

TNIK 抑制剂的 research 进展

刘钰强^{1,2,3}, 陈瀚^{1,2,3}, 刘旭圆^{1,2,3}, 王松会^{1,2,3*}, 刘磊^{1,2,3*}

1. 天津药物研究院有限公司 药物成药性评价与系统转化全国重点实验室, 天津 300301

2. 天津市新药设计与发现重点实验室, 天津 300301

3. 朴创医药科技(天津)有限公司, 天津 300301

摘要: 肿瘤坏死因子受体相关因子 2 (TRAF2) 和非催化区酪氨酸激酶 (NCK) 相互作用激酶 (TNIK) 是生发中心激酶 (GCK) 家族中的一种丝氨酸/苏氨酸激酶。作为 Wnt/ β -catenin 信号通路的关键激活因子, TNIK 在肿瘤、纤维化及代谢性疾病等多种疾病的发生发展过程中发挥重要调控作用。近年来, TNIK 小分子抑制剂研发经历了从高通量筛选发现到结构导向理性设计、再到人工智能 (AI) 辅助药物设计的演进历程, 但临床转化仍面临“构象悖论”(闭合构象抑制剂酶学活性强但细胞活性弱)、效力-暴露量-毒性三角矛盾等关键挑战。2023 年, AI 设计的双咪唑骨架抑制剂 Rentosertib 凭借构象选择性优化与成药性精准调控进入特发性肺纤维化 IIa 期临床, 为突破上述矛盾提供了范例。系统梳理 TNIK 抑制剂的结构生物学基础, 按化学骨架分类综述构效关系与结合模式剖析临床转化瓶颈, 并展望 AI 辅助设计和新型抑制策略的应用前景。

关键词: TNIK; 激酶抑制剂; 构象选择性; AI 辅助药物设计; 构象悖论

中图分类号: R979.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2026)10-3433-14

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2026.10.006

Advances in TNIK inhibitor research

LIU Yuqiang^{1,2,3}, CHEN Han^{1,2,3}, LIU Xuyuan^{1,2,3}, WANG Songhui^{1,2,3}, LIU Lei^{1,2,3}

1. State Key Laboratory of Druggability Evaluation and Systematic Translational Medicine, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research Co., Ltd., Tianjin 300301, China

2. Tianjin Key Laboratory of Molecular Design and Drug Discovery, Tianjin 300301, China

3. Puchuang Pharmaceutical Technology (Tianjin) Co., Ltd., Tianjin 300301, China

Abstract: Tumor necrosis factor receptor-associated factor-2- and NCK-interacting protein kinase (TNIK) is a serine/threonine kinase belonging to the germinal center kinase (GCK) family. As a critical activator of the Wnt/ β -catenin signaling pathway, TNIK plays an important regulatory role in the pathogenesis and progression of numerous diseases, including tumors, fibrosis and metabolic disorders. In recent years, the R&D of small-molecule TNIK inhibitors has evolved from serendipitous discovery to structure-guided design, and further to artificial intelligence (AI)-aided drug design. However, its clinical translation still faces key challenges such as the “conformational paradox” (closed-conformation inhibitors exhibit strong enzymatic activity but weak cellular activity) and the efficacy-exposure-toxicity triangle dilemma. In 2023, the AI-designed bis-imidazole scaffold inhibitor Rentosertib entered Phase IIa clinical trials for idiopathic pulmonary fibrosis through conformational selectivity optimization and precise druggability regulation, providing a paradigm for breaking through the above contradictions. This paper systematically reviews the structural biology basis of TNIK inhibitors, discusses their structure-activity relationships and binding modes categorized by chemical scaffolds, analyzes the bottlenecks in clinical translation, and prospects the application of AI-assisted design and novel inhibition strategies.

Key words: TNIK; kinase inhibitor; conformational selectivity; AI-assisted drug design; conformational paradox

肿瘤坏死因子受体相关因子 2 (TRAF2) 和非催化区酪氨酸激酶 (NCK) 相互作用激酶 (TNIK) 是一种定位于染色体 3q26.2~3q26.31 的丝氨酸/苏氨酸激酶, 属于生发中心激酶 (GCK) 家族。该蛋

收稿日期: 2026-06-04

作者简介: 刘钰强, 本科, 副研究员, 主要从事肿瘤领域创新药研究。E-mail: liuyq@tipr.com.cn

*通信作者: 王松会, 硕士, 副研究员, 主要从事心脑血管领域创新药研究。E-mail: wangsh@tipr.com.cn

刘磊, 博士, 副研究员, 主要从事心脑血管与肿瘤领域创新药研究。E-mail: liul@tipr.com.cn

自由 1 360 个氨基酸组成, 相对分子质量 1.55×10^5 ^[1]。作为 Wnt/ β -连环蛋白 (β -catenin) 通路的关键激活因子, TNIK 通过磷酸化转录因子 4 (TCF4) Ser154 驱动靶基因转录, 同时参与转化生长因子- β (TGF- β)、磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (PI3K/Akt/mTOR) 及 c-Jun 氨基末端激酶 (JNK) 等多条信号通路的调控^[2]。TNIK 在多种慢性纤维化、肿瘤及退行性病变中异常高表达, 已被视为极具潜力的多疾病治疗靶点^[3]。

TNIK 抑制剂通过阻断 Wnt/ β -catenin 等信号通路而发挥抗纤维化与抗肿瘤活性, 目前主要围绕特发性肺纤维化 (IPF) 及实体瘤等适应症开展临床及临床前研究。目前, 全球唯一进入临床阶段的 TNIK 抑制剂 Rentosertib (研发代号 ISM001-055、INS018-055) 为人工智能 (AI) 从头设计产物, 其 IIa 期临床试验已在 IPF 患者中证实可显著改善用力肺活量 (FVC) ($P < 0.05$)^[4-5]。然而, 纵观 TNIK 抑制剂的研发历程, 临床转化仍面临激酶选择性不足、构象依赖性活性差异及支架功能干扰等核心挑战。本文从 TNIK 结构特征与信号网络切入, 按化学骨架分类解析代表性 TNIK 抑制剂的结合模式与构效关系, 深入剖析“构象悖论”等临床转化瓶颈, 并展望 AI 药物设计及新型抑制策略的未来方向, 为 TNIK 抑制剂的进一步开发及临床转化提供参考。

1 TNIK 的结构生物学信息

TNIK 归属于 GCK-IV 亚家族, 其分子架构由 3 个功能域串联组成: N 端激酶结构域 (催化核心)、中间结构域 (MD) 和 C 端 Citron 同源结构域 (CNH 结构域)^[1,6]。N 端激酶域为典型的蛋白激酶双叶折叠结构, 由 N-叶 (N-lobe) 和 C-叶 (C-lobe) 通过柔性铰链区连接而成, 其中铰链区的 Glu106 和 Cys108 残基是多数三磷酸腺苷 (ATP) 竞争性抑制剂形成关键氢键的核心锚定点^[6]。中间结构域介导 TNIK 与 TRAF2、NCK、 β -catenin 等适配蛋白的相互作用, 可在空间上拉近转录因子 TCF4 与 β -catenin, 增强转录复合体的组装稳定性^[6]。C 端 CNH 结构域呈 β -螺旋桨样折叠结构, 可与 GTP 结合的小 GTP 酶 Ras 相关蛋白 2 (Rap2) 特异性结合, 参与调控细胞骨架重排和膜转运过程^[6-7]。

尽管激酶域的晶体结构已有多篇报道, 但全长 TNIK 的结构解析仍面临挑战, 研究者利用蛋白质结构预测工具 AlphaFold 获得的 TNIK 结构模型, 为理解其支架功能提供了重要线索^[6]。该模型揭示,

激酶域下游存在一段特征性螺旋片段, 对应 β -catenin 的结合界面, 表明 TNIK 通过特定空间构象将 β -catenin 与 TCF4 在三维空间中拉近, 促进转录复合体组装。值得注意的是, 全长 TNIK 的构象柔性不仅决定了其催化活性的调节, 更直接影响其作为支架蛋白的功能完整性。

2 TNIK 介导的信号通路及潜在适应症

基于 TNIK 蛋白的多结构域特征, TNIK 在细胞内信号转导网络中发挥中枢调控作用, 广泛参与 Wnt、TGF- β 、PI3K/Akt、JNK、核因子- κ B (NF- κ B) 等多条关键通路的调节 (图 1)^[3]。这些通路的异常激活或失调与多种人类疾病密切相关。鉴于 TNIK 在信号网络中的节点地位, 理解其介导的各条通路对于阐明其病理生理作用及指导靶向药物开发具有重要意义。

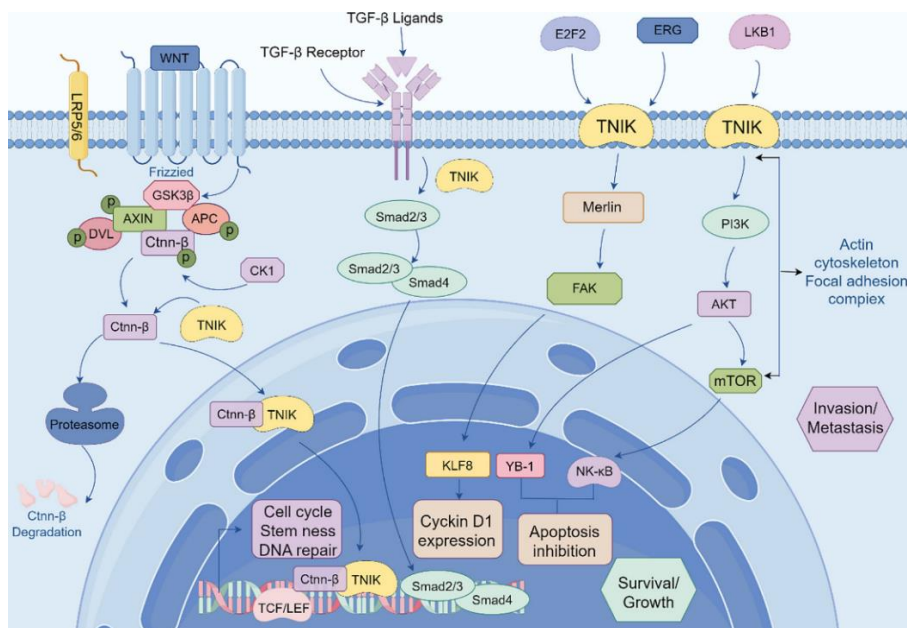
2.1 Wnt/ β -catenin 信号通路

Wnt/ β -catenin 信号通路 (即经典 Wnt 通路) 是 TNIK 研究最为深入的通路。在该通路中, Wnt 配体与细胞膜上的卷曲蛋白 (Frizzled) 受体及共受体低密度脂蛋白受体相关蛋白 6 (LRP6) 结合后, 抑制由轴蛋白 (AXIN)、腺瘤性结肠息肉病蛋白 (APC)、酪蛋白激酶 1 (CK1) 和糖原合成酶激酶 3 (GSK3) 组成的 β -catenin 降解复合物, 使 β -catenin 在胞质中累积并进入细胞核, 与 T 细胞因子/淋巴增强因子结合, 启动下游靶基因的转录^[3]。研究证实, TNIK 是 TCF4 的相互作用因子, 能够直接结合 TCF4 与 β -catenin, 并使 TCF4 发生磷酸化, 是 Wnt 转录程序的必需特异性激活因子^[8]。

该通路的异常激活与多种疾病密切相关。在结直肠癌中, 超过 80% 的病例携带 Wnt 通路基因突变 (如 APC 突变), 导致 β -catenin 的组成性激活, 因此抑制 TNIK 靶点能够阻断由突变引起的异常 Wnt/ β -catenin 信号^[3]。此外, 该通路的失调还参与卵巢癌、滑膜肉瘤、甲状腺乳头状癌及多发性骨髓瘤等多种肿瘤的发生^[3,9]。

2.2 TGF- β 信号通路

TGF- β 信号通路在早期胚胎发育、器官形成、免疫监视、组织修复及成体内稳态中具有重要作用^[10]。在病理状态下, TGF- β 的过表达会通过 Smad (如 Smad2/3 与 Smad4 复合物) 与非 Smad 信号通路 (包括 Wnt/ β -catenin) 之间的复杂串扰, 触发上皮-间质转化 (EMT)、细胞外基质 (ECM) 沉积及癌相关成纤维细胞的形成, 进而促进纤维化疾病与肿瘤的发展^[3]。

图 1 TNIK 的上游调控蛋白及其参与调控的下游通路示意图^[3]Fig. 1 Schematic diagram of upstream regulatory proteins of TNIK and downstream pathways involved in its regulation^[3]

2.3 膜突蛋白样蛋白 (Merlin)/黏着斑激酶 (FAK) 信号通路

膜突蛋白样蛋白 (Merlin) 是由神经纤维瘤蛋白 2 基因编码的肿瘤抑制蛋白, 能够负向调控细胞生长^[11]。研究证实, TNIK 能够直接磷酸化 Merlin, 影响其结构和活性, 而 FAK 则是 Merlin 的下游效应分子。该通路在肺鳞状细胞癌中的作用尤为突出, TNIK 可能通过 Merlin 介导的 FAK 通路激活参与调控细胞迁移、侵袭^[12]。

2.4 PI3K/Akt/mTOR 信号通路

PI3K/Akt/mTOR 信号通路与癌症的侵袭、转移行为密切相关。研究表明, 在 TNIK 扩增的人胃癌细胞系中, TNIK 抑制剂可显著下调 Akt 的磷酸化水平, 同时上调自噬标志物微管相关蛋白 1 轻链 3 (LC3) 的表达^[13]。近期研究还提示 TNIK 在肥胖和 2 型糖尿病等代谢性疾病的发生发展中亦发挥重要作用^[14]。

此外, TNIK 通过调控 JNK 和 NF- κ B 信号通路参与炎症反应的调节, 使其成为自身免疫性疾病治疗的潜在干预靶点^[15-16]。最新研究还揭示 TNIK 可作为内皮细胞通透性的氧化还原传感器, 进一步拓展了其生理功能的认知边界^[17]。

TNIK 通过整合多条信号网络在结直肠癌、IPF、代谢性疾病等多种病理过程中发挥核心调控作用, 这为其作为多适应证治疗靶点提供了充分的生物学依据。基于上述信号网络中的关键地位, 开

发靶向 TNIK 的小分子抑制剂已成为多个疾病领域的研究热点。

3 TNIK 小分子抑制剂分类及结合模式

TNIK 小分子抑制剂的研发经历了从筛选发现到结构导向设计, 再到 AI 驱动的头设计等多阶段演进。理解不同化学骨架抑制剂的结构特征与构效关系, 是把握 TNIK 抑制剂设计逻辑的关键。

截至目前报道的所有 TNIK 小分子抑制剂均以 ATP 结合位点为靶标, 通过占据 ATP 裂隙竞争性抑制激酶催化活性^[18]。然而, 尽管多数化合物在体外酶学水平表现出纳摩尔级的高抑制效力, 其在细胞和动物模型中的实际药效却往往存在数量级差异。为厘清这一现象背后的结构机制, 本文将尚未进入临床的代表性候选化合物按核心化学骨架分类, 剖析其构效关系与结合模式, 并在此基础上探讨决定细胞层面药效的关键构象因素。最后, 聚焦于目前唯一进入临床阶段的里程碑式分子 Rentosertib, 系统解析其突破传统设计局限的创新策略。代表性 TNIK 抑制剂的基本信息见表 1。

3.1 单杂环类抑制剂

单杂环类抑制剂以五元或六元含氮杂环为核心骨架, 通过杂环氮原子或邻近取代基直接与 TNIK 激酶域较链区 (Glu106 和 Cys108) 形成氢键网络, 是早期高通量筛选中最易命中的骨架类型。该类骨架结构简洁、合成路线成熟, 但也存在激酶选择性不足、构象偏好单一等固有缺陷。

表 1 TNIK 小分子抑制剂结构特征汇总

Table 1 Summary of structural features of TNIK small molecule inhibitors

化合物名称/编号	半数抑制浓度(IC ₅₀)/(nmol·L ⁻¹)	主要特征与局限	PDB ID
NCB-0001 (1) ^[19-20]	8.6	首个确立 Cys108 为核心靶标结合位点的苗头分子；靶标选择性一般	—
化合物 2 ^[21]	1.3	与靶标形成含阳离子- π 和盐桥的强相互作用	—
KY-05009 (3) ^[22-23]	9.0	TGF- β 信号通路抑制	—
化合物 4 ^[24-25]	12.0	结直肠癌动物模型 TGI 72.3%	—
化合物 5 ^[6,26]	8.0	细胞活性极弱 (IC ₅₀ >2 μ mol·L ⁻¹)，Type I 型激酶	5AX9
NCB-0846 (6) ^[6,27]	21.0	首个口服体内有效的 TNIK 抑制剂；激酶靶标选择性差，Type II 型激酶	5D7A
NCB-0970 (7) ^[27]	272.0	NCB-0846 对映异构体，活性低 13 倍	—
化合物 8 ^[28]	7.01	TNIK/CDK9 双重抑制剂	—
化合物 9 ^[8]	6.0	口服生物利用度高 (84.64%)；但毒性较高	—
化合物 10 ^[29]	<0.1 μ mol·L ⁻¹	激酶选择性差	—
Mebendazole (11) ^[30]	K _d $\approx$ 1 μ mol·L ⁻¹	老药新用；低活性，高选择性	—
Dovitinib (12) ^[31-32]	K _d = 24 nmol·L ⁻¹	高亲和力，但 TNIK 酶抑制活性较差	—
化合物 13 ^[33]	26.0	激酶高选择性；在体药效较差	—
化合物 14 ^[34]	50.0	激酶高选择性；在体药效较差	—
ON108600 (15) ^[35-36]	5.0	激酶选择性较差	—
PD407824 (16) ^[2,6,37]	0.7	具有基因毒性，Type I 型激酶	2X7F
化合物 17 ^[38]	0.13	最强酶抑制活性	—
化合物 18 ^[6,39-40]	8.0	强酶抑制活性，细胞活性较差，Type I 型激酶	6RA5
化合物 19 ^[6,39-40]	7.0	强酶抑制活性，细胞活性较差，Type I 型激酶	6RA7
Rentosertib (20) ^[4-5,41]	7.8	AI 药物设计；靶标选择性高，Type I 型激酶	8ZML

3.1.1 噻唑类抑制剂 噻唑类化合物是最早被系统研究的 TNIK 抑制剂骨架之一。2010 年日本国立癌症研究中心的专利 (WO2010064111) 首次报道了该类化合物^[19]。先导分子 NCB-0001 (图 2) IC₅₀ 为 8.6 nmol·L⁻¹，其构效关系研究揭示了 2 个关键结合特征：一是氨基噻唑核心通过与铰链区 Glu106 和 Cys108 形成氢键网络锚定结合；二是末端苯环与

Phe107 产生 π - π 堆积相互作用^[20]。尽管 NCB-0001 在结直肠癌细胞中可浓度相关性抑制 β -catenin/TCF4 介导的转录，但其激酶选择性谱显示出显著的脱靶风险——在激酶谱中对混合谱系激酶 1 (MLK1) (IC₅₀ = 18 nmol·L⁻¹) 以及含激酶插入区受体 (KDR)、表皮生长因子受体 (EGFR)、Fms 样酪氨酸激酶 3 (FLT3)、GSK3 β 等多个靶点均存在显著交叉抑制^[19]。

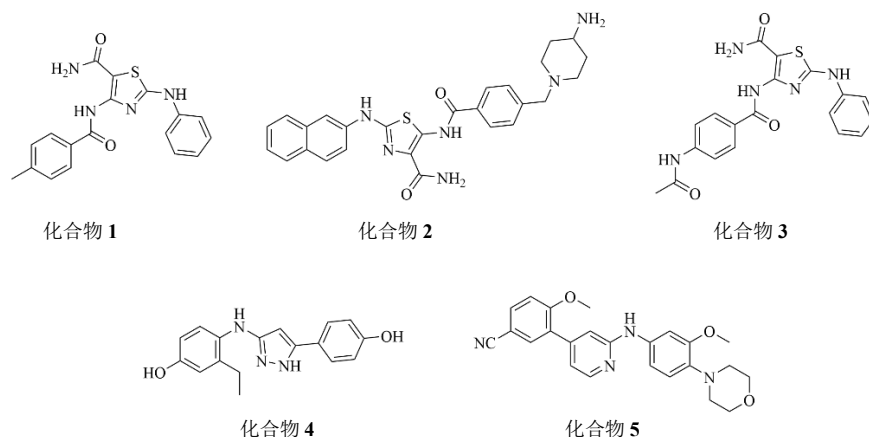


图 2 单杂环类抑制剂的化学结构

Fig. 2 Chemical structures of monocyclic heterocycle inhibitors

2013 年,日本卡纳生物科学株式会社的改进专利(WO2013176293)进一步拓展了噻唑骨架的化学空间^[21]。该专利所报道化合物中, TNIK 抑制活性最优者的 IC_{50} 达 $1\sim 10\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 代表性化合物 2 (图 2) 的酶抑制活性提升至 IC_{50} 为 $1.3\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。晶体结构分析揭示了 2 项新的相互作用: 4-氨基嘧啶片段与磷酸结合环(P-loop)上的 Tyr36 形成阳离子- π 相互作用, 嘧啶环则与催化环 Asp153 形成盐桥; 这些额外的结合力进一步巩固了分子在 ATP 结合口袋中的稳定构象^[20]。

KY-05009 ($IC_{50}=9\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 图 2) 是噻唑系列中具代表性的优化产物之一。该化合物能够以剂量依赖方式抑制 ATP 与 TNIK 的结合, 其抑制常数(K_i) 为 $100\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。在非小细胞肺癌 A549 细胞中, KY-05009 可通过削弱 Smad 及非 Smad 信号通路, 显著而强效地阻断由 TGF- β 激活的 EMT 过程, 受影响的通路还包括 Wnt、NF- κ B、FAK-Src-桩蛋白相关黏着斑通路以及 JNK 信号通路^[22]。研究表明, KY-05009 与多靶点激酶抑制剂 Dovitinib 联合使用时, 可在人多发性骨髓瘤 IM-9 细胞中产生协同抑制效应^[23]。从成药性角度看, 氨基噻唑类化合物合成路线成熟、水溶性较好, 但因其与铰链区的结合模式在激酶家族中普遍存在, 选择性优化难度较大: 早期化合物在 400 余种激酶谱中常显示数十个脱靶, 这一缺陷成为该骨架临床转化的主要瓶颈。

3.1.2 吡唑类抑制剂 韩国化学技术研究所(KRICT)在专利 WO2019156438 和 WO2019156439 中披露了基于氨基吡唑骨架的 320 个化合物, 最优化合物的 IC_{50} 低至 $1\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 其中 WO2019156439 中的化合物在 SW620 结直肠癌细胞中抗增殖作用 IC_{50} 低至 $0.1\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[24-25]。代表性化合物 4 (图 2) 在 $50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\text{ ig}$ 给药、每日 2 次剂量下单药治疗达到 72.3% 的肿瘤生长抑制率(TGI), 而与伊立替康($40\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\text{ ip}$, 每周 1 次)联合使用时 TGI 提升至 78.8%^[25]。然而, 该骨架存在显著的成药性局限: WO2019156439 中化合物的口服生物利用度普遍偏低(多数低于 10%, 部分甚至低于 5%), 主要归因于酚羟基引发的 II 相代谢^[25]。2019 年 FutuRx 公司获授权并联合 KRICT 成立 TNIK Therapeutics 公司, 主要聚焦结直肠癌适应证的开发。

3.1.3 吡啶类抑制剂 Koc-Kan 等^[26]报道了 4-苯基-2-苯胺基吡啶类 TNIK 抑制剂, 其中代表性化合物

5 (图 2) 的酶活性 IC_{50} 为 $8\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。晶体结构(蛋白质数据库编号 5AX9, PDB: 5AX9)显示其与 TNIK 呈现精细的结合模式: 吡啶环氮原子与 Cys108 主链氨基形成氢键, 苯胺基 NH 与 Cys108 羰基形成第二个氢键, 末端氨基延伸至 ATP 结合位点的裂隙深处并与 Lys54、Met105 和 Asp171 产生疏水相互作用, 同时 Lys54 与 Glu69 之间形成盐桥, 上述相互作用为蛋白激酶闭合型活性构象的典型结构特征^[6,26]。共晶结构解析进一步表明, 该系列化合物可将 TNIK 稳定于 α C-helix-in 的闭合活性构象, 这直接导致其对 Wnt 靶基因表达的抑制极弱($IC_{50}>2\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 对结直肠癌细胞活力也无显著影响。此类现象首次系统性揭示了 TNIK 抑制领域著名的“构象悖论”: 即稳定 α C-helix-in 闭合构象(Type I 型结合)的抑制剂虽能实现极低的酶学 IC_{50} 值, 却无法阻断 TNIK 与 TCF4 及 β -catenin 的支架蛋白相互作用, 最终导致“强效酶学抑制但极弱细胞活性”的严重脱节^[6]。

3.2 稠合杂环及多环类抑制剂

稠合杂环及多环类抑制剂构成 TNIK 抑制剂中结构多样性最丰富的类别。该类骨架的共同特征在于包含 2 个或更多稠合环系统, 通过扩展的共轭体系提供更稳定的结合构象与更丰富的空间取代位点, 便于进行系统性的构效关系优化。根据核心骨架的化学结构差异, 可进一步细分为喹啉/喹啉、苯并咪唑、二氢苯并噻嗪酮/苯并噻嗪酮、苯并噻嗪酮、吡咯并咪唑、吡咯并吡啶及萘啶等多个亚类。各类骨架虽共享多环稠合的结构共性, 但在结合模式、构象选择性和生物学活性方面呈现显著差异, 反映了 TNIK 抑制剂设计中对 ATP 口袋占据策略的多元化探索。

3.2.1 喹啉/喹啉与双喹啉类抑制剂 喹啉类代表了 TNIK 抑制剂研发史上的重要拐点。NCB-0846 (图 3) 是首个具有口服体内活性的 TNIK 小分子抑制剂, 对 TNIK 的 IC_{50} 为 $21\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[27]。晶体结构解析(PDB: 5D7A)揭示了其独特的结合模式: 喹啉核心与铰链区 Cys108 形成 2 个氢键, 末端苯并咪唑环通过分子内氢键与 Gln157 主链形成第 3 个氢键^[27]。更重要的是, NCB-0846 将 TNIK 稳定在开放非活性构象(α C-helix-out), 导致调节棘(R-spine)解体并有效破坏 TNIK 支架复合物的组装。这一结合模式使其在细胞模型中展现出显著的抗 Wnt 信号活性, 成为早期跨越“构象悖论”的关

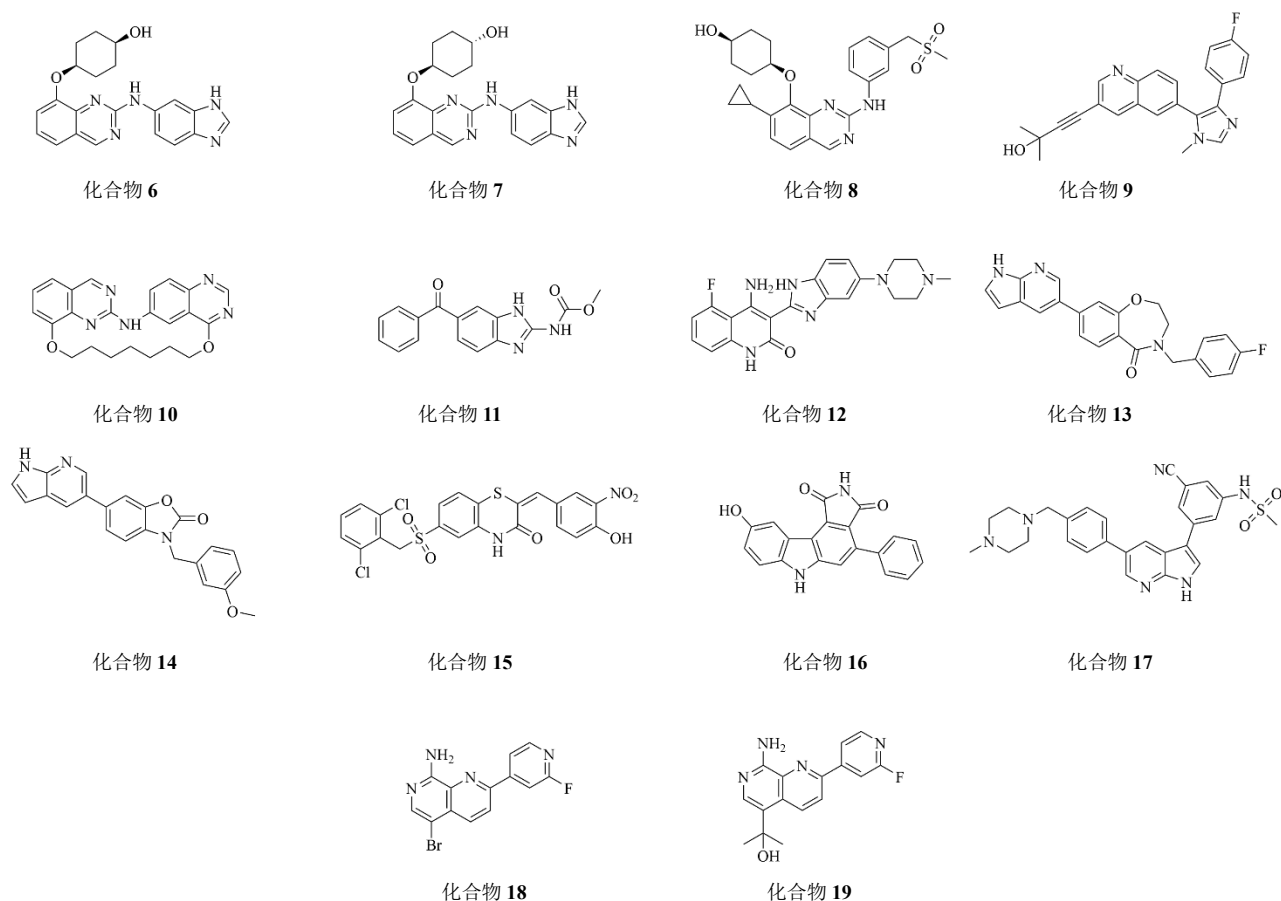


图 3 稠合杂环及多环类抑制剂的化学结构

Fig. 3 Chemical structures of fused heterocycle and polycyclic inhibitors

键突破,为后续抑制剂优化确立了“构象决定细胞功能”的核心准则^[6]。体内外活性评估显示,NCB-0846 在结直肠癌细胞系中可抑制肿瘤生长和干性,在滑膜肉瘤模型中表现出抗肿瘤活性,并可抑制 TGF- β 激活的 EMT 过程^[27]。

NCB-0846 的立体选择性是其构效关系研究中最值得关注的发现之一。其环己烷末端手性羟基的对映异构体 NCB-0970 (图 3) 的抑制活性 ($IC_{50}=272\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 是 NCB-0846 活性的十三分之一,提示手性中心的空间取向直接决定了分子在 ATP 口袋中的结合亲和力。然而,NCB-0846 在 $0.1\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下对 FLT3、Janus 激酶 3 (JAK3)、血小板源性生长因子受体 α (PDGFR α)、原肌球蛋白受体激酶 A (TRKA) 等靶点抑制率 $>80\%$,其广谱脱靶选择性是临床转化的主要障碍^[27]。构效关系分析表明,该选择性不足源于喹啉骨架与铰链区的结合模式在激酶家族中的普遍性,仅依赖该核心难以实现 TNIK 亚型选择性区分。

后续的喹啉/喹啉衍生物在双重靶向和口服

生物利用度方面进一步拓展。中国的赛诺哈勃药业有限公司在专利 WO2023143135 中披露了喹啉衍生物作为 TNIK 和细胞周期蛋白依赖性激酶 9 (CDK9) 双重抑制剂,其中化合物 8 (图 3) 实现了 TNIK ($IC_{50}=7.01\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 与 CDK9 ($IC_{50}=1.45\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的双重抑制,提示联合抑制可能存在协同抗肿瘤效应^[28]。四川大学团队基于 Rentosertib 药效团进行片段生长设计的喹啉衍生物化合物 9 (图 3) 将 TNIK 抑制活性提升至 $6\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$,对 HCT-116 细胞的 IC_{50} 为 $2.11\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$;在 $1\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 给药浓度下,除 TNIK 之外,化合物 9 仅对 KDR 与原癌基因酪氨酸蛋白激酶 Yes (YES1) 两种激酶产生抑制作用^[8]。后续体内药动学研究显示,化合物 9 在小鼠体内表现出优异的药动学特征,口服生物利用度达 84.64% ,但在 HCT-116 异种移植瘤模型中 TGI 仅 $52\%\sim 59\%$,高剂量组出现体质量减轻和动物死亡^[8]。药动学分析显示 $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量下药时曲线下面积 (AUC_{0-4}) 达 $45\,694\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$,提示高系统暴露量导致的脱靶毒性是效力受限的主要

原因——这一案例深刻揭示了“效力-暴露量-毒性”三角矛盾在 TNIK 抑制剂优化中的核心地位。

美国的 Silverback Therapeutics 公司在专利 WO2019079357 中报道的双喹唑啉类抑制剂化合物 **10** (图 3), 其结构与 NCB-0846 的双环仲胺构型高度相似^[29]。该化合物在 371 个激酶面板测试中, 0.1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下对 TNIK、雄性生殖细胞相关激酶 (MAK)、原肌球蛋白受体激酶 C (TRKC)、CDK9/细胞周期蛋白 T2(cyclin T2) 以及错构样/NIK 相关激酶 1 (MINK1) 等多个靶点表现出超过 50% 抑制活性, 提示该骨架在 ATP 竞争性抑制剂的选择性优化方面仍面临固有局限。

3.2.2 苯并咪唑类抑制剂 Tan 等^[30]通过计算机辅助药物设计 (CADD) 策略对 1 448 种美国食品药品监督管理局 (FDA) 批准药物进行虚拟筛选, 发现广谱驱虫药甲苯咪唑 (MBZ, 图 3) 可选择性抑制 TNIK ($K_d \approx 1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。MBZ 的苯并咪唑核心与铰链区 Cys108 形成氢键, 其氨基甲酸酯的羰基也与 Cys108 产生额外相互作用。在 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下, MBZ 对 TNIK 的抑制率达 91.8%, 同时对 ABL 原癌基因 2 非受体酪氨酸激酶 (ABL2)、EGFR、丝裂原活化蛋白激酶激酶 1 (MEK1) 同源激酶无明显抑制^[30]。虽然 MBZ 安全性好、毒理学数据充分且具备明确的临床用药经验, 但微摩尔级效力与专门设计的纳摩尔级抑制剂相比仍存在明显差距, 提示药物重定位策略在 TNIK 靶点上的适用性受限于其非针对性的药效团特征。

Dovitinib (图 3) 是由 Novartis Pharma AG 开发的多靶点受体酪氨酸激酶抑制剂, 主要靶点包括成纤维细胞生长因子受体 1-3 (FGFR1-3)、FLT3 和巨噬细胞集落刺激因子受体 (c-Fms) 等, 对 TNIK 具有高亲和力 (解离常数 $K_d = 24 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $K_i = 13 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)^[31-32]。2016 年, Chon 等^[32]在研究其对人多发性骨髓瘤 IM-9 细胞的抗癌机制时, 意外发现 TNIK 参与了其活性机制。作为处于上市前阶段的药物, Dovitinib 的药动力学特性已知且安全性充分表征, 但其多靶点特性使其不适合作为 TNIK 特异性抑制剂开发, 仅可作为机制研究的辅助工具或在联合用药策略中发挥作用。

3.2.3 二氢苯并噻嗪酮/苯并噻嗪酮类抑制剂 四川大学杨水云、李利团队先后报道了 2 个系列的新型骨架化合物。其中, 二氢苯并噻嗪酮类代表化合物 **13** (图 3) 的 TNIK IC_{50} 为 26 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 在 HCT-

116 细胞中抗增殖作用的 IC_{50} 为 4.26 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[33]。该化合物在 371 种激酶谱中展现出优异的选择性, 仅在血管内皮生长因子受体 4 (FLT4, $\text{IC}_{50} = 30 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 及 FLT1 ($\text{IC}_{50} = 191 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 上存在微弱脱靶, 对其他所有激酶的 IC_{50} 均 $\geq 500 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。其选择性显著优于早期的氨基噻唑类和喹唑啉类化合物。分子对接结果显示, 化合物 **13** 的 7-氮杂吡啶末端与铰链区形成氢键时不伸入 ATP 结合口袋最深区域, 据此推测其结合模式与 NCB-0846 类似, 即通过稳定激酶的非活性开放构象而发挥抑制作用, 因而具备抗 Wnt 信号通路的潜在结构基础^[33]。然而, 化合物 **13** 的酶学活性与细胞活性之间相差约 2 个数量级, 提示其细胞膜渗透性或胞内靶向效率可能成为优化瓶颈。

苯并噻嗪酮代表化合物 **14** (图 3) 的 TNIK IC_{50} 为 50 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 在 HCT-116 细胞中的抗增殖 IC_{50} 约 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 其主要脱靶靶点为 Flt4, 次要为 KDR^[34]。化合物 **13** 与 **14** 具有相同的 7-氮杂吡啶末端基团和类似的结合模式特征。值得注意的是, 该 2 个化合物与 TNIK P-loop 区域的相互作用较弱, 其抑制活性可能主要来源于与溶剂区附近 Lys41 和 Lys118 残基通过阳离子- π 相互作用产生的额外结合力。尽管选择性显著改善, 但二者的口服生物利用度和体内药代动力学数据尚未见报道, 限制了对其成药性的全面评价。

3.2.4 苯并噻嗪酮类抑制剂 苯并噻嗪酮系列中, ON108600 (图 3) 是早期报道的强效 TNIK 抑制剂 ($\text{IC}_{50} = 5 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)^[35-36]。该分子对酪蛋白激酶 2 α 1 (CK2 α 1) 和双特异性酪氨酸磷酸化调节激酶 1B (DYRK1B) 亦表现出同等水平的抑制活性 (IC_{50} 分别为 5、7 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 在三阴性乳腺癌模型中可有效抑制肿瘤干细胞并诱导紫杉醇耐药细胞的凋亡, 但其选择性不足限制了作为 TNIK 特异性抑制剂的开发前景。从成药性角度而言, ON108600 在多靶点协同抑制策略中可能具有潜在价值, 但作为单一 TNIK 靶向药物仍需进行深度骨架优化以提高选择性。

3.2.5 吡咯并咪唑类抑制剂 PD407824 (图 3) 是最早被解析晶体结构的 TNIK 抑制剂之一, 最初作为细胞周期检查点激酶 Wee1 和 Chk1 的抑制剂被开发, 对 TNIK 展现出极强的抑制活性 ($\text{IC}_{50} = 0.7 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)^[2,37]。2016 年解析的 TNIK-PD407824 共晶结构 (PDB: 2X7F) 首次揭示了 TNIK 激酶结

构域的抑制剂结合模式：吡咯并咪唑环与铰链区 Glu106 和 Cys108 的主链羰基和酰胺基团形成多重氢键网络，同时通过氢键与位于 N-lobe 的 Tyr36 残基发生相互作用。这些多重分子间作用力共同稳定了 PD407824 与 TNIK 的结合，使 TNIK 激酶结构域呈现出闭合的活性构象 (α C-helix-in) [6]。然而，PD407824 因强烈的 DNA 嵌入毒性和药理学方面的局限而未能进一步开发。作为刚性稠杂环化合物的代表性案例，PD407824 提示研究人员在追求极高酶学活性的同时，必须系统评估化合物的安全性和吸收、分布、代谢、排泄与毒性 (ADMET) 性质。

3.2.6 吡咯并咪唑类抑制剂 2021 年，Yang 等^[38]从自建激酶抑制剂化合物库中筛选获得一系列 1H-吡咯并[2,3-b]咪唑为骨架化合物，其中最优化合物 17 (图 3) 的酶学抑制活性达迄今最高水平，对 TNIK 的 IC_{50} 为 $0.13 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。该化合物在 Jurkat 细胞中呈浓度依赖性地抑制白细胞介素-2 (IL-2) 的分泌，抑制效果与已知 TNIK 抑制剂 NCB-0846 相当。该系列化合物目前仍处于早期发现阶段，缺乏激酶选择性谱数据。然而，其 1H-吡咯并[2,3-b]咪唑骨架作为常见 ATP 竞争性结合基序，存在潜在的脱靶效应风险；此外，IL-2 分泌抑制的体内免疫调节作用及其可能带来的免疫抑制不良反应，以及化合物的体内药理学性质和长期耐受性，均需在后续临床前研究中系统评估。

3.2.7 蔡啶类抑制剂 Read 等^[39]于 2019 年报道了 2 类蔡啶衍生物化合物 18 和 19 (图 3)，其酶学抑制活性 IC_{50} 分别为 $8 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $7 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。该类蔡啶化合物是从吡啶并咪唑骨架的丝裂原活化蛋白激酶激酶激酶 4 (MAP4K4) 抑制剂优化而来，故对与 TNIK 具有高度序列同源性的 MAP4K4 及 MINK1 亦表现出交叉抑制活性^[40]。化合物 18 与靶标 TNIK 的共晶结构 (PDB: 6RA5) 揭示，蔡啶骨架通过 Glu106 和 Cys108 主链的羰基和酰胺基团与铰链区形成 2 个氢键；同时蔡啶环还与 Lys54 形成氢键，而 Lys54 与 Glu69 之间形成盐桥^[6]。上述相互作用使得 TNIK 再次呈现闭合的活性构象 (α C-helix-in)，与 PD407824 及苯胺基吡啶类抑制剂结合靶标后的状态高度相似，从而再度陷入“构象悖论”：此类化合物虽具有优异的酶学活性，其在细胞水平上的抗增殖及抗 Wnt 信号活性却十分有限。这一结果进一步确证，结合后所诱导的激酶构象状态是决定 TNIK 抑制剂细胞水平药效的先决因素。在

选择性方面，这类化合物的 MAP4K4/MINK1 交叉抑制问题源于 GCK 家族激酶 ATP 结合口袋的高度序列相似性，仅通过蔡啶骨架本身难以实现亚家族区分。

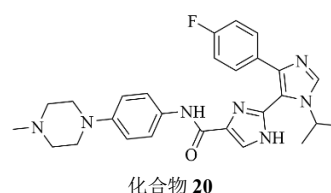
纵观传统骨架抑制剂的研发历程，“构象悖论”始终是制约 TNIK 抑制剂临床转化的核心瓶颈。早期研究多致力于追求极低的酶学 IC_{50} 值，却忽视了构象选择性对细胞功能阻断的决定性影响：Type I 型激酶抑制剂（如化合物 5、PD407824、蔡啶类）虽酶活性卓越但因稳定闭合活性构象导致细胞活性弱；而以 NCB-0846 为代表的 Type II 型激酶抑制剂虽能通过稳定开放非活性构象有效抑制 Wnt 信号，却又普遍面临激酶选择性差或 ADMET 性质不佳的挑战。如何在维持高抑制效力的同时，实现特异性的构象调控并兼顾成药性，成为 TNIK 靶向药物研发的“多重矛盾”。

直至近年来 AI 驱动药物设计的引入，这一困境方取得重要突破。AI 平台不仅能够探索超越传统化学直觉的全新骨架，更能在多维化学空间中同步优化结合模式与理化属性。由 AI 从头设计并成功进入 IIa 期临床的里程碑分子 Rentosertib 为 TNIK 抑制剂的研发带来了突破，其设计利用结构创新突破构象悖论，引领该靶点药物的研发新阶段。

3.3 咪唑类骨架抑制剂与 AI 设计的突破

咪唑骨架代表了 TNIK 抑制剂设计中最新且最成功的策略，其标志性产物 Rentosertib (图 4) 是首个由 AI 从头设计并推进至临床 IIa 期的 TNIK 抑制剂^[4-5]。该化合物的研发不仅突破了“构象悖论”的核心难题，更标志着 AI 驱动药物设计从概念验证走向临床应用的里程碑。

3.3.1 AI 辅助设计流程 英矽智能科技 (上海) 有限公司 (Insilico Medicine) 利用 Chemistry 42 平台将 TNIK 高分辨率晶体结构输入深度生成模型，在确认铰链区 Cys108 与 Glu106 的结合区域可被有效占据后，将核心骨架优化为双咪唑结构，并通过强



化合物 20

图 4 Rentosertib 的化学结构

Fig. 4 Chemical structure of Rentosertib

化学习在百万级化学空间中完成虚拟筛选与迭代优化^[4]。与传统 CADD 依赖预定义物理力场和打分函数、在有限化学空间内进行分子对接不同, AI 驱动的生成式设计依托变分自编码器 (VAE)、生成对抗网络 (GAN) 及 Transformer 架构, 能够在数十亿级化学空间中生成符合预设理化约束的全新分子骨架。Chemistry 42 平台通过迁移学习策略, 将 TNIK 有限的结构-活性数据与 GCK 家族其他成员的大规模构效关系数据相结合, 有效提升了模型对小样本靶点的预测精度。上述 AI 辅助的基于结构的药物设计 (SBDD) 工作流程, 自起始化合物至优化候选药物仅耗时约 18 个月, 显著缩短了传统药物发现周期。

3.3.2 结合模式与选择性 2024 年发表的 X-ray 共晶结构 (PDB: 8ZML, 图 5) 进一步验证了其构象调控的准确性, 体外酶学实验表明 Rentosertib 对 TNIK 具有强效抑制活性 ($IC_{50}=7.8\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)^[41]。结合模式揭示 4 个关键特征: (1) Rentosertib 采用酰胺而非传统杂环作为铰链结合基序, 其酰胺羰基

与铰链区 Cys108 主链 NH 形成关键氢键——这一非典型的铰链结合策略构成其选择性优势的结构基础之一; (2) 咪唑 1 的类吡啶氮与酰胺 NH 形成分子内氢键, 使铰链结合部分稳定在近平面构象; (3) 4-氟苯基深入后门腔, 咪唑 1 的 NH 与门控残基 Met105 的甲硫基形成氢键, 使 Met105 侧链处于为“开放”构象, 从而成为首个被证实能够调制 TNIK 门控残基构象并结合变构后门的抑制剂; (4) 咪唑 2 与催化位点 Lys54 形成氢键, 同时推开 Asp171 侧链, 破坏了 Asp171-Lys54 原有的氢键网络。Rentosertib 在 $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下对 430 种激酶谱中仅约 10% (43 种) 显示 $>80\%$ 抑制, 仅 TNIK 表现出最高效力 ($IC_{50}=31\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)^[41]。其卓越选择性源于以下结构特征: (1) 变构后门腔占据策略利用 TNIK Met105 周围的氨基酸序列差异实现选择性识别; (2) 双咪唑骨架能同时将功能基团精确投射至铰链区和门控残基区域; (3) 分子内氢键约束减少结合熵损失。

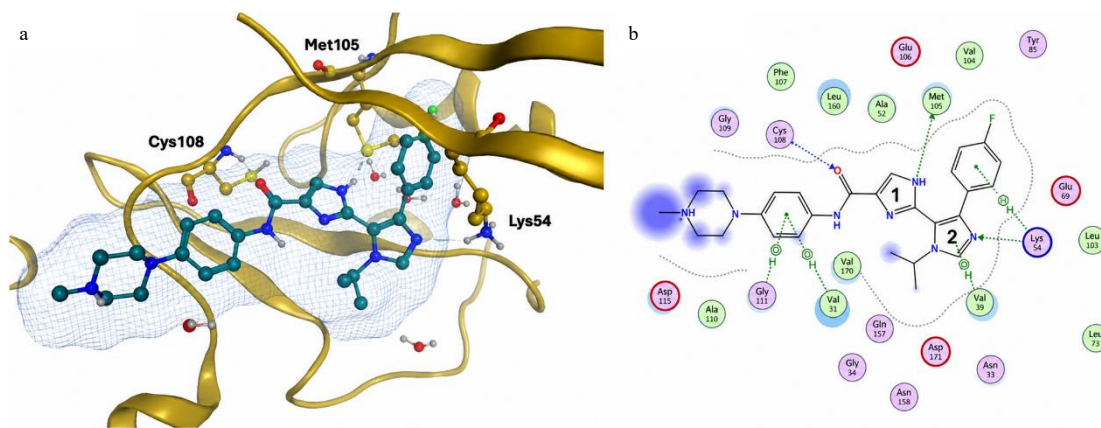


图 5 Rentosertib 与 TNIK 激酶结构域结合的 X 射线晶体结构 (PDB 编号: 8ZML, a) 和由分子操作环境 (MOE) 生成的展示 Rentosertib 与 TNIK 之间的蛋白-配体相互作用二维示意图 (b)^[40]

Fig. 5 X-ray crystal structure of Rentosertib bound to the TNIK kinase domain (PDB ID: 8ZML, a) and 2D diagram (generated with MOE) illustrating protein-ligand interactions between Rentosertib and TNIK (b)^[40]

3.3.3 突破构象悖论的三重机制 Rentosertib 结合后 TNIK 呈现 DFG-in 和 α C-helix-in 构象, 按传统分类属于 I 型 (Type I) 结合模式, 本应受“构象悖论”的制约^[41]。然而, Rentosertib 通过三重独特机制突破了这一规律: (1) 咪唑 2 与催化位点 Lys54 的氢键及 Asp171-Lys54 盐桥的破坏扰动了催化网络; (2) 对门控残基 Met105 构象的强制调节通过长程构象传播影响了中间域与转录复合体的空间适配性; (3) 双咪唑骨架在铰链区和催化区域产生

的多重交联作用使 TNIK 锁定在“虽为 α C-helix-in 但功能受损”的特殊构象状态。这表明突破构象悖论的关键并非简单稳定开放非活性构象, 而是通过创新性结合模式在闭合活性构象框架内实现功能阻断。

3.3.4 成药性与临床进展 Rentosertib 展现出优异的综合药物代谢与药动力学特性: 小鼠口服生物利用度为 44%, 在 $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下 hERG 抑制试验抑制率仅 10.56%, 对 5 种主要细胞色素 P450

(CYP450)同工酶无明显抑制^[41]。英矽智能推动 Rentosertib 于 2023 年进入 IIa 期临床(NCT05938920 等),相关研究成果于 2025 年发表于《Nature Medicine》。本研究旨在评估 Rentosertib 在为期 12 周的治疗周期内的安全性、耐受性及临床疗效。主要终点方面,各治疗组间治疗期间不良事件(TEAE)的发生率无统计学显著差异^[5];次要终点方面,接受 60 mg 每日 1 次受试组表现出 FVC 的改善趋势,其平均变化量为增加 98.4 mL,而安慰剂组平均下降 20.3 mL^[5]。血浆蛋白质组学分析进一步证实,Rentosertib 的给药剂量及疗程与血清蛋白表达谱的变化显著相关,其中部分下调的蛋白与 IPF 及肺纤维化的病理进程具有明确关联^[5]。该研究标志着首个由 AI 全流程设计的候选药物已成功推进至临床验证阶段。

3.3.5 AI 驱动设计的局限与湿实验匹配挑战 尽管 Rentosertib 的成功标志着 AI 药物设计的重要里程碑,该领域仍有待持续优化。在强化学习多目标优化中,如何系统化设定酶学活性、构象选择性、ADMET 和选择性之间的权重分配,仍需进一步标准化。现有 AI 模型大多基于激酶类靶点的高通量筛选数据训练,对 G 蛋白偶联受体(GPCR)、离子通道等靶点的泛化能力尚待验证^[42]。多目标优化算法能有效平衡“构象悖论”中的多重需求,近期系统综述也指出生成式 AI 已在罕见病药物开发中展现出缩短研发周期的巨大潜力^[42-43]。此外,AI 计算生成分子的速度远超传统化学合成与生物活性测试的承载能力,未来的改进方向在于建立“高通量合成与在线表征平台”,使湿实验的验证通量能够更有效地匹配 AI 生成的分子流,实现工业级循环迭代。2026 年发表于《自然》子刊的综述也强调了这一问题,指出 AI 设计在肿瘤药物发现中虽展现出巨大前景,但临床转化仍面临湿实验验证的“最后一公里”挑战^[44]。

4 超越传统 ATP 竞争性小分子抑制剂的新策略

目前报道的绝大多数 TNIK 小分子抑制剂以 ATP 结合位点为靶标,通过竞争性占据 ATP 裂隙发挥抑制作用。然而,ATP 口袋在激酶家族中的高度保守性导致了选择性难题,加之“构象悖论”的制约,促使研究者探索超越传统 ATP 竞争性小分子抑制剂新策略。天然产物、RNA 介导抑制以及蛋白降解靶向嵌合体(PROTAC)降解策略等近年来受到广泛关注。

4.1 天然产物

天然产物以其结构多样性和通常较低的脱靶毒性优势成为发现新骨架的潜在来源。Ma 等^[45]通过分子对接与分子动力学模拟筛选出 2 种天然化合物候选分子,与 NCB-0846 相比展现出更高的结合亲和力和更优的 ADME 预测结果。Sun 等^[46]报道异喹啉类天然生物碱药根碱通过靶向 TNIK 抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路和 EMT 过程,在乳腺癌模型中显示出抗增殖活性。Vinogradov 等^[47]利用硫肽从头发现策略产生了具有纳摩尔级 TNIK 抑制活性的分子。

然而,天然产物普遍存在效力不足(多在微摩尔级)、水溶性差和口服生物利用度低等成药性缺陷,限制了其作为先导化合物直接开发的可行性。尽管如此,它们为新型骨架发现和优化提供了宝贵的结构模板。

4.2 RNA 介导的抑制策略

非编码 RNA 的表观遗传学调控为 TNIK 抑制提供了全新的视角。Wu 等^[48]发现 miR-5590-3p 作为内源性非编码 RNA 可通过靶向降解 TNIK mRNA,有效抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路,为 TNIK 调控提供了表观遗传学层面的新视角。RNA 介导的基因沉默策略理论上可以实现对 TNIK 表达水平的精准调控,完全避免了小分子抑制剂的构象选择性问题。

然而,非编码 RNA 的体内递送效率、组织特异性和免疫原性仍然是临床转化的主要障碍,目前该策略仍处于概念验证阶段。

4.3 PROTAC 靶向降解策略

Zhou 等^[49]报道了基于蛋白降解靶向嵌合体(PROTAC)技术的 TNIK 降解剂。相较于传统的小分子抑制剂,PROTAC 具有催化性质、可靶向非活性位点区域、潜在规避耐药突变等理论优势。

然而,PROTAC 相对分子质量通常>800,口服生物利用度和细胞渗透性仍需大幅优化。此外,TNIK 的支架功能是否会被 PROTAC 介导的完全降解所破坏,以及过度降解是否引发代偿性通路激活,均需在体内外模型中进行系统验证。

4.4 不同抑制策略的比较评价

PROTAC 降解策略和 RNA 靶向抑制在理论上可彻底消除 TNIK 蛋白表达,规避 ATP 口袋保守性带来的选择性难题。然而,这 3 种新型策略的临床转化同样面临独特挑战(表 2)。PROTAC 相对分子质量通常>800,口服生物利用度和细胞渗透性仍

表 2 不同 TNIK 抑制策略的比较
Table 2 Comparison of different TNIK inhibition strategies

策略	核心优势	关键挑战	开发阶段
ATP 竞争性小分子 (传统)	口服便利、PK 成熟	选择性差、构象悖论	多个进入临床前
AI 优化小分子 (Rentosertib)	三重目标平衡、高选择性	训练数据依赖性	II 期临床 (IPF)
天然产物	结构新颖、潜在毒性较低	效力不足、理化性质及成药性差	体外验证
RNA 靶向 (siRNA/miRNA)	转录/转译水平精准调控	体内递送困难、存在免疫原性	概念验证
PROTAC 降解	具有催化性质、可靶向非活性位点	相对分子质量大、口服吸收差、体内 PK 挑战	临床前探索

需大幅优化;RNA 介导的基因沉默策略则受限于体内递送效率、组织特异性和免疫原性;天然产物则普遍受限于理化性质和成药性缺陷。尽管如此,这些新型策略为应对 ATP 竞争性抑制剂的固有局限提供了重要补充,未来可能与传统小分子抑制剂形成互补的治疗格局。

5 临床转化瓶颈: 深层机制剖析与应对策略

TNIK 抑制剂从优秀体外化合物到成功临床药物的转化面临多重挑战。整合既往文献与最新研究证据,从机制层面分析关键矛盾及其解决路径。

5.1 激酶选择性: 保守 ATP 口袋与脱靶毒性的矛盾

丝氨酸/苏氨酸激酶的 ATP 结合口袋在进化上高度保守, TNIK 所属的 GCK 家族成员 (如 MAP4K4、MINK1) 在活性位点序列同源性超过 60%, 这是多数早期 TNIK 抑制剂脱靶效应的结构根源^[26]。早期氨基噻唑类 (如 NCB-0001) 和喹唑啉类 (如 NCB-0846) 化合物在激酶谱中均显示数十个高亲和力脱靶靶点^[19,27]。二氢苯并噻唑酮类 (化合物 13) 和苯并噻唑酮类 (化合物 14) 通过独特的结合位点投射策略将脱靶范围大幅缩小至 Flt4 和 Flt1, 选择性显著改善^[33-34]。

Rentosertib 通过 AI 算法精确识别 TNIK 的选择性感热点——铰链区周围氨基酸序列的微小变异及溶剂暴露区的独特拓扑特征——成功突破了传统抑制剂的选择性极限。这一经验值得在未来 TNIK 抑制剂设计中推广, 可以在保持足够酶学抑制效力的同时, 将脱靶范围控制在可接受的安全窗内。

5.2 效力-暴露量-毒性的三角矛盾

高系统暴露量导致的脱靶毒性在 TNIK 抑制剂开发中反复出现。四川大学研究的喹啉衍生物化合物 9 是典型案例: 其 TNIK 抑制活性达 6 nmol·L⁻¹, 口服生物利用度高达 84.64%, 但在 HCT-116 异种移植瘤模型中即使高剂量给药 TGI 仅 52%~59%, 且伴随动物体质量减轻和死亡^[8]。药动学分析揭示,

10 mg·kg⁻¹ 剂量下 AUC₀₋₇ 已达 45 694 μg·h·L⁻¹, 提示高系统暴露量导致的脱靶毒性是效力受限的根本原因^[8]。这一现象的机制可归结为: TNIK 在肠道干细胞、肝细胞和中枢神经系统中均有基础表达。当抑制剂系统暴露量过高时, 不仅靶向肿瘤或纤维化组织中的 TNIK, 也会广泛抑制正常组织中的生理性 TNIK 功能。特别是肠道 TNIK 的抑制可能损害肠道屏障功能并扰乱菌群稳态, 这与临床前模型中观察到的胃肠道毒性高度一致^[7,20]。解决这一矛盾的可能路径包括: (1) 开发组织靶向递送系统 (如纳米载体或肺部吸入制剂) 以提高病灶局部分布, 降低全身暴露; (2) 优化化合物在靶组织中的选择性富集能力, 通过理化参数调控实现组织偏好性分布; (3) 采用间歇给药策略替代持续抑制, 保留 TNIK 在正常组织中的基础生理功能^[50]。

5.3 支架功能干扰的双刃剑效应

TNIK 独特的支架蛋白功能 (通过中间域介导 TCF4-β-catenin 相互作用) 使其抑制剂设计面临双刃剑困境。开放非活性构象抑制剂 (如 NCB-0846) 虽能有效破坏支架复合物组装, 但也可能引发转录复合体解体后的代偿性信号上调^[6]。近期研究提示, TNIK 抑制可能间接激活替代性 Wnt 非经典通路 (如 Wnt/PCP 通路), 这解释了部分动物模型中单药疗效受限的现象^[6]。

此外, TNIK 的支架功能在不同细胞类型中发挥差异化作用——在肠道干细胞中是维持干性的关键因子, 而在神经元中参与突触蛋白稳定^[3,27]。这种组织与细胞类型依赖性使得抑制剂的安全窗设计更为复杂: 同一分子在不同适应证中可能呈现迥异的安全性谱。因此, 未来 TNIK 抑制剂的开发需针对不同适应证建立特异性的安全性评价体系。

纵观 TNIK 抑制剂研发历程, 临床转化面临的核心矛盾可归纳为 3 点: (1) 强效闭合构象抑制剂的细胞活性困境——酶学 IC₅₀ 与细胞活性存在 2~

3 个数量级差距；(2) 高选择性分子的体内药效不足——细胞膜渗透性与胞内靶点占有率不匹配；(3) 口服制剂暴露量与脱靶毒性的失衡——高生物利用度未必转化为高治疗指数。Rentosertib 的成功表明，通过 AI 驱动的多目标优化和变构后门腔占据策略，可以在一定程度上突破上述矛盾，但彻底解决仍需在组织靶向递送和支架功能精准调控方面持续创新。

6 结语与展望

TNIK 作为 Wnt/ β -catenin 通路的关键激活因子，在肿瘤、纤维化及代谢性疾病等多种病理过程中发挥中枢调控作用。TNIK 抑制剂的临床转化需从“一刀切”的广谱抑制策略转向基于适应证的精准开发：在结直肠癌等 Wnt 依赖性肿瘤中，应建立基于通路激活状态的生物标志物体系用于患者分层，并探索与 Porcupine 同源蛋白 (PORCN) 抑制剂或 β -catenin 降解剂的联合用药以应对信号网络代偿性激活^[51]。在纤维化领域，Rentosertib 的 IIa 期数据奠定了 TNIK 靶向治疗的基础，未来适应证应从 IPF 进一步向肝纤维化和肾纤维化拓展^[4-5]；这些器官纤维化同样涉及 TGF- β /Wnt 通路的异常激活与 EMT 驱动的组织重构，且临床需求更为迫切，可通过开发组织靶向递送系统（如吸入制剂、纳米载体）提高病灶局部药物浓度，降低全身暴露量引发的脱靶毒性^[7]。对于代谢性疾病与神经退行性疾病等新兴适应证，则需优先开发组织选择性富集的抑制剂，并采用适度剂量或间歇给药策略以兼顾疗效与基础生理功能保护^[50]。

随着 AlphaFold3、冷冻电镜等结构生物学技术的持续进步，全长 TNIK 及其与 TCF4- β -catenin 转录复合体的高分辨率结构解析将为变构抑制剂和支架-催化双重调控策略提供精准模板。同时，AI 辅助药物设计平台（如 Chemistry42）的多维优化算法与自动化合成表征平台的闭环联用将进一步加速创新分子的发现与验证。Rentosertib 的成功已证明“构象悖论”并非不可逾越、多重矛盾可通过系统性优化实现平衡。未来，随着结构生物学、计算化学与 AI 技术的深度融合，以及组织靶向递送和精准临床分层策略的不断完善，TNIK 靶向药物有望在肿瘤、纤维化等多适应证领域实现从概念验证走向临床获批，成为下一代精准医疗的重要武器。

参考文献

- [1] Fu C A, Shen M, Huang B C, et al. TNIK, a novel member of the germinal center kinase family that activates the c-Jun N-terminal kinase pathway and regulates the cytoskeleton [J]. J Biol Chem, 1999, 274(43): 30729-30737.
- [2] 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.
- [3] Li Y T, Wang F Y, Wang K X, et al. Therapeutic applications and molecular mechanisms of TNIK inhibitors: A comprehensive review of current advances [J]. Bioorg Chem, 2025, 163: 108768.
- [4] Ren F, Aliper A, Chen J, et al. A small-molecule TNIK inhibitor targets fibrosis in preclinical and clinical models [J]. Nat Biotechnol, 2025, 43(1): 63-75.
- [5] Xu Z J, Ren F, Wang P, et al. A generative AI-discovered TNIK inhibitor for idiopathic pulmonary fibrosis: A randomized phase 2a trial [J]. Nat Med, 2025, 31(8): 2602-2610.
- [6] Kukimoto-Niino M, Shirouzu M, Yamada T. Structural insight into TNIK inhibition [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(21): 13010.
- [7] Wu X, Zhang Z, Qiu Z Y, et al. TNIK in disease: From molecular insights to therapeutic prospects [J]. Apoptosis, 2024, 29(9/10): 1361-1376.
- [8] Teng Y X, Wu R, Bo W C, et al. Fragment growth-based discovery of novel TNIK inhibitors for the treatment of colorectal cancer [J]. Eur J Med Chem, 2024, 268: 116240.
- [9] Guo J N, Liang J M, Wang Y Z, et al. TNIK drives castration-resistant prostate cancer via phosphorylating EGFR [J]. iScience, 2023, 27(1): 108713.
- [10] Peng D D, Fu M Y, Wang M N, et al. Targeting TGF- β signal transduction for fibrosis and cancer therapy [J]. Mol Cancer, 2022, 21(1): 104.
- [11] Song X H, Xu H W, Wang P, et al. Focal adhesion kinase (FAK) promotes cholangiocarcinoma development and progression via YAP activation [J]. J Hepatol, 2021, 75(4): 888-899.
- [12] Torres-Ayuso P, An E, Nyswaner K M, et al. TNIK is a therapeutic target in lung squamous cell carcinoma and regulates FAK activation through merlin [J]. Cancer Discov, 2021, 11(6): 1411-1423.
- [13] Yu D H, Zhang X, Wang H, et al. The essential role of TNIK gene amplification in gastric cancer growth [J]. Oncogenesis, 2014, 3(2): e89.
- [14] Phung Pham T C, Dollet L, Ali M S, et al. TNIK is a conserved regulator of glucose and lipid metabolism in

- obesity [J]. *Sci Adv*, 2023, 9(32): eadf7119.
- [15] Shkoda A, Town J A, 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(8): e1001376.
- [16] Zhang T, Ma C, Zhang Z Q, et al. NF- κ B signaling in inflammation and cancer [J]. *MedComm*, 2021, 2(4): 618-653.
- [17] Joachim J, Maselli D, Petsolari E, et al. TNIK: A redox sensor in endothelial cell permeability [J]. *Sci Adv*, 2024, 10(51): eadk6583.
- [18] Zhang R, Yu Y, Yang Y, et al. Therapeutic targeting of TNIK in papillary thyroid carcinoma: a novel approach for tumor growth suppression [J]. *Med Oncol*, 2024, 41(6): 160.
- [19] Tesshi Y, Miki S, Koichi Y, et al. TNIK inhibitor and the use: WO, WO2010064111A1 [P]. 2010-06-10.
- [20] Qin L H, Aladinskiy V, Gennert D, et al. Traf2- and Nck-interacting kinase inhibitors: A patent review (2008-2024) [J]. *Expert Opin Ther Pat*, 2025, 35(10): 1051-1061.
- [21] Sawa M, Moriyama, Yamada T, et al. Novel bicyclic thiazole compounds: WO, WO2013176293A1 [P]. 2013-11-28.
- [22] Kim J, Moon S H, Kim B T, 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(10): e110180.
- [23] Lee Y, Jung J I, Park K Y, et al. Synergistic inhibition effect of TNIK inhibitor KY-05009 and receptor tyrosine kinase inhibitor dovitinib on IL-6-induced proliferation and Wnt signaling pathway in human multiple myeloma cells [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(25): 41091-41101.
- [24] Chang S Y, Lee H, Kim K Y, et al. Hetero ring-fused phenyl compounds for inhibiting TNIK and medical uses thereof: WO, WO2019156438A1 [P]. 2019-08-15.
- [25] Chang S Y, Lee H, Kim K Y, et al. Compounds for inhibiting TNIK and medical uses thereof: WO, WO2019156439A1 [P]. 2019-08-15.
- [26] Ho K K, Parnell K M, Yuan Y, et al. Discovery of 4-phenyl-2-phenylaminopyridine based TNIK inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2013, 23(2): 569-573.
- [27] Masuda M, Uno Y, Ohbayashi N, et al. TNIK inhibition abrogates colorectal cancer stemness [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 12586.
- [28] Wang H, Yi T, Meng J, et al. Quinazoline derivative and use thereof: WO, WO2023143135A1 [P]. 2023-08-03.
- [29] Coburn C A, Smith S W, Dubose R F. Tnik modulators, conjugates, and uses thereof: WO, WO2019079357A1 [P]. 2019-04-25.
- [30] Tan Z, Chen L, Zhang S X. Comprehensive modeling and discovery of mebendazole as a novel TRAF2- and NCK-interacting kinase inhibitor [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 33534.
- [31] Karaman M W, Herrgard S, Treiber D K, et al. A quantitative analysis of kinase inhibitor selectivity [J]. *Nat Biotechnol*, 2008, 26(1): 127-132.
- [32] Chon H J, Lee Y, Bae K J, 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(7): 1591-1599.
- [33] Li Y S, Zhang L T, Yang R C, et al. Discovery of 3, 4-dihydrobenzo [f] [1, 4] oxazepin-5(2H)-one derivatives as a new class of selective TNIK inhibitors and evaluation of their anti-colorectal cancer effects [J]. *J Med Chem*, 2022, 65(3): 1786-1807.
- [34] Luo X L, Yang R C, Li Y S, et al. Discovery of benzo [d] oxazol-2(3H)-one derivatives as a new class of TNIK inhibitors for the treatment of colorectal cancer [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2022, 67: 128745.
- [35] Padgaonkar A, Cosenza S, Pallela V, et al. Abstract 4453: The dual CK2/TNIK inhibitor, ON108600 targets cancer stem cells and induces apoptosis of paclitaxel resistant triple-negative breast cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2015, 75(15_Supplement): 4453.
- [36] Sato K, Padgaonkar A A, Baker S J, 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(1): 4671.
- [37] Squire C J, Dickson J M, Ivanovic I, et al. Structure and inhibition of the human cell cycle checkpoint kinase, Wee1A kinase [J]. *Structure*, 2005, 13(4): 541-550.
- [38] Yang B W, Wu Q, Huan X J, 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.
- [39] Read J, Collie I T, Nguyen-McCarty M, et al. Tool inhibitors and assays to interrogate the biology of the TRAF2 and NCK interacting kinase [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2019, 29(15): 1962-1967.
- [40] Crawford T D, Ndubaku C O, Chen H F, et al. Discovery of selective 4-Amino-pyridopyrimidine inhibitors of MAP4K4 using fragment-based lead identification and optimization [J]. *J Med Chem*, 2014, 57(8): 3484-3493.
- [41] Aladinskiy V, Kruse C, Qin L H, et al. Discovery of bis-imidazolecarboxamide derivatives as novel, potent, and selective TNIK inhibitors for the treatment of idiopathic

- pulmonary fibrosis [J]. *J Med Chem*, 2024, 67(21): 19121-19142.
- [42] Yoo W. Precision oncology in the age of AI: Lessons from AI-driven drug discovery and clinical translation [J]. *BJC Rep*, 2026, 4(1): 18.
- [43] Niazi S K. Artificial intelligence in small-molecule drug discovery: A critical review of methods, applications, and real-world outcomes [J]. *Pharmaceutics*, 2025, 18(9): 1271.
- [44] Wu J L, He J D, Ni Q Y, et al. AI-driven drug discovery: Focus on targets for solid tumors [J]. *Pharmaceutics*, 2026, 18(3): 329.
- [45] Ma L S, Li R, Yao Z W, et al. Computational study on new natural compound inhibitors of Traf2 and Nck-interacting kinase (TNIK) [J]. *Aging*, 2022, 14(20): 8394-8410.
- [46] Sun Y F, Gao X Y, Wu P P, et al. Jatrorrhizine inhibits mammary carcinoma cells by targeting TNIK mediated Wnt/ β -catenin signalling and epithelial-mesenchymal transition (EMT) [J]. *Phytomedicine*, 2019, 63: 153015.
- [47] Vinogradov A A, Zhang Y, Hamada K, et al. De novo discovery of thiopeptide pseudo-natural products acting as potent and selective TNIK kinase inhibitors [J]. *J Am Chem Soc*, 2022, 144(44): 20332-20341.
- [48] Wu X L, Zhong Y W, Zhang H, et al. miR-5590-3p inhibits the proliferation and invasion of ovarian cancer cells through mediating the Wnt/ β -catenin signaling pathway by targeting TNIK [J]. *Histol Histopathol*, 2024, 39(3): 345-355.
- [49] Zhou K, Cheong J E, Krishnaji S T, et al. Inhibition of Wnt signaling in colon cancer cells via an oral drug that facilitates TNIK degradation [J]. *Mol Cancer Ther*, 2023, 22(1): 25-36.
- [50] Ewald C Y, Pulous F E, Lok S W Y, et al. TNIK's emerging role in cancer, metabolism, and age-related diseases [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2024, 45(6): 478-489.
- [51] Kim M J, Huang Y J, Park J I. Targeting Wnt signaling for gastrointestinal cancer therapy: Present and evolving views [J]. *Cancers*, 2020, 12(12): 3638.

[责任编辑 刘东博]