

TNIK小分子抑制剂在抗肿瘤治疗中的研究进展

陈梦销¹, 何毅^{1*}, 聂神有^{1,2*}

(1. 重庆医科大学生命科学研究院, 新靶标与化学干预教育部医药基础研究创新中心, 重庆 400016;

2. 重庆医科大学附属第二医院泌尿外科, 重庆 400010)

摘要: 肿瘤坏死因子受体相关因子-2和Nck相互作用蛋白激酶(TNIK)与肿瘤的发生、发展和预后密切关系, 参与了Wnt/ β -catenin等重要的信号通路的调节, 是肿瘤治疗中的一个潜在的重要靶标。目前已经报道多种结构多样且体外酶活很高的TNIK抑制剂, 但是由于选择性差、毒性大和体内抗肿瘤治疗效果不显著等多方面原因, 限制了其进一步开发。截至目前, 尚没有一个TNIK抑制剂进入临床研究。本文将对近年来靶向TNIK的小分子抑制剂在抗肿瘤治疗中的最新研究进展进行综述, 以期后续TNIK抑制剂的研究开发提供借鉴。

关键词: TNIK; Wnt/ β -catenin; 小分子抑制剂; 激酶; 抗肿瘤

中图分类号: R914 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)05-1151-12

Research progress on small-molecule inhibitors targeting TNIK in cancer treatment

CHEN Meng-xiao¹, HE Yi^{1*}, NIE Shen-you^{1,2*}

(1. Basic Medicine Research and Innovation Center for Novel Target and Therapeutic Intervention, Ministry of Education, Institute of Life Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 2. Department of Urology, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

Abstract: Traf2- and Nck-interacting kinase (TNIK) is closely related to the cancer occurrence, development, and prognosis. TNIK plays an important role in regulating Wnt/ β -catenin pathway, thus becoming a potential target for cancer treatment. Various small-molecule TNIK inhibitors with diverse structures and potent *in vitro* activities have been developed to treat tumors. However, no TNIK inhibitor has entered clinical phase mainly due to poor selectivity, toxicity, and unsatisfied *in vivo* anti-tumor efficiency. This review summarizes the research progress of small molecule inhibitors targeting TNIK, with the aim of giving some guidance for future research and development of small-molecule inhibitors.

Key words: Traf2- and Nck-interacting kinase; wnt/ β -catenin; small molecule inhibitor; kinase; anti-tumor

1999年, 肿瘤坏死因子受体相关因子-2 (Traf2) 和 Nck 相互作用蛋白激酶 (Traf2- and Nck-interacting kinase, TNIK) 第一次在酵母双杂交筛选实验中被发现, 其很可能参与了细胞骨架的调控。随后, 研究发现

TNIK 在人体多种组织中广泛表达, 尤其在心脏、大脑和骨骼肌中检测到更高水平表达。TNIK 最早被发现能够影响突触后信号传导^[1], 随后发现 TNIK 在神经系统中高表达, 并在谷氨酸能突触的突触后密度中积累^[2]。最近, 通过结合全甲基组的关联研究与先前的全基因组关联研究 (GWASs), TNIK 被重新定义为精神分裂症的易感基因^[3]。除了对神经系统的影响, TNIK 与肿瘤的关系也非常密切。在肿瘤信号通路的研究中发现, TNIK 参与了 Wnt/ β -catenin 信号通路的调控^[4], 因此,

收稿日期: 2023-09-22; 修回日期: 2024-02-19.

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (22177017); 重庆市博士“直通车”项目 (sl202100000610).

*通讯作者 Tel: 15123805327, E-mail: heyisky@cqmu.edu.cn;

Tel: 18602128026, E-mail: nieshenyou@cqmu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-1095

TNIK 成为了与 Wnt/ β -catenin 信号通路异常激活相关肿瘤治疗的重要靶点。

1 TNIK 作为抗肿瘤的潜力靶点

从发现第一个抗肿瘤 TNIK 抑制剂 PD407824 以来^[5], 目前共报道了 30 多个靶向 TNIK 的抗肿瘤抑制剂。虽然之前有综述对 TNIK 的结构及其抗结肠直肠癌的抑制剂进行了报道^[6-8], 但是目前尚无综述对所有靶向 TNIK 的抗肿瘤抑制剂的构效关系研究和临床前研究状态进行全面总结。本文将对 TNIK 与肿瘤发生发展的关系进行总结, 对所有 TNIK 抑制剂按化学结构特点分类并进行构效分析, 以及简要概述这些抑制剂的临床前研究状态, 并对其抑制剂的未来发展进行展望。

1.1 TNIK 的结构特征

TNIK 是一种属于生发中心激酶 (germinal center kinase, GCK) 的丝氨酸/苏氨酸激酶^[8]。就结构而言, TNIK 由 1 360 个氨基酸组成, 包含一个 N 端激酶结构域 (图 1), 一个中间结构域和一个 C 末端区域 (又称为 citron 同源结构域, CNH)。TNIK 的中间结构域与 Traf2 的 Traf 结构域相互作用。TNIK 的中间结构域可通过选择性地剪接, 使其分成了 8 个不同的亚型, 然而亚型之间的功能差异尚不清楚^[1]。与其他 GCK 激酶类似, CNH 区域能激活 c-Jun N-terminal kinase (JNK) 通路。CNH 区域还能特异性与 Rap2 发生相互作用, 参与肌动蛋白细胞骨架的调节^[9]。与其他蛋白激酶相同, TNIK 的激酶结构域含有 ATP 结合位点, 这个结合位点成为了小分子抑制剂作用位点。

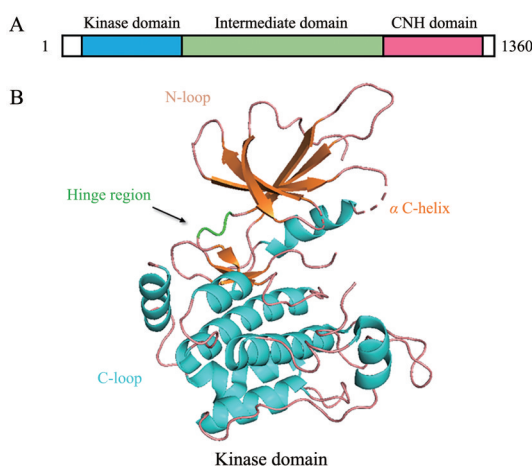


Figure 1 Structure of Traf2- and Nck-interacting kinase (TNIK). A: Domain organization of TNIK; B: Crystal structure of the kinase domain of human TNIK (PDB: 5CWZ)

迄今为止, 所有已报道的 TNIK 抑制剂都是靶向激酶结构域的 ATP 结合位点的竞争性抑制剂。对不同种抑制剂的晶体复合物结构进行分析发现, TNIK 抑制

剂与 TNIK 激酶区域的结合存在两种不同构象, 一种是闭合的活性构象, 另一种是开放的非活性构象^[8]。

1.2 TNIK 与肿瘤

研究发现, TNIK 的过度表达不仅参与了肌动蛋白细胞骨架的调节, 而且还激活了如 Wnt、JNK、NF- κ B 等^[4,10,11]多种信号通路。TNIK 不仅与多种肿瘤如结肠直肠癌、胃癌、胰腺癌等的发生发展具有密切的关系, 对肿瘤的预后也有一定的影响。与此同时, 在 TNIK 高表达的肺鳞癌 LK2 和 NCI-H520 细胞模型中, 靶向诱导 TNIK shRNA 后, 细胞在三维细胞培养基中显示出明显的生长抑制。因此, TNIK 是肿瘤治疗的一个潜在重要靶点。

1.2.1 TNIK 参与 Wnt/ β -catenin 通路调控与肿瘤的关系 上皮细胞-间充质转化 (EMT) 是上皮细胞在胚胎发生、发育、伤口愈合、器官纤维化和癌症转移过程中获得间充质细胞特征所经历的复杂变化过程。转化生长因子- β (TGF- β) 是癌细胞中触发 EMT 的最主要细胞因子。Smad 与 Wnt/ β -catenin 通路之间的相互依赖关系已经被证实, TGF- β 通过 Smad 和 Wnt/ β -catenin 信号通路之间的级联来触发 EMT^[12]。通过对 Wnt/ β -catenin 通路的关键因子 TNIK 的抑制来调控肿瘤细胞 EMT 的相关研究已有报道^[13,14]。

Wnt 信号通路异常是驱动结肠直肠癌发生发展的主要因素^[15]。2009 年, Mahmoudi 等^[4]发现 TNIK 是 TCF-4 和 β -catenin 组成的转录复合物的重要共激活因子。Wnt 通路未激活时, 细胞内的 β -catenin 将被由膜表面受体蛋白 Frizzled (FZD) 和 LRP5/6, 以及 Axin、APC、糖原合成酶激酶 3 (GSK3) 和酪蛋白激酶 1 α (CK1 α) 等组成的 β -catenin 降解复合物通过泛素蛋白酶体系统降解 (图 2, 左)。Wnt 信号与膜表面受体蛋白 Frizzled (FZD) 和 LRP5/6 结合激活通路, 引起降解复合物破坏, 进而 β -catenin 积累并移位进入细胞核, 此时 TNIK 以 β -catenin 依赖的方式被招募, 与 TCF-4 和 β -catenin 组成的转录复合物直接结合, 并磷酸化 TCF-4 的 154 位丝氨酸, 进而诱导 Wnt 靶基因的转录。90% 的结肠癌细胞中存在两个主要的突变基因: 腺瘤性结肠息肉病基因 (APC) 和 CTNNB1 基因^[16], 其中 APC 基因突变占 80%^[17]。当 APC 发生突变失活后, 降解复合体无法形成, β -catenin 移位至细胞核内产生堆积, 进一步与转录因子-4 (TCF-4) 及一系列共激活因子 (如 CBP/P300, Brg1, Pygopus/Bcl9 复合物等^[18-20]) 组成转录复合物激活下游基因的表达 (图 2, 右)。由于 APC 的高频突变引起降解复合体无法形成, 造成信号截断并导致靶向 APC 上游靶点的治疗效果大大降低, 因此作为通路最下游的效应因子 TNIK 成为了结肠直肠癌最有潜力的治疗

靶点^[21]。目前结直肠癌的治疗以手术和放化疗为主^[22], 靶向治疗仍然具有较大的挑战。研究发现, TNIK 还对结直肠癌的预后有着较大的影响^[23]。TNIK 蛋白表达与临床病理特征之间存在显著相关性, 高 TNIK 表达是 II 期和 III 期结直肠癌术后复发的重要预后因素。

滑膜肉瘤 (synovial sarcomas, SS) 是一种罕见的侵袭性肿瘤, 占软组织肉瘤的 10%~20%^[24], 该疾病经常对细胞毒性药物产生耐药性。研究证明, Wnt/ β -catenin 信号通路的失调与滑膜肉瘤发生发展密切相关^[25]。常见 β -catenin 在滑膜肉瘤细胞核积累, 并观察到细胞过表达 Wnt 通路靶基因的产物, 如 AXIN2、DKK1、c-MYC 和 CyclinD1 等^[26]。因此, 靶向 Wnt/ β -catenin 信号通路具有治疗滑膜肉瘤的潜力。2020 年, Sekita 等^[27]在部分滑膜肉瘤细胞中检测到 Wnt/ β -catenin 信号的激活, 而敲低 TNIK 对 Wnt/ β -catenin 激活的滑膜肉瘤细胞产生了强烈的生长抑制, 并能诱导细胞凋亡, 通过对 TNIK 进行药理抑制同样得到了类似的结果, 这为滑膜肉瘤的靶向治疗提供了重要的指导。

1.2.2 TNIK 参与 JNK、PI3K 等通路调控与肿瘤的关系 2014 年, TNIK 被鉴定为胃癌中的扩增基因。研究发现胃癌中扩增的 TNIK 独立于 Wnt 信号通路, 参与调控 PI3K/AKT 信号通路来促进胃癌细胞的增殖, 但 TNIK 抑制剂抑制 AKT 磷酸化的抑制机制尚不清楚, 同时还发现 TNIK 对细胞自噬具有保护作用^[28]。

2018 年, Li 等^[29]通过 RNAi 结合 RNA-seq 和 MS 分析研究发现, TNIK 在三阴性乳腺癌细胞 (triple negative breast cancer cells, TNBC) 中受转录辅激活因子 WBP2 的正调控。WBP2 可上调 TNIK 和 GPS1 的表达从而启动 Wnt 信号通路, 通过整合 JNK 和 Wnt 信号, 促进 TNBC 细胞的生长。Sato 等^[30]发现了一种多靶点的抑制剂 108600, 可以同时抑制 CK2/TNIK/DYRK1 三种激酶产生

抑制, 对 TNBC 干细胞的生长具有明显的抑制并且能克服其化疗耐药性, 这为改善患者的预后治疗提供了重要的参考意义。

肺鳞癌 (lung squamous cell carcinoma, LSCC) 占肺癌的 30% 左右, 由于肺鳞癌细胞缺乏如 EGFR 等敏感基因的突变 (约 5%), 目前 LSCC 没有靶向药物。2020 年, Torres-Ayuso 等^[31]报道, 约 50% 的肺鳞癌细胞中存在 TNIK 基因的扩增, 发现 TNIK 可对 Merlin 蛋白进行多个位点的磷酸化, 进而激活下游的粘着斑激酶 (FAK)。通过对 TNIK 小分子抑制剂的研究发现, NCB-0846 可显著抑制肿瘤生长, 并提出了 TNIK 的催化活性是维持 LSCC 细胞生长的必要条件。由此可见, TNIK 是肺鳞癌的靶向治疗的一个极具前景的靶点。

2021 年, Hirozane 等^[32]报道了 TNIK 在骨肉瘤 (osteosarcoma, OS) 细胞中高表达, 并通过对代谢组学的分析, 发现对 TNIK 进行药理抑制后诱导了 OS 肿瘤细胞明显的代谢变化, 肿瘤细胞由正常的有氧糖酵解转为偏向于氧化磷酸化的代谢重编程来促进脂质的生成。OS 细胞经抑制剂处理后, 脂质生成相关的因子表达升高, 同时, TNIK 和与脂肪细胞有关的 PARP γ 存在互作的关系。

2019 年, Lee 等^[33]开发了一个基于质谱的基因组分析平台确认了 TNIK 是前列腺癌的潜在治疗靶点。

尽管 TNIK 干预诸多肿瘤发生、发展和预后的具体机制目前尚不清楚, 但目前研究表明 TNIK 对肿瘤的发生发展中起着至关重要的作用, 并对其预后产生负面影响, 而抑制 TNIK 能显著地抑制肿瘤的生长和改善预后。因此, 开发 TNIK 小分子抑制剂不仅能提供探索 TNIK 在肿瘤发生发展中的作用机制的工具化合物, 而且对 TNIK 相关肿瘤的靶向治疗具有深远的意义。

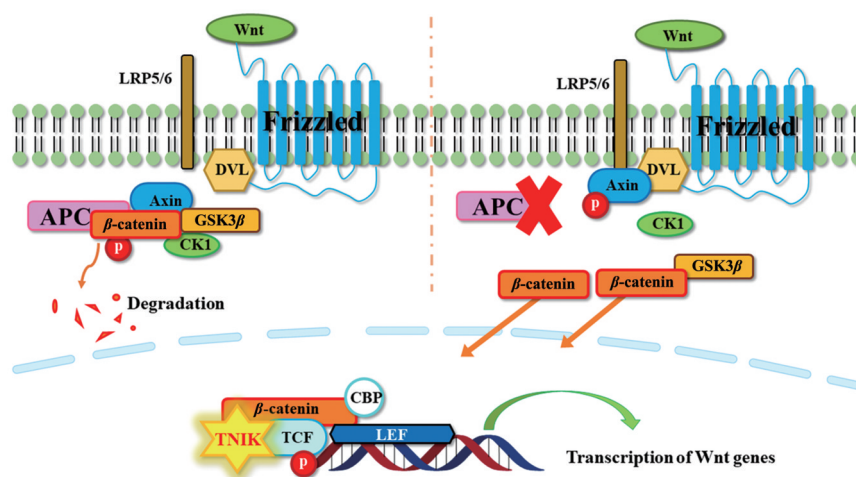


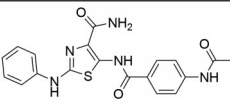
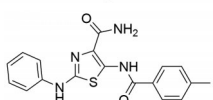
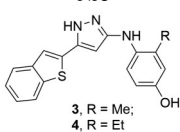
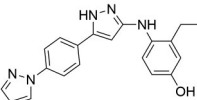
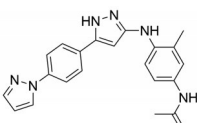
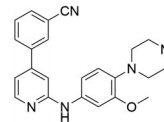
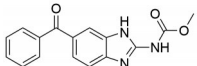
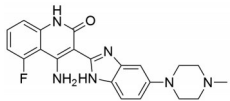
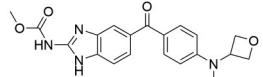
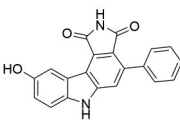
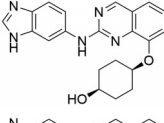
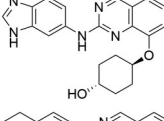
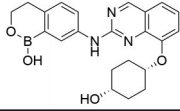
Figure 2 Wnt/ β -catenin signaling pathway and the function of TNIK

2 TNIK小分子抑制剂研究进展

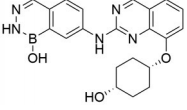
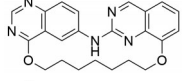
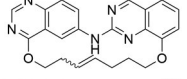
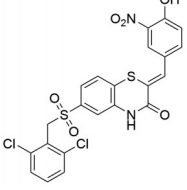
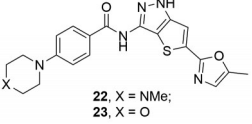
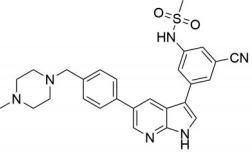
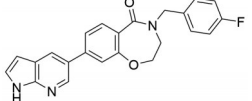
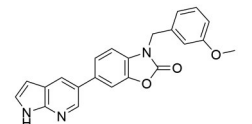
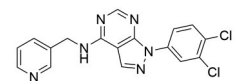
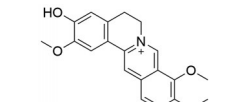
如前所述, TNIK成为诸多肿瘤治疗的一个具有潜力的新靶点, 吸引了药物化学家们的极大兴趣, 过去十年已有30多个小分子抑制剂报道, 均处于临床前研究

阶段(表1)。根据与TNIK的ATP结合位点的化合物母核结构特点, 可将抑制剂分为单杂环类、苯并杂环类和稠杂环类。本文将从小分子发现策略、构效分析等方面分析TNIK小分子抑制剂研发状况。

Table 1 Representative small molecule TNIK inhibitors. NA: Not available; CRC: Colorectal cancer; NSCLC: Non-small cell lung cancer; MM: Multiple myeloma

Name (Number)	Target	Chemical structure	IC ₅₀ /nmol·L ⁻¹	Indication
NCB-0001 (1)	TNIK		8.6	CRC
KY-05009 (2)	TNIK		9	CRC
N5355	TNIK	NA	3	CRC
3, 4	TNIK		100, 200	CRC
TNK-002 (5)	TNIK		28	CRC
TNK-007 (6)	TNIK		40	CRC
9	TNIK		6	CRC
Mebendazole (10)	TNIK		NA	CRC, NSCLC
Dovitinib (11)	FGFR, VEGF, TNIK		K _i = 13 nmol·L ⁻¹	MM
OBD9 (12)	TNIK		< 1 μmol·L ⁻¹	CRC
PD407824 (13)	Chk1, Wee1A, TNIK		0.7	NA
NCB-0846 (14)	TNIK		21	CRC
NCB-0970 (15)	TNIK		272	CRC
16	TNIK		≤ 10	NA

Continued

Name (Number)	Target	Chemical structure	IC ₅₀ /nmol·L ⁻¹	Indication
17	TNIK		≤ 10	NA
18	TNIK		≤ 10	NA
19	TNIK		≤ 10	NA
ON 108600 (22)	CK2/TNIK		5	NA
23, 24	TNIK		48, 49	NA
27	TNIK		0.13	CRC
29	TNIK		26 ± 8	CRC
32	TNIK		50 ± 6	CRC
33	TNIK		30.12 ± 0.55	NA
Jatrorrhizin (34)	TNIK		NA	CRC

2.1 单杂环母核小分子抑制剂

2.1.1 五元杂环母核小分子抑制剂 2013年, Uno等^[34]对一个含有10 000个靶向激酶的化合物库进行高通量筛选, 针对人重组TNIK, 鉴定得到了一系列噻唑类TNIK抑制剂, 对这些化合物进行优化, 得到了苗头化合物NCB-0001 (1, IC₅₀ = 8.6 nmol·L⁻¹, 图3, 表1)。以NCB-0001的氨基噻唑结构为基础, 进一步优化得到了一个强效的先导化合物N1662, 随后优化得到了高选择性的TNIK抑制剂N5355 (结构暂未披露), IC₅₀ = 3 nmol·L⁻¹^[35]。N5355通过抑制Wnt信号显著抑制结肠癌细胞增殖, 下调Wnt靶基因AXIN2的表达

且未改变非活性Wnt癌细胞中AXIN2的表达水平。此外, 用N5355处理TGF-β1刺激的癌细胞可抑制肿瘤细胞迁移, 这表明N5355还具有抑制肿瘤转移的潜力。

2014年, Kim等^[36]在研究人肺腺癌A549细胞中

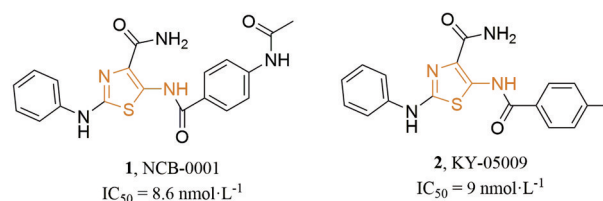


Figure 3 The structures of NCB-0001 and KY-05009

TGF- β 1介导的上皮-间充质转化(EMT)过程中,发现KY-05009 (**2**, $IC_{50} = 9 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)对TGF- β 1介导的EMT具有良好的抑制作用(图3)。分子对接显示, KY-05009噻唑母核上的氮和苯氨基上的氢与铰链区的Cys108存在两个氢键相互作用,这种氢键作用是KY-05009抑制TNIK作用的关键因素;噻唑和苯甲酰胺与Leu160和Val170具有CH/ π 相互作用;苯环位于Val31和Gly111之间,稳定了CH/ π 相互作用的结合模式(图4)。KY-05009并不抑制核TNIK蛋白水平的增加,但抑制了TNIK与TCF4的结合。由于EMT是多条信号通路作用的结果,抑制参与EMT过程的分子的功能可以控制肿瘤的转移。因此,推测KY-05009对TNIK的抑制可能是通过抑制下游Smad和非Smad信号通路,包括Wnt、NF- κ B和MAP激酶通路等。

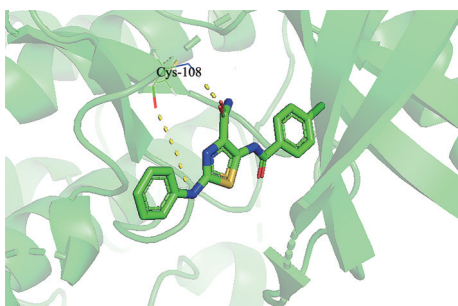


Figure 4 The modeling studies of KY-05009 based on TNIK crystal structure (PDB: 2X7F)

2019年,Chang等^[37]在专利中报道了一系列含3-氨基-5-苯基吡唑的化合物,其中代表性的化合物如**3**和**4**(图5),对SW620细胞的抑制活性 IC_{50} 分别为100和200 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。从结构上来说,跟噻唑类TNIK抑制剂不同的是中间的核心结构由噻唑更换为吡唑,同时保留了能与Cys108形成氢键的仲胺结构。

Van等^[38]于2022年在其专利中同样报道了一系列含有吡唑母核的衍生物,如TNK-002 (**5**)和TNK-007 (**6**)(图5)。 IC_{50} 分别为28和40 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.1.2 六元杂环母核小分子抑制剂 六元杂环母核的TNIK抑制剂报道相对较少。2013年,Ho等^[39]通过高通量筛选得到的苗头化合物**7** ($IC_{50} = 65 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $S(50) = 56\%$) [$S(50)$ 表示在1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下,对118个

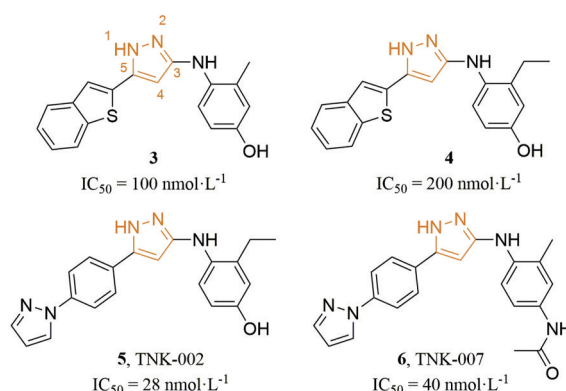


Figure 5 Aminopyrazole-containing TNIK inhibitors

激酶中抑制达50%及以上的激酶所占百分比]。为了提高选择性,将噻唑通过骨架跃迁获得吡唑衍生物**8** ($IC_{50} = 290 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$),尽管活性降低约80%,但对TNIK的选择性却提高。进一步对氨基吡唑进行优化得到了化合物**9**,其对TNIK的活性 ($IC_{50} = 6 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)和选择性 [$S(50) = 5.1\%$]均得到改善(图6)。分子模拟发现,化合物**7**和**9**的母核有共同的结合模式,即氨基吡唑和氨基吡唑都能跟铰链区Phe107酰胺键的NH和Cys108的羰基形成氢键。不同的是,化合物**9**的氰基直接连在苯环上,结构比较固定,不会与TNIK催化位点的Lys154形成氢键。氰基的位置使得化合物**9**的吡唑环和苯环能够与氨基酸残基Met105、Val170和Ala83结合更紧密,并产生额外的疏水相互作用(图7)。因此,化合物**9**的活性更强,选择性更高。

在对细胞活性的测试中发现,这一系列化合物虽然表现出对TNIK的强效抑制(IC_{50} 为纳摩尔水平),但是对TCF4/ β -catenin复合物激活引起的Wnt信号靶基因的转录并没有出现理想的抑制效果。进一步研究发现,相对于对Wnt信号通路的激酶活性,TNIK其他方面的功能可能更重要,例如在稳定TCF4/ β -catenin转录复合物中的作用。

2.2 苯并杂环母核小分子抑制剂

2.2.1 苯并五元杂环母核小分子抑制剂 2016年,Tan等^[40]采用比较分子相似因子分析(comparative molecular similarity indices analysis, CoMSIA)和分子

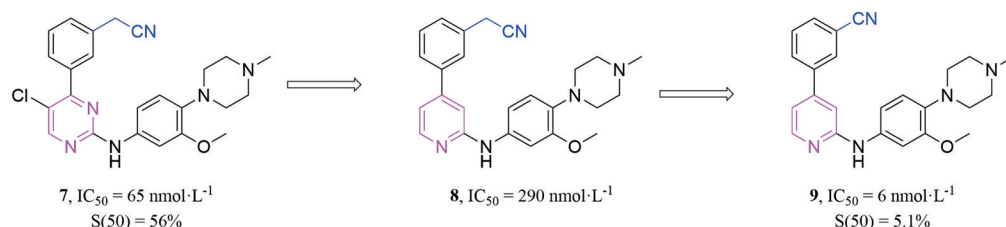


Figure 6 The structures of aminopyridine-containing TNIK inhibitors

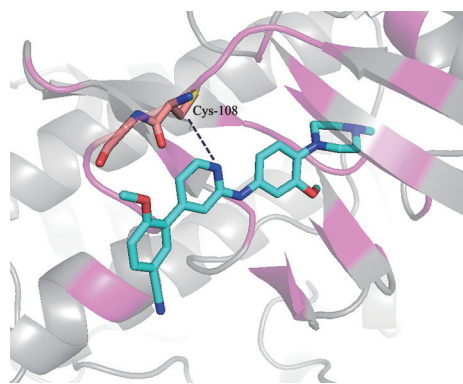


Figure 7 The modeling studies of **9** based on TNIK crystal structure (PDB: 2X7F)

对接工具,对Uno等^[34]报道的氨基噻唑 TNIK 抑制剂进行了药效团解析,并对1 448种FDA已批准上市的小分子药物进行了筛选评估,发现驱虫药甲苯达唑(mebendazole, **10**,图8)在 $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的浓度下可以选择性抑制91.8%的TNIK。与其他激酶相比,甲苯达唑对TNIK显示出较高的选择性。通过细胞实验发现,甲苯达唑对 β -catenin激活的结肠癌和非小细胞肺癌细胞系表现出强大的细胞毒性,这可能为结直肠癌和非小细胞肺癌的治疗提供了新的选择。

2016年,Chon等^[41]发现酪氨酸激酶抑制剂多韦替尼(dovitinib, **11**,图8)能够显著抑制TNIK与ATP($K_i = 13\ \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)的相互作用以及Wnt信号通路的效应因子,如 β -catenin和TCF4的激活。研究还发现TNIK在多发性骨髓瘤IM-9细胞中高表达,在其他的血液瘤细胞中表达量相对较低。分子对接显示,多韦替尼在TNIK的铰链区与E106和C108有三种氢键相互作用,这是其抑制TNIK的关键。进一步研究发现多韦替尼与TNIK的ATP口袋结合,抑制其激酶活性,进而影响IM-9细胞的增殖。该研究首次揭示了TNIK的内源性调控与多发性骨髓瘤细胞的增殖有关。2017年,Lee等^[42]通过进一步研究发现,TNIK小分子抑制剂KY-05009与多韦替尼联用,协同抑制白介素-6(IL-6)诱导的多发性骨髓瘤(MM)细胞的增殖,诱导细胞凋亡。

OBD9(**12**,图8)是苯并咪唑类化合物甲苯达唑的环氧丙烷衍生物,OBD9是基于甲苯达唑筛选得到的强效抗结直肠癌小分子,对HCT116和SW620两种细胞系在 $1\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度时已展现出较强的细胞毒性(细胞活力 $< 50\%$),同时其改善了甲苯达唑溶解度较差的缺点,溶解度增加了100倍。OBD9还展现了良好的药代动力学性质,对小鼠进行口服给药($15\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),血浆浓度在1 h达到顶峰,药物消除缓慢,在8~24 h仍能检测到,口服生物利用度为73.1%。在观察到OBD9

对TNIK的催化活性并未产生强效抑制后,进一步研究发现OBD9介导TNIK的自噬降解抑制结直肠癌,在小鼠的肿瘤异种移植模型中,OBD9也表现出了良好的体内活性和安全性^[43]。

Masuda等^[6]发现化合物PD407824(**13**,图8)对TNIK具有很强的抑制活性($\text{IC}_{50} = 0.7\ \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)。对PD407824与TNIK的晶体复合物(PDB: 2X7F)分析发现,琥珀酰亚胺基团与铰链区的Cys108酰胺的N-H和Glu106的羧基O之间分别形成氢键。此外,酚羟基与Cys108的主碳链上的羰基也存在氢键作用(图9)。

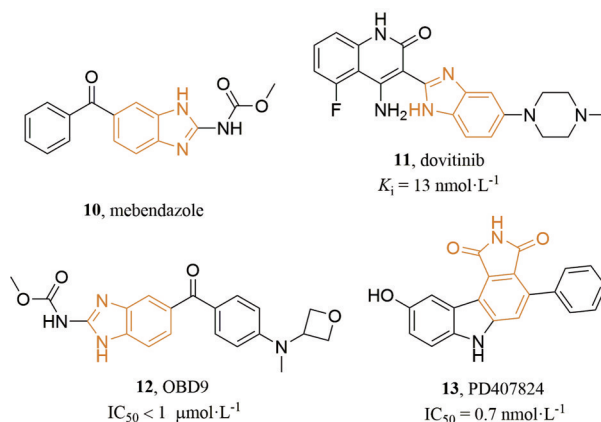


Figure 8 Chemical structures of TNIK inhibitors bearing benzo fused 5-membered ring

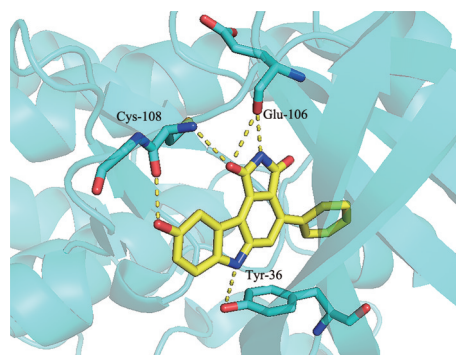


Figure 9 The crystal structures of PD407824-bound TNIK (PDB: 2X7F)

2.2.2 苯并六元杂环母核小分子抑制剂 2016年,Masuda等^[44]通过筛选并进行结构优化得到的TNIK小分子抑制剂NCB-0846(**14**, $\text{IC}_{50} = 21\ \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)与其对映体NCB-0970(**15**, $\text{IC}_{50} = 272\ \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$),两者活性相差10倍,原因在于NCB-0846环己二醇的羟基能与Gln157主碳链上的羰基形成氢键,而非对映异构体NCB-0970上的羟基却削弱了这种氢键作用(图10和11)。对结合和未结合配体的TNIK激酶结构域研究发现,NCB-0846结合的TNIK处于非活性构象(DFG-out),而具有4-苯基-2-苯氨基吡啶母核类化合物如化合物**7~9**结合

的 TNIK 处于活性构象 (DFG-in)。这解释了 4-苯基-2-苯氨基吡啶母核类化合物能抑制 TNIK 的酶活性, 但是对 Wnt 信号通路的抑制却很弱的原因。因此, 简单通过一个小分子来占据 ATP 结构域不足以完全抑制 TNIK 的功能。通过用 NCB-0846 处理来源于原发性结直肠癌患者, 直接培养的肿瘤球状体, NCB-0846 能显著抑制球状体的体外生长。NCB-0846 在动物实验中所展现的抗肿瘤效果也十分理想。口服 NCB-0846 对人源的结直肠癌异种移植模型小鼠的肿瘤生长产生了强烈的抑制, 其抑制效果与 TNIK 的 shRNA (small-hairpin RNA) 组相当。研究还发现 NCB-0846 的选择性较差, 能同时靶向多个激酶如 FLT3、JAK3 等, 因此开发高选择性 TNIK 抑制剂是一个重要的研究方向。

2021 年, Buchl 等^[45]发现 TNIK 作为抗肝纤维化的

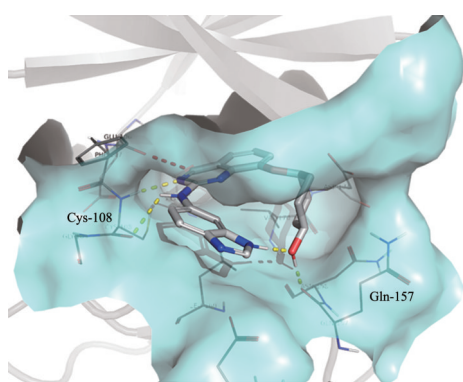


Figure 10 The crystal structure of NCB-0846-bound TNIK-KDs (PDB: 5D7A)

潜在靶点。采用 NCB-0846 处理四氯化碳诱导肝纤维化的小鼠, 对全肝 mRNA 的 qPCR 分析显示, NCB-0846 处理后, 四氯化碳的诱导作用消失。数据表示, 抑制 TNIK 的激酶活性可以抑制小鼠肝纤维的生成。

2023 年, Wang 等^[46]报道了 TNIK 小分子抑制剂 NCB-0846 用于癫痫治疗的研究。研究发现, TNIK 在颞叶性癫痫患者和癫痫大鼠模型中高表达。在癫痫大鼠模型中采用 NCB-0846 处理后, 可以明显延迟神经元的放电, 降低癫痫的危害程度。诸多数据表明, TNIK 可能是癫痫治疗的潜力靶点, 但 TNIK 参与癫痫的发病机制有待进一步研究。

2019 年, Coburn 等^[47]在专利中报道了一系列对 TNIK 有较好的抑制活性的苯并咪唑类衍生物, 代表化合物为 **16~19** (图 11)。其中 **18** 和 **19** 为环状化合物, 对 TNIK 的半数抑制浓度均在纳摩尔水平。专利还报道了一系列 PROTAC 分子 (如 **20**、**21**), 但未披露其对 TNIK 的降解活性。

2021 年, Sato 等^[30]报道了多激酶抑制剂 ON108600 (**22**) 同时抑制 CK2/TNIK/DYRK1 (TNIK $IC_{50} = 5 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 来抑制紫杉醇耐药的 TNBC 细胞的生长与存活。研究结果表明, ON108600 的多重抑制可能是克服 TNBC 紫杉醇耐药的有效途径 (图 12)。

2.3 稠杂环母核的小分子抑制剂

2.3.1 五元并五元杂环母核小分子抑制剂 2016 年, Choi 等^[48]对 TNIK、IKKE 和 TBKI 进行筛选时发现一

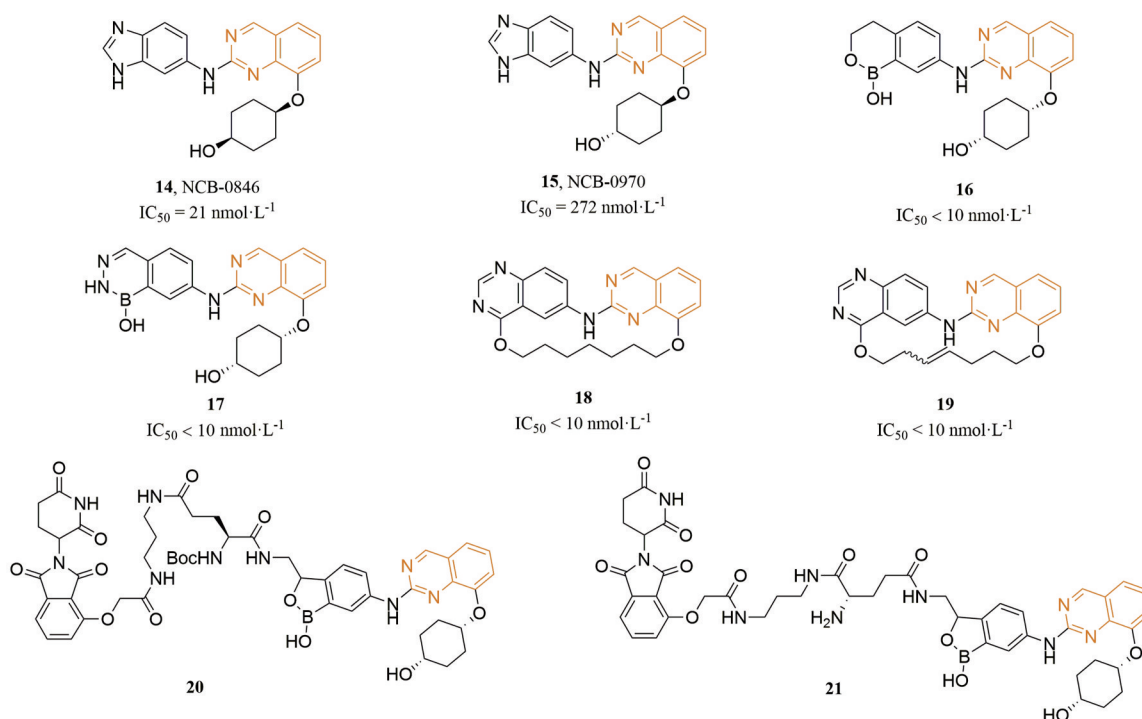


Figure 11 Chemical structures of TNIK inhibitors and PROTACs bearing benzopyrimidine

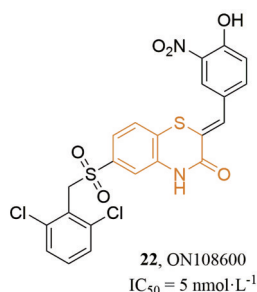


Figure 12 Benzothiazone-containing TNIK inhibitor

系列吡唑衍生物, 如化合物 **23** ($IC_{50} = 48 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和 **24** ($IC_{50} = 49 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 对 TNIK 具有很强的抑制活性 (图 13)。同时, 这些化合物对激酶 TBKI 和 IKKE 也展现出较好的抑制活性 (细胞抑制活性未披露)。

2.3.2 五元并六元杂环母核小分子抑制剂 2021年, Yang 等^[49]通过对一个自建的蛋白激酶抑制剂化合物库进行筛选, 发现含 1H-吡咯[2,3-*b*]吡啶骨架的化合物 **25** 对 TNIK 有很显著的抑制作用, IC_{50} 为 $9.2 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。分子对接结果表明, 两个芳香环 Ar1 (左) 和 Ar2 (右) 分别指向溶剂区和后口袋。后续修饰主要集中于两个芳香环。在 Ar2 间位引入氰基得到了化合物 **26**, 其活性显著增加, 继续对化合物 **26** 进行对接研究, 氰基指向结构化的水分子, 进一步与 Glu69 和 Phe172 残基形

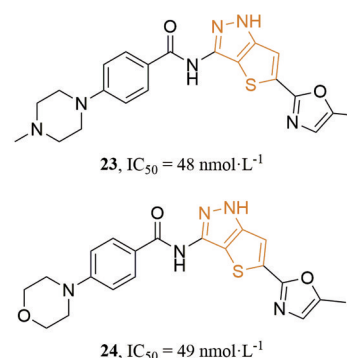
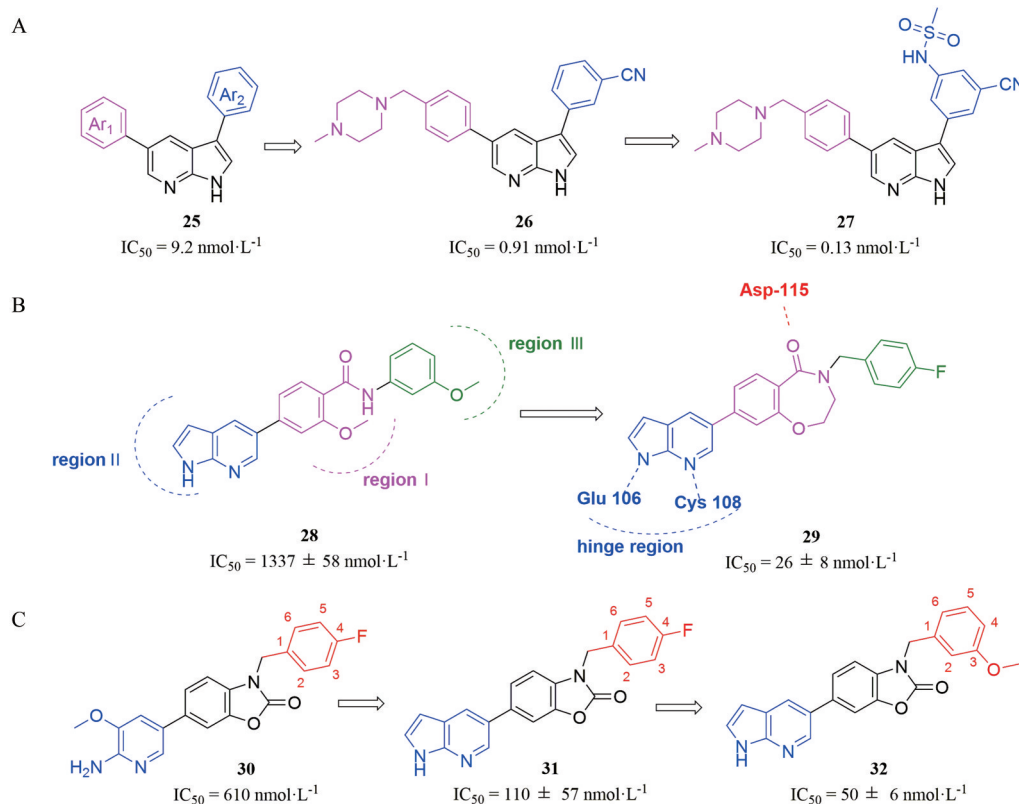


Figure 13 Thiophenopyrazole-containing TNIK inhibitors

成氢键作用。在另一个间位位点引入甲磺酰胺基团得到化合物 **27**, 进一步增强了对 TNIK 的抑制 (图 14A)。

2022年, Li 等^[50]报道了一系列具有 3,4-二氢-1,4-苯并氧氮杂卓-5(2*H*)-酮的新结构 TNIK 抑制剂。研究团队首先通过虚拟筛选得到了苗头化合物 **28**, $IC_{50} = 1337 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。紧接着, 对该化合物的苯甲酰胺 (区域 I)、氮杂吡啶 (区域 II) 和甲氧基苯 (区域 III) 三个区域分别进行结构优化, 最终得到活性最好的化合物 **29** ($IC_{50} = 26 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 图 14B)。对化合物 **29** 和 TNIK 结合的结构进行分析发现, 其活性最佳的原因在于 **29** 的 7-氮杂吡啶与铰链区残基 Cys108 和 Glu106 分别形

Figure 14 Chemical structures of TNIK inhibitors containing 1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]-pyridine. A: The optimization of **25**; B: The cyclization strategy of **29**; C: The optimization of **30**

成氢键作用。**29**中的羰基氧与 Asp115 形成另一个氢键。值得一提的是,七元环也限制了4-氟苯基的取向,使其延伸到由残基 Ala110、Ile306 和 Leu116 组成的疏水口袋中。随后采用小鼠 HCT116 异种移植模型进行体内活性测试,发现当剂量为 $150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时,肿瘤生长受到显著抑制,在给药期间,没有观察到明显的体重减轻。进一步的动物实验中发现 **29** 的半衰期 ($t_{1/2}$) 为 $5.56 \pm 2.92 \text{ h}$ 且具有良好的生物利用度,为 $50.41\% \pm 18.13\%$,这表明 **29** 具有良好的药代动力学特性,是一个安全高选择性的 TNIK 小分子抑制剂。

随后, Luo 等^[51]在虚拟筛选过程中还发现了一系列苯并[d]恶唑-2(3H)-酮衍生物类 TNIK 小分子抑制剂。苗头化合物 **30** 对 TNIK 的抑制活性为 $\text{IC}_{50} = 610 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。对苗头化合物 **30** 的铰链区和疏水区进行了进一步的结构优化,发现 1H-吡咯[2,3-b]吡啶为铰链区的最佳选择 (**31**),其次将4位取代的氟优化为3位取代的甲氧基苯基得到 **32**, $\text{IC}_{50} = 50 \pm 6 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (图 14C)。对接结果显示, **32** 占据了 TNIK 的 ATP 结合位点,并且氮杂吡啶与 TNIK 上的 Cys108 和 Glu106 分别形成氢键。不同的是 **32** 上的苯并恶唑和氮杂吡啶分别跟 Phe107 形成了 π - π 相互作用。**32** 上的3-甲氧基苯基不仅占据了疏水口袋,甲氧基还与 Gly109、Glu163 和 Ile306 形成了疏水相互作用。体外细胞实验发现 **32** 对结肠癌细胞 HCT116 表现出一定的抑制活性, $\text{IC}_{50} = 4997 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$,且具有一定的选择性。**32** 具有很强的抑制 HCT116 细胞体外迁移能力,且以浓度依赖的方式抑制细胞核中 β -catenin 和 TCF-4 的蛋白水平,即抑制 Wnt 信号通路。

2020 年, Arokiaraj 等^[52]通过高通量虚拟筛选 TNIK 的抑制剂,发现了6个含吡唑并嘧啶或嘧啶母核结构的潜在苗头化合物,通过密度泛函理论 (density functional theory, DFT) 和分子动力学 (molecular dynamics, MD) 模拟等相关计算研究了6个分子的结合效果和结构稳定性。根据结果和评分发现,苗头化合物 **33** (图 15) 对 TNIK 蛋白有很高的结合亲和力和相互作用模式,其对 TNIK 的抑制均高于对照且效果良好, IC_{50} 为 $30.12 \pm 0.55 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.3.3 六元并六元杂环母核小分子抑制剂 中药活性成分药根碱 (jatrorrhizin, **34**) 于 2019 年被报道可以抑

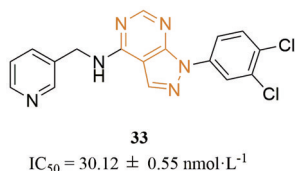


Figure 15 1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidine-containing TNIK inhibitor

制 TNIK 从而达到抑制乳腺癌细胞的增殖 (图 16)^[53]。研究表明,药根碱靶向 TNIK 可以同时有效抑制乳腺癌细胞中 Wnt/ β -catenin 信号通路和 EMT 的表达,从而达到抑制肿瘤细胞的扩增和转移,可能为乳腺癌治疗提供了新方法。

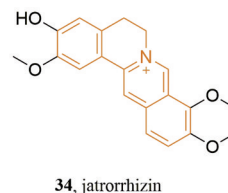


Figure 16 Inhibitor of TNIK based the tetrahydroisoquinoline alkaloid

3 总结与展望

截至目前,已经报道了 30 多个具有多种骨架结构的 TNIK 小分子抑制剂。从小分子抑制剂和 TNIK 结合的晶体结构来看,小分子抑制剂主要结合在 ATP 结合口袋。从结构上,要发挥显著的抑制活性,小分子抑制剂中需具备这样的结构特性,即能与 TNIK 铰链区中的关键氨基酸残基如 Cys108、Glu106、Phe107 等形成氢键或者 π - π 相互作用。此外,结构中还应该具有合适的基团,能够很好地占据 TNIK 的疏水口袋。已报道的各类化合物中活性最强的是 PD407824, IC_{50} 达到了亚纳摩尔级别,但是尚没有化合物进入临床试验,主要原因可能是由于严重的脱靶效应、选择性差和药代动力学性能不适合,同时,鉴于 TNIK 的生物学功能正在被不断探索拓展。因此,提高化合物对 TNIK 的靶向选择性将是小分子抑制剂研发的重要方向。

虽然很多 TNIK 抑制剂在体外实验中显示出很好的抑制活性,但对 Wnt 及相关通路却没有产生抑制。这也可能是 TNIK 小分子抑制剂在动物水平未观察到良好的抗肿瘤效果的一个主要原因。总的来说, TNIK 的生物学功能还有很多未知的地方。

为了开发在临床上具有应用价值的 TNIK 抑制剂,以下几个方向值得进行探索: ① TNIK 的生物学功能以及在各种通路中具体的作用目前还不是很清楚, TNIK 的生物学功能需进一步挖掘; ② 以 TNIK 与 ATP 结合的位点作为小分子抑制剂的结合口袋还需进一步优化,并发展以 TNIK 结构中其他未知的结合口袋 (如变构位点) 为结合位点的抑制剂; ③ 目前肿瘤的临床治疗越来越多地趋向于多种不同治疗策略的联合使用,联合 TNIK 小分子抑制剂的治疗探索目前几乎是空白,未来可能需要更多的关注,例如与免疫治疗的联合,已有研究证明 TNIK 能增强免疫细胞的响应^[54]; ④ 新技术的

应用方面, 蛋白降解靶向嵌合体 (proteolysis targeting chimera, PROTAC) 技术也是颇具潜力的抗肿瘤治疗方向, 尽管 PROTAC 存在分子量较大、透膜性较差等诸多缺点, 但其在 TNIK 上的应用价值仍然值得探索。目前已有专利报道相关 PROTAC 的合成, 但活性数据暂未披露, 相信在将来会有更多的 PROTAC 分子被研发, 以此验证 PROTAC 在 TNIK 领域内的应用前景。

不论是 TNIK 生物机制的探索, 还是小分子抑制剂或降解剂的开发, 都在不断推进人们对 TNIK 的认识, TNIK 有望成为人类抗肿瘤的漫漫长路中的又一希望。

作者贡献: 陈梦销撰写全文及绘制图表; 何毅和聂神有提供综述的全文思路和结构; 所有作者共同参与了文章的撰写及修改。

利益冲突: 本文作者声明没有利益冲突。

References

- [1] Fu CA, Shen M, Huang BCB, et al. TNIK, a novel member of the germinal center kinase family [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274: 30729-30737.
- [2] Wang Q, Amato SP, Rubitski DM, et al. Identification of phosphorylation consensus sequences and endogenous neuronal substrates of the psychiatric risk kinase TNIK [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2016, 356: 410-423.
- [3] Nie F, Zhang M, Shang S, et al. Methylome-wide association study of first-episode schizophrenia reveals a hypermethylated CpG site in the promoter region of the TNIK susceptibility gene [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2021, 106: 110081-110092.
- [4] Mahmoudi T, Li VS, Ng SS, et al. The kinase TNIK is an essential activator of Wnt target genes [J]. *EMBO J*, 2009, 28: 3329-3340.
- [5] Palmer BD, Thompson AM, Booth RJ, et al. 4-Phenylpyrrolo [3,4-c]carbazole-1,3(2H,6H)-dione inhibitors of the checkpoint kinase Wee1 structure-activity relationships for chromophore modification and phenyl ring substitution [J]. *J Med Chem*, 2006, 49: 4896-4911.
- [6] Masuda M, Sawa M, Yamada T. Therapeutic targets in the Wnt signaling pathway: feasibility of targeting TNIK in colorectal cancer [J]. *Pharmacol Ther*, 2015, 156: 1-9.
- [7] Yamada T, Masuda M. Emergence of TNIK inhibitors in cancer therapeutics [J]. *Cancer Sci*, 2017, 108: 818-823.
- [8] Kukimoto-Niino M, Shirouzu M, Yamada T. Structural insight into TNIK inhibition [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23: 13010-13018.
- [9] Taira K, Umikawa M, Takei K, et al. The Traf2- and Nck-interacting kinase as a putative effector of Rap2 to regulate actin cytoskeleton [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279: 49488-49496.
- [10] CHEN YR, TAN TH. The c-Jim N-terminal kinase pathway and apoptotic signaling (review) [J]. *Int J Oncol*, 2000, 16: 651-662.
- [11] Shkoda A, Town JA, Griese J, et al. The germinal center kinase TNIK is required for canonical NF- κ B and JNK signaling in B-cells by the EBV oncoprotein LMP1 and the CD40 receptor [J]. *PLoS Biol*, 2012, 10: e1001376.
- [12] Mani SA, Guo W, Liao MJ, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells [J]. *Cell*, 2008, 133: 704-715.
- [13] Sugano T, Masuda M, Takeshita F, et al. Pharmacological blockage of transforming growth factor-beta signalling by a Traf2- and Nck-interacting kinase inhibitor, NCB-0846 [J]. *Br J Cancer*, 2021, 124: 228-236.
- [14] Kaneko S, Chen X, Lu P, et al. Smad inhibition by the Ste20 kinase Misshapen [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108: 11127-11132.
- [15] Parsons MJ, Tammela T, Dow LE. Wnt as a driver and dependency in cancer [J]. *Cancer Discov*, 2021, 11: 2413-2429.
- [16] Li Z, Zhu Z, Wang Y, et al. HsamiR15a5p inhibits colon cell carcinoma *via* targeting CCND1 [J]. *Mol Med Rep*, 2021, 24: 735-742.
- [17] Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, et al. Activation of β -catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in β -catenin or APC [J]. *Science*, 1997, 275: 1787-1790.
- [18] Li J, Sutter C, Parker DS, et al. CBP/p300 are bimodal regulators of Wnt signaling [J]. *EMBO J*, 2007, 26: 2284-2294.
- [19] Sanchez-Tillo E, de Barrios O, Valls E, et al. ZEB1 and TCF4 reciprocally modulate their transcriptional activities to regulate Wnt target gene expression [J]. *Oncogene*, 2015, 34: 5760-5770.
- [20] Vafaizadeh V, Buechel D, Rubinstein N, et al. The interactions of Bcl9/Bcl9L with β -catenin and Pygopus promote breast cancer growth, invasion, and metastasis [J]. *Oncogene*, 2021, 40: 6195-6209.
- [21] Masuda M, Yamada T. The emergence of TNIK as a therapeutic target for colorectal cancer [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2017, 21: 353-355.
- [22] Dekker E, Tanis PJ, Vleugels JLA, et al. Colorectal cancer [J]. *Lancet*, 2019, 394: 1467-1480.
- [23] Takahashi H, Ishikawa T, Ishiguro M, et al. Prognostic significance of Traf2- and Nck- interacting kinase (TNIK) in colorectal cancer [J]. *BMC Cancer*, 2015, 15: 794-803.
- [24] Riedel RF, Jones RL, Italiano A, et al. Systemic anti-cancer therapy in synovial sarcoma: a systematic review [J]. *Cancers (Basel)*, 2018, 10: 417-435.
- [25] Pretto D, Barco R, Rivera J, et al. The synovial sarcoma translocation protein SYT-SSX2 recruits beta-catenin to the nucleus and associates with it in an active complex [J]. *Oncogene*, 2006, 25: 3661-3669.
- [26] Trautmann M, Sievers E, Aretz S, et al. SS18-SSX fusion protein-induced Wnt/beta-catenin signaling is a therapeutic target in synovial sarcoma [J]. *Oncogene*, 2014, 33: 5006-5016.
- [27] Sekita T, Yamada T, Kobayashi E, et al. Feasibility of targeting

- Traf2-and-Nck-interacting kinase in synovial sarcoma [J]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12: 1258-1274.
- [28] Yu DH, Zhang X, Wang H, et al. The essential role of TNIK gene amplification in gastric cancer growth [J]. *Oncogenesis*, 2014, 2: e89-e96.
- [29] Li Z, Lim SK, Liang X, et al. The transcriptional coactivator WBP2 primes triple-negative breast cancer cells for responses to Wnt signaling *via* the JNK/Jun kinase pathway [J]. *J Biol Chem*, 2018, 293: 20014-20028.
- [30] Sato K, Padgaonkar AA, Baker SJ, et al. Simultaneous CK2/TNIK/DYRK1 inhibition by 108600 suppresses triple negative breast cancer stem cells and chemotherapy-resistant disease [J]. *Nat Commun*, 2021, 12: 4671-4684.
- [31] Torres-Ayuso P, An E, Nyswaner KM, et al. TNIK is a therapeutic target in lung squamous cell carcinoma and regulates FAK activation through Merlin [J]. *Cancer Discov*, 2021, 11: 1411-1423.
- [32] Hirozane T, Masuda M, Sugano T, et al. Direct conversion of osteosarcoma to adipocytes by targeting TNIK [J]. *JCI Insight*, 2021, 6: e137245.
- [33] Lee RS, Zhang L, Berger A, et al. Characterization of the ERG-regulated kinome in prostate cancer identifies TNIK as a potential therapeutic target [J]. *Neoplasia*, 2019, 21: 389-400.
- [34] Uno Y, Moriyama H, Kashimoto S, et al. Targeting Wnt signaling: discovery and characterization of novel thiazole-based Traf2- and NCK-interacting kinase (TNIK) inhibitors [J]. *Mol Cancer Ther*, 2013, 12: B265.
- [35] Uno Y, Moriyama H, Kashimoto S, et al. A novel TNIK inhibitor, N5355 potently induced apoptotic cell death through down-regulation of Wnt signaling [J]. *Eur J Cancer*, 2016, 69: S38.
- [36] Kim J, Moon SH, Kim BT, et al. A novel aminothiazole KY-05009 with potential to inhibit Traf2- and Nck-interacting kinase (TNIK) attenuates TGF- β 1-mediated epithelial-to-mesenchymal transition in human lung adenocarcinoma A549 cells [J]. *PLoS One*, 2014, 9: e110180-e110190.
- [37] Chang S, Lee H, Kim K, et al. Compounds for inhibiting TNIK and medical uses thereof: KR, WO2019156439 [P]. 2019-08-15.
- [38] Van G, Joel M. Traf2- and Nck-interacting kinase (TNIK) inhibitors and uses thereof: IL, WO2022034587 [P]. 2022-02-17.
- [39] Ho KK, Parnell KM, Yuan Y, et al. Discovery of 4-phenyl-2-phenylaminopyridine based TNIK inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2013, 23: 569-573.
- [40] Tan Z, Chen L, Zhang S. Comprehensive modeling and discovery of mebendazole as a novel TRAF2- and NCK-interacting kinase inhibitor [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 33534-33543.
- [41] Chon HJ, Lee Y, Bae KJ, et al. Traf2- and Nck-interacting kinase (TNIK) is involved in the anti-cancer mechanism of dovitinib in human multiple myeloma IM-9 cells [J]. *Amino Acids*, 2016, 48: 1591-1599.
- [42] Lee Y, Jung J, Park K, et al. Synergistic inhibition effect of TNIK inhibitor KY-05009 and receptor tyrosine kinase inhibitor dovitinib on IL-6-induced prolifer [J]. *Oncotarget*, 2017, 8: 41091-41101.
- [43] Zhou K, Cheong J, Krishnaji S, et al. Inhibition of Wnt signaling in colon cancer cells *via* an oral drug that facilitates TNIK degradation [J]. *Mol Cancer Ther*, 2023, 22: 25-36.
- [44] Masuda M, Uno Y, Ohbayashi N, et al. TNIK inhibition abrogates colorectal cancer stemness [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 12586-12599.
- [45] Buchl SC, Hanquier Z, Haak AJ, et al. Traf2 and NCK interacting kinase is a critical regulator of procollagen I trafficking and hepatic fibrogenesis in mice [J]. *HepatoL Commun*, 2022, 6: 593-609.
- [46] Wang M, Gu Y, Li Q, et al. The Traf2 and Nck interacting kinase inhibitor NCB-0846 suppresses seizure activity involving the decrease of GRIA1 [J]. *Genes Dis*, 2023, 11: 100997-101058.
- [47] Coburn C, Smith S, Dubose R. TNIK modulators, conjugates, and uses thereof: US, WO2019079357 [P]. 2019-04-25.
- [48] Choi S, Park K, Seo H, et al. Pyrazole derivatives as TNIK, IKKE and TBKI inhibitor and pharmaceutical composition comprising same: KR, US20160289196 [P]. 2016-10-06.
- [49] Yang B, Wu Q, Huan X, et al. Discovery of a series of 1H-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine compounds as potent TNIK inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2021, 33: 127749-127753.
- [50] Li Y, Zhang L, Yang R, et al. Discovery of 3,4-dihydrobenzo[*f*][1,4]oxazepin-5(2*H*)-one derivatives as a new class of selective TNIK inhibitors and evaluation of their anti-colorectal cancer effects [J]. *J Med Chem*, 2022, 65: 1786-1807.
- [51] Luo X, Yang R, Li Y, et al. Discovery of benzo[*d*]oxazol-2(3*H*)-one derivatives as a new class of TNIK inhibitors for the treatment of colorectal cancer [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2022, 67: 128745-128763.
- [52] Arokiaraj SR, Tajuddin NB, Muthusamy K, et al. TRAF2 and NCK-interacting kinase inhibitors for colorectal cancer: *in vitro* and theoretical validations [J]. *ACS Comb Sci*, 2020, 22: 608-616.
- [53] Sun Y, Gao X, Wu P, et al. Jatrorrhizine inhibits mammary carcinoma cells by targeting TNIK mediated Wnt/beta-catenin signalling and epithelial-mesenchymal transition (EMT) [J]. *Phytomedicine*, 2019, 63: 153015.
- [54] Kim J, Oh J, Peterson HM, et al. TNIK inhibition has dual synergistic effects on tumor and associated immune cells [J]. *Adv Biol (Weinh)*, 2022, 6: e2200030.