cell lymphoma. *Blood*. 2012;120(17):3491-3500.
118. Reya T, Duncan AW, Ailles L, et al. A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature*. 2003;423(6938):409-414.
119. Wang YY, Zhao R, Zhe H. The emerging role of CaMKII in cancer. *Oncotarget*. 2015;6(14):11725-11734.
120. Weiss JM, Csozsi T, Maglakelidze M, et al. Myelopreservation with the CDK4/6 inhibitor trilaciclib in patients with small-cell lung cancer receiving first-line chemotherapy: a phase Ib/randomized phase II trial. *Ann Oncol*. 2019;30(10):1613-1621.
121. Long F, He Y, Fu H, et al. Preclinical characterization of SHR6390, a novel CDK 4/6 inhibitor, in vitro and in human tumor xenograft models. *Cancer Sci*. 2019;110(4):1420-1430.
122. Anderson NA, Cryan J, Ahmed A, et al. Selective CDK6 degradation mediated by cereblon, VHL, and novel IAP-recruiting PROTACs. *Bioorganic Med Chem Lett*. 2020;30(9):127106.
123. Brand M, Jiang B, Bauer S, et al. Homolog-selective degradation as a strategy to probe the function of CDK6 in AML. *Cell Chem Biol*. 2019;26(2):300-306.
124. Jiang B, Wang ES, Donovan KA, et al. Development of dual and selective degraders of cyclin-dependent kinases 4 and 6. *Angew Chemie*. 2019;58:6321-6326.
125. Zhao B, Burgess K. PROTACs suppression of CDK4/6, crucial kinases for cell cycle regulation in cancer. *Chem Commun*. 2019;55(18):2704-2707.
126. Su S, Yang Z, Gao H, et al. Potent and preferential degradation of CDK6 via proteolysis targeting chimera degraders. *J Med Chem*. 2019;62(16):7575-7582.
127. Rana S, Bendjennat M, Kour S, et al. Selective degradation of CDK6 by a palbociclib based PROTAC. *Bioorganic Med Chem Lett*. 2019;29(11):1375-1379.
128. Kollmann K, Heller G, Schneckleithner C, et al. A kinase-independent function of CDK6 links the cell cycle to tumor angiogenesis. *Cancer Cell*. 2013;24(2):167-181.
129. Sako Y, Ninomiya K, Okuno Y, et al. Development of an orally available inhibitor of CLK1 for skipping a mutated dystrophin exon in Duchenne muscular dystrophy. *Sci Rep*. 2017;7:746126.

## AUTHOR BIOGRAPHIES

**Denisa Hendrychová** received her master's degree in molecular and cell biology from Palacký University in Olomouc, Czech Republic, in 2016. Since then, she has been a postgraduate student of experimental biology at the Laboratory of Growth Regulators in the same university with focus on the biochemical characterization of kinase inhibitors with anticancer activities.

**Radek Jorda** received a Ph.D. degree in biochemistry from Palacký University in Olomouc, Czech Republic, in 2011. In the same year, he took up a position in the Laboratory of Growth Regulators and his research is focused on examining the activity of small molecule modulators of oncogenic kinases and steroid receptors with the aim of developing better oncology treatments.

**Vladimír Kryštof** graduated from the Faculty of Science, Palacký University in Olomouc, Czech Republic, in 1996, with an M.Sc. degree in analytical chemistry. In 2002, he was awarded Ph.D. in medical biology. His research expertise includes the design, development, and characterization of novel small-molecule inhibitors of protein kinases.

**How to cite this article:** Hendrychová D, Jorda R, Kryštof V. How selective are clinical CDK4/6 inhibitors? *Med Res Rev.* 2021;41:1578–1598. <https://doi.org/10.1002/med.21769>

## PŘÍLOHA III

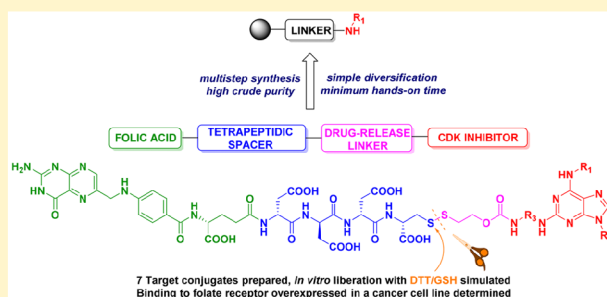
Krajčovičová, S., Gucký, T., **Hendrychová, D.**, Kryštof, V., Soral, M. (2017): A Stepwise Approach for the Synthesis of Folic Acid Conjugates with Protein Kinase Inhibitors. *J Org Chem.* 82, 13530-13541.

# A Stepwise Approach for the Synthesis of Folic Acid Conjugates with Protein Kinase Inhibitors

Soňa Krajščovičová,<sup>†</sup> Tomáš Gucký,<sup>‡</sup> Denisa Hendrychová,<sup>§</sup> Vladimír Kryštof,<sup>§</sup> and Miroslav Soural\*<sup>||</sup><sup>†</sup>Department of Organic Chemistry, Faculty of Science, Palacký University, Tr. 17. listopadu 12, 771 46 Olomouc, Czech Republic<sup>‡</sup>Department of Chemical Biology and Genetics, Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Palacký University and Institute of Experimental Botany AS CR, Šlechtitelů 27, 78371 Olomouc, Czech Republic<sup>§</sup>Laboratory of Growth Regulators, Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Palacký University and Institute of Experimental Botany AS CR, Šlechtitelů 27, 78371 Olomouc, Czech Republic<sup>||</sup>Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University, Hněvotínská 5, 779 00 Olomouc, Czech Republic

## Supporting Information

**ABSTRACT:** Herein, we report an alternative synthetic approach for selected 2,6,9-trisubstituted purine CDK inhibitor conjugates with folic acid as a drug-delivery system targeting folate receptors. In contrast to the previously reported approaches, the desired conjugates were constructed stepwise using solid-phase synthesis starting from immobilized primary amines. The ability of the prepared conjugates to release the free drug was verified using dithiothreitol (DTT) and glutathione (GSH) as liberating agents. Finally, binding to the folate receptor (FOLR1) overexpressed in a cancer cell line was measured by flow cytometry using a fluorescent imaging probe.



## INTRODUCTION

Little or no specificity toward cancer cells is one of the most serious problems of traditional cancer chemotherapy, as it leads to systemic toxicity. The systemic toxicity of conventional chemotherapy causes serious side effects and is also one of the limiting factors of treatment efficiency.<sup>1</sup> The use of small-molecule delivery systems that can decrease the systemic toxicity of cytotoxic drugs to normal cells is a promising approach. Tumor-targeting delivery systems have been studied intensively in the past three decades and represent a promising approach for both increasing chemotherapy selectivity and decreasing systemic toxicity. Selective drug delivery is based on the frequent overexpression of many receptors in tumor cells, which can serve as targets to deliver a cytotoxic agent selectively into a tumor. Relatively selective transport into tumor cells can be accomplished with the use of conjugates of a cytotoxic agent and tumor recognition moiety.<sup>2</sup>

One of the most recent and powerful approaches involves targeting the folate receptor (FOLR1).<sup>3</sup> FOLR1 is a glycosylphosphatidylinositol-anchored cell-surface receptor that binds and transports folic acid into cells with high affinity ( $K_d \approx 0.1$ – $1$  nM). It is overexpressed in a wide range of human cancers.<sup>4</sup> Folate-targeting technology has successfully been applied for the delivery of various chemotherapeutic agents to FOLR1-positive cancers.<sup>5</sup> Because of its selective expression, FOLR1 is considered a “Trojan horse” that delivers molecules

selectively to folate receptors.<sup>6</sup> Specific drug delivery using FOLR1 has been studied intensively since the late 1980s. The crucial points for folic acid–drug conjugate design, namely, its optimal constitution for cell penetration and release of the free drug, have been reported.<sup>7</sup> A suitable folic acid–drug conjugate consists of four parts: folic acid, a spacer, a cleavable self-immolative linker, and a cytotoxic agent. Determining a suitable spacer between folic acid and the cleavable drug-release linker, which is connected to the cytotoxic agent, has been studied with the aim of maintaining a high affinity of the final conjugate to the folate receptors. According to the published results, the spacer modification has a rather small impact on the targeted activities of folates, as it consists of hydrophilic groups.<sup>11</sup> One of the working classes of spacers for this purpose are oligopeptide chains, which have already been utilized in a number of conjugates with various cytotoxic agents. To date, four folate-based therapeutics are undergoing clinical testing.<sup>8–10</sup>

Similarly, the potencies of bioreleasable self-immolative linkers have been extensively examined, and the choice of an appropriate candidate seems to be crucial.<sup>11</sup> These studies have resulted in the design of a disulfide linker that is most effectively cleaved within the cell, releasing the active drug. For

Received: October 18, 2017

Published: November 24, 2017





this reason, this type of linker has been successfully applied in a large number of folate–cytotoxic agent conjugates.<sup>11</sup> Among all others, the most successful conjugate, vintafolide, entered phase II clinical trials and phase III clinical trials for the treatment of platinum-resistant ovarian cancer. Although the clinical trials have been stopped, the strategy of FOLR1 targeting with small-molecule drug conjugates is promising.<sup>12</sup>

Cyclin-dependent kinases (CDKs) are specific serine/threonine protein kinases that play a key role in cell cycle regulation, especially in the progression of the cell cycle from the G1 to S phase and from the G2 to M phase.<sup>13</sup> Therefore, CDKs are promising targets for the inhibition of cancer cell proliferation, and a large number of small-molecule CDK inhibitors have been synthesized and studied for their CDK inhibitory activities.<sup>13</sup> To date, more than 20 of the most potent inhibitors have been registered for clinical trials on cancer diseases.<sup>14,15</sup> The performed structure–activity relationship studies, together with proper knowledge of the binding sites for ATP in various CDKs, have enabled the synthesis of 2,6,9-trisubstituted purines that show potent biochemical, cellular, and *in vivo* activities. In particular, 2,6,9-trisubstituted purine derivatives bearing biarylmethylamino or biaryl amino substituents at the 6 position of the purine skeleton are the most active known CDK inhibitors.<sup>16–18</sup> However, their possible clinical application is significantly limited by their low selectivity. Despite this fact, targeting of CDK inhibitors using conjugation with folic acid has not been reported to date.

We recently reported the syntheses and activities of highly potent purine CDK inhibitors bearing a 4-aminocyclohexyl moiety in the C<sup>2</sup> position.<sup>19</sup> The terminal amino group of these compounds was found to be a suitable functionality to attach to the FOLR1-targeting system (Scheme 1). The preparation and preliminary evaluation of desired conjugates are summarized in this article.

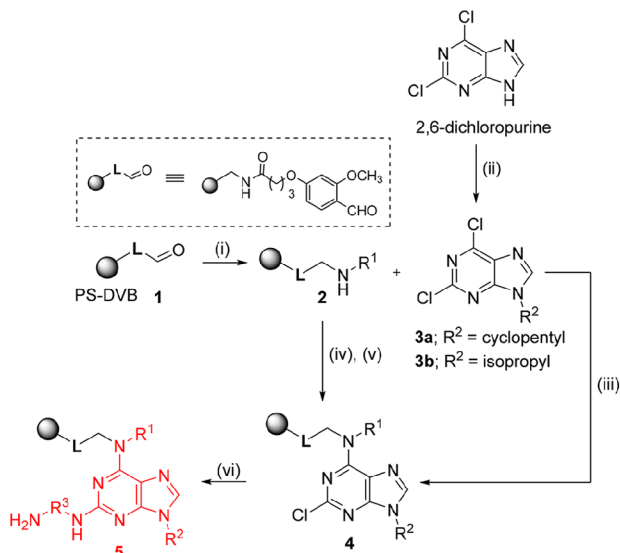
## RESULTS AND DISCUSSION

**Synthesis.** First, we attempted to use the previously reported conventional synthetic approach.<sup>11,20,21</sup> It consisted of the preparation of a folic-acid-oligopeptide-SH segment using solid-phase synthesis and its subsequent coupling with a premodified drug equipped with the self-immolative drug-release linker (Scheme 2, Conventional approach). However, despite the successful preparation of the corresponding intermediates, this strategy failed in the stage of the final thiol–disulfide exchange because of the low purity of the resulting products and irreproducibility on a preparative scale. Moreover, because of the zwitterionic structure and high polarity, the solubility of folic acid in organic solvents (except for DMSO) was limited, and the final products required at least two-step purification using reverse-phase chromatography.<sup>22</sup>

For these reasons, we designed an alternative synthetic approach. It consisted of the sequential construction of the target conjugates in the following direction: purine → drug-release linker → tetrapeptide → folic acid (Scheme 2, Stepwise approach). Considering the well-known advantages of solid-phase synthesis in multistep reaction sequences (especially the fast and simple isolation of reaction intermediates without the need for tedious purification) and taking the previous knowledge in the area of polymer-supported synthesis of purines into account,<sup>23</sup> we designed the entire reaction sequence on the solid phase using a common aminomethyl polystyrene resin equipped with an acid-labile benzaldehyde linker (i.e., backbone amide linker, BAL).

The synthetic pathway was started by the immobilization of primary amines (resulting in purine C<sup>6</sup> substitution) through the reductive amination of starting resin 1. Intermediates 2 were regioselectively arylated with 2,6-dichloropurine and were then subjected to alkylation of the N<sup>9</sup> position with alkyl halides to obtain intermediates 4 (Scheme 3, steps iv and v).

Scheme 3. Synthesis of Immobilized CDK Inhibitors<sup>a</sup>

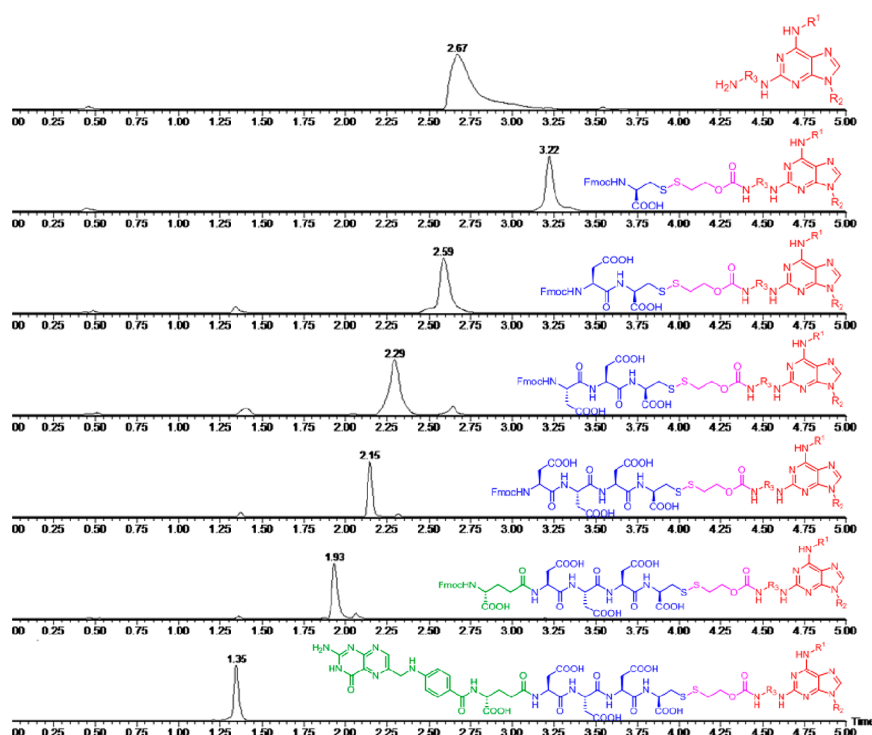


<sup>a</sup>Reagents and conditions: (i) R<sup>1</sup>-amine, NaBH(OAc)<sub>3</sub>, DMF/AcOH (10:1), room temperature; (ii) R<sup>2</sup>-OH, PPh<sub>3</sub>, diisopropyl azodicarboxylate (DIAD), THF, room temperature (3a, 86%; 3b, 80%); (iii) N,N'-diisopropylethylamine (DIPEA), dioxane, 80 °C; (iv) 2,6-dichloropurine, dioxane, DIPEA, 80 °C; (v) R<sup>2</sup>-I, (*tert*-butylimino)-tris(pyrrolidino)phosphorane (BTTP), DMSO, 65 °C; (vi) H<sub>2</sub>N-R<sup>3</sup>-NH<sub>2</sub>, Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub> (dba = dibenzylideneacetone), 2-dicyclohexylphosphino-2',4',6'-triisopropylbiphenyl (XPhos), LiHMDS, THF, 60 °C.

Alternatively, we obtained such intermediates after the N<sup>9</sup>-alkylation of 2,6-dichloropurine in the solution phase using Mitsunobu conditions (yielding 3a and 3b), followed by their immobilization through the arylation of resin 2 (Scheme 3, step iii). The latter alternative procedure yielded the desired intermediates with higher crude purities. Subsequently, the C<sup>2</sup> position underwent replacement of the chlorine with diamines. Because of the low reactivities of intermediates 4, the reaction of these intermediates with 1,4-diaminocyclohexane required very harsh conditions to yield intermediates 5 quantitatively. For this reason, we developed a more efficient Pd-catalyzed substitution using Buchwald–Hartwig C–N coupling conditions that was successfully tested for both 1,4-diaminocyclohexane and putrescine to yield intermediates 5 with excellent crude purities (for a representative example, see Figure 1).

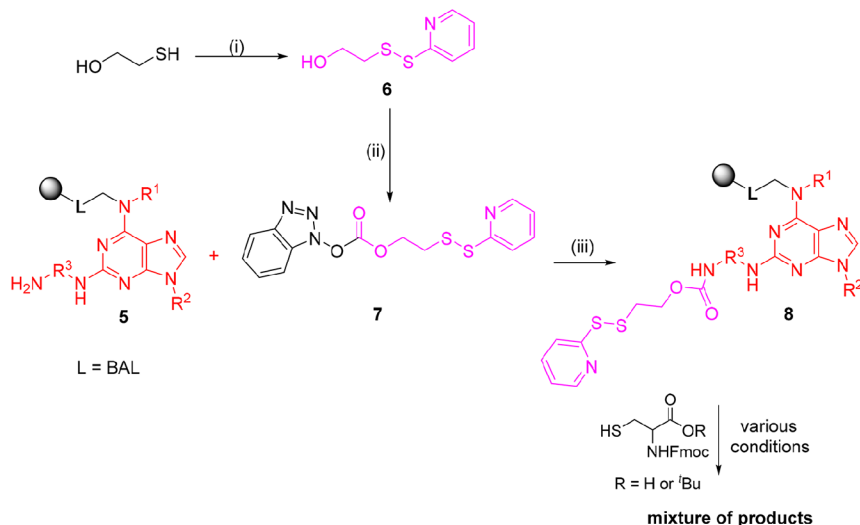
As in the conventional synthetic approach, the key step of the stepwise solid-phase sequence was the formation of the disulfide bridge using thiol–disulfide exchange. First, we intended to mimic the solution-phase approach, and for this reason, intermediates 5 were reacted with reagent 7, which had been presynthesized from mercaptoethanol according to a published procedure (Scheme 4).<sup>24</sup> The desired intermediates 8 were obtained in excellent crude purities, as detected by ultrahigh-performance liquid chromatography (UHPLC)-UV-MS analysis after trifluoroacetic-acid-mediated cleavage from





**Figure 1.** HPLC-UV traces of selected steps of the reaction sequence leading to compound 17c to demonstrate the crude purity of the corresponding intermediates after cleavage from the polymer support.

#### Scheme 4. Attempted Use of Intermediates 8 for Thiol–Disulfide Exchange<sup>a</sup>



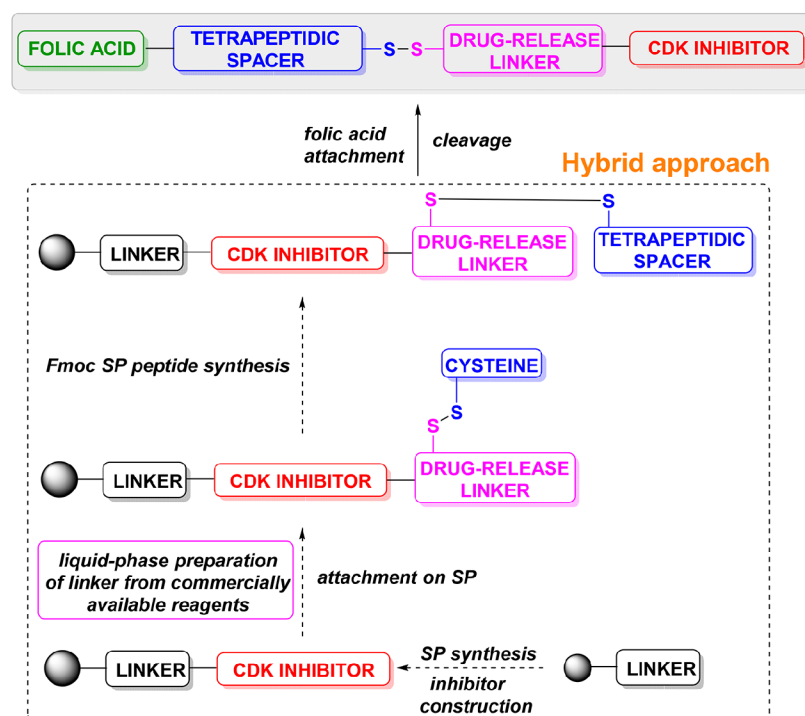
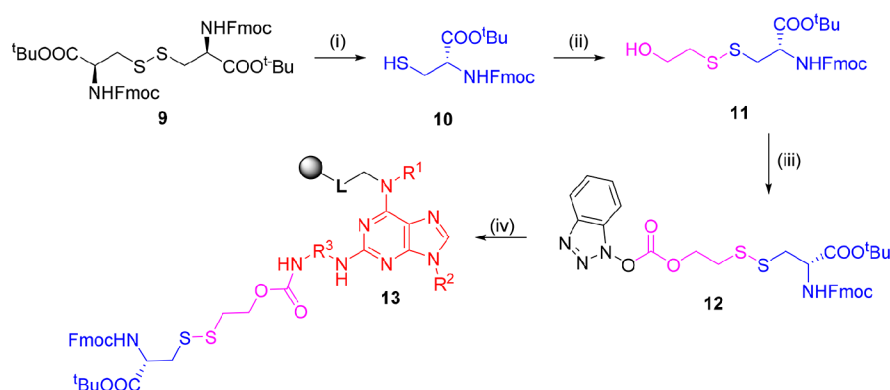
<sup>a</sup>Reagents and conditions: (i) methoxycarbonyl sulfonyl chloride, 2-mercaptopyridine, CH<sub>3</sub>CN, 0 °C to reflux, (**6**: 81%); (ii) 1-hydroxybenzotriazole (HOBT), triphosgene, triethylamine (TEA), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C to room temperature (**7**: 60%); (iii) DMAP, DIPEA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, room temperature.

the resin. However, the subsequent reaction with Fmoc-Cys-OH or Fmoc-Cys-O<sup>t</sup>Bu provided results similar to those obtained in the case of the conventional approach: It was not possible to optimize the thiol–disulfide exchange to obtain the desired intermediates, even using various conditions (various pH values<sup>25</sup> and concentrations of reagents, solvents, and bases).

To overcome such problems, we switched to a hybrid approach consisting of the liquid-phase synthesis of the

problematic segment and its incorporation into the solid-phase synthesis sequence (Scheme 5). More specifically, intermediate **12** was prepared in three steps using commercially available L-cysteine derivative **9**. Compound **12** was then reacted with resin **5**, and the desired intermediate **13** was obtained in excellent crude purity, as determined from HPLC-UV traces after cleavage from the polymer support (see Scheme 6 and Figure 1).

Scheme 5. General Scheme for the Hybrid Approach to Overcome the Problematic Thiol–Disulfide Exchange

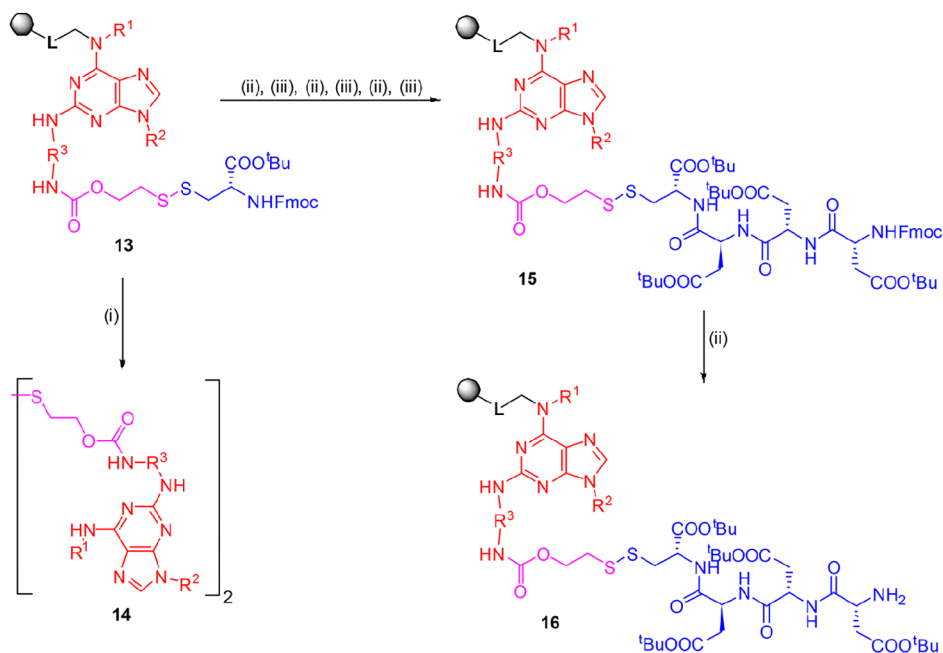
Scheme 6. Synthetic Sequence for the Proposed Hybrid Approach<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Reagents and conditions: (i)  $P(\text{Bu})_3$ , THF/ $\text{H}_2\text{O}$  (40:1), room temperature (**10**, 91%); (ii) mercaptoethanol, methoxycarbonyl sulfonyl chloride, lutidine,  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 0 °C to room temperature (**11**, 75%); (iii) HOBt, triphosgene, TEA,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 0 °C to room temperature (**12**, 62%); (iv)  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , room temperature.

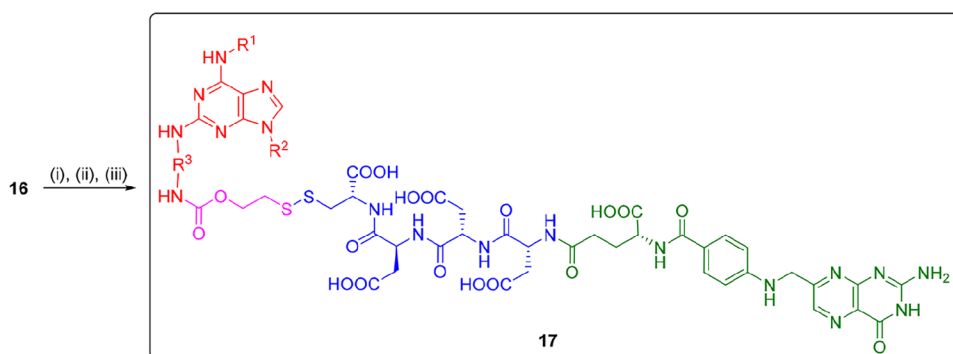
The subsequent task focused on the synthesis of the hydrophilic oligopeptide scaffold using repetitive coupling with Fmoc-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-OH. Contrary to our expectations, this part of the reaction sequence also required careful optimization. Although the synthesis of a tetrapeptide from **13** using a standard Fmoc solid-phase peptide synthesis proceeded well and afforded intermediates **15** in high crude purity, cleavage of its Fmoc protective group using a common cocktail consisting of 20% piperidine in DMF caused the formation of unexpected major products. From the LC-MS traces, their structures were suggested to be the symmetrical disulfides **14** (Scheme 7). Fortunately, after further optimization, the formation of undesired byproducts **14** was fully suppressed using only 1% piperidine in DMF.

Finally, intermediates **16** were subjected to acylation with Fmoc-Glu(OH)-O<sup>t</sup>Bu, followed by cleavage of Fmoc protective group and acylation with pteric acid, which yielded the desired conjugates (Scheme 8). Products **17a–g** were cleaved from the polymer matrix using 50% TFA in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  and purified using semipreparative HPLC.

The reaction sequence was successfully tested using different building blocks, and the list of conjugates synthesized using the developed method is summarized in Table 1. Furthermore, Figure 1 displays the HPLC-UV traces of representative reaction intermediates. This figure demonstrates that the optimized procedure furnished the corresponding compounds in excellent crude purities and good yields after 15 reaction steps and reverse-phase purification.

Scheme 7. Undesired, Base-Catalyzed Redox Reaction Leading to Symmetrical Disulfides 14<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Reagents and conditions: (i) DMF/piperidine (4:1), room temperature; (ii) DMF/piperidine (99:1), room temperature; (iii) Fmoc-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-OH, *N,N'*-diisopropylcarbodiimide (DIC), DMF/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1), room temperature.

Scheme 8. Finishing the Reaction Sequence<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Reagents and conditions: (i) Fmoc-Glu-O<sup>t</sup>Bu, DIC, DMF/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1), room temperature; (ii) pteric acid, HOBt, 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate (HBTU), DIPEA, DMF/DMSO/NMP (9:5:1), room temperature, protected from light; (iii) TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1), room temperature.

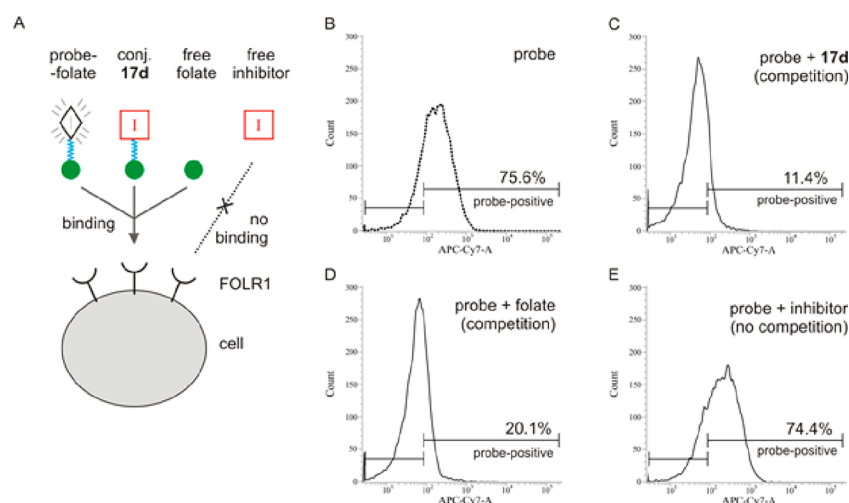
**In Vitro Disulfide Reduction Test.** To test the applicability of our conjugates, we subsequently mimicked drug release *in vitro*. The mechanism of self-immolative cleavage of the linker is based on 1,2-elimination.<sup>21</sup> Accordingly, the release of the CDK inhibitor was successfully accomplished by treating a 0.04 mM solution of representative conjugate 17d (Figure 2A) with 4 mM of the reducing agent dithiothreitol (DTT) at 37 °C. The release was monitored by UHPLC-UV ( $\lambda = 289$  nm) at pH 7 and 7.4. The disulfide bond was cleaved within 5 min and yielded the drug–spacer intermediate (Figure 2B), which subsequently self-immolated and quantitatively released the purine inhibitor after 20 h (Figure 2C). Use of glutathione (GSH) instead of DTT led to cleavage of the conjugate 17d after the same time.

**Cellular and Biochemical Assays.** For a proof of concept, conjugate 17d was further tested for its binding to the HeLa

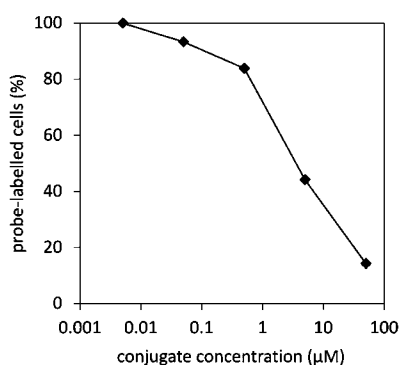
cell line overexpressing FOLR1 by flow cytometry using the folate-receptor-targeted fluorescence probe FolateRSense 680 (PerkinElmer) as a competing agent (Figure 3A). The HeLa cell line was used because of its overexpression of FOLR1 and significantly greater probe uptake over other cell lines; in addition, HeLa cells were also much more sensitive to the conjugate than other cell lines (see Supporting Information, Table S1). The cells were stained with 1  $\mu$ M FolateRSense 680 in the absence or presence of conjugate 17d (Figure 3B,C). In control incubations, the probe was combined with either the unconjugated inhibitor or free folic acid (Figure 3D,E). After 1 hour of incubation, cell-associated fluorescence was quantified by flow cytometry. Autofluorescence of the unstained cells was used for gating strategies, in which cells scattered outside the autofluorescence signal were considered probe-marked cells. The measurements confirmed that the presence of conjugated







**Figure 3.** In vitro binding to the folate receptor: (A) Experimental design is shown for clarity. (B–E) HeLa cells were stained with 1  $\mu\text{M}$  FolateRSense 680 probe (B) alone or in the presence of (C) conjugated CDK inhibitor 17d, (D) free folic acid, or (E) unconjugated CDK inhibitor in 50  $\mu\text{M}$  concentrations. Segments mark probe-negative (left segment) and probe-positive (right segment) cells; numbers refer to the percentages of probe-positive cells.



**Figure 4.** Dose-dependent competition of conjugate 17d with FolateRSense 680 probe for binding to the folate receptor in HeLa cells.

## EXPERIMENTAL SECTION

**General Information.** All reagents were of reagent grade and were used without further purification. Solvents and chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (Milwaukee, IL, [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)) and Acros Organics (Geel, Belgium, [www.acros.cz](http://www.acros.cz)). Dry solvents were dried over 4 Å molecular sieves or stored as received from commercial suppliers. Aminomethyl resin [100–200 mesh, 1% divinylbenzene (DVB), 0.9 mmol/g] was obtained from AAPPTec (Louisville, KY, [www.aapptec.com](http://www.aapptec.com)). The reactions were carried out in plastic reaction vessels (syringes, each equipped with a porous disk) using a manually operated synthesizer (Torviq, Niles, MI, [www.torviq.com](http://www.torviq.com)) or in dried glassware, unless stated otherwise. The volume of wash solvent was 10 mL per 1 g of resin. For washing, resin slurry was shaken with the fresh solvent for at least 1 min before the solvent was changed. Resin-bound intermediates were dried under a stream of nitrogen for prolonged storage and/or quantitative analysis. For the LC-MS analysis, a sample of resin (~5 mg) was treated with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{TFA}$  (1:1, 1 mL, v/v), the cleavage cocktail was evaporated under a stream of nitrogen, and the cleaved compounds were extracted into  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  (1:1, 1 mL, v/v). The LC-MS analyses were carried out on a UHPLC-MS system consisting of a UHPLC chromatograph Acquity with a photodiode array detector and a single-quadrupole mass spectrometer (Waters), using an X-Select C18 column at 30 °C and a flow rate of 600  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Mobile phase consisted of (A) 0.01 M

ammonium acetate in  $\text{H}_2\text{O}$  and (B)  $\text{CH}_3\text{CN}$ , linearly programmed from 10% A to 80% B over 2.5 min and held at the latter composition for 1.5 min. The column was re-equilibrated with 10% of solution B for 1 min. The ESI ion source was operated at a discharge current of 5  $\mu\text{A}$ , a vaporizer temperature of 350 °C, and a capillary temperature of 200 °C. Purification was carried out on a C18 reverse-phase column (YMC Pack ODS-A, 20  $\times$  100 mm, 5- $\mu\text{m}$  particles), with a gradient formed from 10 mM aqueous ammonium acetate and  $\text{CH}_3\text{CN}$  at flow rate of 15 mL/min. Flash chromatography was carried out on silica gel (230–400 mesh). TLC plates were visualized under UV and/or with cerium ammonium molybdate (CAM) stain. For lyophilization of the residual solvents at  $-110$  °C, a ScanVac Coolsafe 110-4 freeze dryer was used. NMR spectra were recorded on a JEOL ECX500 spectrometer at a magnetic field strength of 11.75 T (with operating frequencies of 500.16 MHz for  $^1\text{H}$  and 125.77 MHz for  $^{13}\text{C}$ ). Chemical shifts ( $\delta$ ) are reported in parts per million (ppm), and coupling constants ( $J$ ) are reported in Hertz (Hz). The  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR chemical shifts ( $\delta$  in ppm) were referenced to the residual signals of  $\text{CDCl}_3$  [7.26 ppm ( $^1\text{H}$ ) and 77.23 ppm ( $^{13}\text{C}$ )] and  $\text{DMSO}-d_6$  [2.50 ppm ( $^1\text{H}$ ) and 39.51 ppm ( $^{13}\text{C}$ )].  $^{19}\text{F}$  NMR chemical shifts ( $\delta$  in ppm) were referenced to the signal of trifluoroacetic acid ( $-76.55$  ppm). Structural assignment of resonances was performed with the help of 2D NMR gradient experiments (COSY,  $^1\text{H}$ – $^{13}\text{C}$  HMQC, ROESY). Acetate salt (residual agent from the semipreparative HPLC purification) exhibited a singlet at 1.89–1.90 ppm in the  $^1\text{H}$  NMR spectrum and two resonances at 21.1–21.3 ppm and 172.0–172.1 ppm in the  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum. Abbreviations in NMR spectra: app d, apparent doublet; app s, apparent singlet; app t, apparent triplet; br s, broad singlet; d, doublet; dd, doublet of doublets; m, multiplet; s, singlet; sp, septet; t, triplet. IR spectra (4000–400  $\text{cm}^{-1}$ ) were collected on a Nicolet Avatar 370 FTIR spectrometer. Solid samples were measured neat, and oily samples were measured as films. Abbreviations in IR spectra: s, strong; m, medium; w, weak. HRMS analysis was performed using an Orbitrap Elite LC-MS hybrid quadrupole mass spectrometer (Dionex UltiMate 3000, Thermo Exactive Plus, Waltham, MA) operating in positive full-scan mode (120000 fwhm) in the range of 100–1000  $m/z$ . The settings for electrospray ionization were as follows: oven temperature, 150 °C; source voltage, 3.6 kV. The acquired data were internally calibrated with diisooctyl phthalate as a contaminant in  $\text{CH}_3\text{OH}$ . Samples were diluted to a final concentration of 0.1 mg/mL in  $\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{CH}_3\text{OH}$  (50:50, v/v). Before HPLC separation (Phenomenex Gemini column, 50  $\times$  2.00 mm, 3- $\mu\text{m}$  particles, C18), the samples were injected by direct infusion into the mass spectrometer using an autosampler. The mobile phase was isocratic  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{isopropanol}$

(IPA)/0.01 M ammonium acetate (40:5:55) at a flow rate of 0.3 mL/min.

**Experimental Procedures.** *2,6-Dichloro-9-cyclopentyl-9H-purine (3a)*. To a solution of 2,6-dichloropurine (2 g, 10.60 mmol) and PPh<sub>3</sub> (3.6 g, 13.76 mmol) in dry, degassed THF (20 mL) was added cyclopentanol (1.9 mL, 21.20 mmol), and the solution was cooled to 0 °C. At this temperature, DIAD (2.7 mL, 13.76 mmol) was slowly added, and the reaction mixture was stirred at ambient temperature under a nitrogen atmosphere. The reaction was monitored by UHPLC-MS, which indicated its completion after 18 h. The reaction mixture was concentrated, diluted with brine (100 mL), and extracted with EtOAc (5 × 120 mL). The organic extracts were combined, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered, and evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOAc = 1:1, v/v) to afford compound **3a** as a bright yellow crystalline solid (2.3 g, 86% yield). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.15 (s, 1H), 2.37–2.32 (m, 2H), 2.07–1.94 (m, 4H), 1.90–1.80 (m, 2H) ppm. Other data were consistent with published results.<sup>27</sup>

*2,6-Dichloro-9-isopropyl-9H-purine (3b)*. To a solution of 2,6-dichloropurine (500 mg, 2.64 mmol) and PPh<sub>3</sub> (838 mg, 3.20 mmol) in dry, degassed THF (10 mL) was added isopropanol (400 μL, 5.30 mmol), and the solution was cooled to 0 °C. At this temperature, DIAD (630 μL, 3.20 mmol) was slowly added, and the reaction mixture was stirred at ambient temperature under a nitrogen atmosphere. The reaction was monitored by UHPLC-MS, which indicated its completion after 18 h. The reaction mixture was concentrated, diluted with brine (50 mL), and extracted with EtOAc (5 × 70 mL). The organic extracts were combined, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered, and evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOAc = 1:1, v/v) to afford compound **3b** as a white crystalline solid (490 mg, 80% yield). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.17 (s, 1H), 4.91 (sp, J = 6.8 Hz, 1H), 1.65 (d, J = 6.8 Hz, 6H) ppm. Other data were consistent with published results.<sup>28</sup>

*2-(Pyridin-2-ylidensulfanyl)ethan-1-ol (6)*. To a solution of methoxycarbonyl sulfonyl chloride (2.3 mL, 25.60 mmol) in CH<sub>3</sub>CN (10 mL) at 0 °C was slowly added 2-mercaptoethanol (1.8 mL, 25.60 mmol) in CH<sub>3</sub>CN (10 mL), and the solution was stirred for 30 min at 0 °C. To the clear solution was added 2-mercaptopyridine (2.5 g, 23.04 mmol) in CH<sub>3</sub>CN (15 mL), and the yellow mixture was refluxed for 2 h until a white precipitate formed. The reaction mixture was cooled to ambient temperature and stirred for an additional 1 h at 0 °C. The precipitate was filtered and washed with CH<sub>3</sub>CN (3 × 50 mL). The crude white solid product **6** was dried and used in the next step without further purification (3.9 g, 81% yield). Data were consistent with published results.<sup>29</sup>

*1H-Benzo[D][1,2,3]triazol-1-yl (2-(pyridin-2-ylidensulfanyl)ethyl) Carbonate (7)*. To a solution of triphosgene (1.84 g, 6.20 mmol) in dry CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (15 mL) at 0 °C under a nitrogen atmosphere was slowly added a solution of compound **6** (3.9 g, 20.67 mmol) and TEA (2.9 mL, 20.67 mmol) in dry CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (15 mL). The reaction mixture was stirred at ambient temperature for 1 h. Then, a solution of HOBt (3.16 g, 20.67 mmol) and TEA (2.9 mL, 20.67 mmol) in dry CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (15 mL) was slowly added over a duration of 20 min at 0 °C. The reaction was monitored by UHPLC-MS, which indicated its completion after 12 h. The reaction mixture was concentrated, diluted with brine (50 mL), and extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 × 70 mL). The organic extracts were combined, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered, and evaporated to dryness under reduced pressure. Product **7** was obtained as a white crystalline solid (2.86 g, 40% yield). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.46–8.45 (m, 1H), 8.22–8.20 (m, 1H), 8.04–7.97 (m, 1H), 7.79–7.76 (m, 1H), 7.70–7.62 (m, 2H), 7.57–7.53 (m, 1H), 7.10–7.08 (m, 1H), 4.81 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 3.26 (t, J = 6.4 Hz, 2H) ppm. <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 159.0, 149.9, 147.1, 137.3, 133.4, 133.0, 126.5, 121.3, 120.4, 115.9, 115.2, 66.4, 36.7 ppm. HRMS (ESI) *m/z*: [M + H]<sup>+</sup> calcd for C<sub>14</sub>H<sub>13</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>S<sub>2</sub>, 349.0424; found, 349.0425.

*tert-Butyl (((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)cysteinate (10)*. To a solution of protected cystine **9** (700 mg, 0.87 mmol) in dry, degassed THF/H<sub>2</sub>O (40:1, 12.5 mL, v/v) at 0 °C was slowly added

P(Bu)<sub>3</sub> (240 μL, 0.96 mmol), and the solution was stirred at ambient temperature. The reaction was monitored by TLC (hexane/EtOAc = 3:1, v/v), which indicated its completion after 6–12 h. The reaction mixture was diluted with 10% aqueous AcOH (50 mL) and extracted with EtOAc (5 × 70 mL). The organic extracts were combined, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered, and evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography (hexane/EtOAc = 3:1, v/v) to afford compound **10** as a pale yellow oil (639 mg, 92% yield). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.77 (d, J = 7.5 Hz, 2H), 7.61 (d, J = 7.4 Hz, 2H), 7.41 (app t, J = 7.4 Hz, 2H), 7.33 (app t, J = 7.4 Hz, 2H), 5.70 (d, J = 7.0 Hz, 1H), 4.57–4.53 (m, 1H), 4.46–4.37 (m, 2H), 4.24 (t, J = 6.9 Hz, 1H), 3.03–2.96 (m, 2H), 1.51 (s, 9H), 1.34 (t, J = 8.9 Hz, 1H) ppm. <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 169.0, 155.7, 143.9, 141.4, 127.8, 125.2, 125.1, 120.1, 83.1, 67.1, 55.4, 47.2, 28.1, 27.4 ppm. HRMS (ESI) *m/z*: [M – H]<sup>–</sup> calcd for C<sub>22</sub>H<sub>24</sub>NO<sub>4</sub>S, 398.1426; found, 398.1423.

*tert-Butyl-N-(((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)-S-((2-hydroxyethyl)thio)cysteinate (11)*. To a solution of methoxycarbonyl sulfonyl chloride (200 μL, 2.22 mmol) in CH<sub>3</sub>CN (2 mL) at 0 °C was slowly added 2-mercaptoethanol (155 μL, 2.22 mmol) in CH<sub>3</sub>CN (2 mL), and the solution was stirred for 30 min. Then, a solution of compound **10** (800 mg, 2.00 mmol) and 2,6-lutidine (1.3 mL, 11.1 mL) in CH<sub>3</sub>CN (5 mL) was slowly added to the reaction mixture. The reaction was monitored by UHPLC-MS, which indicated its completion after 1.5 h. The residual solvent was evaporated, and the reaction mixture was diluted with NH<sub>4</sub>Cl (50 mL) and extracted with EtOAc (5 × 70 mL). The organic extracts were combined, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered, and evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography (first, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOAc = 1:1, v/v; second, hexane/EtOAc = 2:1, v/v) to afford compound **11** as a pale yellow oil (715 mg, 75% yield). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.77 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 7.61 (d, J = 7.4 Hz, 2H), 7.41 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 7.32 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 5.67 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 4.59 (dd, J = 12.5, 5.3 Hz, 1H), 4.46–4.36 (m, 2H), 4.24 (t, J = 7.0 Hz, 1H), 3.85 (app t, J = 5.6 Hz, 1H), 3.27 (dd, J = 14.1, 5.3 Hz, 1H), 3.15 (dd, J = 14.1, 5.3 Hz, 1H), 2.90–2.84 (m, 1H), 1.50 (s, 9H) ppm. <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 169.4, 155.9, 143.8, 141.4, 127.8, 127.2, 125.2, 120.1, 83.4, 67.3, 60.4, 54.3, 47.2, 42.2, 41.4, 28.1 ppm. HRMS (ESI) *m/z*: [M + H]<sup>+</sup> calcd for C<sub>24</sub>H<sub>30</sub>NO<sub>5</sub>S<sub>2</sub>, 476.1565; found, 476.1562.

*tert-Butyl-S-((2-(((1H-benzod[1,2,3]triazol-1-yl)oxy)carbonyl)oxy)ethyl)thio)-N-(((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)cysteinate (12)*. To a solution of triphosgene (310 mg, 1.05 mmol) in dry CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (8 mL) at 0 °C under a nitrogen atmosphere was slowly added a solution of compound **11** (715 mg, 1.50 mmol) and 2,6-lutidine (523 μL, 4.5 mmol) in dry CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (8 mL). The reaction mixture was stirred at ambient temperature for 3 h. Then, a solution of HOBt (230 mg, 1.50 mmol) and 2,6-lutidine (523 μL, 4.5 mmol) in dry CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (8 mL) was slowly added within 10 min at 0 °C, and the reaction mixture was stirred at ambient temperature. The reaction was monitored by UHPLC-MS, which indicated its completion after 12 h. The residual solvent was evaporated to dryness, and the crude reaction mixture was diluted with EtOAc (100 mL) and extracted with aqueous NH<sub>4</sub>Cl (6 × 200 mL). The organic extract was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered, and evaporated under reduced pressure. The crude product was used without further purification or was purified by semipreparative HPLC to afford compound **12** as a pale yellow solid (600 mg, 65% yield). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.16 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.99 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.74–7.72 (m, 3H), 7.59 (d, J = 7.4 Hz, 2H), 7.51 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 7.42–7.27 (m, 5H), 5.66 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 4.75 (t, J = 6.7 Hz, 2H), 4.59 (d, J = 6.6 Hz, 1H), 4.42 (dd, J = 10.2, 7.6 Hz, 1H), 4.37–4.31 (m, 1H), 4.22 (t, J = 6.9 Hz, 1H), 3.32 (dd, J = 13.8, 4.8 Hz, 1H), 3.20 (dd, J = 13.8, 4.8 Hz, 1H), 3.13–3.07 (m, 2H), 1.49 (s, 9H) ppm. <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 169.3, 160.8, 155.7, 147.2, 143.8, 141.4, 132.9, 127.8, 127.2, 126.5, 125.2, 120.1, 115.9, 115.2, 83.5, 67.2, 66.6, 54.2, 47.2, 42.1, 36.5, 28.1 ppm. HRMS (ESI) *m/z*: [M + H]<sup>+</sup> calcd for C<sub>31</sub>H<sub>33</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>S<sub>2</sub>, 637.1791; found, 637.1790.

**Preparation of BAL Resin 1.** Aminomethyl polystyrene resin (1 g, loading of 0.98 mmol/g) was swollen in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 mL) for 30 min, washed with DMF (3 × 10 mL), neutralized in DMF/piperidine (5:1,



10 mL) for an additional 30 min, and then again washed with DMF (5 × 10 mL). Backbone amide linker (700 mg, 2.94 mmol) and HOBt (450 mg, 2.94 mmol) were dissolved in DMF/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1, 10 mL, v/v), and DIC (460 μL, 2.94 mmol) was added. The resulting solution was added to a polypropylene fritted syringe with aminomethyl resin. The reaction slurry was shaken at ambient temperature overnight and then washed with DMF (3 × 10 mL) and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 × 10 mL). A bromophenol blue test confirmed the quantitative acylation of amino groups.

**General Procedure for Reductive Amination to Obtain Resin 2.** BAL resin **1** was swollen in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 mL) for 30 min and then washed with dry THF (3 × 10 mL) and dry DMF (3 × 10 mL). A solution of the corresponding amine (4.9 mmol) in DMF/AcOH (10:1, 10 mL, v/v) was added to the resin, and the mixture was shaken overnight at ambient temperature. Then, NaBH(OAc)<sub>3</sub> (210 mg, 2.94 mmol) in DMF/AcOH (20:1, 5 mL, v/v) was added portionwise to the reaction mixture during a period of 4 h, after which the mixture was washed with DMF (5 × 10 mL) and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 × 10 mL) and neutralized with DMF/TEA (10:1, 10 mL, v/v) for an additional 30 min to obtain resin **2**. The loading was determined according to a published procedure.<sup>30</sup>

**General Procedure for the Preparation of Intermediates 4. Arylation with 2,6-Dichloropurine Followed by On-Resin N<sup>9</sup>-Alkylation.** Resin **2** (500 mg) was swollen in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 mL) for 30 min and then washed with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 × 5 mL). 2,6-Dichloropurine (320 mg, 1.55 mmol) and DIPEA (256 μL, 1.55 mmol) were dissolved in dioxane (5 mL) and added to a sealed vial with resin **2**. The reaction slurry was shaken at 80 °C overnight and then washed with THF (5 × 5 mL) and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 × 5 mL). The corresponding resin (500 mg) was swollen in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 mL) for 30 min and then washed with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 × 5 mL), DMF (3 × 5 mL), and DMSO (3 × 5 mL). Alkyl iodide (3.72 mmol), BTPP (1.13 mL, 3.72 mmol), and DMSO (5 mL) were added to the resin. The reaction slurry was shaken at 65 °C overnight and then washed with DMF (10 × 5 mL), DMSO (5 × 5 mL), THF (5 × 5 mL), and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 × 5 mL).

**Arylation with N<sup>9</sup>-Prealkylated Intermediates 3.** Resin **2** (500 mg) was swollen in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 mL) for 30 min and then washed with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 × 5 mL). Intermediates **3** (3 mmol) and DIPEA (495 μL, 3 mmol) were dissolved in dioxane (5 mL) and added to a sealed vial with resin **2**. The reaction slurry was shaken at 80 °C overnight and then washed with THF (5 × 5 mL) and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 × 5 mL).

**General Procedure for the Preparation of Intermediates 5.** Resin **4** (250 mg) was swollen in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 mL) for 30 min and then washed with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 × 5 mL) and dry THF (3 × 5 mL) that had been degassed prior to use. Amine (2 mmol), XPhos (96 mg, 0.2 mmol), Pd<sub>2</sub>dba<sub>3</sub> (92 mg, 0.1 mmol) and LiHMDS (1 M solution in THF, 2 mL, 2 mmol) were dissolved in dry, degassed THF (5 mL) and added to a sealed vial with resin **4**. The reaction slurry was protected from light and shaken at 60 °C for 24 h, after which it was washed with DMF (10 × 5 mL), THF (5 × 5 mL), and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 × 5 mL).

**General Procedure for the Preparation of Intermediates 13.** Resin **5** (250 mg) was swollen in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 mL) for 30 min and then washed with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 × 5 mL). Linker **12** (318 mg, 0.5 mmol) was dissolved in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2.5 mL) and added to a polypropylene fritted syringe with resin **5**. The reaction slurry was shaken at ambient temperature overnight and then washed with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 × 3 mL).

**General Procedure for the Preparation of Intermediates 15.** To obtain intermediates **15**, the following procedures were repeated three times:

**Step 1: Deprotection of Fmoc.** Resin **13** (250 mg) was swollen in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 mL) for 30 min and then washed with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 × 5 mL). To the resin was added a solution of DMF/piperidine (99:1, 2.5 mL, v/v), and the slurry was shaken for 2 h at ambient temperature followed by wash with DMF (5 × 5 mL) and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 × 5 mL).

**Step 2: Acylation.** Fmoc-Asp(O<sup>t</sup>Bu)-OH (308 mg, 0.75 mmol) was dissolved in DMF/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1, 2.5 mL, v/v), and DIC (58 μL, 0.37 mmol) was added. The reaction mixture was added to a propylene fritted syringe with deprotected resin **13**, and the reaction slurry was shaken overnight at ambient temperature. The resin was washed with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 × 3 mL).

**General Procedure for the Preparation of Intermediates 16.** Resin **15** (250 mg) was swollen in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 mL) for 30 min and then washed with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 × 5 mL). To the resin was added a solution of DMF/piperidine (99:1, 2.5 mL, v/v), and the slurry was shaken for 2 h at ambient temperature. The resin was washed with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 × 3 mL).

**General Procedure for the Preparation of Final Compounds 17. Step 1: Acylation with Fmoc-Glu-O<sup>t</sup>Bu.** Fmoc-Glu-O<sup>t</sup>Bu (317 mg, 0.75 mmol) was dissolved in DMF/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1, 2.5 mL, v/v), and DIC (58 μL, 0.37 mmol) was added. The reaction mixture was added to a propylene fritted syringe with resin **16**, and the reaction slurry was shaken overnight at ambient temperature. The resin was washed with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 × 3 mL).

**Step 2: Fmoc Cleavage and Acylation with Pteric Acid.** The resin (250 mg) was swollen in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 mL) for 30 min and then washed with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 × 5 mL). To the resin was added a solution of DMF/piperidine (99:1, 2.5 mL, v/v), and the slurry was shaken for 2 h at ambient temperature and then washed with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 × 3 mL).

Then, HBTU (112 mg, 0.3 mmol) and HOBt (46 mg, 0.3 mmol) were dissolved in DMF/DMSO/NMP (9:5:1, 7.5 mL, v/v), and pteric acid (250 mg, 0.64 mmol) was added. The reaction mixture was added to a propylene fritted syringe with the resin, and the reaction slurry was protected from light and shaken for 18 h at ambient temperature.

The resin was washed with DMF (10 × 5 mL), DMSO (10 × 5 mL), water (10 × 5 mL), DMSO (10 × 5 mL), DMF (10 × 5 mL), THF (10 × 5 mL), and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 × 5 mL).

**Step 3: Cleavage from the Resin.** The resin (250 mg) was swollen in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 mL) for 30 min and then washed with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 × 5 mL). To the resin was added a solution of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/TFA (1:1, 5 mL, v/v) and the slurry was shaken for 2 h at ambient temperature, after which it was evaporated under a stream of nitrogen and extracted into CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (1:1, 3 mL, v/v). The final conjugates **17a–g** were purified by semipreparative HPLC.

**Conjugate 17a.** Yellowish oil (60 mg, 27% yield). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 9.15 (br s, 1H), 8.63 (s, 1H), 8.25 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H), 8.18 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 8.05 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H), 7.89 (s, 1H), 7.84 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.73 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H), 7.66–7.61 (m, 2H), 7.33 (br s, 1H), 7.28 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.95 (t, *J* = 6.7 Hz, 1H), 6.87 (d, *J* = 9.1 Hz, 2H), 6.65–6.62 (m, 2H), 6.35 (br s, 1H), 4.55–4.47 (m, 7H), 4.29–4.20 (m, 3H), 4.16–4.14 (m, 3H), 3.76–3.72 (m, 5H), 3.22–3.13 (m, 2H), 3.06–3.02 (m, 4H), 2.98–2.94 (m, 5H), 2.74–2.55 (m, 4H), 2.03–1.95 (m, 4H), 1.86–1.81 (m, 2H), 1.48 (d, *J* = 6.6 Hz, 6H), 1.35–1.25 (m, 5H) ppm. <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 174.0, 172.3, 172.0, 171.1, 170.5, 170.1, 167.4, 161.9, 158.1, 155.2, 154.4, 154.1, 152.0, 150.6, 148.6, 148.4, 146.3, 135.5, 133.0, 131.1, 128.8, 127.8, 121.5, 115.4, 111.3, 66.2, 61.7, 56.8, 53.4, 52.5, 50.3, 49.9, 49.4, 49.3, 45.9, 43.6, 36.7, 31.6, 31.2, 26.8 ppm. IR ( $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ ) = 3270 (w), 3056 (w), 2919 (w), 2851 (w), 1632 (m), 1605 (m), 1511 (s), 1452–1411 (m), 1300 (m), 1263 (m), 1228 (s), 1178 (s), 1118 (m), 1005 (s), 951 (m), 924 (m), 822 (m), 765 (m), 719 (m) cm<sup>-1</sup>. HRMS (ESI) *m/z*: [M + H]<sup>+</sup> calcd for C<sub>61</sub>H<sub>76</sub>N<sub>19</sub>O<sub>19</sub>S<sub>2</sub>, 1442.5001; found, 1442.5000.

**Conjugate 17b.** Yellowish oil (66 mg, 22% yield). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 8.62 (s, 1H), 8.24–8.23 (m, 1H), 8.19 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H), 8.03 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.84–7.83 (m, 3H), 7.73 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.62 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.39 (br s, 1H), 7.28 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 6.94 (t, *J* = 5.2 Hz, 1H), 6.87 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 6.63 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 4.70–4.63 (m, 1H), 4.49–4.47 (m, 5H), 4.27–4.22 (m, 2H), 4.15 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H), 3.76–3.68 (m, 5H), 3.60 (br s, 1H), 3.26 (br s, 1H), 3.21–3.15 (m, 1H), 3.05–3.02 (m, 4H), 3.00–2.88 (m, 4H), 2.74–2.53 (m, 4H), 2.24–1.99 (m, 11H), 1.85–1.83 (m, 4H), 1.67–1.64 (m, 2H), 1.31–1.26 (m, 4H) ppm. <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 174.1, 172.4, 172.4, 172.3, 172.1, 171.1, 170.6, 170.1, 166.1, 161.5, 158.1, 155.2, 154.5, 150.7, 148.6, 148.4, 146.3, 136.2, 132.9, 128.8, 127.8, 121.6, 121.1, 115.4, 111.3, 66.2, 61.7, 53.4, 52.6, 49.9, 49.4, 49.3, 45.9, 41.7, 37.3, 37.0, 36.7, 31.8, 31.6, 31.2, 26.9 ppm. IR ( $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ ) = 3304 (m), 2914 (w), 2849 (w), 1637 (s), 1604 (s), 1510 (s), 1450–1408 (m), 1264 (m), 1227 (m), 1183 (m), 1115 (m), 1002 (s),



950 (m), 924 (m), 820 (m), 766 (m)  $\text{cm}^{-1}$ . HRMS (ESI)  $m/z$ :  $[M + H]^+$  calcd for  $\text{C}_{63}\text{H}_{78}\text{N}_{19}\text{O}_{19}\text{S}_{22}$ , 1468.5157; found, 1468.5165.

**Conjugate 17c.** Yellowish oil (60 mg, 25% yield).  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  9.11 (br s, 1H), 8.62 (s, 1H), 8.25 (d,  $J = 4.8$  Hz, 1H), 8.17 (d,  $J = 7.2$  Hz, 1H), 8.02 (d,  $J = 5.5$  Hz, 1H), 7.85–7.81 (m, 3H), 7.72 (d,  $J = 7.0$  Hz, 1H), 7.61 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H), 7.37–7.31 (m, 2H), 6.95 (t,  $J = 6.1$  Hz, 1H), 6.87 (d,  $J = 9.1$  Hz, 2H), 6.66–6.60 (m, 2H), 6.56–6.50 (m, 1H), 4.71–4.65 (m, 1H), 4.51–4.47 (m, 5H), 4.23–4.22 (m, 3H), 4.12 (t,  $J = 6.2$  Hz, 2H), 3.75–3.70 (m, 6H), 3.27–3.23 (m, 3H), 3.20–3.14 (m, 2H), 3.05–3.02 (m, 4H), 3.02–2.87 (m, 8H), 2.72–2.56 (m, 4H), 2.22 (m, 1H), 2.16–2.06 (m, 3H), 2.04–1.92 (m, 4H), 1.70–1.60 (m, 3H), 1.55–1.44 (m, 5H) ppm.  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  174.1, 172.4, 172.1, 171.1, 170.6, 170.1, 166.0, 161.2, 158.9, 155.9, 154.5, 152.0, 150.6, 148.6, 148.4, 146.3, 136.1, 132.8, 131.6, 128.7, 127.8, 121.1, 115.3, 111.3, 66.2, 61.7, 54.8, 53.5, 50.3, 50.2, 49.9, 49.2, 45.9, 43.6, 36.8, 31.8, 27.1, 23.7 ppm. IR ( $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ ) = 3282 (m), 2952 (w), 2916 (w), 2850 (w), 1639 (m), 1605 (m), 1511 (s), 1452–1411 (m), 1376 (m), 1228 (s), 1179 (m), 1121 (m), 1005 (s), 997 (m), 951 (m), 923 (m), 823 (m), 801 (m), 765 (s)  $\text{cm}^{-1}$ . HRMS (ESI)  $m/z$ :  $[M + H]^+$  calcd for  $\text{C}_{61}\text{H}_{76}\text{N}_{19}\text{O}_{19}\text{S}_{22}$ , 1442.5001; found, 1442.5009.

**Conjugate 17d.** Yellowish oil (50 mg, 23% yield).  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  8.64–8.58 (m, 2H), 8.37 (d,  $J = 4.8$  Hz, 1H), 8.25 (d,  $J = 5.7$  Hz, 1H), 8.16 (d,  $J = 6.6$  Hz, 1H), 8.00 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H), 7.90 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 7.84 (td,  $J = 7.9, 1.8$  Hz, 1H), 7.76–7.72 (m, 3H), 7.65 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 7.59 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H), 7.44 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H), 7.34–7.27 (m, 2H), 6.94–6.90 (m, 1H), 6.64–6.61 (m, 2H), 6.07 (d,  $J = 6.6$  Hz, 1H), 4.63 (br s, 3H), 4.49–4.41 (m, 4H), 4.38–4.36 (m, 1H), 4.16–4.13 (dd,  $J = 12.8, 6.3$  Hz, 4H), 3.61–3.52 (m, 1H), 2.98–2.86 (m, 10H), 2.63–2.60 (m, 1H), 2.15–2.13 (m, 1H), 2.04–1.92 (m, 6H), 1.81–1.75 (m, 2H), 1.64–1.58 (m, 10H), 1.52–1.49 (m, 5H), 1.30–1.17 (m, 4H) ppm.  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  174.8, 173.9, 173.6, 173.0, 172.4, 171.4, 171.1, 170.6, 165.6, 161.9, 158.3, 156.0, 155.2, 154.9, 150.5, 149.4, 148.3, 141.8, 137.2, 136.9, 128.5, 127.8, 127.6, 126.3, 122.4, 121.9, 120.0, 111.4, 61.7, 53.9, 53.4, 50.7, 50.4, 49.4, 49.2, 45.9, 43.5, 42.6, 38.5, 38.0, 37.4, 31.8, 31.6, 31.3, 27.7, 22.4 ppm. IR ( $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ ) = 3270 (w), 3054 (w), 2917 (w), 2850 (w), 1655 (m), 1604 (s), 1512 (s), 1394 (m), 1300 (m), 1263 (m), 1228 (s), 1178 (m), 1127 (m), 1046 (s), 999 (s), 949 (m), 902 (m), 822 (m), 768 (m), 719 (m)  $\text{cm}^{-1}$ . HRMS (ESI)  $m/z$ :  $[M + H]^+$  calcd for  $\text{C}_{63}\text{H}_{78}\text{N}_{19}\text{O}_{19}\text{S}_{22}$ , 1474.5052; found, 1474.5055.

**Conjugate 17e.** Yellowish oil (24 mg, 19% yield).  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  8.63 (s, 1H), 8.24 (br s, 2H), 8.18 (d,  $J = 7.5$  Hz, 1H), 8.05 (d,  $J = 7.1$  Hz, 1H), 7.72 (s, 2H), 7.62 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H), 7.35–7.28 (m, 5H), 7.23 (d,  $J = 6.8$  Hz, 1H), 7.10 (dd,  $J = 14.3, 7.3$  Hz, 3H), 6.98 (s, 1H), 6.95–6.93 (m, 3H), 6.80 (dd,  $J = 8.1, 1.9$  Hz, 1H), 6.64–6.62 (m, 2H), 6.05 (br s, 1H), 4.67–4.44 (m, 10H), 4.27–4.21 (m, 3H), 4.13 (t,  $J = 6.0$  Hz, 3H), 3.22–3.15 (m, 3H), 2.99–2.91 (m, 6H), 2.70–2.55 (m, 5H), 2.27–1.92 (m, 10H), 1.85–1.63 (m, 11H), 1.23–1.22 (m, 4H) ppm.  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  174.0, 172.2, 172.0, 171.0, 170.5, 170.0, 166.1, 158.2, 156.6, 156.4, 155.2, 154.4, 150.6, 150.1, 148.5, 143.3, 142.7, 135.5, 129.9, 129.68, 128.8, 127.8, 123.2, 122.4, 121.5, 118.3, 117.4, 116.6, 111.3, 61.7, 54.7, 53.3, 52.5, 50.3, 50.1, 49.8, 49.4, 49.2, 45.9, 43.6, 36.7, 31.8, 31.5, 31.2, 22.2, 21.7 ppm. IR ( $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ ) = 3269 (w), 3066 (w), 2947 (w), 2919 (w), 2851 (w), 1654 (m), 1605 (s), 1513 (s), 1487 (m), 1400 (m), 1376 (m), 1349 (m), 1246 (m), 1180 (m), 1128 (m), 1021 (s), 1002 (s), 950 (m), 901 (m), 820 (m), 768 (m), 719 (m), 691 (s)  $\text{cm}^{-1}$ . HRMS (ESI)  $m/z$ :  $[M + H]^+$  calcd for  $\text{C}_{66}\text{H}_{77}\text{N}_{18}\text{O}_{19}\text{S}_{22}$ , 1489.5048; found, 1489.5049.

**Conjugate 17f.** Yellowish oil (45 mg, 20% yield).  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  8.66 (br s, 1H), 8.62 (s, 1H), 8.25–8.18 (m, 3H), 8.17–8.15 (m, 3H), 7.98 (d,  $J = 6.7$  Hz, 1H), 7.93 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H), 7.85 (d,  $J = 7.7$  Hz, 2H), 7.75–7.71 (m, 3H), 7.61 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H), 7.45 (d,  $J = 8.1$  Hz, 4H), 7.27 (d,  $J = 7.6$  Hz, 1H), 6.96–6.93 (m, 1H), 6.66–6.62 (m, 2H), 6.14 (d,  $J = 5.9$  Hz, 1H), 4.63 (br s, 3H), 4.51–4.47 (m, 6H), 4.23–4.18 (m, 3H), 4.13 (t,  $J = 5.8$  Hz, 3H), 3.56 (br s, 1H), 3.20–3.17 (m, 2H), 2.997–2.88 (m, 4H), 2.73–2.60 (m, 3H), 2.22–1.94 (m, 10H), 1.88–1.63 (m, 11H), 1.27–1.23 (m, 5H) ppm.  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  174.2, 172.5, 172.1, 171.1, 170.6,

170.1, 166.0, 161.6, 158.2, 155.2, 154.6, 152.9, 150.6, 149.0, 148.7, 148.4, 137.8, 136.4, 135.4, 128.7, 128.3, 127.8, 121.6, 121.2, 120.0, 119.1, 111.3, 61.7, 53.6, 52.7, 50.4, 50.2, 50.0, 49.4, 49.3, 45.9, 37.4, 37.2, 36.9, 31.8, 31.6, 31.2, 27.0, 23.7 ppm.  $^{19}\text{F}$   $\{^1\text{H}\}$  NMR (471 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  –59.69 (s, 3F) ppm. IR ( $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ ) = 3271 (m), 2936 (w), 1641 (m), 1604 (s), 1512 (m), 1480 (m), 1394 (m), 1337 (m), 1304 (m), 1254 (s), 1220 (s), 1170 (m), 1021 (s), 1002 (s), 998 (s), 952 (m), 901 (m), 823 (m), 764 (m)  $\text{cm}^{-1}$ . HRMS (ESI)  $m/z$ :  $[M + H]^+$  calcd for  $\text{C}_{66}\text{H}_{75}\text{F}_3\text{N}_{19}\text{O}_{19}\text{S}_{22}$ , 1558.4875; found, 1558.4878.

$^1J_{\text{C-F}}$  was not determined because of poor signal-to-noise ratio.

**Conjugate 17g.** Yellowish oil (32 mg, 21% yield).  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  8.63 (s, 1H), 8.21 (d,  $J = 7.5$  Hz, 1H), 8.17 (d,  $J = 7.4$  Hz, 2H), 8.09 (d,  $J = 7.4$  Hz, 1H), 7.77 (d,  $J = 7.2$  Hz, 1H), 7.71 (s, 1H), 7.64 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H), 7.23–7.18 (m, 4H), 7.08 (d,  $J = 7.8$  Hz, 2H), 6.92 (t,  $J = 5.9$  Hz, 1H), 6.65–6.63 (m, 2H), 6.01 (d,  $J = 7.1$  Hz, 1H), 4.64–4.60 (m, 1H), 4.56–4.47 (m, 7H), 4.36–4.23 (m, 3H), 4.14 (t,  $J = 6.0$  Hz, 2H), 3.57 (br s, 2H), 3.25–3.14 (m, 3H), 3.01–2.91 (m, 4H), 2.74–2.62 (m, 4H), 2.25–2.24 (m, 5H), 2.18–2.03 (m, 9H), 1.85–1.78 (m, 6H), 1.67–1.62 (m, 2H), 1.27–1.21 (m, 5H) ppm.  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  173.9, 172.2, 172.0, 171.9, 170.9, 170.4, 170.1, 168.3, 166.1, 158.2, 155.1, 154.1, 150.6, 148.6, 148.4, 137.7, 135.3, 129.3, 128.8, 128.5, 127.8, 127.2, 121.4, 111.2, 61.6, 52.9, 52.3, 50.0, 49.7, 49.3, 49.2, 45.9, 37.2, 36.6, 36.4, 31.7, 31.5, 31.2, 26.7, 23.7, 20.8 ppm. HRMS (ESI)  $m/z$ :  $[M + H]^+$  calcd for  $\text{C}_{66}\text{H}_{75}\text{F}_3\text{N}_{19}\text{O}_{19}\text{S}_{22}$ , 1558.4875; found, 1558.4878.

## ■ ASSOCIATED CONTENT

### Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.joc.7b02650.

Spectroscopic data for the synthesized compounds and description of the folate uptake assay procedure (PDF)

## ■ AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

\*E-mail: miroslav.soural@upol.cz.

### ORCID

Vladimír Kryštof: 0000-0001-5838-2118

Miroslav Soural: 0000-0001-7288-8617

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ■ ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful for Projects CZ.1.07/2.3.00/20.0009 from the European Social Fund; 15-15264S from the Czech Science Foundation; and IGA-LF-2017-028 and IGA PrF\_2017\_014 from Palacky University, Olomouc, Czech Republic. The infrastructure of this project (Institute of Molecular and Translation Medicine) was supported by the National Program of Sustainability (Project LO1304). Eva Řezníčková is acknowledged for her assistance with biological experiments.

## ■ REFERENCES

- Jaracz, S.; Chen, J.; Kuznetsova, L. V.; Ojima, I. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 5043.
- Casi, G.; Neri, D. *J. Med. Chem.* **2015**, *58* (22), 8751.
- Assaraf, Y. G.; Leamon, C. P.; Reddy, J. A. *Drug Resist. Updates* **2014**, *17* (4-6), 89.
- Weitman, S. D.; Lark, R. H.; Coney, L. R.; Fort, D. W.; Frasca, W.; Zurawski, V. R., Jr.; Kamen, B. A. *Cancer Res.* **1992**, *52*, 3396.
- Leamon, C. P.; Reddy, J. A. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2004**, *56*, 1127.
- Low, P. S.; Henne, W. A.; Doorneweerd, D. D. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41* (1), 120.

- (7) Vlahov, I. R.; Leamon, Ch. P. *Bioconjugate Chem.* **2012**, *23*, 1357.
- (8) Leamon, C. P.; Reddy, J. A.; Klein, P. J.; Vlahov, I. R.; Dorton, R.; Bloomfield, A.; Nelson, M.; Westrick, E.; Parker, N.; Bruna, K.; Vetzal, M.; Gehrke, M.; Nicoson, J. S.; Messmann, R. A.; LoRusso, P. M.; Sausville, E. A. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2011**, *336*, 336.
- (9) Vlahov, I. R.; Santhapuram, H. K. R.; Kleindl, P. J.; Howard, S. J.; Stanford, K. M.; Leamon, C. P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 5093.
- (10) Vlahov, I. R.; Vite, G. D.; Kleindl, P. J.; Wang, Y.; Santhapuram, H. K. R.; You, F.; Howard, S. J.; Kim, S. H.; Lee, F. F. Y.; Leamon, C. P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 4578.
- (11) Leamon, C. P.; Vlahov, I. R.; Reddy, J. A.; Vetzal, M.; Santhapuram, H. K. R.; You, F.; Bloomfield, A.; Dorton, R.; Nelson, M.; Kleindl, P.; Vaughn, J. F.; Westrick, E. *Bioconjugate Chem.* **2014**, *25*, 560.
- (12) Vergote, I.; Leamon, C. J. *Ther. Adv. Med. Oncol.* **2015**, *7* (4), 206.
- (13) Malumbres, M.; Barbacid, M. *Trends Biochem. Sci.* **2005**, *30*, 630.
- (14) Krystof, V.; Uldrijan, S. *Curr. Drug Targets* **2010**, *11*, 291.
- (15) Lapenna, S.; Giordano, A. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2009**, *8*, 547.
- (16) Trova, M. P.; Barnes, K. D.; Barford, C.; Benanti, T.; Bielaska, M.; Burry, L.; Lehman, J. M.; Murphy, C.; O'Grady, H.; Peace, D.; Salamone, S.; Smith, J.; Snider, P.; Toporowski, J.; Tregay, S.; Wilson, A.; Wyle, M.; Zheng, X.; Friedrich, T. D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 6608.
- (17) Trova, M. P.; Barnes, K. D.; Alicea, L.; Benanti, T.; Bielaska, M.; Bilotta, J.; Bliss, B.; Duong, T. N.; Haydar, S.; Herr, R. J.; Hui, Y.; Johnson, M.; Lehman, J. M.; Peace, D.; Rainka, M.; Snider, P.; Salamone, S.; Tregay, S.; Zheng, X.; Friedrich, T. D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 6613.
- (18) Oumata, N.; Bettayeb, K.; Ferandin, Y.; Demange, L.; Lopez-Giral, A.; Goddard, M.-L.; Myrianthopoulos, V.; Mikros, E.; Flajolet; Greengard, P.; Meijer, L.; Galons, H. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 5229.
- (19) Gucký, T.; Jorda, R.; Zatloukal, M.; Bazgier, V.; Berka, K.; Řezníčková, E.; Béres, E.; Strnad, M.; Kryštof, V. *J. Med. Chem.* **2013**, *56* (15), 6234.
- (20) Trindade, A. F.; Frade, R. F. M.; Maçôas, E. M. S.; Graça, C.; Rodrigues, C. A. B.; Martinho, J. M. G.; Afonso, C. A. M. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 3181.
- (21) Vlahov, I. R.; Leamon, C. P. *Bioconjugate Chem.* **2012**, *23*, 1357.
- (22) Roy, J.; Nguyen, T. X.; Kanduluru, A. K.; Venkatesh, Ch.; Lv, W.; Reddy, P. V. N.; Low, P. S.; Cushman, M. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 3094.
- (23) Krajčovičová, S.; Soral, M. *ACS Comb. Sci.* **2016**, *18* (7), 371.
- (24) Roy, J.; Nguyen, T. X.; Kanduluru, A. K.; Venkatesh, C.; Lv, W.; Reddy, P. V. N.; Low, P. S.; Cushman, M. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 3094.
- (25) Singh, R.; Whitesides, G. M. In *Sulphur-Containing Functional Groups*; Eds.: Patai, S., Rappoport, Z., Eds.; John Wiley & Sons Ltd.: Chichester, U.K., 1993; Chapter 13, pp 633–658.
- (26) Sharma, S.; Singh, J.; Ojha, R.; Singh, H.; Kaur, M.; Bedi, P. M. S.; Nepali, K. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *112*, 298.
- (27) Gucký, T.; Jorda, R.; Zatloukal, M.; Krystof, V.; Rarová, L.; Řezníčková, E.; Mikulits, W.; Strnad, M. International Patent WO2014121764 A3, 2014.
- (28) Dwyer, M. P.; Guzi, T. J.; Paruch, K.; Doll, R. J.; Keertikar, K. M.; Girijavallabhan, V. M. European Patent EP1539756 B1, 2007.
- (29) Roy, J.; Nguyen, T. X.; Kanduluru, A. K.; Venkatesh, C.; Lv, W.; Reddy, P. V. N.; Low, P. S.; Cushman, M. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 3094–3103.
- (30) Králová, P.; Fülöpová, V.; Maloň, M.; Volná, T.; Popa, I.; Soral, M. *ACS Comb. Sci.* **2017**, *19*, 173–180.

# SUPPORTING INFORMATION

## A Stepwise Approach for the Synthesis of Folic Acid Conjugates with Protein Kinases Inhibitors

Soňa Krajčovičová,<sup>a</sup> Tomáš Gucký,<sup>b</sup> Denisa Hendrychová,<sup>c</sup> Vladimír Kryštof<sup>c</sup> and Miroslav Soural<sup>d\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Organic Chemistry, Faculty of Science, Palacký University, Tr. 17. listopadu 12, 771 46 Olomouc, Czech Republic

<sup>b</sup> Department of Chemical Biology and Genetics, Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Palacký University and Institute of Experimental Botany AS CR, Šlechtitelů 27, 78371 Olomouc, Czech Republic

<sup>c</sup> Laboratory of Growth Regulators, Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Palacký University and Institute of Experimental Botany AS CR, Šlechtitelů 27, 78371 Olomouc, Czech Republic

<sup>d</sup> Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University, Hněvotínská 5, 779 00, Olomouc, Czech Republic

\*Corresponding author

E-mail: [miroslav.soural@upol.cz](mailto:miroslav.soural@upol.cz)

### Table of content

NMR spectra of compound 7.....	S2
NMR spectra of compound 10.....	S3
NMR spectra of compound 11.....	S4
NMR spectra of compound 12.....	S5
NMR spectra of compound 17a.....	S6
NMR spectra of compound 17b.....	S7
NMR spectra of compound 17c.....	S8
NMR spectra of compound 17d.....	S9
NMR spectra of compound 17e.....	S10
NMR spectra of compound 17f.....	S11
NMR spectra of compound 17g.....	S12
Folate uptake assay procedure.....	S13
Cell line sensitivity.....	S14

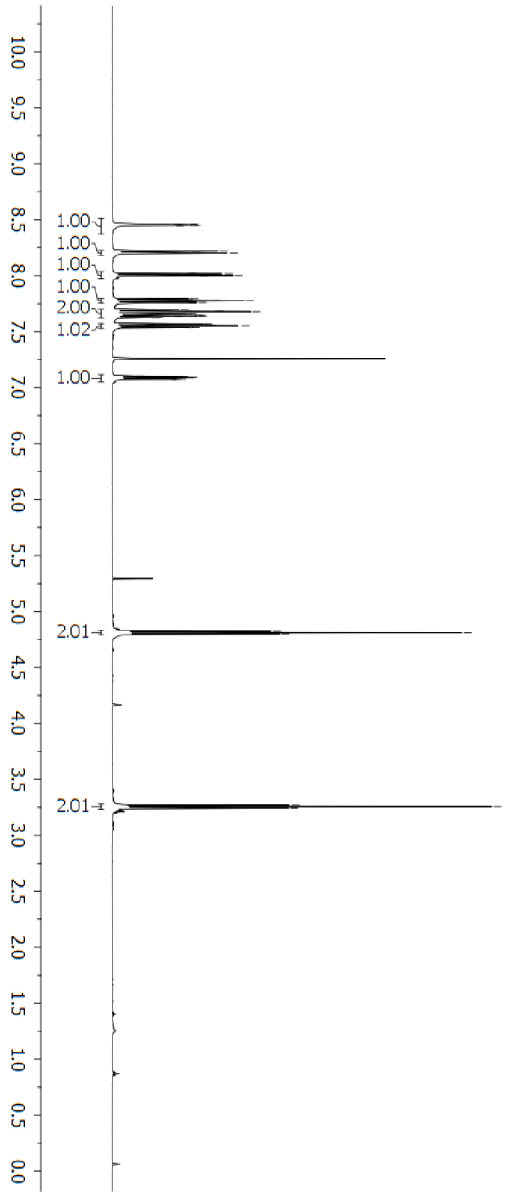
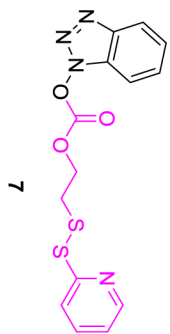
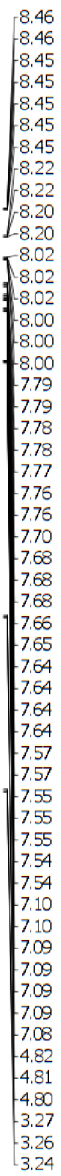


Figure S1: <sup>1</sup>H spectrum of compound 7 in CDCl<sub>3</sub>.

- 159.01
- 149.96
- 147.15
- 137.34
- 133.44
- 133.00
- 126.57
- 121.30
- 120.44
- 115.94
- 115.28
- 66.40
- 36.75

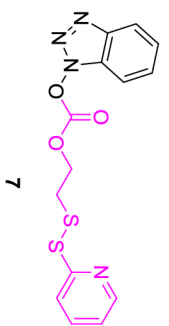


Figure S2: <sup>13</sup>C spectrum of compound 7 in CDCl<sub>3</sub>.

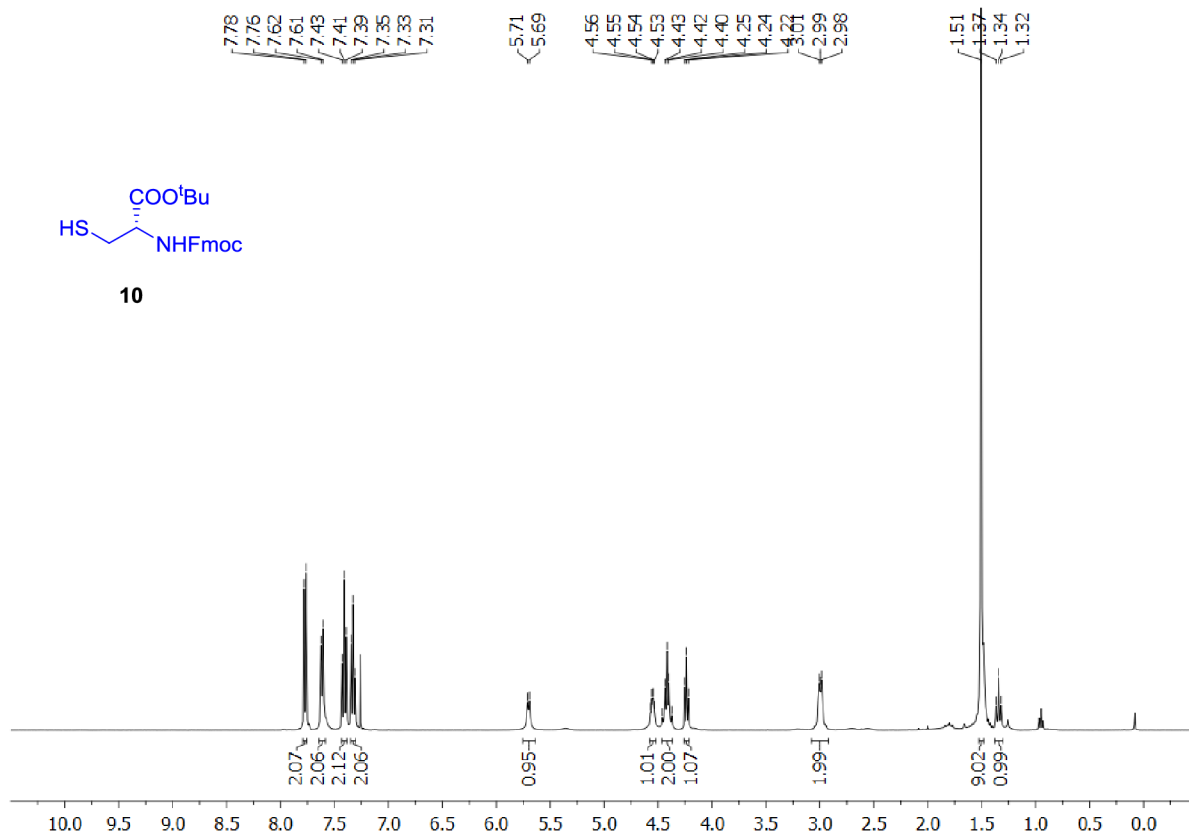


Figure S3:  $^1\text{H}$  spectrum of compound **10** in  $\text{CDCl}_3$ .

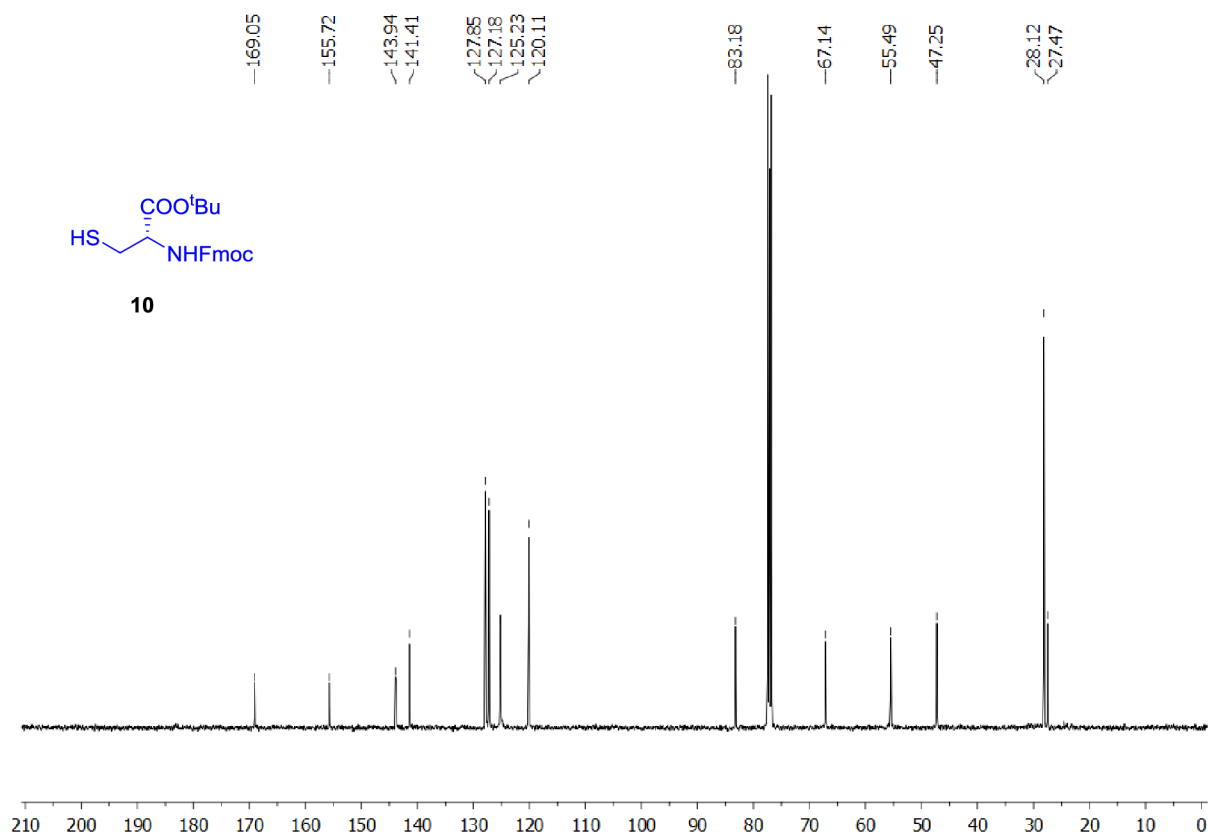


Figure S4:  $^{13}\text{C}$  spectrum of compound **10** in  $\text{CDCl}_3$ .

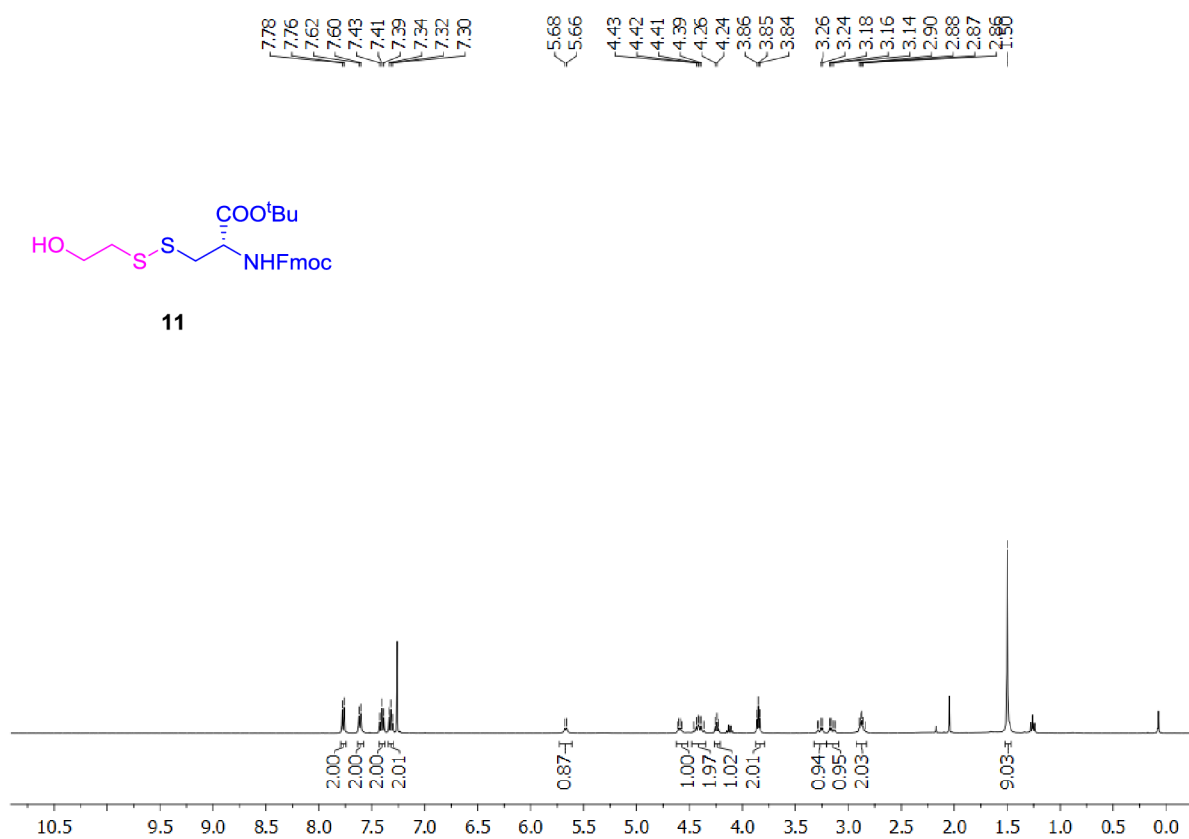


Figure S5:  $^1\text{H}$  spectrum of compound **11** in  $\text{CDCl}_3$ .

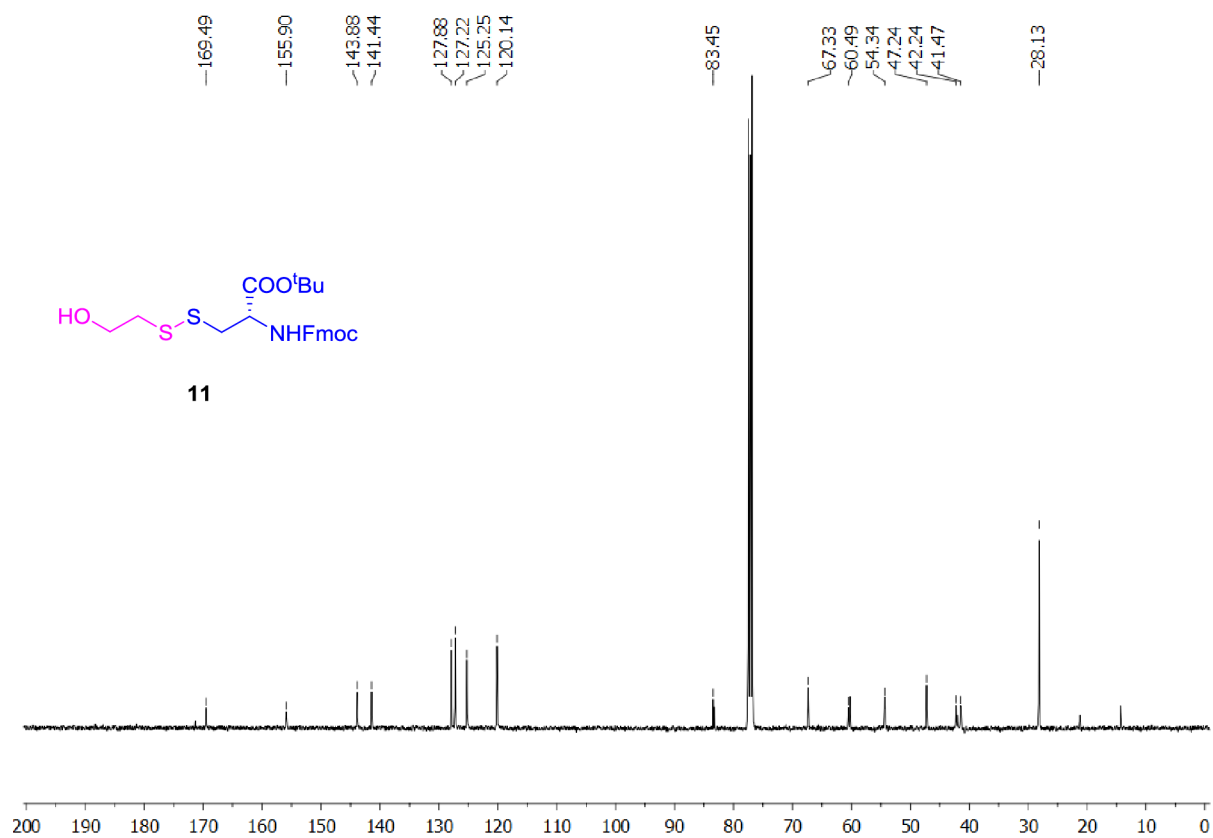


Figure S6:  $^{13}\text{C}$  spectrum of compound **11** in  $\text{CDCl}_3$ .



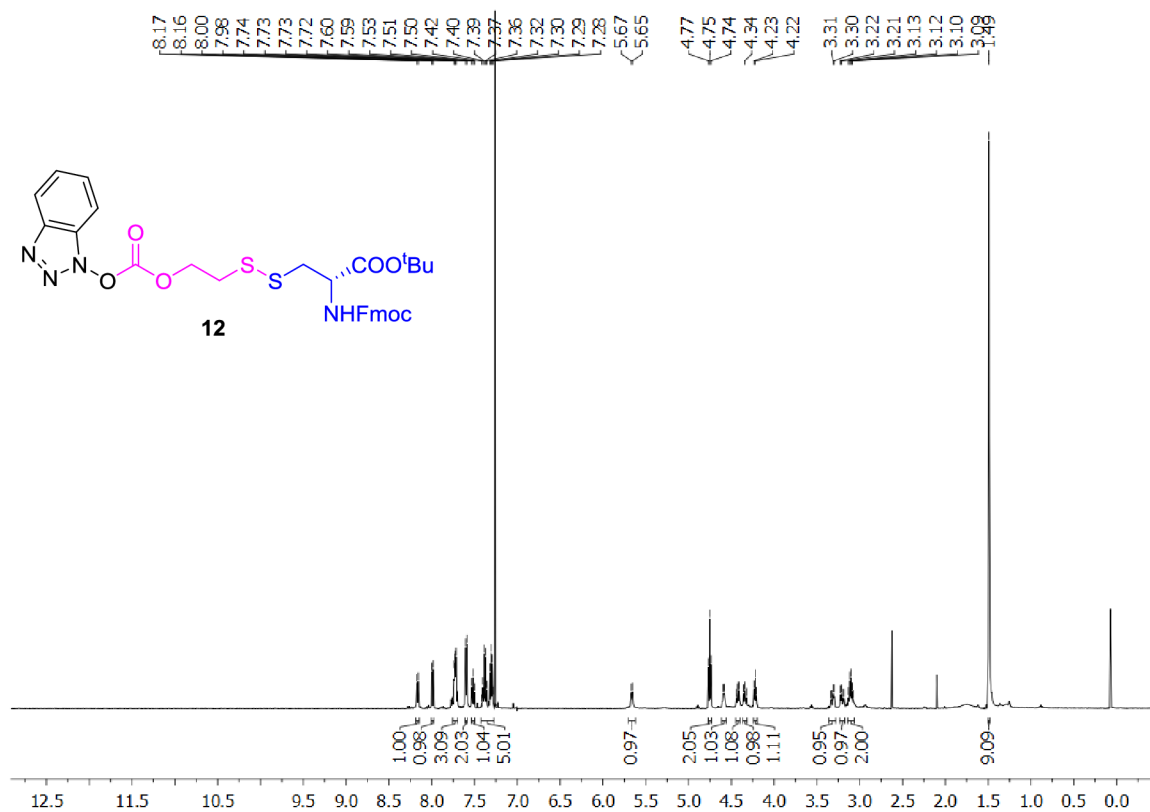


Figure S7:  $^1\text{H}$  spectrum of compound **12** in  $\text{CDCl}_3$ .

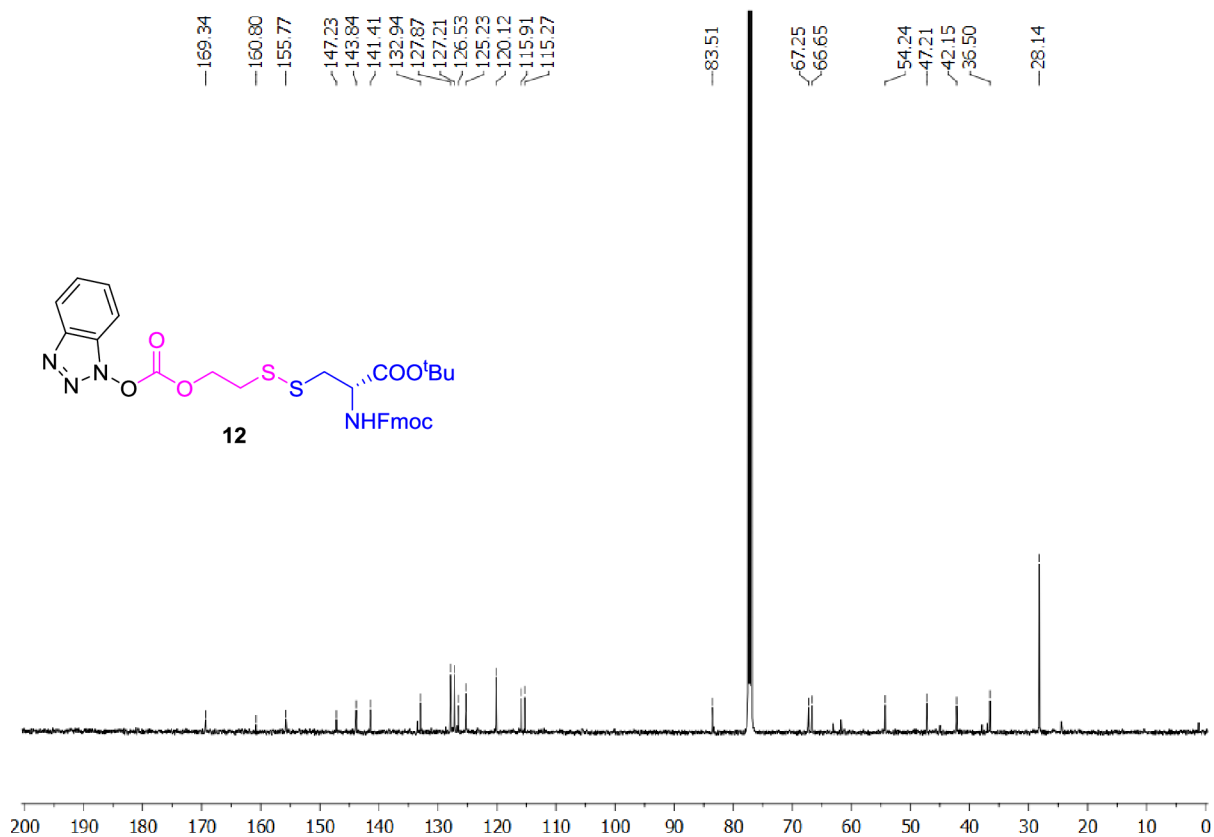


Figure S8:  $^{13}\text{C}$  spectrum of compound **12** in  $\text{CDCl}_3$ .

8.63  
8.63  
8.26  
8.24  
7.89  
7.85  
7.83  
7.66  
7.65  
7.63  
7.61  
7.29  
7.28  
6.95  
6.88  
6.86  
6.65  
6.64  
6.63  
6.62  
4.55  
4.51  
4.48  
4.47  
4.26  
4.24  
4.23  
4.16  
4.15  
4.14  
3.84  
3.75  
3.74  
3.73  
3.05  
3.04  
3.03  
2.98  
2.97  
2.96  
2.94  
2.73  
2.64  
2.64  
2.63  
2.63  
2.61  
2.54  
2.54  
1.99  
1.83  
1.48  
1.47  
1.30

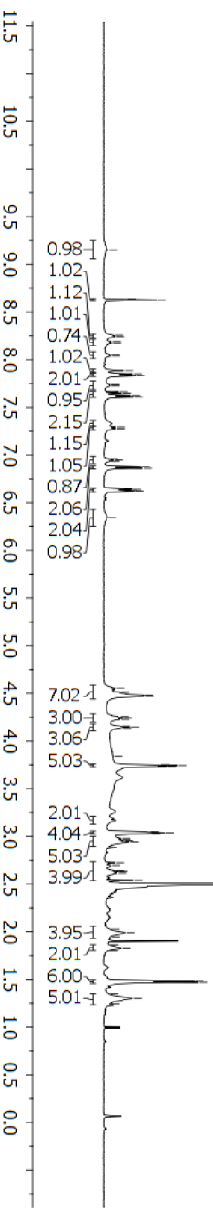
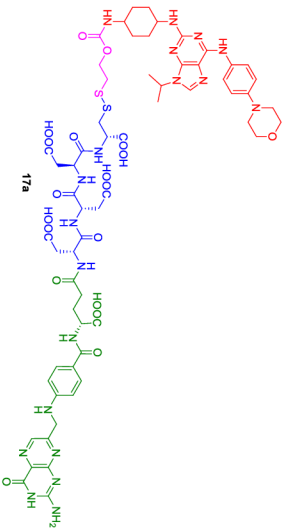


Figure S9: <sup>1</sup>H spectrum of compound **17a** in DMSO-d<sub>6</sub>.

174.08  
172.35  
172.09  
170.57  
170.11  
167.48  
161.98  
158.19  
155.23  
154.42  
150.68  
148.63  
148.49  
146.31  
139.51  
133.00  
131.16  
128.82  
127.81  
121.58  
115.42  
111.35  
66.21  
61.73  
56.84  
53.45  
52.59  
50.31  
49.96  
49.41  
49.32  
47.99  
43.63  
36.72  
31.64  
31.26  
26.88

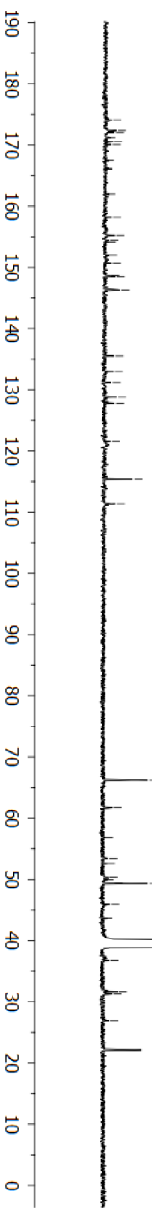
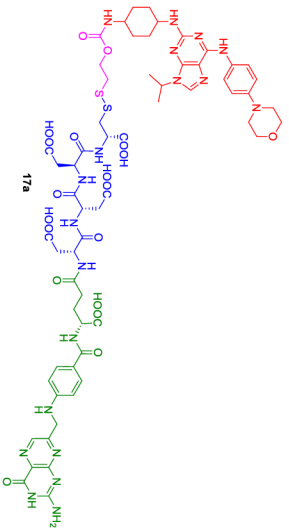
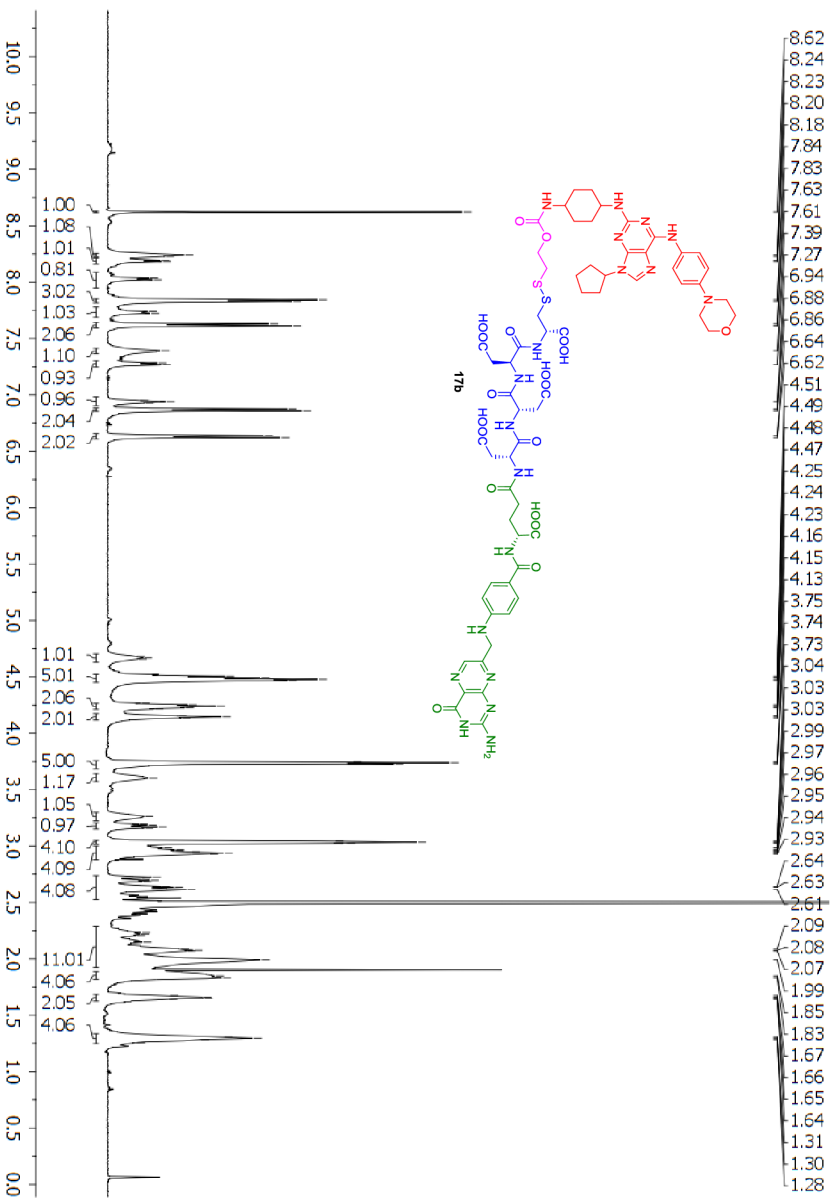
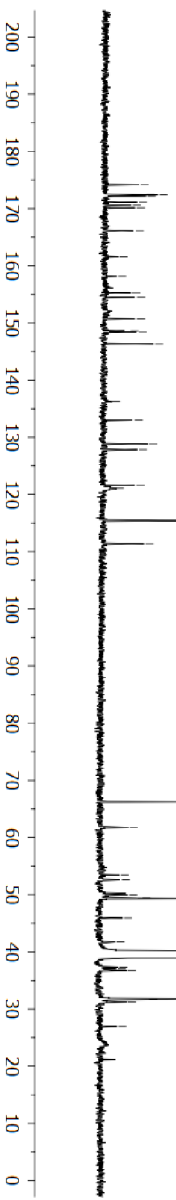
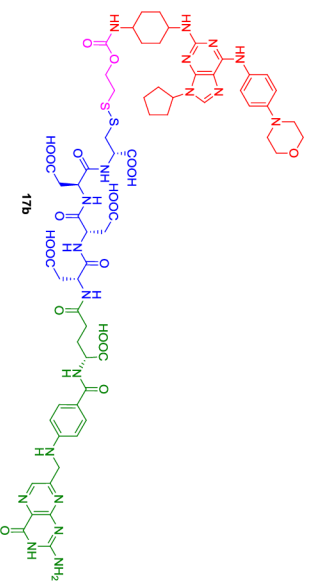


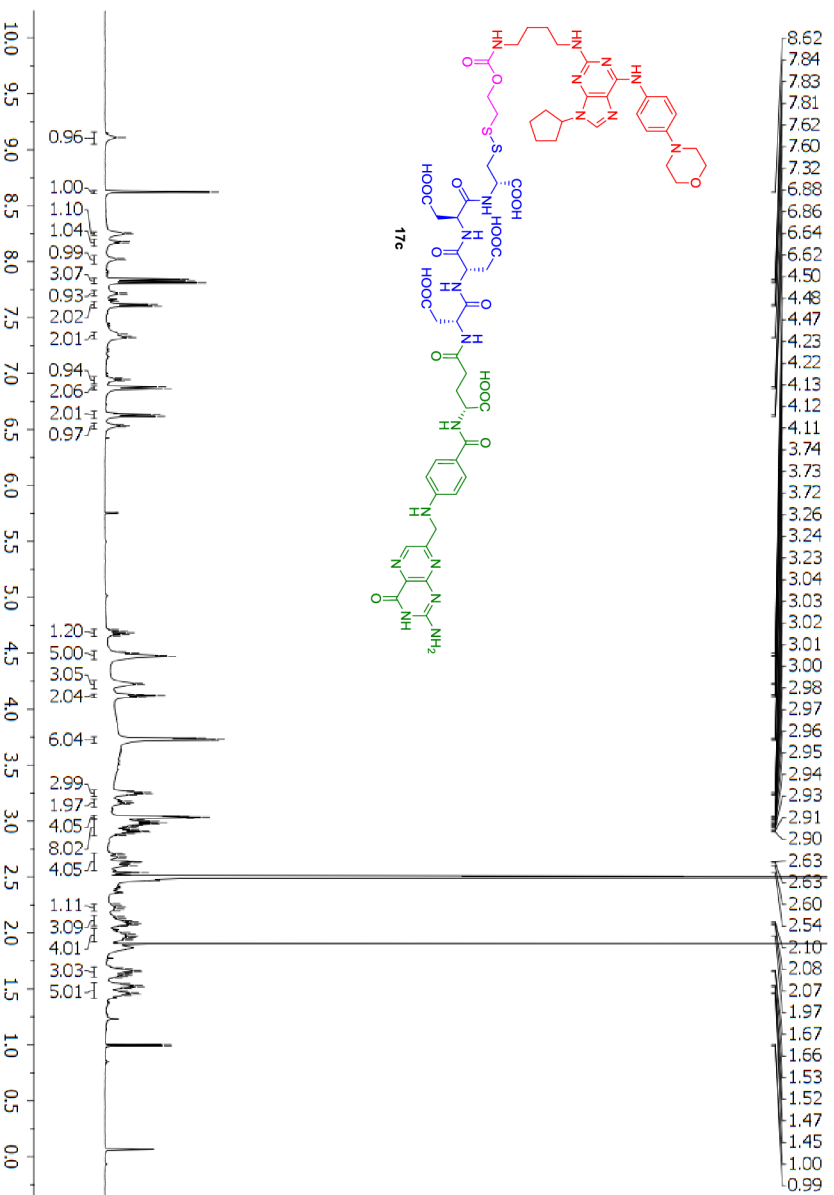
Figure S10: <sup>13</sup>C spectrum of compound **17a** in DMSO-d<sub>6</sub>.



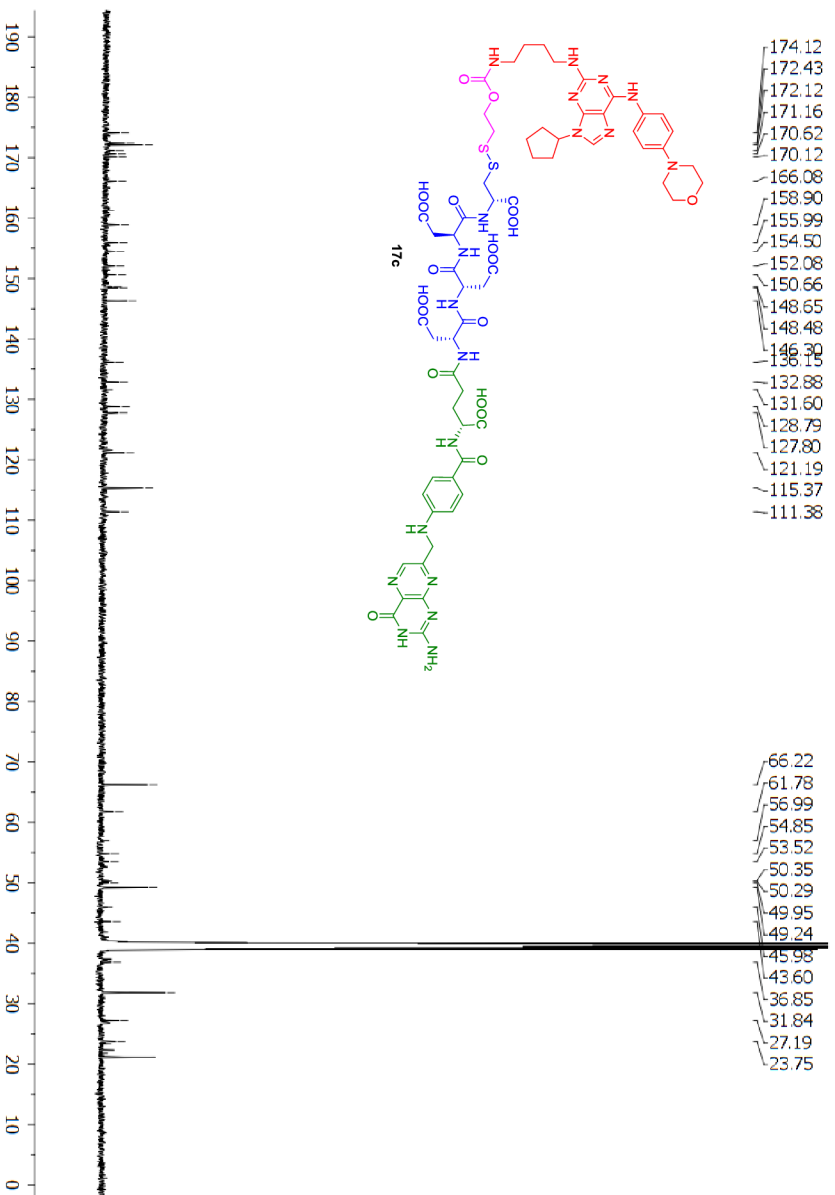
174.17  
172.46  
172.42  
172.36  
172.15  
171.13  
170.61  
170.14  
166.11  
161.56  
158.17  
155.25  
154.51  
150.70  
148.61  
148.44  
146.33  
136.27  
132.98  
128.84  
127.84  
121.60  
121.10  
115.43  
111.37



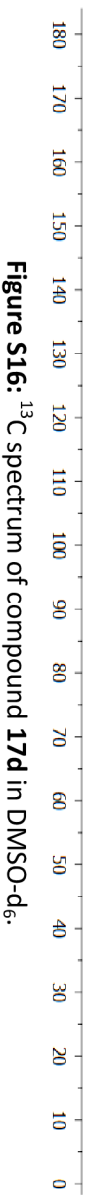
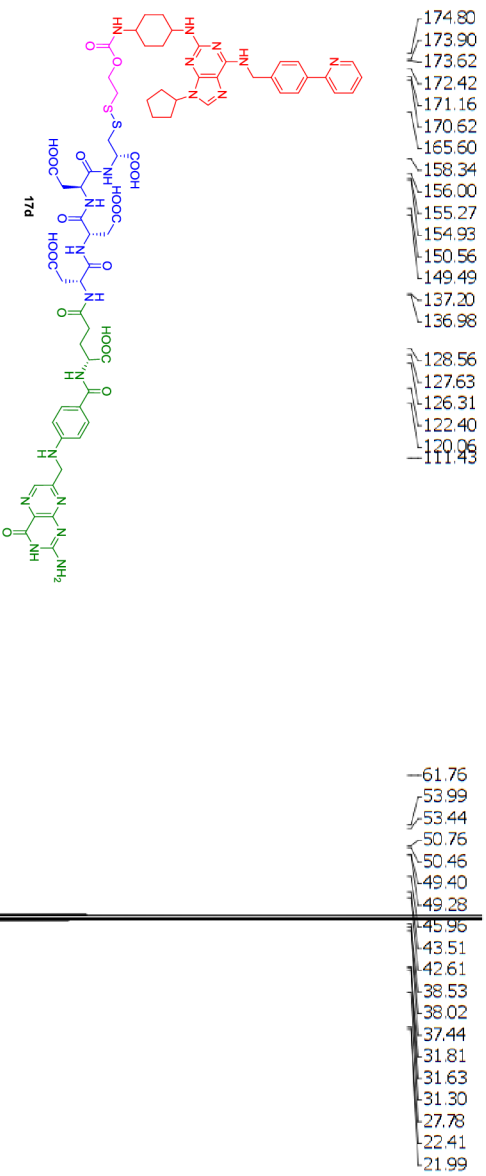
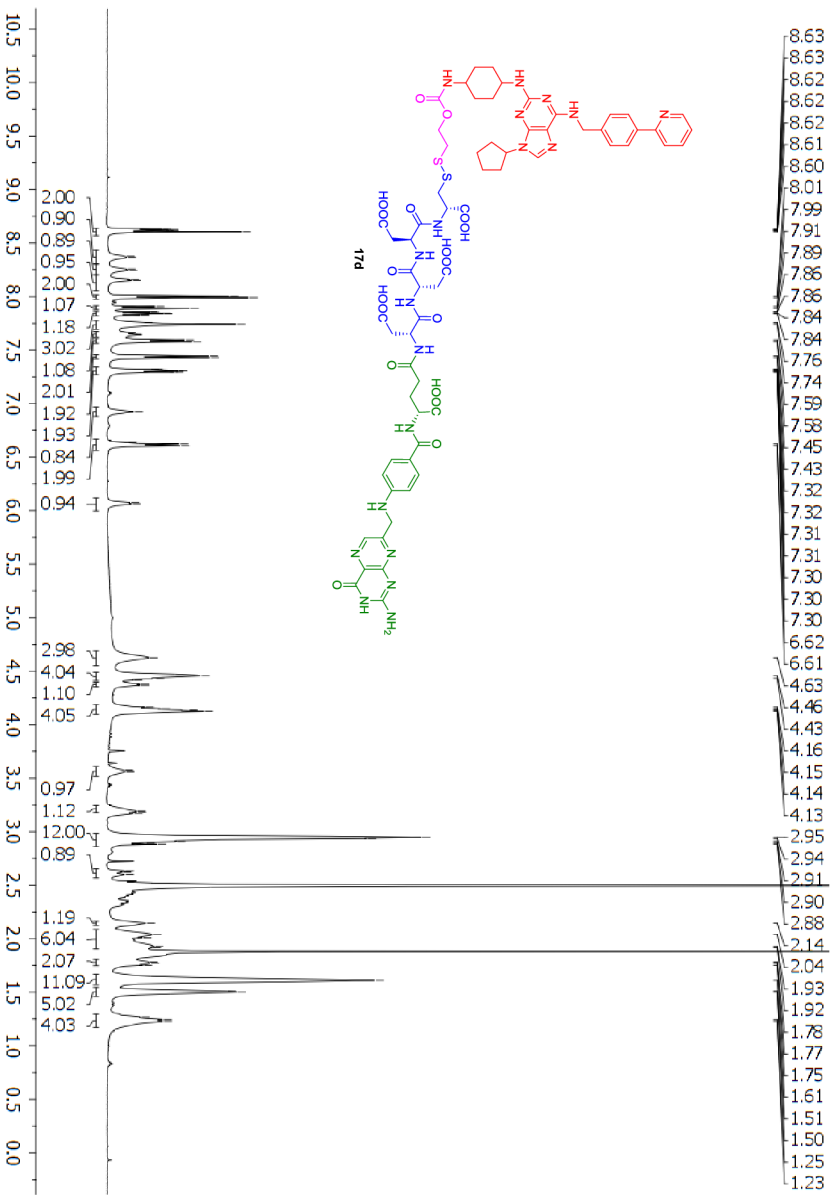
**Figure S12:**  $^{13}\text{C}$  spectrum of compound **17b** in  $\text{DMSO-d}_6$ .



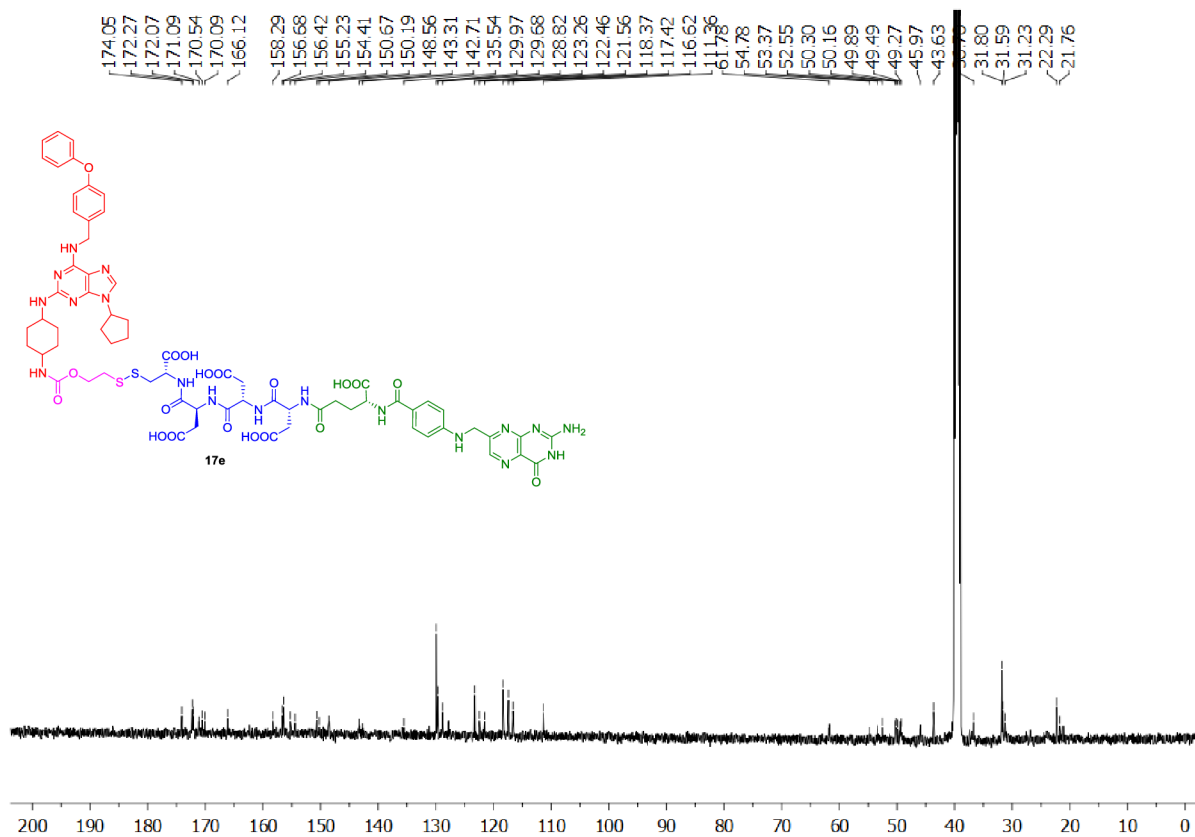
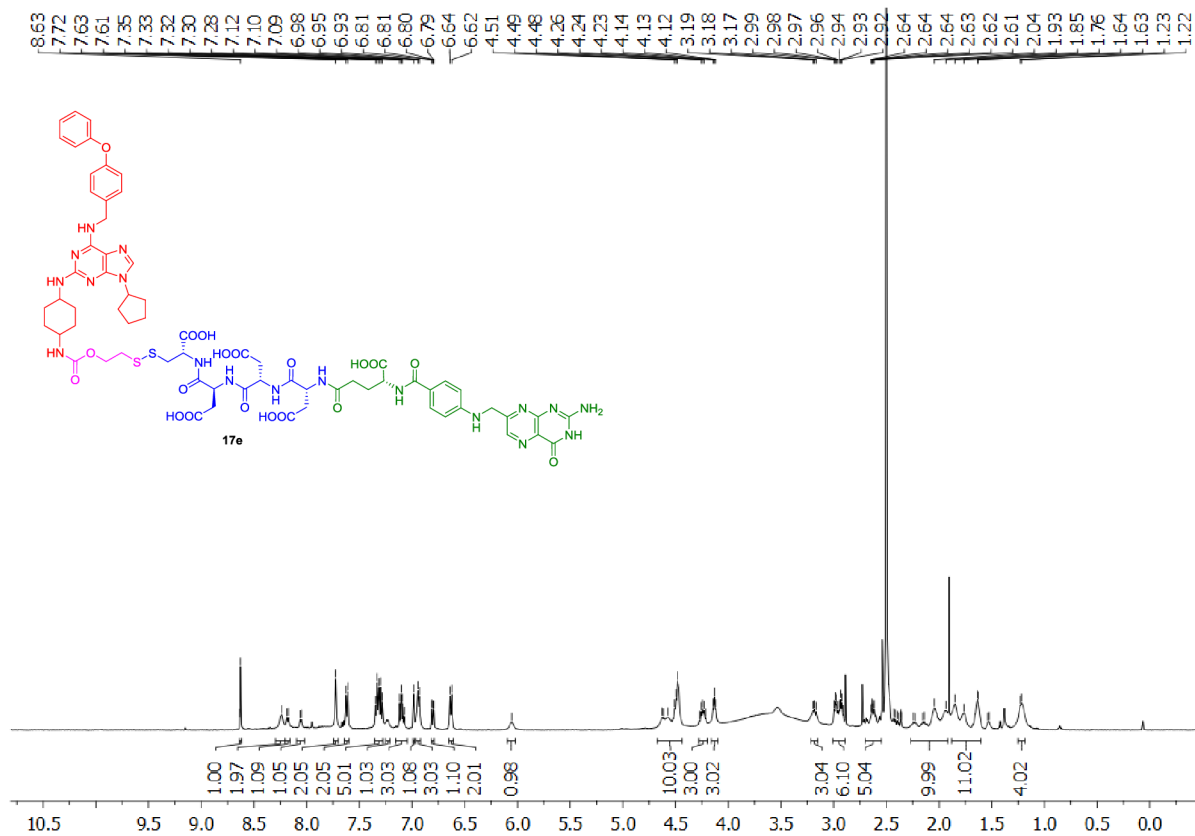
**Figure S13:** <sup>1</sup>H NMR spectrum of compound **17c** in DMSO-d<sub>6</sub>.



**Figure S14:** <sup>13</sup>C NMR spectrum of compound **17c** in DMSO-d<sub>6</sub>.



**Figure S16:** <sup>13</sup>C spectrum of compound **17d** in DMSO-d<sub>6</sub>.





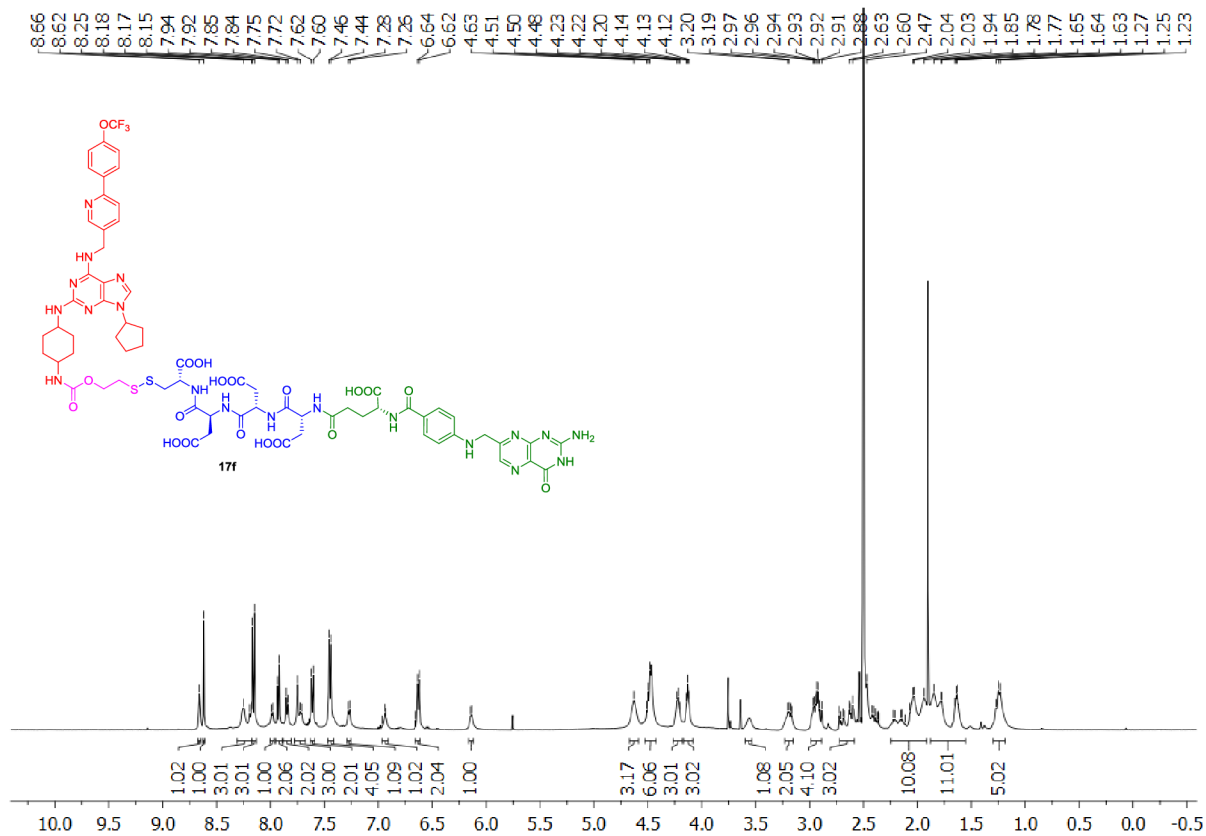


Figure S19:  $^1\text{H}$  spectrum of compound 17f in DMSO- $d_6$ .

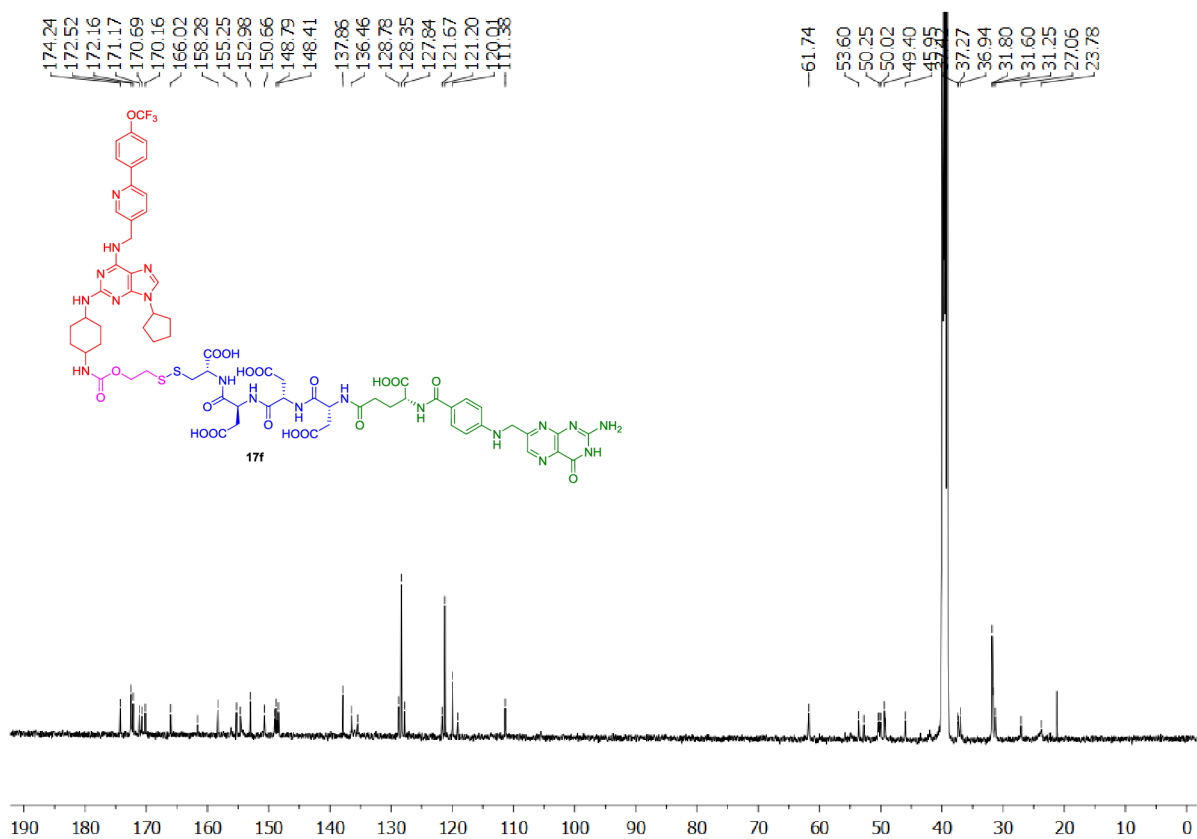


Figure S20:  $^{13}\text{C}$  spectrum of compound 17f in DMSO- $d_6$ .



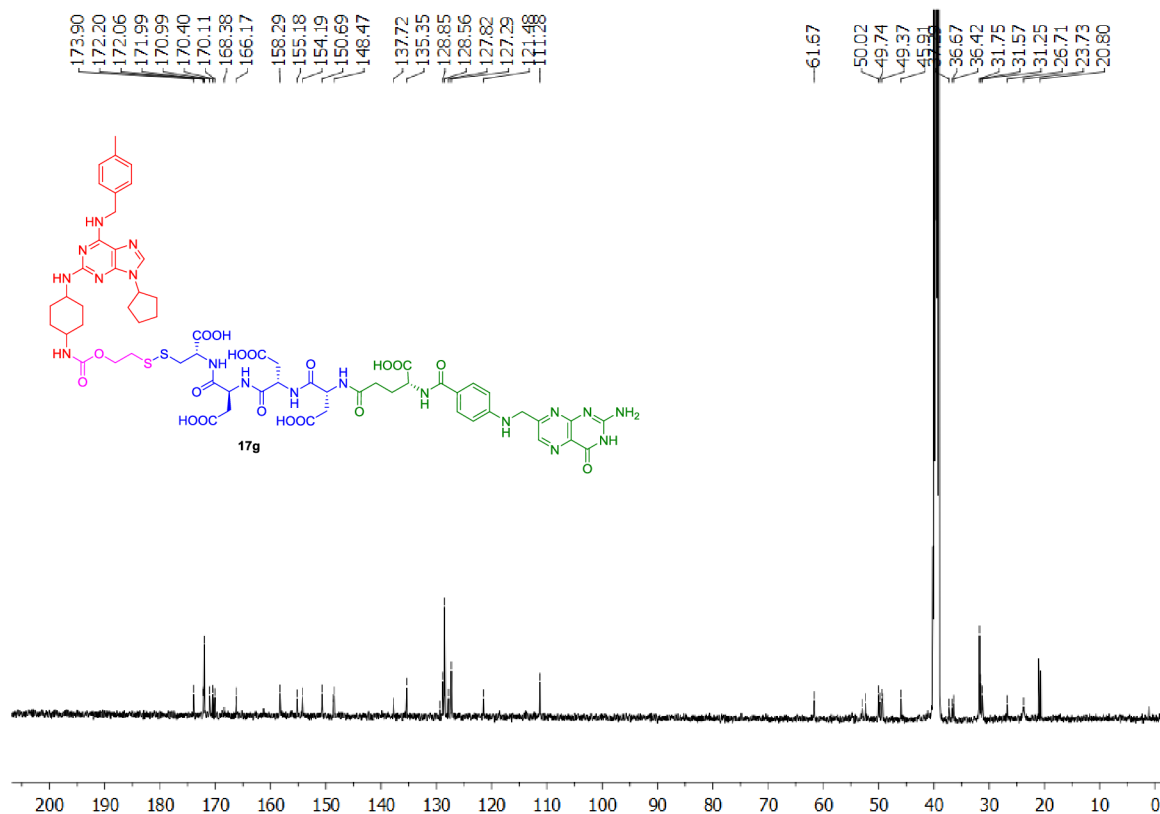


Figure S23:  $^{13}\text{C}$  spectrum of compound **17g** in  $\text{DMSO-d}_6$ .

### ***In vitro* selectivity to folate receptor (Folate uptake assay)**

HeLa cell line derived from human cervix epitheloid carcinoma expressing folate receptor was purchased from ATCC and maintained in DMEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum, penicillin (100 U/ml) and streptomycin (100  $\mu\text{g/ml}$ ) under standard cell culture conditions at 37 °C in 5%  $\text{CO}_2$ .

Before the incubations, HeLa cells were rinsed three times in PBS and then cultured in folate-free DMEM medium supplemented with 10% dialyzed FBS. After 24h incubation, medium was removed and cells were stained with 1  $\mu\text{M}$  folate receptor targeted fluorescence probe FolateRSense 680 (Perkin Elmer) diluted in folate-free DMEM medium in the absence or presence of increasing concentrations of conjugate, unconjugated inhibitor or free folic acid as a positive control. After 1 h staining at 37 °C, cells were rinsed four times to remove surface bound folate, resuspended in PBS and immediately analyzed via flow cytometry (BD FACS Verse) in APC-Cy7 channel.

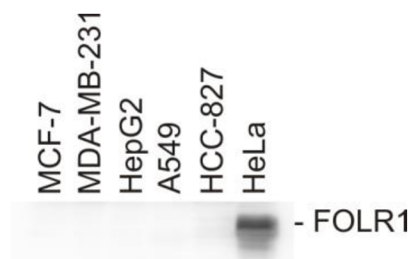
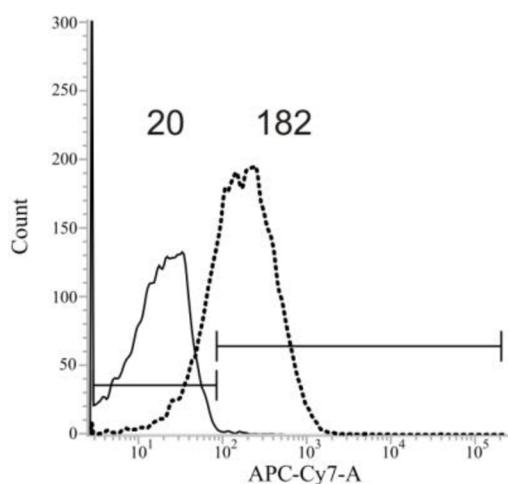


Figure S24. Expression of FOLR1 in different cancer cell lines analyzed by immunoblotting.



**Figure S25.** FolateRSense 680 probe uptake by HeLa cell line. Autofluorescence of unstained cells (solid line) vs. cells stained with 1  $\mu$ M probe (dot line). Numbers refer to mean fluorescence intensity of cells.

### **Cell line sensitivity**

The cytotoxicity of compound **17d** against cell lines HeLa, MCF7 and K562 was determined using MTT assay. Briefly, cells were treated in triplicate with various doses of the compound for 72 h. Then MTT stock solution (5 mg/ml) was added into each well and incubated for 4 h. After this incubation period, produced formazan was dissolved by DMSO and final absorbance was measured at 570 nm with Synergy H4 Hybrid Multi-Mode Microplate Reader. The IC<sub>50</sub> value, the drug concentration lethal to 50% of the cells, was calculated from the dose response curves that resulted from the assays.

**Table S1.** In vitro cytotoxicity of conjugate **17d**.

Cell line	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)
HeLa	2.3
MCF7	>100
K562	>100

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů



**Autoreferát k disertační práci**

**Biochemická a buněčná selektivita inhibitorů  
cyklin-dependentních kinas**

**Mgr. Denisa Hendrychová**

P1527 Biologie

1501V019 Experimentální biologie

Olomouc 2021

Tato disertační práce byla vypracována v rámci prezenčního studia doktorského studijního programu Experimentální biologie 1501V019 na Přírodovědecké fakultě Univerzity Palackého v Olomouci v letech 2016 – 2021. Školícím pracovištěm byla Laboratoř růstových regulátorů, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci & Ústav experimentální botaniky AVČR.

**Uchazeč:** **Mgr. Denisa Hendrychová**

**Školitel:** **doc. RNDr. Vladimír Kryštof, Ph.D.**

Katedra experimentální biologie

Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci

**Konzultant:** **Mgr. Radek Jorda, Ph.D.**

Katedra experimentální biologie

Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci

**Oponenti:** **doc. PharmDr. Martina Čečková, Ph.D.**

Katedra farmakologie a toxikologie

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova

Akademika Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové

**prof. PharmDr. Petr Babula, Ph.D.**

Fyziologický ústav

Masarykova univerzita

Kamenice 753/5, 625 00 Brno

Stanovisko k disertační práci vypracovala Laboratoř růstových regulátorů, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci.

Obhajoba se koná dne 3.9. 2021 před komisí pro obhajoby disertačních prací v programu Experimentální biologie v místnosti ....., Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci-Holici, Šlechtitelů 27.

S vlastní disertací je možno se seznámit 14 dní před obhajobou v knihovně biologických kateder Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci-Holici.

**Prof. Ing. Miroslav Strnad, CSc. DCs.**

Předseda komise pro obhajoby disertačních

prací ve studijním programu EXBIO,

Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci



## Souhrn

V průběhu posledních 30 let bylo objeveno velké množství inhibitorů cyklin-dependentních kinas (CDK), z nichž několik bylo schváleno pro léčbu rakoviny a více než 100 látek je komerčně dostupných jako chemické nástroje pro buněčnou biologii. Nicméně míra, do jaké jsou vlastnosti těchto látek studovány s ohledem na jejich účinnost, selektivitu vůči jednotlivým CDK a buněčné efekty, se významně liší. Inhibitory bývají obvykle označovány jako vysoce selektivní a účinné, nicméně v mnohých případech nebyly dostatečně nebo správně charakterizovány. Znalost biochemické selektivity je přitom nezbytná pro adekvátní interpretaci následků jejich působení a nežádoucích účinků a také pro jejich správné použití v biologických studiích. Nežádoucí účinky však mohou souviset i s jejich nízkou buněčnou selektivitou, kdy tyto látky inhibují kinasy nebo procesy, které podporují nádorové bujení, ale mohou mít esenciální funkci také v nenádorových buňkách. Tato disertační práce je zaměřena na charakterizaci vybraných komerčně dostupných inhibitorů CDK (CDKi), které byly publikovány jako selektivní vůči CDK regulujícím buněčný cyklus. Na základě několika typů experimentů byla hodnocena jejich selektivita vůči CDK1/2/4/5/7/9 a jejich efekty na buněčný cyklus, které byly porovnávány s publikovanými daty. Výsledky poukazují, že většina původně selektivních CDKi by měla být klasifikována jako panselektivní a neměla by být využívána jako selektivních chemických sond. V druhé části práce byl navržen koncept cíleného transportu CDKi konjugovaných s folátem prostřednictvím folátového receptoru exprimovaného nádorovými buňkami. Cytometrickou analýzou byl potvrzen specifický transport konjugátů do nádorových buněk za současného zachování CDK inhibičních vlastností. Cílené doručení inhibitorů tak představuje možný způsob vedoucí k vyšší buněčné selektivě léčiv.

## OBSAH

1	Úvod do řešené problematiky a cíle práce .....	6
2	Metodika.....	8
2.1	Buněčné kultury.....	8
2.2	Analýza cytotoxicity.....	8
2.3	Kinasový inhibiční test .....	8
2.4	Analýza buněčného cyklu.....	9
2.5	SDS-PAGE a imunodetekce .....	9
2.6	Analýza teplotní denaturace .....	10
2.7	Analýza kompetice na folátovém receptoru .....	11
3	Komentované výsledky a diskuse .....	12
3.1	Biochemická selektivita komerčně dostupných CDKi.....	12
3.2	Buněčná selektivita konjugátů 2,6,9-trisubstituovaných purinů .....	14
4	Závěr.....	16
5	Seznam použité literatury .....	17
6	Přehled publikační činnosti .....	22
7	Summary .....	24

## 1 Úvod do řešené problematiky a cíle práce

Cyklin-dependentní kinasy (CDK) představují skupinu serin/threoninových proteinkinás, které se podílí na regulaci buněčného cyklu a transkripce, nicméně jsou zapojeny v mnohem širším spektru buněčných procesů jako je např. apoptóza, oprava DNA, metabolismus, diferenciacce, spermatogeneze nebo angiogeneze (Malumbres *et al.*, 2005; Lim *et al.*, 2013; Malumbres, 2014; Palmer *et al.*, 2020). Jakožto klíčové regulátory řady biologických procesů se staly atraktivním cílem pro vývoj nízkomolekulárních inhibitorů (CDKi) jako protinádorových léčiv a více než 100 těchto látek je komerčně dostupných jako chemické nástroje pro buněčnou biologii. Většina z nich reversibilně interaguje s ATP-vazebným místem kinas (Sánchez-Martínez *et al.*, 2019).

Vysoký stupeň strukturní podobnosti ATP-vazebného místa však poskytuje pouze omezené možnosti selektivně modulovat jednotlivé kinasy a dostupné inhibitory tak často interagují s více než jedním proteinem. I když je tato skutečnost všeobecně známa, míra, do jaké jsou informace o biochemické selektivitě, ale i o účinnosti a buněčných efektech studovány, se u jednotlivých látek výrazně liší (Klaeger *et al.*, 2017). Ukazuje se, že základním mechanismem účinku řady kinasových inhibitorů není inhibice původně předpokládaného primárního cíle, ale inhibice vedlejších cílů, tzv. *off-targets* (Lin *et al.*, 2019), které přispívají k cytotoxickým účinkům látky a kterými mohou být i jiné nekinasové proteiny (Munoz, 2017). Odborná veřejnost se totiž stále potýká s nedostatečnou charakterizací zejména biochemické selektivity nejen vůči jednotlivým CDK, ale i dalším cílům. Základní problém spočívá v tom, že v prvotních fázích vývoje jsou inhibitory obvykle popsány a komerčně prodávány jako vysoce potentní a selektivní vůči danému cíli, nicméně v mnohých případech nebyly dostatečně nebo správně charakterizovány. Výsledkem je, že informace o jejich selektivitě jsou často neúplné a mnohdy je komplikované je najít, protože společně s dalšími látkami jsou součástí rozsáhlejších studií, které byly provedeny až výrazně později (Klaeger *et al.*, 2017; Munoz, 2017; Wells *et al.*, 2020).

Znalost biochemické selektivity je přitom nezbytná pro adekvátní interpretaci následků jejich působení, případné toxicity a nežádoucích účinků, za které je často odpovědná právě inhibice vedlejších cílů. Informace o biochemické selektivitě umožňují také odhalit biomarkery pro selekci vhodných pacientů a predikovat terapeutickou odpověď. Kromě toho jsou důležité také pro správné použití inhibitorů v základním výzkumu, ve kterém jsou často využívány pro cílenou inhibici

za účelem pochopení základních buněčných pochodů a funkcí kinas. Nedostatečně nebo chybně stanovená selektivita inhibitorů vede k zavádějícím výsledkům a komplikuje tyto studie, které jsou zásadní pro vědu a výzkum, a proto by měl být na jejich charakterizaci kladen větší důraz (Munoz, 2017; Lin *et al.*, 2019).

Ačkoliv se může zdát, že promiskuita inhibitorů je spíše negativním faktorem, který je nutné prostudovat z důvodu vysvětlení nežádoucích účinků, tak její existence může mít i výhodné důsledky. Poskytuje totiž příležitost pro tzv. *repurposing*, kdy jsou již existující látky využity k jiným účelům jako vysoce účinné inhibitory původně neodhalených cílů. Takové látky pak mohou být použity pro léčbu odlišných indikací, než bylo původně zamýšleno.

Nežádoucí vedlejší účinky a systémová toxicita však mohou být způsobeny také nízkou buněčnou selektivitou inhibitorů při jejich tkáňové a buněčné distribuci. Většina těchto látek cílí na kinasy či procesy, které podporují nádorové bujení a jejichž regulace je u nádorových buněk narušena. Tyto kinasy ale mohou mít esenciální funkci také v jiných nepatologických procesech normálních nenádorových buněk (Van Beuge *et al.*, 2012; Ferguson *et Gray*, 2018). Nízká buněčná selektivita vede k akumulaci látky i v jiných orgánech, což může způsobovat systémovou toxicitu, která významně omezuje dávkování léčiva a mnohdy bývá příčinou vyřazení z klinického použití. Zvýšení hladiny inhibitorů v cílových buňkách nebo tkáních prostřednictvím selektivního transportu může představovat účinný způsob pro zlepšení efektivity léčby proteinkinasovými inhibitory (Force *et al.*, 2007; Hartmann *et al.*, 2009; Ferguson *et Gray*, 2018).

Cílem této disertační práce bylo poukázat na důležitost studia biochemické selektivity proteinkinasových inhibitorů a ověřit potenciál selektivního transportu prostřednictvím folátového receptoru, který by mohl vést ke zvýšení buněčné selektivity protinádorových léčiv.

## **2 Metodika**

### **2.1 Buněčné kultury**

Lidské nádorové buněčné linie HCT116 wt, HeLa, MCF7, A549, MDA-MB-231 a Hep-G2 byly získány z The European Collection of Authenticated Cell Cultures. Buněčná linie HCC-827 byla koupena z DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures. Linie HCT116 CDK2<sup>-/-</sup> byla získána od dr. Daniela Fishera (CNRS, Montpellier, Francie) a všechny použité linie myších embryonálních fibroblastů MEFs byly získány od dr. Mariana Barbacida (CNIO, Madrid, Španělsko).

Všechny linie byly kultivovány při 37 °C a v atmosféře 5% CO<sub>2</sub>. Pro linie HCT116 wt, HeLa, MCF7, A549, MDA-MB-231 bylo použito kultivační médium DMEM. Toto médium bylo pro linii HCT116 CDK2<sup>-/-</sup> a myší embryonální fibroblasty MEFs obohaceno navíc o glukosu (4,5 g/l). Buněčná linie Hep-G2 byla kultivována v médium EMEM a linie HCC-827 v RPMI. Použitá média byla vždy doplněna 10 - 20% fetálním bovinním sérem, streptomycinem (100 µg/ml), penicilinem (100 U/ml) a L-glutaminem (2 mM).

### **2.2 Analýza cytotoxicity**

Buněčné linie byly vysazeny do 96-jamkové mikrotitrační destičky a druhý den byly ovlivněny testovanými látkami v příslušných koncentracích v triplicátu po dobu 72 hodin. Následně byl přidán roztok MTT (výsledná koncentrace 1 mg/ml) po dobu 4 hod. Vzniklý formazán byl rozpuštěn v DMSO a byla stanovena absorbance při 570 nm spektrofotometrem Infinite M200 PRO (Tecan). V případě metody Calcein AM byl po 72 hodinové inkubaci s testovanými látkami přidán roztok Calceinu AM (výsledná koncentrace 1 µg/ml) a po 1 hod byla změřena fluorescence při 485/538 nm na fluorimetru Fluoroskan Ascent (Labsystems). Všechna měření byla provedena v alespoň 3 technických replikátech.

### **2.3 Kinasový inhibiční test**

Kinasová reakce byla provedena standardizovaným kinasovým inhibičním testem s rekombinantními CDK1/B1, CDK2/E1 (exprimovaných v hmyzích buňkách Sf9), CDK2/A2 (exprimovaných v *E. coli*), CDK4/D1, CDK5/p25, CDK7/H/MAT1, CDK9/T1 (Proqinase) a aurora A, B (Sigma). Jako substrát byl použit histon H1 (CDK1/2/5), RPPTLSPIPHIPR peptid (CDK4), (YSPTSPS)<sub>2</sub>KK peptid (CDK7), nebo MBP (Aurora A/B). Reakce probíhala

v přítomnosti ATP, 0,05  $\mu\text{Ci}$  [ $\gamma$ - $^{33}\text{P}$ ]ATP a testované látky v kinasovém reakčním pufru v celkovém objemu 10  $\mu\text{l}$  (koncentrace DMSO v reakci nepřesáhla 0,2 %) v mikrotitrační destičce s použitím Eppendorf ThermoMixer (350 rpm, 30 °C). Koncentrace ATP v kinasové reakci byla stanovena na základě hodnot  $K_m$  testovaných kinas. Reakce byla vždy zastavena přidávkem 5  $\mu\text{l}$  3% kyseliny fosforečné. Z každé reakční směsi bylo poté nanášeno 5  $\mu\text{l}$  na P-81 fosfocelulosu (Whatman), která byla následně 3x promyta 0,5% kyselinou fosforečnou po dobu 6 min a poté opláchnuta 96% ethanolem a usušena. Fosfoceluloseový papír byl exponován v kazetě s citlivou deskou přes noc a poté byla citlivá deska oskenována skenerem FLA7000 (Fujifilm). Koncentrace testované látky nezbytná pro redukci kinasové aktivity na 50 % ( $\text{IC}_{50}$ ) byla stanovena z křivek závislosti fosforylace na koncentraci testovaných látek s využitím programu Origin verze 6.0. Všechny reakce byly provedeny nejméně ve třech technických replikátech.

#### **2.4 Analýza buněčného cyklu**

Buněčné linie byly vysazeny na Petriho kultivační desky a druhý den byly ovlivněny testovanými látkami. Po 24 hod inkubace byly buňky sklizeny trypsinizací a zafixovány ve vychlazeném 70% ethanolu. Zafixované vzorky byly rehydratovány PBS a následně inkubovány 30 min v 2N HCl s 0,5% Tritonem X-100. Pro neutralizaci byly promyty v 0,1M Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> (pH = 8,5) a poté nabarveny roztokem propidium jodidu (výsledná koncentrace 100  $\mu\text{g/ml}$ ). Po půl hodinové inkubaci byl měřen relativní obsah jaderné DNA pomocí průtokového cytometru BD FACS Verse s BD FACSuite Software verze 1.0.6 (BD Biosciences) s využitím excitačního laseru o vlnové délce 488 nm. Získaná data byla analyzována pomocí softwaru ModFit LT verze 4.1.7 (Verity Software house).

#### **2.5 SDS-PAGE a imunodetekce**

Buňky určené pro imunodetekci proteinů byly po ovlivnění příslušnými látkami sklizeny a následně lyzovány po dobu 20 min v RIPA pufru (20 mM TRIS pH = 7,4; 100 mM NaCl; 2 mM EGTA; 5 mM EDTA; 0,2% Nonidet P-40 pH = 7,4; před použitím přidáno: 1 mM DTT; 1 mM PMSF; 1 mM Na<sub>2</sub>VO<sub>3</sub>; 2 mM NaF; 0,5  $\mu\text{g/ml}$  leupeptin a 2  $\mu\text{g/ml}$  aprotinin). Pomocí ultrazvukového homogenizátoru byly vzorky sonikovány a poté zcentrifugovány. Spektrofotometrickou Bradfordovou metodou byla změřena koncentrace proteinů ve vzorcích. Po vyrovnání koncentrace k nim byl přidán vzorkovací pufr (0,3 M TRIS pH = 6,8; 10% SDS;

50% glycerol; 0,05% bromfenolová modř; 5% 2-merkptoethanol) a následně byly denaturovány při 95 °C po dobu 3 min.

Proteiny byly separovány polyakrylamidovou gelovou elektroforézou za denaturujících podmínek a následně pomocí western blotingu přeneseny na nitrocelulosoovou membránu. Membrány byly blokovány v 3% BSA a následně inkubovány s primárními a sekundárními protilátkami značenými křenovou peroxidázou. Kvantifikace byla provedena s použitím chemiluminiscenčního kitu ECL (Thermo Scientific) za použití CCD kamery LAS4000 (FujiFilm). Specifikace jednotlivých protilátek jsou uvedeny v příslušných publikacích.

## **2.6 Analýza teplotní denaturace**

Tato metoda byla nově používaným přístupem testování, a proto bylo nejprve nutné optimalizovat její podmínky. Buněčná linie byla vysazena na Petriho kultivační misky a druhý den byla ovlivněna testovanými látkami v příslušných koncentracích. Po 3 hodinové inkubaci byly buňky sklizeny, přičemž tato doba je dostačující pro interakci látky s cílovou kinasou, ale zároveň nedochází k ovlivnění buněčné viability oproti kontrolnímu vzorku neovlivněných buněk. Vlastní analýza teplotní denaturace byla provedena dvěma přístupy. V prvním případě byly sklizené buňky nejprve lyzovány RIPA pufrém podle předchozí kapitoly a lyzáty s vyrovnanými hladinami proteinů byly rozděleny po 50 µl do PCR stripů. V druhém případě byla sklizená buněčná suspenze doplněna o inhibitory proteas a poté byla rozdělena po 50 µl do PCR stripů. Takto připravené vzorky byly vystaveny teplotní denaturaci. V obou případech byly vzorky předehřáty po dobu 1 min na 25 °C a poté byla provedena denaturace v požadovaném teplotním gradientu s následným ochlazením po dobu 1 min, a to pomocí termocykléru MJ Mini (BioRad). Rozsah teplotního gradientu byl vždy zvolen na základě předběžných experimentů, při kterých byl stanoven tzv. bod tání ( $T_m$ ), při kterém dochází k denuraci jednotlivých kinas. Takto denaturované vzorky intaktních buněk pak byly lyzovány opakovaným zmražením a zahřátím pomocí tekutého dusíku a termobloku nastaveného na 25 °C. Následně byla v obou případech provedena centrifugace pro odstranění precipitovaných a agregovaných proteinů (případně zbytků buněk) a k supernatantu byl přidán vzorkovací pufr. Teplotní stabilita proteinů byla stanovena imunodetekcí (jejíž postup byl popsán v předchozí kapitole) a porovnáním bodů tání mezi kontrolními a ovlivněnými vzorky. V obou přístupech bylo dosaženo srovnatelných výsledků s tím rozdílem, že proteiny v intaktních buňkách disponují vyšší teplotou bodu tání, a tudíž bylo nutné použít vyšší teploty oproti buněčným



lyzátům. Pro výsledné experimenty byl nakonec zvolen přístup teplotní denaturace buněčných lyzátů vzhledem k tomu, že poskytuje určité technické výhody, kdy lze sklizené buňky zamrazit a pokračovat v experimentu později.

## **2.7 Analýza kompetice na folátovém receptoru**

Buněčné linie byly vysazeny na Petriho kultivační misky a byly inkubovány po dobu 24 hodin. Poté bylo vyměněno kultivačním médiu za médium bez folátů a antibiotik s přidavkem 10% dialyzovaného fetálního séra, aby bylo možné kontrolovat množství folátů při experimentu, a v tomto médiu byly inkubovány dalších 24 hodin. Poté byly buňky kultivovány 1 hod při 37 °C s fluorescenční sondou cílící folátový receptor, FolateRSense 680 (Perkin Elmer), nejprve v přítomnosti, nebo nepřítomnosti samotného folátu jako kompetičního agens. Po inkubaci byly buňky opláchnuty PBS pro odstranění nespecificky navázaných folátů, resuspendovány v PBS a bylo měřeno zastoupení buněk s navázanou fluorescenční sondou pomocí průtokového cytometru BD FACS Verse s BD FACSuite Software verze 1.0.6 (BD Biosciences) s využitím excitačního laseru o vlnové délce 640 nm. Získaná data byla analyzována pomocí softwaru BD FACSuite TM (BD Biosciences). V tomto kroku byla optimalizována koncentrace fluorescenční sondy pro dosažení specifické interakce s FR a koncentrace vlastního folátu pro jejich dostatečnou kompetici. Také byla tímto způsobem ověřována exprese FR ve vybraných buněčných liniích MDA-MB-231, HepG2, A549, HCC-827 a HeLa. Po potvrzení silné exprese FR buněčnou linií HeLa a zoptimalizování metody byla testována také vazba vlastních folátových konjugátů. Buňky HeLa byly vysazeny a kultivovány stejným způsobem a následně inkubovány 1 hod s 1  $\mu$ M fluorescenční sondou v nepřítomnosti, nebo přítomnosti testovaného konjugátu, nekonjugovaného inhibitoru, nebo samotného folátu. Poté byly opláchnuty PBS a analyzovány průtokovým cytometrem.

### 3 Komentované výsledky a diskuse

#### 3.1 Biochemická selektivita komerčně dostupných CDKi

Vzhledem k časté incidenci neúplných nebo nesprávných informací o biochemické selektivitě CDKi, které jsou mnohdy využívány jako chemické nástroje pro buněčnou biologii, bylo v první části práce charakterizováno 31 vybraných komerčně dostupných CDKi. Byly vybrány takové látky, které jsou uváděny jako selektivní vůči CDK1, 2 nebo 4/6, nicméně pro ně nebyly dostupné úplné informace o jejich selektivitě, anebo se vyznačovaly neočekávanými biologickými efekty spojenými s inhibicí dalších kinas (**Jorda *et al.*, 2018a, Příloha I**). Jejich selektivita byla testována biochemickým inhibičním testem, a to vůči CDK1/2/4/6/7/9, a studován byl také vliv těchto inhibitorů na buněčný cyklus průtokovou cytometrií. Inhibice některých cílů byla ověřována analýzou teplotní denaturace nebo fosforylace přímých substrátů. Tyto účinky byly spojovány s biochemickým profilem látek a s publikovanými daty.

V rámci skupiny CDK1 selektivních inhibitorů bylo testováno pět látek, z nichž benfluoren (**Brachwitz *et al.*, 2003**), elbfluoren (**Voigt *et al.*, 2005**) a „CDK1 inhibitor“ (**Andreani *et al.*, 2000**) překvapivě nedosáhly dostatečné inhibiční aktivity vůči žádné z testovaných CDK (**Příloha I, Obr. 3**). Podle publikovaných dat „CDK1 inhibitor“ neselektivně inhibuje řadu různých kinas (**Anastassiadis *et al.*, 2011; Gao *et al.*, 2013**), které jsou pravděpodobně odpovědné za G2/M blok buněčného cyklu linie HCT116, nikoliv však CDK1 (**Příloha I, Obr. 2**). V případě benfluorenu a elbfluorenu nebyl dokonce pozorován žádný vliv na buněčný cyklus (**Příloha I, Obr. 2A**) a částečný G2/M blok vyvolaný inhibitorem CGP74514A (**Imbach *et al.*, 1999; Pernicová *et al.*, 2014; Jorda *et al.*, 2015**) odpovídal spíše inhibici CDK2 jako primárního cíle (**Příloha I, Obr. 2, 3**). V rámci této testované skupiny pouze RO3306 (**Vassilev *et al.*, 2006**) dosáhl dostatečné selektivity vůči CDK1, která koresponduje i s indukovaným buněčným efektem a s výsledky termodenaturační analýzy (**Příloha I, Obr. 2, 3**). Podle publikovaných dat však RO3306 disponuje inhibicí dalších kinas z CMGC rodiny, zejména DYRK (MRC Kinase Profiling Inhibitor Database, 2021).

Skupina CDK2 inhibitorů tvoří jednu z nejpočetnějších, avšak tyto látky často inhibují i druhý primární cíl, zejména CDK1, 5 nebo 9 vzhledem k jejich sekvenční podobnosti, a jsou pak označovány jako duální inhibitory. V rámci studie bylo testováno šest látek uváděných jako selektivní vůči CDK2, nicméně ani jedna z nich nesplnila kritéria selektivní sondy.

Ačkoliv „CDK2 inhibitor II“ (Davis *et al.*, 2001) disponoval dostatečnou selektivitou vůči CDK2 (**Příloha I, Obr. 4, S3**), jeho použití je podstatně limitováno nízkou rozpustností. Inhibitory SU9516 (Lane *et al.*, 2001), CVT313 („CDK2 inhibitor III“) (Brooks *et al.*, 1997) a GW8510 (Davis *et al.*, 2001) kromě CDK2 interagoval v kinasovém testu i s CDK5 (**Příloha I, Obr. 4**), což bylo potvrzeno také poklesem fosforylace serinu-732 FAK kinasy (**Příloha I, S3**). Naproti tomu milciclib (PHA848125) (Brasca *et al.*, 2009) v nízkých koncentracích inhibuje CDK4, zatímco ve vyšších dávkách CDK2 (**Příloha I, Obr. 4, S4**). Zajímavým příkladem je také látka NU6140 („CDK2 inhibitor IV“) (Pennati *et al.*, 2005), která se na panelu CDK v kinasovém inhibičním testu jevila jako CDK2 selektivní (**Příloha I, Obr. 4**), nicméně způsobovala výraznou tetraploidizaci buněk (**Příloha I, Obr. 5A**) prostřednictvím inhibice aurora kinas (**Příloha I, Obr. 5B, C**). Tyto výsledky tak poskytují nový pohled na možný mechanismus účinku NU6140.

CDK4 a 6 disponují strukturou mírně odlišnou od jiných CDK, díky které jsou jejich inhibitory obvykle více selektivní (Echalier *et al.*, 2014). V rámci testovaného panelu kinas disponoval palbociclib (Fry *et al.*, 2004), ribociclib (Rader *et al.*, 2013) a abemaciclib (Dickler *et al.*, 2017; Sledge *et al.*, 2017) silnou inhibicí CDK4 (**Příloha I, Obr. 6**). Analýza buněčného cyklu potvrdila tuto inhibici očekávaným G1 blokem buněčného cyklu v nanomolárních koncentracích (**Příloha I, Obr. 7A, S4**). Při vyšších dávkách ale abemaciclib i palbociclib zvyšují procentuální zastoupení buněk v G2/M fázi v důsledku interakce s jinými kinasami (**Příloha I, Obr. S5**) (Liu *et al.*, 2012; Hafner *et al.*, 2019). Tři z dalších testovaných látek, NSC625987 („CDK4 inhibitor II“) (Kubo *et al.*, 1999), ryuvidin („CDK4 inhibitor III“) (Ryu *et al.*, 2000) a CINK4 („CDK4/6 inhibitor IV“) (Soni *et al.*, 2001), nedosáhly dostatečné inhibice žádné z testovaných CDK (**Příloha I, Obr. 6, 7**). Použití ryuvidinu je navíc významně omezeno jeho nízkou rozpustností. „CDK4 inhibitor V“ (Tsou *et al.*, 2009), arcyriaflavin A (Sánchez-Martínez *et al.*, 2003) a jeho derivát „CDK4 inhibitor“ (Zhu *et al.*, 2003) sice inhibují CDK4, nicméně také CDK1/2 a 5 (**Příloha I, Obr. 6**). ON123300 byl popsán jako inhibitor CDK4 a ARK5 (Reddy *et al.*, 2014), nicméně ve vyšších dávkách se projevuje také inhibicí CDK2 (**Příloha I, Obr. 6, 7**). Jeho aplikace jako CDK4 selektivní inhibitor je tedy striktně vymezena použitím vhodné koncentrace.

Poslední testovanou skupinu tvořilo 10 duálních CDKi. Žádná z těchto látek selektivně neinhibovala pouze dvě udávané CDK v kinasovém inhibičním testu (**Příloha I, Obr. 8**). Pouze tři z nich, BMS265246 (Misra *et al.*, 2003), BML259 (Helal *et al.*, 2004)

a „CDK2/9 inhibitor” (Wang *et al.*, 2004), opravdu inhibovaly jejich udávané primární cíle s největší účinností, ale společně s „CDK1/2 inhibitorem III” (Lin *et al.*, 2005) a CGP60474 (Ruetz *et al.*, 2003) inhibují také CDK5 (**Příloha I, Obr. S6, 8**). Duální inhibitory BIO (6-BIO) (Meijer *et al.*, 2003) a (R)-DRF053 kromě CDK inhibují také další vedlejší cíle, GSK3 $\beta$ , respektive CSNK1 $\delta$  (Polychronopoulos *et al.*, 2004; Oumata *et al.*, 2008), zatímco „CDK1/5 inhibitor” (Ortega *et al.*, 2002) a PNU112455A95 (Clare *et al.*, 2001) mají pouze velmi omezenou inhibiční aktivitu vůči testovaným CDK (**Příloha I, Obr. 8**). Zajímavým příkladem je NU6102, který byl původně popsán jako duální inhibitor CDK1 a 2 (Davies *et al.*, 2002; Hardcastle *et al.*, 2004), ale v některých studiích se vyznačoval selektivitou pouze vůči CDK2 (Coxon *et al.*, 2017; Echalié *et al.*, 2012; Jorda *et al.*, 2018b; Krasinska *et al.*, 2008). Kinasový inhibiční test potvrdil preferenci k CDK2, nicméně výrazný G2/M blok linie HCT116 s vyřazeným genem pro CDK2 značí inhibici CDK1 (**Příloha I, Obr. 8, S7**).

### 3.2 Buněčná selektivita konjugátů 2,6,9-trisubstituovaných purinů

Účinná biologická aktivita CDKi roskovitinu (Havlíček *et al.*, 1997) se stala inspirací pro vývoj řady dalších derivátů 2,6,9-trisubstituovaných purinů, nicméně jejich klinická aplikace je limitována nízkou buněčnou selektivitou (Bettayeb *et al.*, 2008; Oumata *et al.*, 2008; Trova *et al.*, 2009). Tato skutečnost podnítila k vytvoření prvního konceptu konjugátů CDK inhibitorů s folátovým transportním systémem, který potenciálně zvyšuje selektivitu vůči nádorovým buňkám (**Krajčovičová *et al.*, 2017, Příloha III**).

Na základě krystalových struktur CDK2 a jiných folátových konjugátů (Vergote *et Leamon*, 2015) byly navrženy a syntetizovány konjugáty **17a-g** (**Příloha III, Tab. 1**) založené na struktuře 2,6,9-trisubstituovaných purinů s CDK2-inhibičními a antiproliferačními účinky (Gucký *et al.*, 2013). Jejich terminální amino skupina je konjugována prostřednictvím disulfidového linkeru a oligopeptidového spaceru s folátem. Nejúčinnější konjugát **17d** (**Příloha III, Obr. S24 a S25**) byl podroben skupinou M. Sourala *in vitro* simulaci disulfidové reakce v redukčním prostředí, kdy byla potvrzena kompletní redukce disulfidového linkeru již po 5 min působení a uvolnění samotného inhibitoru po 20 hod (**Příloha III, Obr. 2**). Naproti tomu v případě nejznámějšího folátového konjugátu, vintafolidu, dochází ke kompletní redukci glutathionem až po 2 h, zatímco v případě dithiothreitolu po 10 min (Vlahov *et Leamon*, 2012). Průtokovou cytometrií byla potvrzena schopnost konjugátu **17d** vázat FR nádorové linie HeLa

s použitím fluorescenční sondy cílicí folátový receptor, FolateRSense 680, jako kompetičního agens (**Příloha III, Obr. 3A**). Konjugovaný inhibitor podstatně snížil procentuální zastoupení buněk s navázanou fluorescenční sondou, přičemž tato kompetice byla koncentračně závislá a účinnější než s volným folátem (**Příloha III, Obr. 3B, 4**). V kontrolním experimentu samotný nekonjugovaný inhibitor s fluorescenční sondou nekompetoval. Tyto analýzy potvrzují specifický transport konjugátu **17d** prostřednictvím FR za současného zachování srovnatelné kinasové inhibiční aktivity ( $IC_{50} = 77$  nM) a to i v nepřítomnosti redukčního činidla. Vazba folátu tedy neblokuje interakci konjugátu s ATP-vazebným místem CDK2 a jeho účinnost není limitována rychlostí uvolnění samotného inhibitoru v buňkách. Zachování vysoké účinnosti inhibitorů je jedním z významných faktorů, které ovlivňují úspěšnost při klinickém použití. Přestože se některé folátové konjugáty dostaly do klinického testování, jako např. vintafolid (Vlahov *et al.*, 2006; Dosio *et al.*, 2010) nebo BMS-753493 (Peethambaram *et al.*, 2015), žádný z nich dosud nebyl schválen právě v důsledku jejich nízké účinnosti (Scaranti *et al.*, 2020). Vintafolid se vyznačuje pouze omezenou účinností při monoterapeutické léčbě, která vyžaduje jeho použití v kombinaci s jinými chemoterapeutiky, která jsou však neselektivní a způsobují nežádoucí vedlejší účinky (Naumann *et al.*, 2013; Hanna *et al.*, 2014). Konjugace folátu s CDK inhibitory s vysokou biochemickou i buněčnou účinností by v tomto ohledu mohly představovat vývoj efektivních inhibitorů s vyšší selektivitou vůči nádorovým buňkám.

## 4 Závěr

První část této dizertační práce byla věnována charakterizaci komerčně dostupných CDKi. Bylo hodnoceno, zda tyto látky splňují kritéria vhodných selektivních chemických sond, která zahrnují dostatečnou selektivitu (>50násobný rozdíl v hodnotách  $IC_{50}$  v biochemickém testu zahrnujícím alespoň 125 kinas), biochemickou (<100 nM) a buněčnou účinnost (<500 nM) (Frye, 2010; Workman *et Collins*, 2010; Knapp *et al.*, 2013). Bylo zjištěno, že z 31 látek pouze palbociclib, abemaciclib a ribociclib splňují všechna kritéria. Ze skupiny CDK2 inhibitorů, pouze NU6102 a „CDK2 inhibitor II“ disponují dostatečnou selektivitou vůči CDK2, nicméně nedosáhly dostatečné buněčné účinnosti. Z testovaných CDK1i je pouze RO3306 vhodným kandidátem, neboť žádná jiná látka nedosáhla tak vysoké selektivity pro CDK1. V případě některých látek dokonce nebyla prokázána inhibice CDK jako primárních buněčných cílů a mnohé z nich zřejmě inhibují i jiné proteinkinasy v rámci kinomu nebo i jiné nekinasové cíle. NU6140 byl vyhodnocen jako silný inhibitor aurora kinas a tyto cíle díky tomu již byly doplněny v produktových listech řady komerčních společností. Ze získaných výsledků je evidentní, že informace o biochemické selektivitě jsou nezbytné pro pochopení mechanismu účinku a pro výběr vhodné selektivní sondy. Biochemické testy by měly být vždy doplněny o buněčné testy a další analýzy pro dosažení korektní a úplné validace selektivity inhibitorů.

Kinasové inhibitory se však vyznačují promiskuitou nejen na biochemické, ale i na buněčné úrovni, kdy dochází k jejich akumulaci i ve zdravých nenádorových buňkách, která může vést k systémové toxicitě a vyřazení látky z klinického použití. V druhé části práce byl proto navržen a testován koncept cíleného transportu CDKi konjugovaných s folátem prostřednictvím folátového receptoru exprimovaného nádorovými buňkami. Nejúčinnější 2,6,9-trisubstituovaný purinový konjugát **17d** byl podroben *in vitro* simulaci disulfidové reakce v redukčním prostředí, která ověřila účinnou redukci disulfidového linkeru a úplné uvolnění samotného inhibitoru po 20 hod. Cytometrickou analýzou byl potvrzen specifický transport konjugátu prostřednictvím FR do nádorových buněk a zachování jeho CDK2 inhibičních vlastností, které nejsou limitovány rychlostí uvolnění samotného inhibitoru v buňkách. Tento koncept tak naznačuje možnou cestu vývoje protinádorových léčiv s vyšší buněčnou selektivitou.

## 5 Seznam použité literatury

- Anastassiadis, T., Deacon, S. W., Devarajan, K., Ma, H., & Peterson, J. R. (2011). Comprehensive assay of kinase catalytic activity reveals features of kinase inhibitor selectivity. *Nature Biotechnology*, 29(11), 1039–1045.
- Andreani, A., Cavalli, A., Granaola, M., Leoni, A., Locatelli, A., Morigi, R., Rambaldi, M., Recanatini, M., Garnier, M., & Meijer, L. (2000). Imidazo[2,1-b]thiazolylmethylene- and indolylmethylene-2-indolinones: A new class of cyclin-dependent kinase inhibitors. Design, synthesis, and CDK1/cyclin B inhibition. *Anti-Cancer Drug Design*, 15(6), 447–452.
- Bettayeb, K., Oumata, N., Echalié, A., Ferandin, Y., Endicott, J. A., Galons, H., & Meijer, L. (2008). CR8, a potent and selective, roscovitine-derived inhibitor of cyclin-dependent kinases. *Oncogene*, 27(44), 5797–5807.
- Brachwitz, K., Voigt, B., Meijer, L., Lozach, O., Schächtele, C., Molnár, J., & Hilgeroth, A. (2003). Evaluation of the first cytostatically active 1-aza-9-oxafluorenes as novel selective CDK1 inhibitors with Pglycoprotein modulating properties. *Journal of Medicinal Chemistry*, 46(5), 876–879.
- Brasca, M. G., Amboldi, N., Ballinari, D., Cameron, A., Casale, E., Cervi, G., Colombo, M., Colotta, F., Croci, V., D'Alessio, R., Fiorentini, F., Isacchi, A., Mercurio, C., Moretti, W., Panzeri, A., Pastori, W., Pevarello, P., Quartieri, F., Roletto, F., ... Ciomei, M. (2009). Identification of N,1,4,4-tetramethyl-8-[[4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl]amino]-4,5-dihydro-1H-pyrazolo[4,3-h]quinazoline-3-carboxamide (PHA-848125), a potent, orally available cyclin dependent kinase inhibitor. *Journal of Medicinal Chemistry*, 52(16), 5152–5163.
- Brooks, E. E., Gray, N. S., Joly, A., Kerwar, S. S., Lum, R., Mackman, R. L., Norman, T. C., Rosete, J., Rowe, M., Schow, S. R., Schultz, P. G., Wang, X., Wick, M. M., & Shiffman, D. (1997). CVT-313, a specific and potent inhibitor of CDK2 that prevents neointimal proliferation. *Journal of Biological Chemistry*, 272(46), 29207–29211.
- Clare, P. M., Poorman, R. A., Kelley, L. C., Watenpaugh, K. D., Bannow, C. A., & Leach, K. L. (2001). The Cyclin-dependent Kinases cdk2 and cdk5 Act by a Random, Anticooperative Kinetic Mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 276(51), 48292–48299.
- Coxon, C. R., Anscombe, E., Harnor, S. J., Martin, M. P., Carbain, B., Golding, B. T., Hardcastle, I. R., Harlow, L. K., Korolchuk, S., Matheson, C. J., Newell, D. R., Noble, M. E. M., Sivaprakasam, M., Tudhope, S. J., Turner, D. M., Wang, L. Z., Wedge, S. R., Wong, C., Griffin, R. J., ... Cano, C. (2017). Cyclin-Dependent Kinase (CDK) Inhibitors: Structure-Activity Relationships and Insights into the CDK-2 Selectivity of 6-Substituted 2-Arylamino-purines. *Journal of Medicinal Chemistry*, 60(5), 1746–1767.
- Davies, T. G., Bentley, J., Arris, C. E., Boyle, F. T., Curtin, N. J., Endicott, J. A., Gibson, A. E., Golding, B. T., Griffin, R. J., Hardcastle, I. R., Jewsbury, P., Johnson, L. N., Mesguiche, V., Newell, D. R., Noble, M. E. M., Tucker, J. A., Wang, L., & Whitfield, H. J. (2002). Structure-based design of a potent purine-based cyclin-dependent kinase inhibitor. *Nature Structural Biology*, 9(10), 745–749.
- Davis, S. T., Benson, B. G., Bramson, H. N., Chapman, D. E., Dickerson, S. H., Dold, K. M., Eberwein, D. J., Edelstein, M., Frye, S. V., Gampe, J., Griffin, R. J., Harris, P. A., Hassell, A. M., Holmes, W. D., Hunter, R. N., Knick, V. B., Lackey, K., Lovejoy, B., Luzzio, M. J., ... Kuyper, L. F. (2001). Prevention of chemotherapy-induced alopecia in rats by CDK inhibitors. *Science*, 291(5501), 134–137.
- Dickler, M. N., Tolaney, S. M., Rugo, H. S., Cortes, J., Dieras, V., Patt, D., Wildiers, H., Hudis, C. A., O'Shaughnessy, J., Zamora, E., Yardley, D. A., Frenzel, M., Koustenis, A., & Baselga, J. (2017). MONARCH 1, a phase II study of abemaciclib, a CDK4 and CDK6 inhibitor, as a single agent, in patients with refractory HR+/HER2-metastatic breast cancer. *Clinical Cancer Research*, 23(17), 5218–5224.
- Dosio, F., Milla, P., & Cattel, L. (2010). EC-145, a folate-targeted Vinca alkaloid conjugate for the potential treatment of folate receptor-expressing cancers. *Current Opinion in Investigational Drugs*, 11(12), 1424–1433.
- Echalié, A., Hole, A. J., Lolli, G., Endicott, J. A., & Noble, M. E. M. (2014). An inhibitor's-eye view of the ATP-binding site of CDKs in different regulatory states. *ACS Chemical Biology*, 9(6), 1251–1256.
- Ferguson, F. M., & Gray, N. S. (2018). Kinase inhibitors: The road ahead. *Nature Reviews Drug Discovery*, 17(5), 353–376.
- Force, T., Krause, D. S., & Van Etten, R. A. (2007). Molecular mechanisms of cardiotoxicity of tyrosine kinase inhibition. *Nature Reviews Cancer*, 7(5), 332–344.
- Fry, D. W., Harvey, P. J., Keller, P. R., Elliott, W. L., Meade, M. A., Trachet, E., Albassam, M., Zheng, X. X., Leopold, W. R., Pryer, N. K., & Toogood, P. L. (2004). Specific inhibition of cyclin-dependent kinase 4/6 by PD 0332991 and associated antitumor activity in human tumor xenografts. *Molecular Cancer Therapeutics*, 3(11), 1427–1437.



- Frye, S. V. (2010). The art of the chemical probe. *Nature Chemical Biology*, 6(3), 159–161.
- Gao, Y., Davies, S. P., Augustin, M., Woodward, A., Patel, U. A., Kovelman, R., & Harvey, K. J. (2013). A broad activity screen in support of a chemogenomic map for kinase signalling research and drug discovery. *Biochemical Journal*, 451(2), 313–328.
- Gucký, T., Jorda, R., Zatloukal, M., Bazgier, V., Berka, K., Řezníčková, E., Béres, T., Strnad, M., & Kryštof, V. (2013). A novel series of highly potent 2,6,9-trisubstituted purine cyclin-dependent kinase inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 56(15), 6234–6247.
- Hafner, M., Mills, C. E., Subramanian, K., Chen, C., Chung, M., Boswell, S. A., Everley, R. A., Liu, C., Walmsley, C. S., Juric, D., & Sorger, P. K. (2019). Multiomics Profiling Establishes the Polypharmacology of FDA-Approved CDK4/6 Inhibitors and the Potential for Differential Clinical Activity. *Cell Chemical Biology*, 26(8), 1067-1080.e8.
- Hanna, N., Juhász, E., Cainap, C., Gladkov, O., Ramlau, R., Juan-Vidal, O., Lal, R., Symanowski, J., Perez, W., Nguyen, B., & Harb, W. (2014). Target: a Randomized, Phase II Trial Comparing Vintafolide Versus Vintafolide Plus Docetaxel, Versus Docetaxel Alone in Second-Line Treatment of Folate-Receptor-Positive Non-Small Cell Lung Cancer (NscLc) Patients. *Annals of Oncology*, 25(Supplement 4), v1.
- Hardcastle, I. R., Arris, C. E., Bentley, J., Boyle, F. T., Chen, Y., Curtin, N. J., Endicott, J. A., Gibson, A. E., Golding, B. T., Griffin, R. J., Jewsbury, P., Menyerol, J., Mesguiche, V., Newell, D. R., Noble, M. E. M., Pratt, D. J., Wang, L. Z., & Whitfield, H. J. (2004). N2-substituted O6-cyclohexylmethylguanidine derivatives: Potent inhibitors of cyclin-dependent kinases 1 and 2. *Journal of Medicinal Chemistry*, 47(15), 3710–3722.
- Hartmann, J., Haap, M., Kopp, H.-G., & Lipp, H.-P. (2009). Tyrosine Kinase Inhibitors – A Review on Pharmacology, Metabolism and Side Effects. *Current Drug Metabolism*, 10(5), 470–481.
- Havlíček, L., Hanuš, J., Veselý, J., Leclerc, S., Meijer, L., Shaw, G., & Strnad, M. (1997). Cytokinin-derived cyclin-dependent kinase inhibitors: Synthesis and cdc2 inhibitory activity of olomoucine and related compounds. *Journal of Medicinal Chemistry*, 40(4), 408–412.
- Helal, C. J., Sanner, M. A., Cooper, C. B., Gant, T., Adam, M., Lucas, J. C., Kang, Z., Kupchinsky, S., Ahlijanian, M. K., Tate, B., Menniti, F. S., Kelly, K., & Peterson, M. (2004). Discovery and SAR of 2-aminothiazole inhibitors of cyclin-dependent kinase 5/p25 as a potential treatment for Alzheimer's disease. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 14(22), 5521–5525.
- Imbach, P., Capraro, H. G., Furet, P., Mett, H., Meyer, T., & Zimmermann, J. (1999). 2,6,9-Trisubstituted purines: Optimization towards highly potent and selective CDK1 inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 9(1), 91–96.
- Jorda, R., Hendrychová, D., Voller, J., Řezníčková, E., Gucký, T., & Kryštof, V. (2018a). How Selective Are Pharmacological Inhibitors of Cell-Cycle-Regulating Cyclin-Dependent Kinases? *Journal of Medicinal Chemistry*, 61(20), 9105–9120.
- Jorda, R., Bučková, Z., Řezníčková, E., Bouchal, J., & Kryštof, V. (2018b). Selective inhibition reveals cyclindependent kinase 2 as another kinase that phosphorylates the androgen receptor at serine 81. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1865(2), 354–363.
- Jorda, R., Schütznerová, E., Cankář, P., Brychtová, V., Navrátilová, J., & Kryštof, V. (2015). Novel arylazopyrazole inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 23(9), 1975–1981.
- Klaeger, S., Heinzlmeir, S., Wilhelm, M., Polzer, H., Vick, B., Koenig, P. A., Reinecke, M., Ruprecht, B., Petzoldt, S., Meng, C., Zecha, J., Reiter, K., Qiao, H., Helm, D., Koch, H., Schoof, M., Canevari, G., Casale, E., Re Depaolini, S., ... Kuster, B. (2017). The target landscape of clinical kinase drugs. *Science*, 358(6367), eaan4368.
- Knapp, S., Arruda, P., Blagg, J., Burley, S., Drewry, D. H., Edwards, A., Fabbro, D., Gillespie, P., Gray, N. S., Kuster, B., Lackey, K. E., Mazzafera, P., Tomkinson, N. C. O., Willson, T. M., Workman, P., & Zuercher, W. J. (2013). A public-private partnership to unlock the untargeted kinome. *Nature Chemical Biology*, 9(1), 3–7.
- Krasinska, L., Cot, E., & Fisher, D. (2008). Selective chemical inhibition as a tool to study Cdk1 and Cdk2 functions in the cell cycle. *Cell Cycle*, 7(12), 1702–1708.
- Kubo, A., Nakagawa, K., Varma, R. K., Conrad, N. K., Cheng, J. Q., Lee, W. C., Testa, J. R., Johnson, B. E., Kaye, F. J., & Kelley, M. J. (1999). The p16 status of tumor cell lines identifies small molecule inhibitors specific for cyclin-dependent kinase 4. *Clinical Cancer Research*, 5(12), 4279–4286.
- Lane, M. E., Yu, B., Pestell, R. G., Wadler, S., Rice, A., Lipson, K. E., Liang, C., Sun, L., Tang, C., & McMahon, G. (2001). A novel cdk2-selective inhibitor, SU9516, induces apoptosis in colon carcinoma cells. *Cancer Research*, 61(16), 6170–6177.

- Lim, S., & Kaldis, P. (2013). Cdks, cyclins and CKIs: Roles beyond cell cycle regulation. *Development (Cambridge)*, 140(15), 3079–3093.
- Lin, A., Giuliano, C. J., Palladino, A., John, K. M., Abramowicz, C., Yuan, M. Lou, Sausville, E. L., Lukow, D. A., Liu, L., Chait, A. R., Galluzzo, Z. C., Tucker, C., & Sheltzer, J. M. (2019). Off-target toxicity is a common mechanism of action of cancer drugs undergoing clinical trials. *Science Translational Medicine*, 11(509), eaaw8412.
- Lin, R., Connolly, P. J., Huang, S., Wetter, S. K., Lu, Y., Murray, W. V., Emanuel, S. L., Gruninger, R. H., Fuentes-Pesquera, A. R., Rugg, C. A., Middleton, S. A., & Jolliffe, L. K. (2005). 1-Acyl-1H-[1,2,4]triazole-3,5-diamine analogues as novel and potent anticancer cyclin-dependent kinase inhibitors: Synthesis and evaluation of biological activities. *Journal of Medicinal Chemistry*, 48(13), 4208–4211.
- Liu, F., & Korc, M. (2012). Cdk4/6 inhibition induces epithelial-mesenchymal transition and enhances invasiveness in pancreatic cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 11(10), 2138–2148.
- Malumbres, M. (2014). Cyclin-dependent kinases. *Genome Biology*, 15(6), 122.
- Malumbres, M., & Barbacid, M. (2005). Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends in Biochemical Sciences*, 30(11), 630–641.
- Meijer, L., Skaltsounis, A. L., Magiatis, P., Polychronopoulos, P., Knockaert, M., Leost, M., Ryan, X. P., Vonica, C. A., Brivanlou, A., Dajani, R., Crovace, C., Tarricone, C., Musacchio, A., Roe, S. M., Pearl, L., & Greengard, P. (2003). GSK-3-Selective Inhibitors Derived from Tyrian Purple Indirubins. *Chemistry and Biology*, 10(12), 1255–1266.
- Meisenheimer, P. L., Willson, T. M., & Robers, M. B. (2020). Quantifying CDK inhibitor selectivity in live cells. *Nature Communications*, 11(1), 2743.
- Misra, R. N., Xiao, H. Y., Rawlins, D. B., Shan, W., Kellar, K. A., Mulheron, J. G., Sack, J. S., Tokarski, J. S., Kimball, S. D., & Webster, K. R. (2003). 1H-pyrazolo[3,4-b]pyridine inhibitors of cyclin-dependent kinases: Highly potent 2,6-difluorophenacyl analogues. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 13(14), 2405–2408.
- MRC Kinase Profiling Inhibitor Database (duben 2021). <http://www.kinase-screen.mrc.ac.uk/screeningcompounds/608458>.
- Munoz, L. (2017). Non-kinase targets of protein kinase inhibitors. *Nature Reviews Drug Discovery*, 16(6), 424–440.
- Naumann, R. W., Coleman, R. L., Burger, R. A., Sausville, E. A., Kutarska, E., Ghamande, S. A., Gabrail, N. Y., DePasquale, S. E., Nowara, E., Gilbert, L., Gersh, R. H., Teneriello, M. G., Harb, W. A., Konstantinopoulos, P. A., Penson, R. T., Symanowski, J. T., Lovejoy, C. D., Leamon, C. P., Morgenstern, D. E., & Messmann, R. A. (2013). PRECEDENT: A randomized phase II trial comparing vintafolide (EC145) and pegylated liposomal doxorubicin (PLD) in combination versus PLD alone in patients with platinum-resistant ovarian cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 31(35), 4400–4406.
- Ortega, M. A., Montoya, M. E., Zarranz, B., Jaso, A., Aldana, I., Leclerc, S., Meijer, L., & Monge, A. (2002). Pyrazolo[3,4-b]quinoxalines. A new class of cyclin-dependent kinases inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 10(7), 2177–2184.
- Oumata, N., Bettayeb, K., Ferandin, Y., Demange, L., Lopez-Giral, A., Goddard, M. L., Myrianthopoulos, V., Mikros, E., Flajolet, M., Greengard, P., Meijer, L., & Galons, H. (2008). Roscovitine-derived, dualspecificity inhibitors of cyclin-dependent kinases and casein kinases 1. *Journal of Medicinal Chemistry*, 51(17), 5229–5242.
- Palmer, N., & Kaldis, P. (2020). Less-well known functions of cyclin/CDK complexes. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 107, 54–62.
- Peethambaram, P. P., Hartmann, L. C., Jonker, D. J., De Jonge, M., Plummer, E. R., Martin, L., Konner, J., Marshall, J., Goss, G. D., Teslenko, V., Clemens, P. L., Cohen, L. J., Ahlers, C. M., & Alland, L. (2015). A phase I pharmacokinetic and safety analysis of epothilone folate (BMS-753493), a folate receptor targeted chemotherapeutic agent in humans with advanced solid tumors. *Investigational New Drugs*, 33(2), 321–331.
- Pennati, M., Campbell, A. J., Curto, M., Binda, M., Cheng, Y. Z., Wang, L. Z., Curtin, N., Golding, B. T., Griffin, R. J., Hardcastle, I. R., Henderson, A., Zaffaroni, N., & Newell, D. R. (2005). Potentiation of paclitaxel-induced apoptosis by the novel cyclin-dependent kinase inhibitor NU6140: A possible role for survivin down-regulation. *Molecular Cancer Therapeutics*, 4(9), 1328–1337.
- Pernicová, Z., Slabáková, E., Fedr, R., Šimečková, Š., Jaroš, J., Suchánková, T., Bouchal, J., Kharaišvili, G., Král, M., Kozubík, A., & Souček, K. (2014). The role of high cell density in the promotion of neuroendocrine transdifferentiation of prostate cancer cells. *Molecular Cancer*, 13(1), 113.

- Polychronopoulos, P., Magiatis, P., Skaltsounis, A. L., Myrianthopoulos, V., Mikros, E., Tarricone, A., Musacchio, A., Roe, S. M., Pearl, L., Leost, M., Greengard, P., & Meijer, L. (2004). Structural Basis for the Synthesis of Indirubins as Potent and Selective Inhibitors of Glycogen Synthase Kinase-3 and Cyclin-Dependent Kinases. *Journal of Medicinal Chemistry*, 47(4), 935–946.
- Rader, J., Russell, M. R., Hart, L. S., Nakazawa, M. S., Belcastro, L. T., Martinez, D., Li, Y., Carpenter, E. L., Attiyeh, E. F., Diskin, S. J., Kim, S., Parasuraman, S., Caponigro, G., Schnepf, R. W., Wood, A. C., Pawel, B., Cole, K. A., & Maris, J. M. (2013). Dual CDK4/CDK6 inhibition induces cell-cycle arrest and senescence in neuroblastoma. *Clinical Cancer Research*, 19(22), 6173–6182.
- Reddy, E. P. (2014). Discovery of 8-cyclopentyl-2-[4-(4-methyl-piperazin-1-yl)-phenylamino]-7-oxo-7,8-dihydro-pyrido[2,3-d]pyrimidine-6-carbonitrile (7x) as a potent inhibitor of cyclin-dependent kinase 4 (CDK4) and AMPK-related kinase 5 (ARK5). *Journal of Medicinal Chemistry*, 57(3), 578–599.
- Reddy, M. V. R., Akula, B., Cosenza, S. C., Athuluridivakar, S., Mallireddigari, M. R., Pallela, V. R., Billa, V. K., Subbaiah, D. R. C. V., Bharathi, E. V., Vasquez-Del Carpio, R., Padgaonkar, A., Baker, S. J., & Ruetz, S., Fabbro, D., Zimmermann, J., Meyer, T., & Gray, N. (2003). Chemical and biological profile of dual Cdk1 and Cdk2 inhibitors. *Current Medicinal Chemistry - Anti-Cancer Agents*, 3(1), 1–14.
- Ryu, C. K., Kang, H. Y., Lee, S. K., Nam, K. A., Hong, C. Y., Ko, W. G., & Lee, B. H. (2000). 5-Arylamino-2-methyl-4,7-dioxobenzothiazoles as inhibitors of cyclin-dependent kinase 4 and cytotoxic agents. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 10(5), 461–464.
- Sánchez-Martínez, C., Shih, C., Faul, M. M., Zhu, G., Paal, M., Somoza, C., Li, T., Kumrich, C. A., Winneroski, L. L., Xun, Z., Brooks, H. B., Patel, B. K. R., Schultz, R. M., DeHahn, T. B., Spencer, C. D., Watkins, S. A., Considine, E., Dempsey, J. A., Ogg, C. A., ... Wagner, J. (2003). Aryl[a]pyrrolo[3,4-c]carbazoles as selective Cyclin D1-CDK4 inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 13(21), 3835–3839.
- Scaranti, M., Cojocar, E., Banerjee, S., & Banerji, U. (2020). Exploiting the folate receptor  $\alpha$  in oncology. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 17(6), 349–359.
- Sledge, G. W., Toi, M., Neven, P., Sohn, J., Inoue, K., Pivot, X., Burdaeva, O., Okera, M., Masuda, N., Kaufman, P. A., Koh, H., Grischke, E. M., Frenzel, M., Lin, Y., Barriga, S., Smith, I. C., Bourayou, N., & Llombart-Cussac, A. (2017). MONARCH 2: Abemaciclib in combination with fulvestrant in women with HR+/HER2-advanced breast cancer who had progressed while receiving endocrine therapy. *Journal of Clinical Oncology*, 35(25), 2875–2884.
- Soni, R., O'Reilly, T., Furet, P., Muller, L., Stephan, C., Zumstein-Mecker, S., Fretz, H., Fabbro, D., & Chaudhuri, B. (2001). Selective in vivo and in vitro effects of a small molecule inhibitor of cyclin-dependent kinase 4. *Journal of the National Cancer Institute*, 93(6), 436–446.
- Trova, M. P., Barnes, K. D., Alicea, L., Benanti, T., Bielaska, M., Bilotta, J., Bliss, B., Duong, T. N., Haydar, S., Herr, R. J., Hui, Y., Johnson, M., Lehman, J. M., Peace, D., Rainka, M., Snider, P., Salamone, S., Tregay, S., Zheng, X., & Friedrich, T. D. (2009). Heterobiaryl purine derivatives as potent antiproliferative agents: Inhibitors of cyclin dependent kinases. Part II. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 19(23), 6613–6617.
- Tsou, H. R., Liu, X., Birnberg, G., Kaplan, J., Otteng, M., Tran, T., Kutterer, K., Tang, Z., Suayan, R., Zask, A., Ravi, M., Bretz, A., Grillo, M., McGinnis, J. P., Rabindran, S. K., Ayril-Kaloustian, S., & Mansour, T. S. (2009). Discovery of 4-(benzylaminomethylene)isoquinoline-1,3-(2H,4H)-diones and 4-[(pyridylmethyl)aminomethylene]isoquinoline-1,3-(2H,4H)-diones as potent and selective inhibitors of the cyclin-dependent kinase 4. *Journal of Medicinal Chemistry*, 52(8), 2289–2310.
- Tsou, H. R., Liu, X., Birnberg, G., Kaplan, J., Otteng, M., Tran, T., Kutterer, K., Tang, Z., Suayan, R., Zask, A., Ravi, M., Bretz, A., Grillo, M., McGinnis, J. P., Rabindran, S. K., Ayril-Kaloustian, S., & Mansour, T. S. (2009). Specific delivery of kinase inhibitors in nonmalignant and malignant diseases. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 9(1), 59–70.
- Vassilev, L. T., Tovar, C., Chen, S., Knezevic, D., Zhao, X., Sun, H., Heimbrook, D. C., & Chen, L. (2006). Selective small-molecule inhibitor reveals critical mitotic functions of human CDK1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(28), 10660–10665.
- Vergote, I., & Leamon, C. P. (2015). Vintafolide: A novel targeted therapy for the treatment of folate receptor expressing tumors. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 7(4), 206–218.
- Vlahov, I. R., & Leamon, C. P. (2012). Engineering folate-drug conjugates to target cancer: From chemistry to clinic. *Bioconjugate Chemistry*, 23(7), 1357–1369.

- Vlahov, I. R., Santhapuram, H. K. R., Kleindl, P. J., Howard, S. J., Stanford, K. M., & Leamon, C. P. (2006). Design and regioselective synthesis of a new generation of targeted chemotherapeutics. Part 1: EC145, a folic acid conjugate of desacetylvinblastine monohydrazone. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 16(19), 5093–5096.
- Voigt, B., Meijer, L., Lozach, O., Schächtele, C., Totzke, F., & Hilgeroth, A. (2005). Novel CDK inhibition profiles of structurally varied 1-aza-9-oxafluorenes. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 15(3), 823–825.
- Wang, S., Meades, C., Wood, G., Osnowski, A., Anderson, S., Yuill, R., Thomas, M., Mezna, M., Jackson, W., Midgley, C., Griffiths, G., Fleming, I., Green, S., McNae, I., Wu, S. Y., McInnes, C., Zheleva, D., Walkinshaw, M. D., & Fischer, P. M. (2004). 2-Anilino-4-(thiazol-5-yl)pyrimidine CDK Inhibitors: Synthesis, SAR Analysis, X-ray Crystallography, and Biological Activity. *Journal of Medicinal Chemistry*, 47(7):1662-75.
- Wells, C. I., Vasta, J. D., Corona, C. R., Wilkinson, J., Zimprich, C. A., Ingold, M. R., Pickett, J. E., Drewry, D. H., Pugh, K. M., Schwinn, M. K., Hwang, B. (Brian), Zegzouti, H., Huber, K. V. M., Cong, M., Meisenheimer, P. L., Willson, T. M., & Robers, M. B. (2020). Quantifying CDK inhibitor selectivity in live cells. *Nature Communications*, 11(1), 2743.
- Workman, P., & Collins, I. (2010). Probing the Probes: Fitness Factors For Small Molecule Tools. *Chemistry and Biology*, 17(6), 561–577.
- Zhu, G., Conner, S. E., Zhou, X., Shih, C., Li, T., Anderson, B. D., Brooks, H. B., Morris Campbell, R., Considine, E., Dempsey, J. A., Faul, M. M., Ogg, C., Patel, B., Schultz, R. M., Spencer, C. D., Teicher, B., & Watkins, S. A. (2003). Synthesis, structure-activity relationship, and biological studies of indolocarbazoles as potent cyclin D1-CDK4 inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 46(11), 2027–2030.

## 6 Přehled publikační činnosti

### Seznam publikovaných prací:

- Publikace zahrnuté v této práci:
  - I. Jorda, R.\*, **Hendrychová, D.\***, Voller, J., Řezníčková, E., Gucký, T., Kryštof, V. (2018): How Selective Are Pharmacological Inhibitors of Cell-Cycle-Regulating Cyclin-Dependent Kinases? *J Med Chem.* 61, 9105-9120. \*Sdílené prvoautorství
  - II. **Hendrychová, D.**, Jorda, R., Kryštof, V. (2021): How selective are clinical CDK4/6 inhibitors? *Med Res Rev* 41, 1578-1598.
  - III. Krajčovičová, S., Gucký, T., **Hendrychová, D.**, Kryštof, V., Soural, M. (2017): A Stepwise Approach for the Synthesis of Folic Acid Conjugates with Protein Kinase Inhibitors. *J Org Chem.* 82, 13530-13541.
- Další publikace:
  - IV. Jorda, R., Magar, P., **Hendrychová, D.**, Pauk, K., Dibus, M., Pilařová, E., Imramovský, A., Kryštof, V. (2020): Novel modified leucine and phenylalanine dipeptides modulate viability and attachment of cancer cells. *Eur J Med Chem.* 188, 112036.
  - V. Salas, C., Zarate, A.M., Kryštof, V., Mella, J., Faundez, M., Brea, J., Loza, M.I., Brito, I., **Hendrychová, D.**, Jorda, R., Cabrera, A.R., Tapia, R.A., Espinosa-Bustos, C. (2020): Promising 2,6,9-Trisubstituted Purine Derivatives for Anticancer Compounds: Synthesis, 3D-QSAR, and Preliminary Biological Assays. *Int J Mol Sci.* 21, 161.
  - VI. Xavier, N.M., Goncalves-Pereira, R., Jorda, R., **Hendrychová, D.**, Oliveira, M.C. (2019): Novel dodecyl-containing azido and glucuronamide-based nucleosides exhibiting anticancer potential. *Pure Appl. Chem.* 91, 1085-1105.
  - VII. Krajčovičová, S., Jorda, R., **Hendrychová, D.**, Kryštof, V., Soural, M. (2019): Solid-phase synthesis for thalidomide-based proteolysis-targeting chimeras (PROTAC). *Chem Commun (Camb).* 55, 929-932.

### Konferenční příspěvky:

- **Hendrychová, D.:** How selective are pharmacological inhibitors of cyclin-dependent kinases? *Chemistry and Biology of Phytohormones and Related Substances*, květen 24-26, 2018, Luhačovice, Česká republika. Ústní prezentace.

- **Hendrychová, D.**, Řezníčková, E., Gucký, T., Krajčovičová, S., Soral, M., Kryštof, V.: Folic acid conjugates with purine cyclin-dependent kinase inhibitors. XIII. Diagnostic, Predictive and Experimental Oncology Days, listopad 28-30, 2017, Olomouc, Česká republika. Poster.
- **Hendrychová, D.**, Jorda, R., Řezníčková, E., Kryštof, V.: Promiscuity and selectivity of commercially available inhibitors of cyclin-dependent kinases. VII International Symposium on Advances in Synthetic and Medicinal Chemistry, srpen 27-31, 2017, Vídeň, Rakousko. Poster.
- **Hendrychová, D.:** Selectivity of commercially available inhibitors of cyclin-dependent kinases. Chemistry and Biology of Phytohormones and Related Substances, květen 21-23, 2017, Kouty nad Desnou, Česká republika. Ústní prezentace.
- Jorda, R., **Hendrychová, D.:** Are commercially available selective inhibitors of cyclin-dependent kinases really selective? Cell Cycle meeting, CNRS, září 22, 2016, Montpellier, Francie. Poster.
- Jorda, R., Řezníčková, E., **Hendrychová, D.**, Skrášková, Z., Kryštof, V.: Are commercially-available selective inhibitors of cyclin-dependent kinases really selective? 12<sup>th</sup> International Congress of Cell Biology, červenec 21-25, 2016, Praha, Česká republika. Poster.

## 7 Summary

Over the last 30 years a number of small-molecule inhibitors of cyclin-dependent kinases (CDK) have been discovered. Some of them have been approved for the treatment of cancer and more than 100 are commercially available as chemical tools for cell biology. However, the extent to which the properties of these compounds are studied varies significantly with respect to their efficacy, selectivity for individual CDKs and cellular effects. Inhibitors are often claimed to be potent and selective, but they have not been sufficiently or correctly validated in many cases. The knowledge of biochemical selectivity is essential for adequate interpretation of the consequences of their action and side effects, as well as for their correct application in biological studies. However, side effects may also be related to their low cellular selectivity, because they inhibit kinases or processes that promote tumor growth, which may have an essential function in non-tumor cells. This doctoral thesis is focused on the characterisation of selected commercially available CDK inhibitors (CDKi), which are claimed to selectively inhibit cell-cycle regulating CDKs. Selectivity of CDKi toward CDK1/2/4/5/7/9 and their effects on a cell cycle were evaluated in several types of experiments and compared with published data. Results suggest that most originally selective CDKi should be reclassified as pan-selective and should not be used as selective chemical tools. In the second part of this thesis, the concept of targeted transport of folate-conjugated CDKi through the folate receptor expressed by tumor cells was suggested. Cytometric analysis confirmed the specific transport of the conjugates into tumor cells while preserving their CDK inhibitory properties. Therefore, targeted delivery of inhibitors represents a possible strategy to achieve increased cellular selectivity of drugs.