

靶向 β -catenin/Tcf相互作用小分子抑制剂的研究进展

孟佳欣^{1,2}, 钟武^{2*}

1. 沈阳药科大学 制药工程学院, 沈阳 110016; 2. 国家应急防控药物工程技术研究中心 军事科学院军事医学研究院毒物药物研究所, 北京 100850

【摘要】 β -catenin/Tcf相互作用抑制剂是阻断Wnt/ β -catenin信号通路异常激活以及开发抗癌药物的研究重点之一, 目前已报道了许多相关化合物。本文简述了Wnt/ β -catenin信号通路的基本构成、靶向 β -catenin/Tcf相互作用的小分子抑制剂的发现和研究进展。主要按照发现或研究方法对抑制剂进行分类, 介绍抑制剂的体内外活性和选择性, 最后发现合理的结构设计可为今后寻找新的高活性抑制剂提供参考。

【关键词】 β -catenin/Tcf相互作用; 小分子抑制剂; 生物活性

【中图分类号】 R963

【文献标识码】 B

【文章编号】 1672-3384(2021)12-0031-05

Doi: 10.3969/j.issn.1672-3384.2021.12.007

Small molecule inhibitors targeting at the interaction of β -catenin/Tcf: research progress

MENG Jia-xin^{1,2}, ZHONG Wu^{2*}

1. School of Pharmaceutical Engineering, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China; 2. National Engineering and Technology Center of Emergency Prevention and Control Drugs, Institute of Pharmacology & Toxicology of the Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China

【Abstract】 β -catenin/Tcf interaction inhibitors were one of the research focuses on blocking the abnormal activation of Wnt/ β -catenin signaling pathway and developing anti-cancer drugs. Many related compounds have been reported. This article briefly described the basic composition of the Wnt/ β -catenin signaling pathway, the discovery and research progress of targeted at the interaction of small molecule β -catenin/Tcf inhibitors. The inhibitors are classified according to the discovery or research methods, and the in vivo and in vitro activities and selectivity of inhibitors are introduced. Finally, it is found that reasonable structural design can provide a reference for looking for the new high activity inhibitors in the future.

【Key words】 β -catenin/Tcf interaction; small molecule inhibitors; bioactivity

Wnt/ β -catenin是一种经典且高度保守的信号通路, 在调节组织发育和维持体内平衡中起着关键作用。该通路的异常激活与多种癌症的发生和发展有关, 如结肠直肠癌、肝癌、胰腺癌、黑色素瘤和乳腺癌等^[1-2]。 β -catenin/T细胞因子(T-cell factor, Tcf)相互作用是Wnt/ β -catenin信号通路的下游部分, 阻断 β -catenin与Tcf相互作用的小分子可以有效地阻止此类疾病的产生。

近些年来, β -catenin/Tcf相互作用抑制剂成为阻断Wnt/ β -catenin信号通路以及开发抗癌药物的研

究重点之一, 目前已报道了许多该类小分子抑制剂。本文根据 β -catenin/Tcf相互作用小分子抑制剂的发现或研究方法对其进行分类, 讨论其生物活性, 以期今后发现新的高活性抑制剂提供参考。

1 Wnt/ β -catenin信号通路简介

在Wnt/ β -catenin信号通路中, 缺乏Wnt信号时, β -catenin与由腺瘤性结肠息肉病蛋白(adenomatous polyposis coli, APC)、糖原合成酶激酶3 β 、酪蛋白激酶1 α 和轴蛋白(Axin)组成的复合物相结合, 促

基金项目: 应急医学药物新品种研发及其关键创新技术体系(2018ZX09711003)

*通信作者: 钟武, E-mail: zhongwu@bmi.ac.cn

进 β -catenin磷酸化及其与 β -转导蛋白重复序列蛋白的相互作用,导致 β -catenin泛素化,随后被蛋白酶体降解^[3],细胞质中的 β -catenin水平很低,不易进入细胞核与转录因子作用。在这种情况下,Tcf/淋巴增强因子(lymphoid enhancing factor, Lef)与抑制因子结合, β -catenin靶基因的转录受到抑制。当Wnt信号存在时,Wnt信号将与跨膜受体蛋白Frizzled结合,进而激活细胞内蛋白Dishevelled,导致复合物解离,从而阻止 β -catenin降解,使其在细胞质中累积并转移至细胞核中激活Tcf/Lef,诱导靶基因如c-Myc、细胞周期蛋白D1(cyclin D1)和白细胞介素-8等的表达,致使肿瘤的产生。

2 靶向 β -catenin/Tcf相互作用抑制剂的发现

Tcf4是Tcf/Lef家族中最重要的转录因子, β -catenin/Tcf4的相互作用可激活许多致癌基因转录。其相互作用的中心区域呈延伸或螺旋状构象^[4],具有非常大的蛋白质相互作用界面,该界面上存在小分子的结合位点^[5]。如果小分子物质与位点紧密结合,可能会有效地破坏 β -catenin与Tcf4或其他蛋白质的结合,这使得使用小分子物质作为该相互作用的抑制剂成为可能。

在Wnt/ β -catenin信号通路中, β -catenin与APC的结合是 β -catenin降解的必要条件, β -catenin与E-钙黏蛋白(E-cadherin)的结合是细胞黏附和干细胞正常功能的基础。但E-cadherin、APC、Axin以及Tcf家族的其他成员与 β -catenin的结合界面与 β -catenin/Tcf4结合界面大部分重叠,任何干扰 β -catenin/Tcf4相互作用的小分子抑制剂也可能破坏 β -catenin与其他成分的相互作用,从而引起更多的并发症。因此,小分子抑制剂应该对 β -catenin/Tcf4相互作用具有更高的选择性,以减少不良反应。这使得开发抑制 β -catenin/Tcf相互作用的药物更具挑战性。目前,许多小分子抑制剂已经被报道,下文对这些小分子进行简要讨论。

3 靶向 β -catenin/Tcf相互作用的小分子抑制剂

3.1 天然产物抑制剂

Lepourcelet等^[6]通过高通量筛选发现6种来源

于微生物对 β -catenin/Tcf相互作用呈剂量依赖性抑制($IC_{50}<10\text{ }\mu\text{mol/L}$),包括PKF115-584、PKF118-310、PKF118-744、PKF222-815、CGP049090和ZTM000990。其中PKF115-584、PKF222-815和CGP049090对 β -catenin/APC复合物有干扰作用。Wei等^[7]研究表明,PKF118-310、PKF115-584和CGP049090在体外对3种肝细胞癌细胞系(HepG2、Hep40和Huh7)均表现出剂量依赖性细胞毒性,对正常细胞毒性较低。

Gonsalves等^[8]在已发现的天然化合物中检测出iCRT3、iCRT5和iCRT14可显著抑制S37A β 转染的HEK293细胞的 β -catenin/Tcf4相互作用,对 β -catenin与E-cadherin或 α -catenin的抑制作用不明显。在iCRT3对人结肠癌样本(6个)细胞毒性作用的研究中,3个患者样本对iCRT3高度敏感, IC_{50} 与已批准的抗癌药物(如氟尿嘧啶)相当,另外3个患者样本对iCRT3不敏感,表明该化合物需要进一步改进。

Li等^[9]报道了一种存在于冬凌草中的化合物鄂西香茶菜素henryin,可抑制 β -catenin/Tcf4相互作用。通过细胞生长检测初步分析表明henryin选择性地抑制结直肠癌细胞系(SW480和HCT116)的生长,降低了HCT116细胞的Axin2、cyclin D1和c-Myc基因的表达,诱导细胞 $G_{1/S}$ 期阻滞。

3.2 基于 β -catenin与Tcf4的结合位点发现的抑制剂

化合物PNU-74654和化合物BC21可以与 β -catenin上含有K435和R469残基的空腔结合(PNU-74654的 $K_D=450\text{ nmol/L}$),进而抑制 β -catenin/Tcf4相互作用,同时影响Wnt/ β -catenin靶基因的表达和基因产物的活性^[10]。BC21还可以呈剂量依赖性的诱导人结肠癌细胞HCT116细胞死亡,其用量在5和 $10\text{ }\mu\text{mol/L}$ 时可以分别抑制80%和100%的HCT116细胞活性,但对正常细胞无细胞毒性。

Zhang等^[11]发现BC23是一种新型的 β -catenin/Tcf4相互作用抑制剂,与BC21相比具有更大的结构优化空间,可呈剂量依赖性地抑制H1299非小细胞肺癌细胞中的活性($IC_{50}=2.3\text{ }\mu\text{mol/L}$),并下调靶基因cyclin D1和c-Myc的表达。当BC23与辐射结合使用时,可有效增强H1299非小细胞肺癌细胞对放射治疗的敏感性。

Fang等^[12]发现化合物LF3可以直接与 β -catenin结合,阻止 β -catenin/Tcf4复合物的生成,进而抑制多种结肠癌细胞系中相关靶基因的表达,但LF3不影响 β -catenin与E-cadherin的结合。在SW480结肠癌细胞中,LF3可以通过诱导细胞周期阻滞,导致细胞凋亡,进而抑制结肠癌细胞的增殖。在小鼠实验中,使用50 mg/kg剂量的LF3就可以抑制小鼠SW480异种移植瘤的生长,促进肿瘤分化且无全身毒性。

3.3 通过生物检测方法发现的抑制剂

Schneider等^[13]建立了Alpha Screen和荧光偏振(fluorescence polarization, FP)2种方法来定量评估抑制剂对 β -catenin与Tcf、E-cadherin或APC相互作用之间的选择性,并筛选出4个有活性的化合物L338192、R360163、R999636和T155535。这4个化合物对 β -catenin/Tcf相互作用的抑制性($K_i \leq 80 \mu\text{mol/L}$)强于 β -catenin/APC的相互作用($K_i > 1$)。

Wang等^[14]通过荧光素酶质粒基因分析法发现了化合物NC043,其在不影响 β -catenin的稳定性和 β -catenin/E-cadherin相互作用的情况下,可抑制 β -catenin/Tcf4相互作用,使结肠癌细胞 G_2 周期停滞,同时抑制SW480细胞生长,但机制尚不明确。

Kim等^[15]发现CWP232228可拮抗核中 β -catenin与Tcf的结合,抑制Wnt/ β -catenin信号传导,并耗尽 $\text{CD}_{133}^+/\text{ALDH}^+$ 肝癌干细胞,从而降低肝癌干细胞的自我更新能力和体内外的致瘤性。

3.4 通过结构修饰得到的抑制剂

化合物TMP-A-1对 β -catenin/Tcf4相互作用具有良好的抑制活性 $[\text{IC}_{50(22\text{C}11)} = 0.60 \mu\text{mol/L}]$ ^[16],但其具有溶解性差和代谢不稳定的特征。Chen等^[17]对TMP-A-1进行了结构优化,通过改变联苯、2-氨基上的取代基和替代苄基设计并合成的化合物TMP-A-2 $[\text{IC}_{50(22\text{C}11)} = 0.74 \mu\text{mol/L}]$ 具有更好的溶解性和更高的代谢稳定性,化合物TMP-A-16k具有更好的效价 $[\text{IC}_{50(22\text{C}11)} = 0.22 \mu\text{mol/L}, \text{IC}_{50(33,13)} = 0.19 \mu\text{mol/L}]$ 、溶解性、渗透性和口服生物利用度(46%)。但这2种化合物均未显示出体内抑制活性。

同一研究小组为改善原有化合物的体内效应,基于配体设计的TMP-B-50与TMP-A-1结构相似且具有更好的脂水分配系数(CLogP:4.7),对其进行结构改造合成的TMP-B-9和TMP-B-19对结肠癌细

胞有很高的抑制活性^[18],对有变异 β -catenin的细胞有选择性生长抑制作用。但由于TMP-B-9的渗透性差、吸收能力差以及TMP-B-19的溶解度和代谢稳定性差,小鼠口服这2种化合物后,血浆和肿瘤内药物浓度很低。在小鼠腹膜内注射给药TMP-B-9时,可抑制肿瘤生长,具有体内有效性。

Mao等^[19]对以上二氨基喹啉类 β -catenin/Tcf4信号通路抑制剂进行结构修饰,合成的二氨基喹啉衍生物中TMP-C-74、78和86在HCT116和SW480细胞表现出较好的抑制活性(IC_{50} 值均在 $1 \mu\text{mol/L}$ 左右)。

Catrow等^[20]检测出了一种新的 β -catenin/Tcf相互作用的小分子抑制剂ZINC02092166。通过将四环素环转变为芳香族体系和将酰肼亚结构改为酰胺基等方式对其进行结构改造,设计出的化合物26、29、31和33对 β -catenin/Tcf相互作用的抑制选择性高于 β -catenin与E-cadherin或APC的相互作用。

Ahn等^[21]设计并合成的二苯乙烯衍生物1c以剂量依赖的方式抑制转染 β -catenin的SW480细胞和HEK293细胞的增殖, IC_{50} 分别约为1.2和 $5 \mu\text{mol/L}$ 。通过分子对接技术证实了化合物1c可以直接抑制 β -catenin与Tcf4之间的相互作用。

Shin等^[22]通过白藜芦醇环化反应设计并合成了化合物HI-B1,可以直接与 β -catenin结合并破坏 β -catenin/Tcf4的相互作用。聚合酶链式反应试验表明,HI-B1可降低结肠癌细胞系DLD1和CACO2中cyclin D1和Axin2的mRNA表达,下调相关蛋白水平。APC^{Min}小鼠模型实验证明了HI-B1可抑制体内由 β -catenin引起的肿瘤。来源于患者的结肠癌异种移植模型试验结果显示,HI-B1仅在 β -catenin高度表达的模型中有效。

3.5 基于Tcf肽残基结构设计的高选择性抑制剂

结晶学和生物化学分析表明, β -catenin与Tcf结合的关键区域有3个:第1个是K435/K508,Tcf4中的D16/E17残基与之结合;第2个是K312/K345,Tcf4的E24/E29残基通过2种不同的构象与之结合;第3个是疏水口袋,内衬F253、I256、F293、A295和I296区域,Tcf4的V44和L48残基绑定到这个口袋^[23-24]。根据这3个结合区域蛋白相互作用情况,可以设计出结构新颖、结合亲和力高和选择性高的配体。

Yu等^[25]发现一种新的基于蛋白相互作用面位点的非肽类小分子抑制剂的设计策略,并将此方法应用于 β -catenin/Tcf相互作用的新型抑制剂的设计。模仿人Tcf4的D16/E17残基设计并合成的UU-T01可以有效地阻断 β -catenin和Tcf4之间的结合($K_i=3.14\text{ }\mu\text{mol/L}$)。

Huang等^[26]通过对Tcf4、E-cadherin和APC与 β -catenin结合的晶体结构的检测,确定了靶向Tcf4中的G¹³和E¹⁷结合位点可以选择性地抑制 β -catenin/Tcf相互作用,而不影响 β -catenin与E-cadherin或APC的相互作用。利用拟肽组学设计策略设计并合成的UU-T02和UU-T03具有良好的活性。FP竞争抑制实验证明,UU-T02对 β -catenin/Tcf相互作用有很高的抑制活性($K_i=1.36\text{ }\mu\text{mol/L}$),选择性高于 β -catenin与E-cadherin或APC的相互作用。基于细胞实验表明,UU-T03具有更好的细胞抑制活性。

化合物UU-T02虽然对 β -catenin/Tcf相互作用有良好的抑制活性,但在基于细胞的实验中效果不佳。Wang等^[27]对UU-T02进行结构优化,通过靶向 β -catenin/Tcf4的G¹³和E¹⁷结合位点,设计并合成了有很高抑制活性的化合物UU-T53和57(K_i 分别为0.64和0.44 $\mu\text{mol/L}$),并且其对 β -catenin/Tcf相互作用的选择性优于 β -catenin与E-cadherin或APC的相互作用。基于细胞的研究表明,UU-T56(UU-T53的乙酯衍生物)在不影响 β -catenin与E-cadherin或APC相互作用的情况下可以抑制 β -catenin/Tcf的相互作用。

综上所述, β -catenin/Tcf4抑制剂是阻断Wnt/ β -catenin信号通路以及开发抗癌药物的研究重点。与早期发现的抑制剂相比,新发现的抑制剂普遍具有更高的活性和药物相似性,少数抑制剂如ZINC02092166的衍生物、UU-T53和UU-T57在Tcf4、E-cadherin或APC的选择性方面取得了突破,它们对 β -catenin/Tcf相互作用的选择性优于 β -catenin与E-cadherin或APC的相互作用。一些抑制剂如TMP-C-74、78和86在结直肠癌细胞系(如SW480和HCT116)的异种移植瘤模型中显示出良好的体内活性和良好的耐受性。遗憾的是这些抑制剂都没有进入临床试验。值得注意的是,利用 β -catenin与Tcf4、E-cadherin或APC相互作用的差异设计并合

成的小分子具有更高的效价和选择性,为以后寻找高效抑制剂提供了新方向,在结构设计和虚拟筛选中有望找到具有新颖性和更高选择性的抑制剂。

【参考文献】

- [1] Nusse R, Clevers H. Wnt/ β -Catenin signaling, disease, and emerging therapeutic modalities[J]. Cell, 2017, 169(6):985-999.
- [2] Xu X, Zhang M, Xu F, et al. Wnt signaling in breast cancer: biological mechanisms, challenges and opportunities[J]. Mol Cancer, 2020, 19(1):165.
- [3] Li F, Chong Z Z, Maiese K. Winding through the WNT pathway during cellular development and demise[J]. Histol Histo-pathol, 2006, 21(1):103-124.
- [4] Poy F, Lepourcelet M, Shivdasani R A, et al. Structure of a human Tcf4 - β -catenin complex[J]. Nat Struct Biol, 2001, 8(12):1053-1057.
- [5] Fasolini M, Wu X, Flocco M, et al. Hot spots in Tcf4 for the interaction with β -catenin[J]. J Biol Chem, 2003, 278(23):21092-21098.
- [6] Lepourcelet M, Chen Y N, France D S, et al. Small-molecule antagonists of the oncogenic Tcf/ β -catenin protein complex. [J]. Cancer Cell, 2004, 5(1):91-102.
- [7] Wei W, Chua M S, Grepper S, et al. Small molecule antagonists of Tcf4/ β -catenin complex inhibit the growth of HCC cells in vitro and in vivo[J]. Int J Cancer, 2010, 126(10):2426-2436.
- [8] Gonsalves F C, Klein K, Carson B, et al. An RNAi-based chemical genetic screen identifies three small-molecule inhibitors of the Wnt/wingless signaling pathway [J]. Proc Natl AcadSci USA, 2011, 108(15):5954-5963.
- [9] Li X, Pu J, Jiang S, et al. Henryin, an ent-kaurane diterpenoid, inhibits Wnt signaling through interference with β -Catenin/TCF4 interaction in colorectal cCancer cells[J]. Plos One, 2013, 8(7):e68525.
- [10] Tian W, Han X, Yan M, et al. Structure-based discovery of a novel inhibitor targeting the β -catenin/Tcf4 interaction [J]. Biochemistry, 2012, 51(2):724-731.
- [11] Zhang Q, Gao M, Luo G, et al. Enhancement of radiation sensitivity in lung cancer cells by a novel small molecule inhibitor that targets the β -Catenin/Tcf4 interaction [J]. Plos One, 2016, 11(3):e0152407.
- [12] Fang L, Zhu Q, Neuenschwander M, et al. Small-molecule antagonist of the β -catenin/TCF4 interaction blocks the self-renewal of cancer stem cells and suppresses tumorigenesis[J]. Cancer Res, 2016, 76(4):891-901.
- [13] Schneider J A, Craven T W, Kasper A C, et al. Design of peptoid-peptide macrocycles to inhibit the β -catenin TCF interaction in prostate cancer[J]. Nat Commun, 2018, 9(1):4396.
- [14] Wang W, Liu H, Wang S, et al. A diterpenoid derivative 15-oxospiramylactone inhibits Wnt/ β -catenin signaling and colon cancer cell tumorigenesis[J]. Cell Res, 2011, 21(5):730-740.
- [15] Kim J Y, Lee H Y, Park K K, et al. CWP232228 targets liver cancer stem cells through Wnt/ β -catenin signaling: a novel therapeutic approach for liver cancer treatment [J]. Oncotarget, 2016, 7(15):20395-20409.
- [16] Trosset J Y, Dalvit C, Knapp S, et al. Inhibition of protein-pro-

- tein interactions: the discovery of druglike β -catenin inhibitors by combining virtual and biophysical screening [J]. *Proteins*, 2010, 64(1):60-67.
- [17] Chen Z, Venkatesan A M, Dehnhardt C M, et al. 2,4-Diamino-quinazolines as inhibitors of β -catenin/Tcf4 pathway: Potential treatment for colorectal cancer [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2009, 19(17):4980-4983.
- [18] Dehnhardt C M, Venkatesan A M, Chen Z, et al. Design and synthesis of novel diaminoquinazolines with in vivo efficacy for β -catenin/T-cell transcriptional factor 4 pathway inhibition [J]. *J Med Chem*, 2010, 53(2):897-910.
- [19] Mao Y, Lin N, Tian W, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of new diaminoquinazolines as β -Catenin/Tcf4 pathway inhibitors [J]. *J Med Chem*, 2012, 55(3):1346-1359.
- [20] Catrow J L, Zhang Y, Zhang M, et al. Discovery of selective small-molecule inhibitors for the β -Catenin/T-Cell factor protein-protein interaction through the optimization of the acyl hydrazone moiety [J]. *J Med Chem*, 2015, 58(11):4678-4692.
- [21] Ahn S, Ahn E, Sung J, et al. Synthetic polyphenol compounds inhibit β -catenin/Tcf signaling: structure-activity relationship [J]. *J Ind and Eng Chem*, 2017, 56: 258-269.
- [22] Shin S H, Lim D Y, Reddy K, et al. A small molecule inhibitor of the β -Catenin-TCF4 interaction suppresses colorectal cancer growth in vitro and in vivo [J]. *EBioMedicine*, 2017, 25: 22-31.
- [23] Knapp S, Zama M, Volpi D, et al. Thermodynamics of the high-affinity interaction of TCF4 with β -catenin [J]. *J Mol Biol*, 2001, 306(5):1179-1189.
- [24] Fasolini M, Wu X, Flocco M, et al. Hot spots in Tcf4 for the interaction with β -Catenin [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(23): 21092-21098.
- [25] Yu B, Huang Z, Zhang M, et al. Rational design of small-molecule inhibitors for β -catenin/T-cell factor protein-protein interactions by bioisostere replacement [J]. *ACS Chem Biol*, 2013, 8(3):524-529.
- [26] Huang Z, Zhang M, Burton SD, et al. Targeting the Tcf4 G¹³ AND E¹⁷ binding site to selectively disrupt β -catenin/T-cell factor protein-protein interactions [J]. *ACS Chem Biol*, 2014, 9(1):193-201.
- [27] Wang Z, Zhang M, Wang J, et al. Optimization of peptidomimetics as selective inhibitors for the β -Catenin/T-cell factor protein-protein interaction [J]. *J Med Chem*, 2019, 62(7): 3617-3635.

收稿日期:2021-04-27 本文编辑:杨昕