

靶向 G-四链体的抗肿瘤分子研究进展

王悦¹, 孟桐¹, 延辉¹, 王志国²

(1. 聊城大学药学院, 山东聊城 252059; 2. 杭州师范大学医学部, 浙江杭州 311121)

摘要 G-四链体(G4)是由富含鸟嘌呤的DNA或RNA序列形成的非标准核酸二级结构,多位于端粒DNA末端和致癌基因的启动子区域,与细胞衰老、癌基因表达等重要的生物学过程密切相关。由于稳定G4结构能够诱导细胞的衰老、凋亡并抑制癌基因的表达,G-四链体已经成为抗肿瘤研究的新的靶点。近年来,科学家设计了多种小分子G4稳定剂,研究表明相关分子通过稳定G4结构表现出良好的肿瘤抑制活性,因此以G4为靶点设计和开发新的小分子药物具有广阔的发展前景。汇总近五年来靶向不同G4结构的各类小分子配体,系统分析了其结构和抗肿瘤活性之间的关系,为新型抗肿瘤小分子药物的设计与优化奠定重要基础。

关键词 端粒, G-四链体, 抗肿瘤药物, 稳定剂

中图分类号 R730.1

文献标识码 A

开放科学(资源服务)标识码(OSID)



Research Progress of Anti-Tumor Molecules Targeting G-Quadruplex

WANG Yue¹, MENG Tong¹, YAN Hui¹, WANG Zhiguo²

(1.School of Pharmaceutical Sciences, Liaocheng University, Liaocheng 252059, China; 2. School of Medicine, Hangzhou Normal University, Hangzhou 311121, China)

Abstract G-quadruplex (G4) is a non-canonical nucleic acid secondary structure formed by guanine-rich DNA/RNA sequences. G4 structures mostly locate at the end of telomere DNA or the promoter region of oncogenes. It is closely related to important biological processes including cell senescence and oncogene expression. Since stabilization of G4 structures can induce senescence and apoptosis of cancer cells and inhibit oncogene expression, G4 has been recognized as a new target for cancer therapy. In recent years, scientists have designed and synthesized a variety of small molecules that exhibit good antitumor activity by stabilizing G4 structures. Therefore, design and development novel small molecule drugs targeting G4 have broad prospects. In this paper, various small molecule ligands targeting different G4 structures in the past five years were summarized, and the relationship between their structures and antitumor activity was systematically analyzed, which laid an important foundation for the design and optimization of novel small molecule antitumor drugs.

Key words telomere, G-quadruplex, antitumor drugs, stabilizers

收稿日期: 2021-04-01

基金项目: 国家自然科学基金项目(21203084)资助

通讯作者: 延辉, 男, 汉族, 博士, 副教授, 研究方向: 物理化学, E-mail: yanhuilcu@163.com; 王志国, 男, 汉族, 博士, 副研究员, 研究方向: 计算生物学, E-mail: zhgwang@hznu.edu.cn.

0 引言

癌症是世界第二大致死性疾病,最新的全球癌症统计数据表明 2020 年有近 1000 万患者死于癌症^[1]。近年来,针对癌症的免疫治疗和靶向治疗取得了突破性进展^[2],遗传和表观遗传异常以及肿瘤细胞中促进肿瘤生长的致癌基因的鉴定更是为分子靶向疗法提供了重要的理论依据^[3],但是仍有大量癌症患者饱受病痛折磨,新型抗肿瘤策略和抑癌药物的研发仍是癌症治疗领域关注的焦点。近年来,人们发现了一种特殊的核酸结构能够干预恶性肿瘤转化和癌症发展,这种新型核酸结构被称为 G-四链体(G4)^[4]。

G4 是由富含鸟嘌呤的 DNA 或 RNA 序列形成的非标准核酸二级结构,多位于端粒 DNA 末端和癌基因的启动子区域。端粒是真核细胞线状染色体末端的 DNA-蛋白质复合物,复合物中的端粒酶可以催化延长端粒。正常体细胞中检测不到端粒酶活性^[7],端粒会随着细胞分裂而缩短,当端粒在正常细胞(非干细胞)中变得非常短时,会诱发 DNA 损伤反应,最终导致细胞凋亡^[5]。然而,大约 80%-85% 的癌细胞中端粒酶被过度激活^[6],使得癌细胞能够在不缩短端粒长度的情况下进行复制并在适宜的条件下无限增殖。体内和体外研究发现端粒 G4 可以抑制肿瘤细胞中端粒酶的活性,并进一步诱导产生端粒 DNA 损伤、染色体末端融合和细胞凋亡,而正常体细胞则不受影响^[8]。因此,开发具有诱导端粒 G4 结构形成和稳定 G4 结构功能的小分子配体是抗肿瘤治疗的新策略。

除端粒 G4 外,*c-MYC*、*c-KIT* 等癌基因的启动子区域也可由鸟嘌呤富集序列形成 G4 结构^[9,10]。研究发现,*c-MYC* 和 *c-KIT* G4 结构的稳定能够抑制癌基因的表达,从而抑制肿瘤的发生和发展^[11,12]。因此,癌基因启动子区域的 G4 也是重要的抗肿瘤靶点,亟待关注。

金属离子在 G4 结构的稳定中发挥着重要作用,但是人体内的金属离子如 K^+ 、 Na^+ 等不足以抗衡解旋酶如 G4R1 对 G4 的解旋作用^[13],导致端粒酶的活性不能被充分抑制。所以,大量研究通过设计不同类型的小分子配体靶向结合并稳定 G4 结构来抑制癌细胞端粒酶活性、诱导肿瘤细胞凋亡。本文汇总了近五年来报道的 G4 靶向性小分子稳定剂,系统分析其与 G4 的相互作用机制及结构-活性关系,对新型抗肿瘤药物的设计和开发具有重要意义。

1 G-四链体的结构

在 K^+ 、 Na^+ 等金属离子存在的条件下,富含鸟嘌呤的 DNA 和 RNA 序列通过折叠形成 G4 结构。G4 结构中四个鸟嘌呤之间通过 Hoogsteen 氢键形成共平面的 G-四分体结构(图 1(a)),G-四分体进一步通过 π - π 堆积作用形成非标准的核酸二级结构 G4^[8]。除单价金属离子外,研究发现二价金属离子如 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 等也能够稳定 G4 结构^[14,15]。

从结构上看,G4 由多层堆叠的 G-四分体刚性 G-stem、柔性 loop 结构以及中心金属离子构成^[16]。根据 loop 链取向可以将 G4 分为以下三类:(1)四条链取向一致,称为平行构象 G4^[17](图 1(b));(2)两条链取向一致并与另外两条链取向相反,称为反平行构象 G4^[18](图 1(c));(3)三条链取向一致而第四条链取向相反,称为杂合构象^[19](图 1(d))。

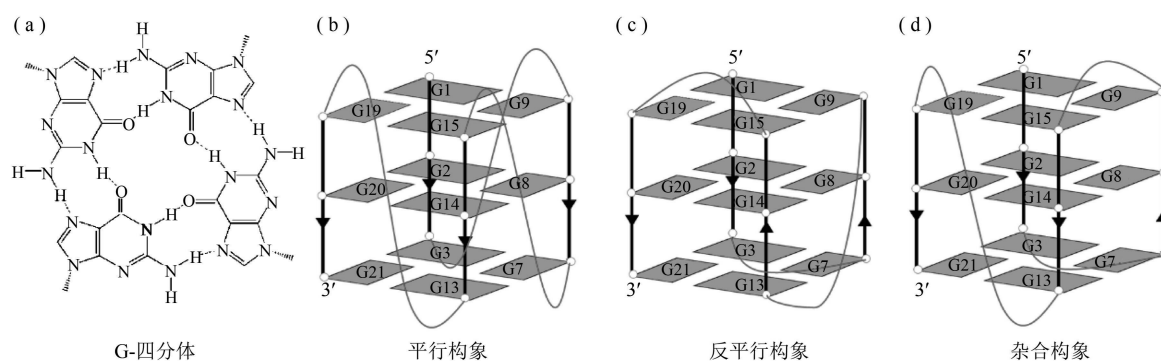


图 1 G-四分体和不同结构的 G4

2 靶向 G-四链体的小分子配体

2.1 蒽醌类化合物

早在二十世纪六十年代研究人员就发现蒽环类抗生素有抗肿瘤活性,并于 1978 年首次合成蒽二醌类化合物米托蒽醌(MTX)^[20](图 2(a)),但未能明确其抗癌机制。2018 年 Sweta 等人^[21]通过荧光、¹H/³¹P 核磁共振波谱和约束分子动力学方法阐明了 MTX 与端粒 G4 之间的相互作用,并且确定了 MTX 结合于端粒 G4 的 loop 凹槽而不是以末端堆积的方式结合于 G-四分体外侧。由于 DNA 双螺旋和 G4 中的沟槽结构有明显差异,因此 MTX 与端粒 G4 的结合是特异性的,二者相互作用的揭示对新型特异性蒽醌衍生物的设计具有重要意义。

1997 年 Sun 等人^[22]首次报道了对人端粒酶起抑制作用的蒽醌类化合物 2,6-diamidoanthraquinone (1)(图 2(b)),该化合物选择性作用于端粒 G4 而非双链 DNA。化合物 1 中的蒽醌发色团是蒽环类抗生素的重要结构特征,蒽环类药物的抗癌效果显著,但副作用(心脏毒性)大,需进一步改进。Awasthi 等人^[23]在蒽醌发色团的侧链上引入了 1-取代黄酰胺基团和各种氨基酸类取代基。MCF-7、PC-3 和 Hela 癌细胞株实验以及抗菌和抗氧化活性检测表明,与 MTX 相比,新合成的 1-取代分子在细胞水平上促进了与端粒 G4 的结合,其中 1-[1-oxo-2-(benzosulfonamide)-ethylamido]-anthracene-9,10-dione(S4,图 2(c))表现出比 MTX 更好的抗肿瘤活性。研究发现,S4 分子侧链的结构是其抗癌活性改善的关键因素^[23]。

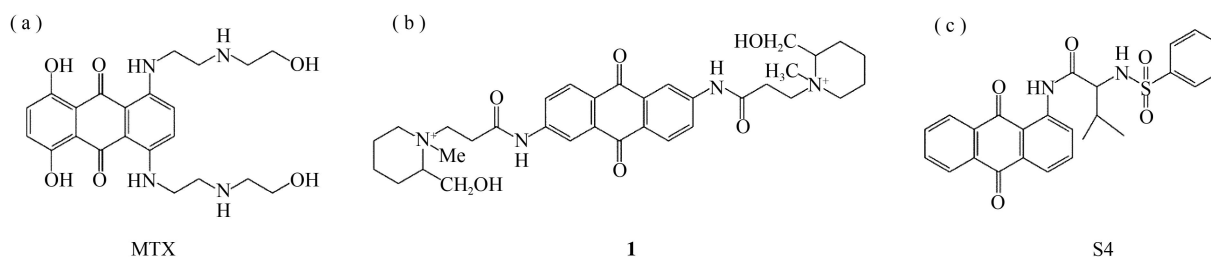


图 2 蒽醌类化合物

2.2 吡啶类化合物

恶性肿瘤常发 KRAS 突变,调节 KRAS 蛋白表达的方法之一是靶向稳定其启动子区域的 G4 结构。Carvalho 等人报道了新型吡啶橙(AO)类 KRAS G4 稳定剂(图 3(a)),体外实验和分子模拟研究表明 AO 衍生物能与 KRAS G4 形成稳定结合^[24]。

Guo 等人^[25]针对 *c-KIT* G4 设计合成了一系列 7-substituted-5,6-dihydrobenzo[*c*]吡啶衍生物(图 3(b)),体外检测发现该系列衍生物可以有效地结合并稳定 *c-KIT* G4,并且对双链 DNA 具有良好的选择性。针对人白血病细胞 K562、肺癌细胞株 A549、宫颈癌细胞(Hela)系以及人正常 BJ 细胞的研究发现,大多数的非甲基化衍生物对于癌细胞的细胞毒性较强,而对于人正常细胞的抑制作用相对较弱,表明化合物对癌细胞的靶向选择性。其中,化合物 N1-(2,3-dimethoxy-5,6-dihydrobenzo[*c*]acridin-7-yl)-N3,N3-diethylpropane-1,3-diamine(2b,图 3(b))对 Hela 细胞的抑制作用最强,对另外两种癌细胞的细胞毒性较弱,特别是对于人正常细胞的细胞毒性最弱。

Paluszkiwicz 等人^[26]开发合成了 36 种新型非对称双吡啶衍生物(UAs)(图 3(c)),细胞毒性实验表明这些化合物对于几种肿瘤细胞系如结肠癌、乳腺癌、前列腺癌和胰腺癌具有高效抑制作用,动物实验中 UAs 对实体瘤同样表现出很高的抗肿瘤活性。作用机制研究表明双吡啶衍生物选择性靶向 G4 结构而非双链 DNA。UAs 与 *c-MYC* G4 的构效关系研究发现,药物-*c-MYC* G4 复合物的热稳定性不仅取决于杂环的结构,还取决于单体连接物二烷基氨基链的性质。

中山大学王国涛等人^[27]合成了 28 种新的双吡啶衍生物并评估了它们与 *c-MYC* G4 以及 *i*-基序的结合。研究发现 N1,N1'-(Ethane-1,2-diyl)bis(N3-(2,7-dimethylacridin-9-yl)-propane-1,3-diamine)(a9,图 3(d))可以结合并稳定 G4 和 *i*-基序,导致 *c-MYC* 基因转录下调,进而抑制癌细胞增殖并诱导 SiHa 细胞周期阻滞和细胞凋亡。研究揭示了 a9 作为 G4 和 *i*-基序结构配体在调控致癌基因复制和转录方面的双重作用,表明 a9 可以作为研发高特异性抗癌药物的先导化合物。

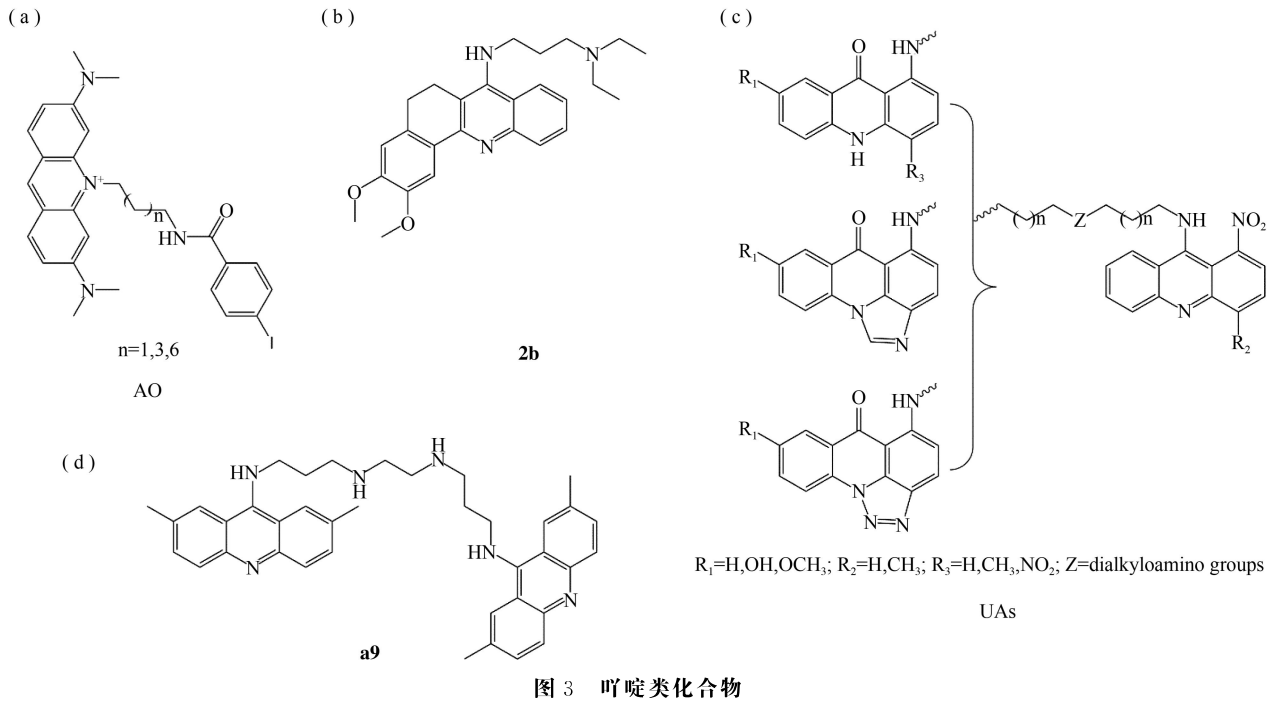


图 3 嘧啶类化合物

2.3 黄酮及类黄酮化合物

槲皮素是一种具有抗癌活性的天然黄酮类化合物,但是水溶性较差、酶降解速率快、稳定性差等缺点限制了药用价值^[28]。科研工作者通过对槲皮素的碳环羟基等进行结构修饰,以求获取抗癌活性和生物利用度更高的槲皮素衍生物,以用于癌症的临床治疗^[29,30]。

Tawani 等人^[31]研究了人类 *c-MYC* G4 DNA 与九种代表性类黄酮化合物(木犀草素、槲皮素、芦丁、染料木黄酮、山奈酚、葛根素、橙皮苷、杨梅素和大豆苷元)的相互作用(图 4),荧光滴定实验发现槲皮素与 *c-MYC* G4 的 Pu24T 序列具有最高亲和力,NMR 研究发现槲皮素主要堆叠在 Pu24T G4 的 5' 和 3' 端,并通过 $\pi-\pi$ 堆积作用使二者稳定结合。应用 MTT 法测定槲皮素对 HeLa 细胞以及正常细胞株的细胞毒性。研究发现槲皮素诱导 *c-MYC* 基因表达下调和细胞凋亡,其抑制 HeLa 细胞生长的 IC_{50} 值为 $4.0 \mu m$ 。该研究揭示了类黄酮通过选择性靶向 *c-MYC* 启动子区域 G4 抑制肿瘤细胞复制的功能,表明其可以作为潜在的抗癌药物进行深入研究。

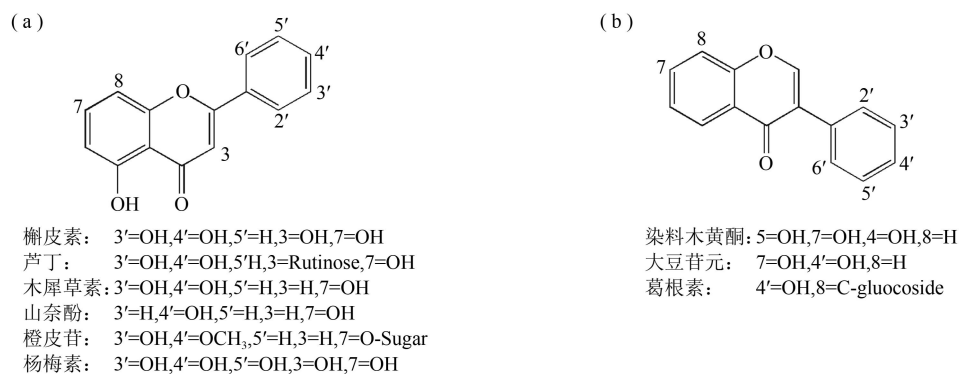


图 4 黄酮及类黄酮化合物

2.4 卟啉类化合物

四(N-甲基吡啶-2-基)卟啉 TMPyP4(图 5(a))是活性较高且研究较多的阳离子型卟啉化合物,其主要通过外部堆叠的方式稳定端粒 G4 并特异性抑制 MCF7 细胞端粒酶活性^[32,33]。Ruan 等人^[34]合成了一系列总电荷低于 TMPyP4 的具有不同侧链的 TMPyP4 类似物,并通过 FRET(荧光共振能量转移)熔融、紫外线滴定、圆二色谱等研究发现带有三个正电荷的 4P3(图 5(b))可能是比 TMPyP4 更好的端粒 G4 稳定剂配体。随后,王志国等人^[35]通过分子对接和分子动力学研究揭示了该类阳离子型卟啉化合物与人端粒 G4 结合时电荷数量和结合强度之间的定量关系,为后续 G4 模拟靶向的药物设计和开发提供了指导。

Perenon 等人^[36]利用表面等离子共振技术(SPR)研究了 N-methyl mesoporphyrin IX (NMM,图 5(c))与不同拓扑结构 G4 之间的相互作用,揭示了 NMM 对平行结构 G4 的高选择性,其解离常数比其他 G4 拓扑结构至少低 10 倍,并且 NMM 还具有将 G4 构象从混合拓扑以及反平行拓扑转变为平行拓扑构象的能力。NMM 主要通过 N-甲基定位以 π - π 堆积方式作用于平行 G4 的底层 G-四分体,但在混合结构或反平行结构中,末端 G-四分体被 loop 结构部分遮蔽所形成的空间位阻效应阻碍 NMM 与 G4 的有效结合^[37]。

近期研究发现 c-MYC G4 结构的稳定性与 pH 密切相关^[38,39]。在中性 pH 和 25-37 °C 条件下,由 Watson-Crick 氢键稳定的双链 DNA 结构会阻碍 c-MYC G4 的形成。Navarro 等人^[40]对吡啶配体与 SMARCA4 基因启动子区域附近 G4 结构稳定性的研究发现,在中性或酸性 pH 下双链 DNA 不稳定,对应的 DNA 序列易形成 G4 和 i-基序。此外,在中性 pH 下 TMPyP4 对 SMARCA4 序列形成的 G4 结构具有潜在的稳定作用,但是在由 SMG01:SMC01 形成的 DNA 双链结构中,TMPyP4 的添加几乎不会诱导 c-MYC G4 结构的形成^[41]。由于 TMPyP4 与双链 DNA 的高水平结合易对正常细胞和组织产生副作用,其作为先导分子的使用受到限制。为了减少与 dsDNA 的相互作用,Chilakamarthi 等人^[42]合成了 TMPyP4 类似物 5Me(图 5(d)),癌细胞系的体外细胞毒性实验表明,5Me 具有与 TMPyP4 相当的抑制癌细胞生长的作用,同时对正常细胞的毒性较小。此外,在光照下 5Me 比 TMPyP4 能更有效的抑制癌细胞生长。

在 TMPyP4 中心引入金属离子如 Cu(II)、Zn(II)、Ni(II)、Mn(II)、Zn(II)、Co(II)等能够改变其电子结构并调整其结合端粒 G4 以及抑制端粒酶的能力^[43-45]。Sabharwal 等人^[46]应用紫外、荧光、圆二色谱、FRET 和 SPR 方法研究了 PtTMPyP4 和 PdTMPyP4(图 5(e))两种吡啶类金属络合物与不同构象的人端粒 DNA Tel22 G4 及癌基因启动子 G4 之间的相互作用,发现 PtTMPyP4 和 PdTMPyP4 具有相似的结合特性且其结合能力及结合稳定性均高于 TMPyP4,此发现对于理解金属离子在小分子配体和 G4 结合中的作用具有重要意义。

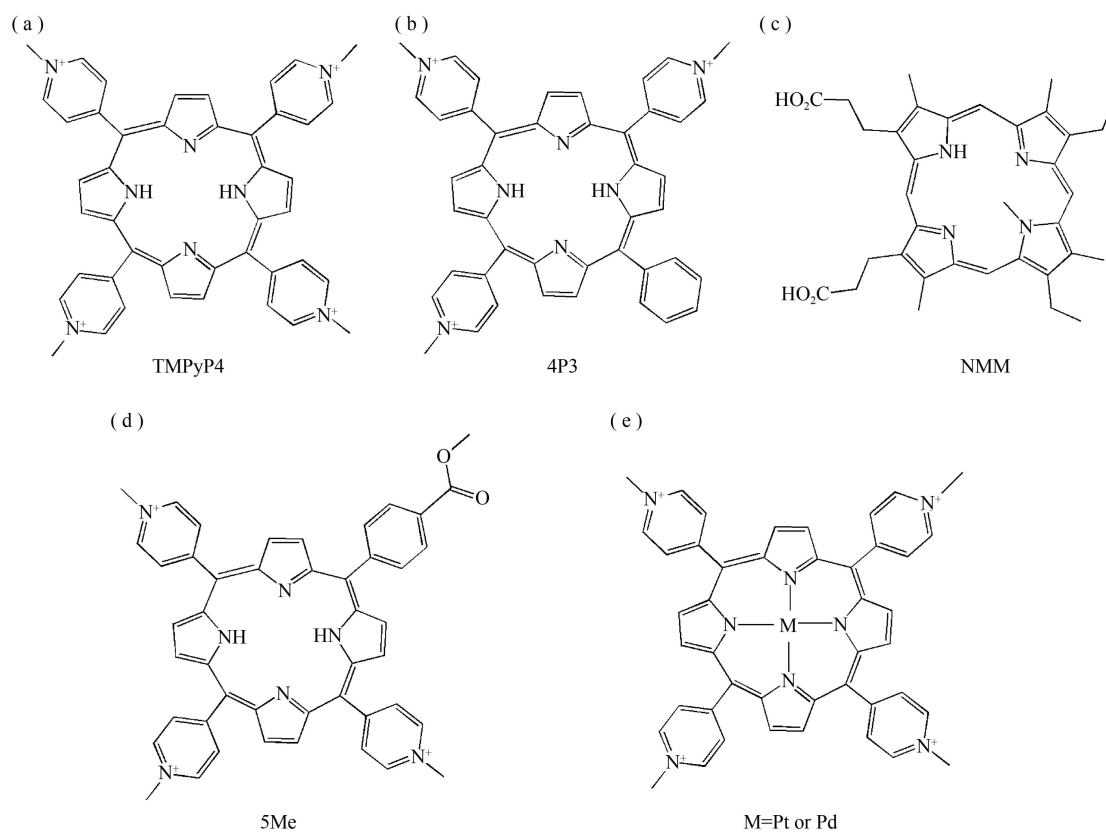


图 5 吡啶类化合物

2.5 吡啶类衍生物

自 1990 年吡啶类化合物 1-[[[(Dialkylamino)alkyl]amino]-4-methyl-5]f-pyrido[4,3-b]benzo[e]-and-benzo[g]indoles 对白血病小鼠肿瘤细胞和实体瘤细胞的细胞毒性作用被发现以来^[47],此化合物在 pyrido[4,3-b]indoles 和 e-位上的苯并环丁烯酮及稠合苯并环修饰均被证实具有更好的抗肿瘤作用。化合物 1-

[[3-(dimethylamino)propyl]amino]-9-hydroxy-4-methyl-5*i*-pyrido[4,3-*b*]benzo[*e*]indole (14c)^[47]被认为是最有希望的吡啶类抗肿瘤化合物(图 6(a))。Nagesh 等人^[48]研究发现二氢吡啶并吡啶衍生物可以选择性稳定人癌细胞中的 *c*-MYC G4,并下调 *c*-MYC 的表达,如化合物 4-cyanophenyl derivative (DHII-4CPh)(图 6(b))表现出明显的针对 *c*-MYC G4 的稳定作用和抗癌活性。

越来越多的吡啶类衍生物被发现通过稳定 G4 结构表达其生物活性。Prasad 等人^[49]合成了一系列在结构上类似但灵活性不同的柔性(scaffold 1,图 6(c))和刚性(scaffold 2,图 6(d))双吡啶衍生物,研究发现柔性双吡啶衍生物可以更好地适应周围环境,与 G4 结构中的碱基形成更好的堆积和极性相互作用,相比刚性衍生物能够更好的结合并稳定 *c*-MYC G4。进一步对双吡啶取代基位置(图 6(e))及化学组成关系的研究发现,电荷的贡献在与 *c*-MYC G4 的结合中至关重要,同时侧链喹啉基团的甲基化能有效提升双吡啶衍生物的生物活性^[50]。

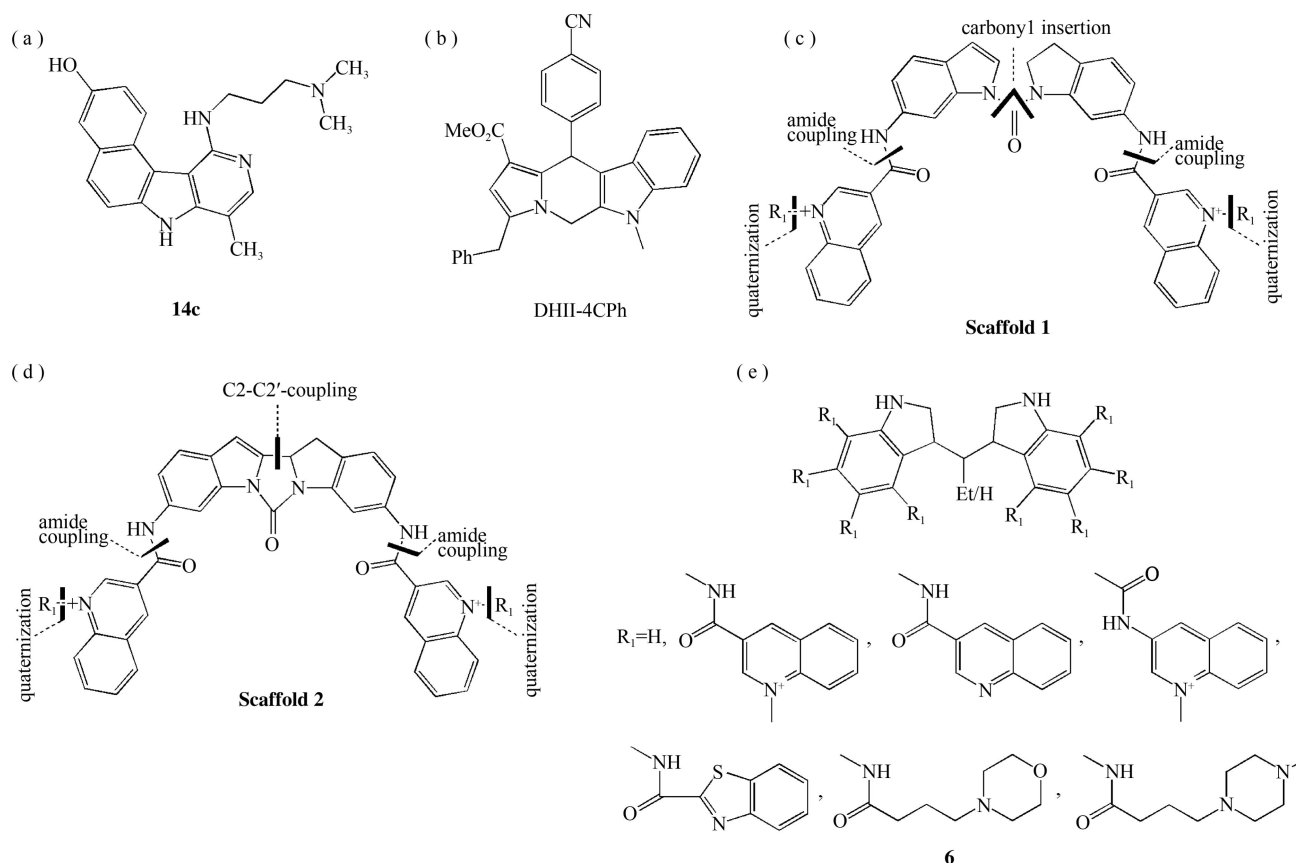


图 6 吡啶类化合物

2.6 喹啉类化合物

喹啉/喹啉酮类(发色团)化合物如 hydroxy-DPTQ、methoxy-DPTQ(图 7(a)和 7(b))等是现代医学中非常重要的一类化合物,其主要功能是抗菌、抗肿瘤。在肿瘤治疗中,可以通过消除发色团分子的毒性,提高喹啉类药物的选择性、特异性和生物利用度^[51]。Eduarda 等人^[52]基于喹啉和三氮唑杂环构建了一系列与端粒 G4 相互作用的柔性小分子,研究发现这类分子主要结合于端粒 G4 的 loop 凹槽区域且喹啉基团对二者的结合至关重要。通过对四种癌细胞株的细胞毒性筛选,作者发现 4,4'-((4,4'-(1,3-phenylene)bis(1H-1,2,3-triazole-4,1-diyl))bis(1-methylquinolin-1-ium)) (1d,图 7(c))细胞毒性最强,特别是对结肠癌干细胞的抑制活性。以上发现使得喹啉-三氮唑杂环化合物可以作为抗耐药性癌症新药研究的先导化合物。

针对一些新型的大环双吡啶喹啉类化合物(图 7(d)),Das 等人^[53]通过生物物理和分子动力学模拟方法研究揭示了其与 *c*-MYC G4 结合并稳定 G4 结构的分子机制。相较双链 DNA 结构,大环双吡啶喹啉类化合物对于 *c*-MYC G4 结构具有明显的选择性,且其选择性相比于开链类化合物明显更高。一些吡啶并喹啉化合物也表现出较好的体内外抗肿瘤活性。Altwaijry 等人^[54]合成了一系列 5-methyl-5H-indolo[2,3-*b*]quinoline 类似物(图 7(e)),其对 *c*-MYC G4 具有很高的亲和力,组织病理学检测证实该类似物对实体瘤具

有抗有丝分裂、诱导凋亡和坏死等显著疗效,并且对肝脏的副作用小,该研究是天然新甲状腺素类似物体内抗肿瘤活性的首次报道。

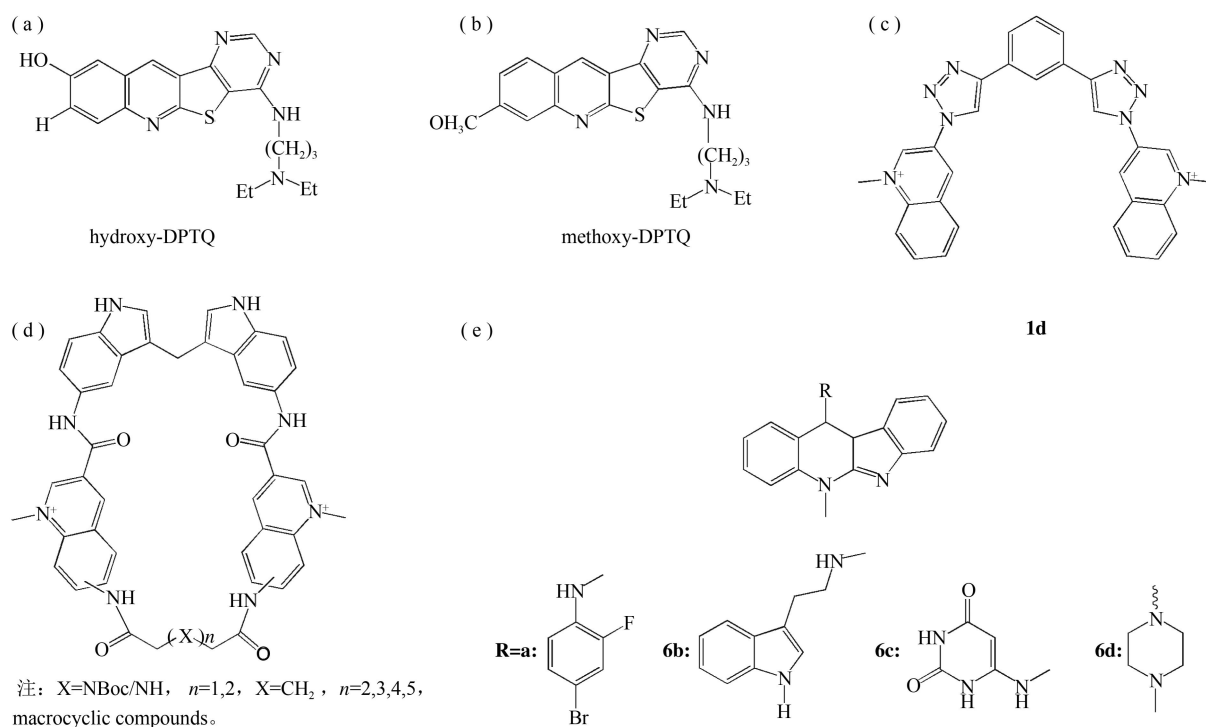


图7 喹啉类化合物

2.7 脲类衍生物

Sparapani 等人^[55]利用高通量 FRET、DNA 竞争实验和分子模拟研究表明带正电荷的二咪唑并[1,2-a; 1,2-c]嘧啶的双脲基脲类衍生物能够稳定端粒 G4 结构而对双链 DNA 结构无明显作用。Amato 等人^[56,57]随后合成了一系列新型脲类衍生物,并通过分子对接、FRET、圆二色谱以及细胞毒性研究揭示了其选择性结合并稳定端粒 G4 和端粒 R-loop 的功能。对比研究发现,2-((E)-5-(tert-Butyl)-2-hydroxy-3-((E)-(2-oxo-1,2-dihydro-3H-benzo[g]indol-3ylidene) methyl) benzylidene) hydrazine-1-carboxy-midamide Hydrochloride (15, 图 8)对端粒平行构象的 G4 结构有良好的选择性,能够同时触发细胞死亡和微核形成,即造成基因组不稳定。与常见的端粒酶抑制剂 BRACO-19 相比,2 μM 15 和 10 μM BRACO-19 在刺激 U2OS 病灶细胞时达到的效果是相同的,即较低浓度的 15 即可诱导 DNA 损伤并导致细胞凋亡,表明 G4 构象特异性配体可能表现出更好的抗癌特性,该发现对后续以 G4 为靶点的新型药物的研发具有重要的指导意义。

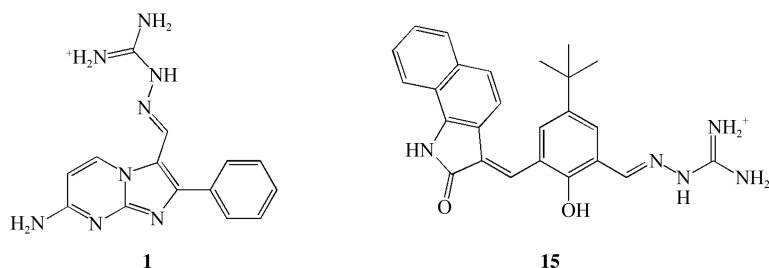


图8 脲类化合物

2.8 金属配合物

顺铂及其类似物是临床上广泛应用的抗癌药物^[58-60]。铂(II)相对于同等的镍(II)和钯(II)配合物结构更稳定,并且可以先被氧化成 Pt(IV)前药,随后在体内还原为活性状态。但是由于铂类化合物通过攻击基因组 DNA 杀死癌细胞,因此会不可避免地损伤正常细胞并造成严重的毒副作用^[62]。可以考虑的策略之一是通过靶向特定的 DNA 高级结构如 G4 降低铂(II)类药物的毒性。Morel 等人^[60]合成了多种铂(II)配合物,并通过 FRET、FID(火焰离子化检测)、荧光滴定、凝胶电泳以及细胞毒性等实验发现,通过甲基苯基(Pt-ttpy)扩展三联吡啶或用双喹啉(Pt-BisQ)取代三联吡啶核心(图 9(a)和 9(b))能够增加复合物与 *c-MYC* G4

的亲合力,在卵巢癌细胞系以及正常细胞系中的测试发现相关化合物可克服顺铂耐药性。

Pham 等人^[63]制备了 14 种新型镍(II)席夫碱配合物,与其他新的镍配合物相比,带有两个侧基的 N,N'-Bis-(4-((1-(2-ethyl)piperidine)oxy)benzophenylidene)-ethylenediaminenickel(II)(4,图 9(c))和带有四个侧基的 N,N'-Bis-(4,4'-((1-(2-ethyl)piperidine)oxy)benzo-phenylidene)ethylenediaminenickel(II)(14,图 9(d)),对端粒 G4 具有更高的亲和力和更好的诱导肿瘤细胞凋亡的作用。更广泛的镍席夫碱配合物的制备和活性检测发现,化合物 4 与平行端粒 G4 的结合最为稳定^[64]。

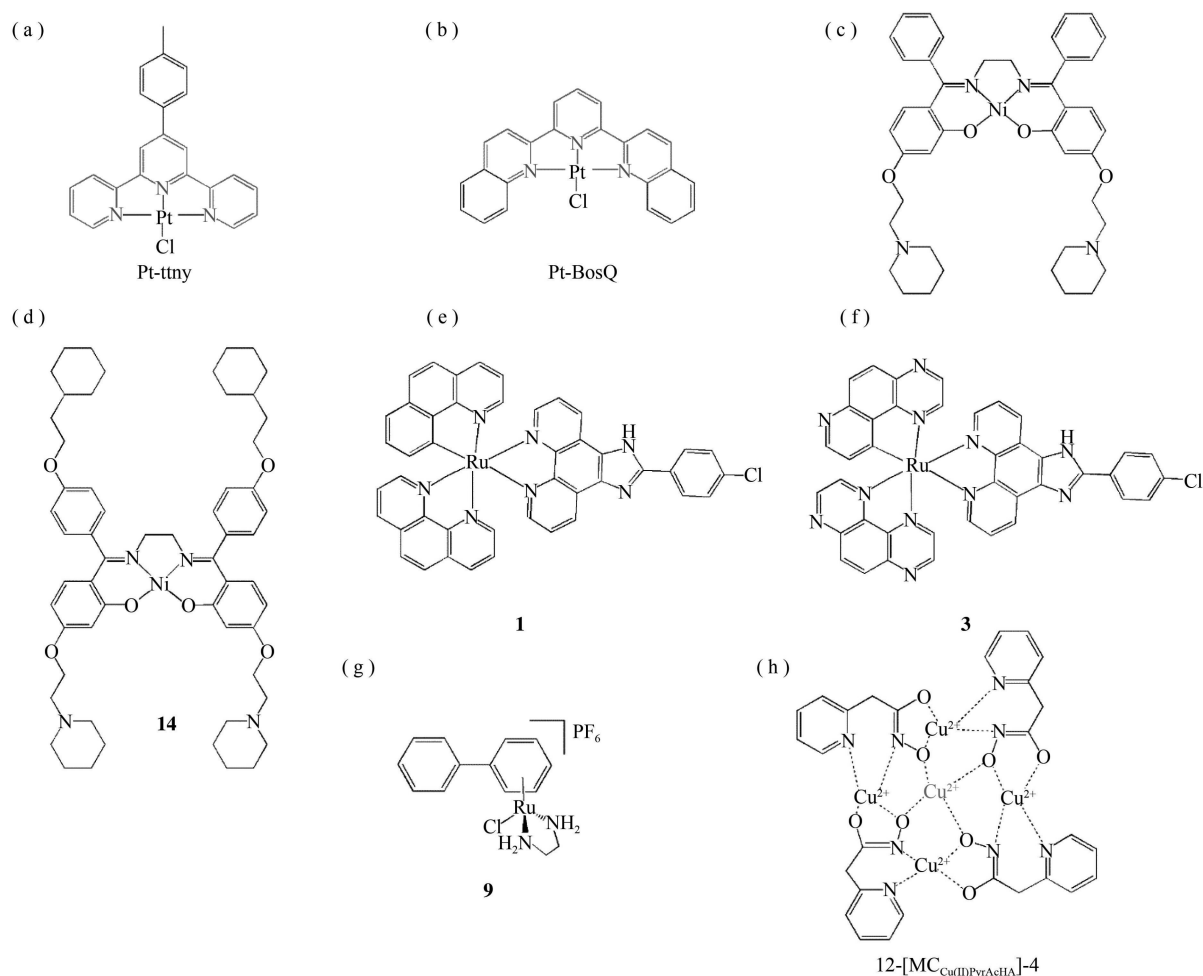


图 9 金属配合物结构

Weynand 等人^[65]报道了靶向 G4 DNA 的新型钌(II)配合物的设计和表征,证实钌(II)配合物对端粒 G4 结构的选择性高于双链 DNA 结构。光细胞毒性研究发现,钌(II)配合物 $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{CPIP}] \cdot 2\text{PF}_6$ (1,图 9(e))和 $[\text{Ru}(\text{TAP})_2\text{CPIP}] \cdot 2\text{PF}_6$ (3,图 9(f))对 U2OS 骨肉瘤细胞具有显著的光细胞毒性。光照下,在钌(II)配合物存在的情况下,U2OS 骨肉瘤细胞的光照死亡率为 100%,但是以相同的药物浓度在黑暗中观察到非常低的死亡率。黄超等人研究了有机金属钌(II)抗癌复合物 $(\eta^6\text{-biphenyl})\text{Ru}(\text{ethylenediamine})\text{Cl}[\text{PF}_6]$ (9,图 9(g))与人端粒 G4(22-mer)的相互作用,研究表明 G4 环上的 T6 和 T17 是化合物 9 的优先结合位点,而在鸟嘌呤上没有观察到钌。金属钌复合物在与端粒 G4 相互作用时与胸腺嘧啶的结合优于鸟嘌呤,表明金属钌(II)络合物和铂(II)配合物对端粒 G4 的作用机制不同,端粒 G4 中的胸腺嘧啶是钌类抗癌的重要靶向基团^[66]。

Rajczak 等人^[67]合成了 $12\text{-}[\text{MC}_{\text{Cu}(\text{II})\text{PyrAcHA}}]\text{-4}$ 金属冠醚配合物(MC)(图 9(h)),对其与人端粒和 c-MYC 序列的相互作用研究发现,Cu(II)配合物即使过量 18 倍也不会破坏反平行构象的端粒 G4 结构。此外,G4:MC 在摩尔比为 1:1 时足以实现金属配合物对端粒 G4 的稳定作用,进一步提高 MC 浓度只会稍微改善端粒 G4 的稳定性。G4 FID 分析和 $\text{Tb}^{3+}/\text{G4}$ 发光复合物猝灭测试揭示了金属冠醚配合物对端粒 G4 具有高亲和力,并且金属冠醚配合物的金属腔相比其他配合物的金属腔对端粒 G4 亲和力更强,表明这种金属冠醚配合物具有巨大的医学应用潜力。

表 1 靶向 G4 的小分子配体结构特征、靶向的 G4 类型及生物学活性数据

类型	化合物	靶点	活性数据
蒽醌类衍生物	MTX(图 2(a))	端粒 G4	端粒酶:IC ₅₀ = 2 μM ^[21]
	1(图 2(b))	端粒 G4	端粒酶:IC ₅₀ = 23 μM ^[22]
	S4(图 2(c))	ct-G4	Hela cells:IC ₅₀ = 1.008 μM ^[23]
	AO(图 3(a))	KRAS G4	HeLa cells:IC ₅₀ = 0.9-5.7 Mm ^[24]
吡啶类化合物	2b(图 3(b))	c-KIT G4	Hela cells:IC ₅₀ = 3.2 μM K562 cells:IC ₅₀ = 9.2 μM A549 cells:IC ₅₀ = 5.7 μM ^[25]
	C-2028(图 3(c))	c-MYC G4	Panc-1:IC ₅₀ = 0.024 μM
		KRAS G4	HT-29:IC ₅₀ = 0.037 μM HCT-116:IC ₅₀ = 0.017 μM ^[26]
	a9(图 3(d))	c-MYC G4	A375:IC ₅₀ = 0.28 μM
			Hela:IC ₅₀ = 0.45 μM
			A549:IC ₅₀ = 0.18 μM
U2OS:IC ₅₀ = 0.31 μM HCT116:IC ₅₀ = 0.15 μM SiHa:IC ₅₀ = 1.22 μM HuH7:IC ₅₀ = 0.16 μM ^[27]			
黄酮类化合物	槲皮素(图 4(a))	c-MYC G4	HeLa:IC ₅₀ = 4.0 μM ^[31]
卟啉类似物	TMPyP4(图 5(a))	端粒 G4	SW39:IC ₅₀ = 56.3 μM SW26:IC ₅₀ = 62.9 μM ^[32]
	5Me(图 5(d))	端粒 G4	光照条件下,SKOV3:IC ₅₀ = 2.3 μM PANC-1:IC ₅₀ = 3 μM ^[32]
吡啶类似物	DHII-4CPh(图 6(b))	c-MYC G4	c-MYC 表达减少,癌蛋白水平降低 ^[48]
	scaffold 1(图 6(c))	c-MYC G4	Taq 酶:IC ₅₀ = 0.4 μM ^[49]
	Scaffold 2(图 6(d))	c-MYC G4	Taq 酶:IC ₅₀ = 0.11 μM ^[49]
	1d(图 7(c))	端粒 G4	HT-29:IC ₅₀ = 10.63 μM ^[52]
喹啉类似物	6a(图 7(e))	c-MYC G4	EAC cell IC ₅₀ = 1.7 × 10 ⁻⁴ μM ^[54]
	6b(图 7(e))	c-MYC G4	EAC cell IC ₅₀ = 6.4 × 10 ⁻⁵ μM ^[54]
	6c(图 7(e))	c-MYC G4	EAC cell IC ₅₀ = 3.3 × 10 ⁻⁴ μM ^[54]
	6d(图 7(e))	c-MYC G4	EAC cell IC ₅₀ = 1.5 × 10 ⁻⁴ μM ^[54]
腺类衍生物	15(图 8 15)	端粒 G4	U2OS cell line:IC ₅₀ = 2.06 μM HeLa cell line:IC ₅₀ = 0.75 μM ^[57]
			A2780:IC ₅₀ = 3 μM
	Pt-ttpty(图 9(a))	c-MYC G4	A2780 cis:IC ₅₀ = 2.5 μM CCD19Lu:IC ₅₀ = 1.75 μM ^[60]
金属配合物	Pt-BisQ(图 9(b))	c-MYC G4	A2780:IC ₅₀ = 4 μM A2780 cis:IC ₅₀ = 6 μM CCD19Lu:IC ₅₀ = 4.1 μM ^[60]
			4(图 9(c))
	1, 3(图 9e, (f))	端粒 G4	光照下 U2OS 骨肉瘤细胞死亡率 100%, 而以相同的药物浓度在黑暗中 观察到非常低的死亡率 ^[65]

注:ct-DNA 为游离的来自肿瘤的 DNA (circulating tumor DNA, ctDNA)。

2.9 G-四链体配合物及其生物学功能

基于以上近五年来报道的 8 类主要的靶向 G4 结构的小分子配体,我们系统汇总了其所靶向的特异性 G4 及相关生物学活性数据,详见表 1。通过分析相关化合物的结构特性并对比其抗癌活性,可以帮助新药研发人员针对特定类型的 G4 结构确定最佳的小分子配体类型,并进一步高效设计新型、特异性的靶向 G4 的抗肿瘤小分子化合物。

3 总结和展望

小分子配体可以通过稳定端粒和癌基因启动子 G4 以达到抑制端粒酶活性和癌基因转录并最终诱导 DNA 损伤反应和癌细胞凋亡,因此 G4 作为新的抗肿瘤药物的靶点已经成为相关领域研究的热点。本文总结了近五年来靶向 G4 的小分子配体,通过系统分析其靶点类型和结构-活性关系得出以下主要结论:(1) 目前靶向 G4 的小分子配体骨架主要以芳香环为基础,且与开链分子相比,大环类化合物对 G4 的选择性更高。(2) 具有吸电子基团的芳香类化合物如阳离子卟啉化合物和金属配合物更容易通过 π - π 堆积作用增加与 G4 结合的稳定性。(3) 配体侧链的结构和功能是抗癌药物生物活性的关键因素。通过改变侧链的长度和柔性可以设计新的化合物并有效改善其生物学特性,如抑癌活性和细胞毒性。

虽然针对靶向 G4 的抗肿瘤化合物的研究较多,但是当前仍无相关的药物得到临床应用,这主要是由 G4 结构的多样性以及小分子化合物结合的特异性不够造成的。因此,未来的研究中尚需进一步针对靶点 G4 的结构特征设计和优化构象特异的小分子配体,通过提高特异性结合强度提升其抗肿瘤活性。本文将作为相关研究的开展开拓新的思路,具有重要意义。

参 考 文 献

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA-A Cancer Journal for Clinicians*, 2021, DOI: 10.3322/caac.21660.
- [2] COUZIN-FRANKEL J. Breakthrough of the year 2013. Cancer immunotherapy[J]. *Science*, 2013, 342(6165):1432-1433.
- [3] SUN W M, SHI Q L, ZHANG H Y, et al. Advances in the techniques and methodologies of cancer gene therapy[J]. *Discovery Medicine*, 2019, 27(146):45-55.
- [4] KOSIOL N, JURANEK S, BROSSART P, et al. G-quadruplexes: a promising target for cancer therapy[J]. *Molecular Cancer*, 2021, 20(1):40-46.
- [5] MONSEN R C, CHAKRAVARTHY S, DEAN W L, et al. The solution structures of higher-order human telomere G-quadruplex multimers[J]. *Nucleic Acids Research*, 2021, 49(3):1749-1768.
- [6] ANH T P, VITALY K, KIM N L, DINSHAW J. Structure of two intramolecular G-quadruplexes formed by natural human telomere sequences in K⁺ solution[J]. *Nucleic Acids Research*, 2007, 35(19):6517-6525.
- [7] HARLEY C B, VILLEPONTEAU B. Telomeres and telomerase in aging and cancer[J]. *Current Opinion in Genetics & Development*, 1995, 5(2):249-255.
- [8] ZAHLER A M, WILLIAMSON J R, CECH T R, et al. Inhibition of telomerase by G-quartet DNA structures[J]. *Nature*, 1991, 350(6320):718-720.
- [9] HSU S, VARNAI P, BUGAUT A, et al. A G-rich sequence within the c-kit oncogene promoter forms a parallel G-quadruplex having asymmetric G-tetrad dynamics[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2009, 131(37):13399-13409.
- [10] AMBRUS A, CHEN D, DAI J, et al. Solution structure of the biologically relevant G-quadruplex element in the human c-MYC promoter. Implications for G-quadruplex stabilization[J]. *Biochemistry*, 2005, 44(6):2048-2058.
- [11] YOU H, WU J, SHAO F, et al. Stability and kinetics of c-MYC promoter G-quadruplexes studied by single-molecule manipulation[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2015, 137(7):2424-2427.
- [12] ZORZAN E, ROS S D, MUSETTI C, et al. Screening of candidate G-quadruplex ligands for the human c-KIT promotorial region and their effects in multiple in-vitro models[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(16):21658-21675.
- [13] CREACY S D, ROUTH E D, IWAMOTO F, et al. G4 resolvase 1 binds both DNA and RNA tetramolecular quadruplex with high affinity and is the major source of tetramolecular quadruplex G4-DNA and G4-RNA resolving activity in HeLa cell lysates[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283(50):34626-34634.
- [14] KOTCH F W, FETTINGER J C, DAVIS J T. A lead-filled G-quadruplex: insight into the G-quartet's selectivity for Pb²⁺ over K⁺ [J]. *Organic Letters*, 2000, 2(21):3277-3286.
- [15] WEI C, TANG Q, LI C. Structural transition from the random coil to quadruplex of AG₃(T₂AG₃)₃ induced by Zn²⁺ [J]. *Biophysical Chemistry*, 2008, 132(2-3):110-113.

- [16] 朱红. G-quadruplex 结构和稳定性的分子模拟研究[D]. 合肥: 中国科学技术大学, 2015.
- [17] PARKINSON G N, LEE M P H, NEIDLE S. Crystal structure of parallel quadruplexes from human telomeric DNA[J]. *Nature*, 2002, 417(6891):876-880.
- [18] WANG Y, PATEL D J. Solution structure of the human telomeric repeat d[AG₃(T₂AG₃)₃] G-tetraplex[J]. *Structure*, 1993, 1(4):263-282.
- [19] DAI J, CARVER M, YANG D. Polymorphism of human telomeric quadruplex structures[J]. *Biochimie*, 2008, 90(8):1172-1183.
- [20] 张世昌, 冯奉仪. 抗肿瘤新药米托蒽醌:药理和临床[J]. *中国肿瘤临床*, 1991, 18(6):427-430,436.
- [21] TRIPATHI S, BARTHWAL R. NMR based structure reveals groove binding of mitoxantrone to two sites of [d-(TTAGGGT)]₄ having human telomeric DNA sequence leading to thermal stabilization of G-quadruplex[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 111:326-341.
- [22] SUN D, THOMPSON B, CATHERS B E, et al. Inhibition of human telomerase by a G-quadruplex-interactive compound[J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 1997, 40(14):2113-2116.
- [23] AWASTHI P, VATSAL M, SHARMA A. Structural and biological study of synthesized anthraquinone series of compounds with sulfonamide feature[J]. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 2019, 37(17):4465-4480.
- [24] CARVALHO J, PEREIRA E, MARQUEVIELLE J, et al. Fluorescent light-up acridine orange derivatives bind and stabilize KRAS-22RT G-quadruplex[J]. *Biochimie*, 2018, 144:144-152.
- [25] GUO Q, SU H, NING W, et al. Synthesis and evaluation of 7-substituted-5,6-dihydrobenzo[c]acridine derivatives as new c-KIT promoter G-quadruplex binding ligands[J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2017, 130(21):458-471.
- [26] PALUSZKIEWICZ E, HOROWSKA B, BOROWA-MAZGAJ B, et al. Design, synthesis and high antitumor potential of new unsymmetrical bisacridine derivatives towards human solid tumors, specifically pancreatic cancers and their unique ability to stabilize DNA G-quadruplexes[J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2020, 204:112599.
- [27] KUANG G, ZHANG M, KANG S. Syntheses and evaluation of new bisacridine derivatives for dual binding of G-quadruplex and i-Motif in regulating oncogene c-myc expression[J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2020, 63:9136-9153.
- [28] MATSUO M, SASAKI N, SAGA K, et al. Cytotoxicity of flavonoids toward cultured normal human cells [J]. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 2005, 28(2): 253-259.
- [29] 贾景景, 郭中原, 梁曜华, 等. 槲皮素衍生物的合成及其抗肿瘤活性研究[J]. *中国药学杂志*, 2016, 51(23): 2013-2017.
- [30] 胡玲, 张福田, 张晓谦, 等. 槲皮素衍生物抗癌活性研究新进展[J]. *精细化工中间体*, 2020, 50(3):5-13.
- [31] TAWANI A, MISHRA S K, KUMAR A. Structural insight for the recognition of G-quadruplex structure at human c-myc promoter sequence by flavonoid quercetin[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1):3600.
- [32] KIM M Y, GLEASON-GUZMAN M, IZBICKA E, et al. The different biological effects of telomestatin and TMPyP₄ can be attributed to their selectivity for interaction with intramolecular or intermolecular G-quadruplex structures[J]. *Cancer Research*, 2003, 63(12): 3247-3256.
- [33] SABHARWAL N, CHEN J, LEE J, et al. Interactions between spermine-derivatized tentacle porphyrins and the human telomeric DNA G-quadruplex[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(11):3686.
- [34] RUAN T L, DAVIS S J, POWELL B M, et al. Lowering the overall charge on TMPyP₄ improves its selectivity for G-quadruplex DNA [J]. *Biochimie*, 2017, 132:121-130.
- [35] WANG Z, LI J, LIU J-P. Effects of cation charges on the binding of stabilizers with human telomere and TERRA G-quadruplexes[J]. *Journal of biomolecular Structure & Dynamics*, 2018, 37(7):1908-1921.
- [36] PERENON M, BONNET H, LAVERGNE T, et al. Surface plasmon resonance study of the interaction of N-methyl mesoporphyrin IX with G-quadruplex DNA[J]. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2020, 47(3):1563-1572.
- [37] NICOLUDIS J M, MILLER S T, JEFFREY P D, et al. Optimized end-stacking provides specificity of N-Methyl mesoporphyrin IX for human telomeric G-quadruplex DNA[J]. *Journal of the american chemical society*, 2012, 134(50):20446-20456.
- [38] BENABOU S, MAZZINI S, ANNA A, et al. A pH-dependent bolt involving cytosine bases located in the lateral loops of antiparallel G-quadruplex structures within the SMARCA4 gene promoter[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1):15807.
- [39] BRČIĆ J, JANEZ P. NMR structure of a G-quadruplex formed by four d(G4C2) repeats; insights into structural polymorphism[J]. *Nucleic Acids Research*, 2018, 46(21):11605-11617.
- [40] NAVARRO A, BENABOU S, ERITJA R, et al. Influence of pH and a porphyrin ligand on the stability of a G-quadruplex structure within a duplex segment near the promoter region of the SMARCA4 gene[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 159:383-393.
- [41] ABOU A H, ROBERTO E K, GonzáLEZ C, et al. 2'-Fluoroarabinonucleic acid modification traps G-quadruplex and i-motif structures in human telomeric DNA[J]. *Nucleic Acids Research*, 2017, 20:11535-11546.
- [42] CHILAKAMARTHI U, KOTESHWAR D, JINKA S, et al. Novel amphiphilic G-quadruplex binding synthetic derivative of TMPyP₄ and its effect on cancer cell proliferation and apoptosis induction[J]. *Biochemistry*, 2018, 57(46):6514-6527.
- [43] YAO X, SONG D, QIN T, et al. Interaction between G-quadruplex and zinc cationic porphyrin; the role of the axial water[J]. *Scientific*

Reports, 2017, 7(1):10951.

- [44] QIN Q, QIN J, CHEN M, et al. Chiral platinum (II)-4-(2,3-dihydroxypropyl)-formamide oxoaporphine (FOA) complexes promote tumor cells apoptosis by directly targeting G-quadruplex DNA in vitro and in vivo[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(37):61982-61997.
- [45] HUO Y-F, ZHU L-N, LIU K-K, et al. Water-soluble cationic metalloporphyrins: specific G-quadruplex-stabilizing ability and reversible chirality of aggregates induced by AT-Rich DNA[J]. *Inorganic Chemistry*, 2017, 56(11):6330-6342.
- [46] SABHARWAL N C, MENDOZA O, NICOLUDIS J M, et al. Investigation of the interactions between Pt(II) and Pd(II) derivatives of 5,10,15,20-tetrakis (N-methyl-4-pyridyl) porphyrin and G-quadruplex DNA[J]. *Journal Biological Inorganic Chemistry*, 2016, 21(2): 227-239.
- [47] HUNG N C, LHOSTE J M, LAVELLE F, et al. Synthesis and antitumor activity of 1-[[(dialkylamino)alkyl]amino]-4-methyl-5H-pyrindo[4,3-b]benzo[*c*]- and -benzo[*g*]indoles. A new class of antineoplastic agents[J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 1990, 21(5):1519-1528.
- [48] NAGESH N, RAJU G, SRINIVAS R, et al. A dihydroindolizino indole derivative selectively stabilizes G-quadruplex DNA and down-regulates c-MYC expression in human cancer cells[J]. *BBA-General Subjects*, 2015, 1850(1):129-140.
- [49] PRASAD B, JAMROSKOVIC J, BHOWMIK S, et al. Flexible versus rigid G-quadruplex DNA ligands: synthesis of two series of bis-indole derivatives and comparison of their interactions with G-quadruplex DNA[J]. *Chemistry*, 2018, 24(31):7926-7938.
- [50] PRASAD B, DAS R N, JAMROSKOVIC J, et al. The relation between position and chemical composition of bis-indole substituents determines their interactions with G-quadruplex DNA[J]. *Chemistry-A European Journal*, 2020, 26(43):9561-9572.
- [51] KUKOWSKA M. Amino acid or peptide conjugates of acridine/acridone and quinoline/quinolone-containing drugs. A critical examination of their clinical effectiveness within a twenty-year timeframe in antitumor chemotherapy and treatment of infectious diseases[J]. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2017, 109:587-615.
- [52] MENDES E, CADONI E, CARNEIRO F, et al. Combining 1,3-ditriazolylbenzene and quinoline to discover a new G-quadruplex-interactive small molecule active against cancer stem-like cells[J]. *ChemMedChem*, 2019, 14(14):1325-1328.
- [53] DAS R N, ANDREASSON M, KUMAR R, et al. Macrocyclization of bis-indole quinolines for selective stabilization of G-quadruplex DNA structures[J]. *Chemical Science*, 2020, 11(38):10529-10537.
- [54] ALTWAIJRY N, EL-GHLBAN S, SAYED E, et al. In vitro and in vivo antitumor activity of indolo[2,3-b]quinolines, natural product analogs from neocryptolepine alkaloid[J]. *Molecules*, 2021, 26(3):754.
- [55] SPARAPANI S, BELLINI S, GUNARATNAM M, et al. Bis-guanylhydrazone diimidazo[1,2-a;1,2-c]pyrimidine as a novel and specific G-quadruplex binding motif[J]. *Chemical Communications*, 2010, 46(31):5680-5682.
- [56] AMATO J, MORIGI R, PAGANO B, et al. Toward the development of specific G-quadruplex binders: synthesis, biophysical, and biological studies of new hydrazone derivatives[J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2016, 59(12):5706-5720.
- [57] AMATO J, MIGLIETTA G, MORIGI R, et al. Monohydrazone based G-quadruplex selective ligands induce DNA damage and genome instability in human cancer cells[J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2020, 63(6):3090-3103.
- [58] QIAN C, YI L, EVA F, et al. G-quadruplex DNA targeted metal complexes acting as potential anticancer drugs[J]. *Inorganic Chemistry Frontiers*, 2017, 4:10-32.
- [59] VILAR R. Nucleic acid quadruplexes and metallo-drugs[J]. *Met Ions Life*, 2018, 18:325-350.
- [60] NAUD-MARTIN D, LANDRAS-GUETTA C, VERGA D, et al. Selectivity of terpyridine platinum anticancer drugs for G-quadruplex DNA[J]. *Molecules*, 2019, 24(3):404.
- [61] ANG D L, KELSO C, BECK J L, et al. A study of Pt(II)-phenanthroline complex interactions with double-stranded and G-quadruplex DNA by ESI-MS, circular dichroism, and computational docking[J]. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 2020, 25(3):429-440.
- [62] CAO Q, LI Y, FREISINGER E, et al. G-quadruplex DNA targeted metal complexes acting as potential anticancer drugs[J]. *Inorganic Chemistry Frontiers*, 2017, 4(1):10-32.
- [63] PHAM S Q T, ASSADAWI N, WELLS J, et al. A new class of quadruplex DNA-binding nickel schiff base complexes[J]. *Dalton Transactions*, 2020, 49(15):4843-4860.
- [64] PHAM S Q T, RICHARDSON C, KELSO C, et al. The effect of isomerism and other structural variations on the G-quadruplex DNA-binding properties of some nickel schiff base complexes[J]. *Dalton Transactions*, 2020, 49(30):10360-10379.
- [65] WEYNAND J, DIMAN A, ABRAHAM M, et al. Towards the development of photo-reactive ruthenium(II) complexes targeting telomeric G-quadruplex DNA[J]. *Chemistry-A European Journal*, 2018, 24(72):19216-19227.
- [66] HUANG C, MA Z, LIN J, et al. Tandem mass spectrometry reveals preferential ruthenation of thymines in human telomeric G-quadruplex DNA by an organometallic ruthenium anticancer complex[J]. *Organometallics*, 2020, 39(18):3315-3322.
- [67] RAJCZAK E, JUSKOWIAK B. Conformational rearrangements of G-quadruplex topology promoted by Cu(II) 12-MCCu(II)PyrAcHA-4 metallacrown[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 156(1):1258-1269.
- [68] DUARTE A R, CADONI E, RESSURREICAO A S, et al. Design of modular G-quadruplex ligands[J]. *Chemmedchem*, 2018, 13(9): 869-893.