

# Сигнальный путь Wnt: перспективы фармакологического регулирования

**В.В. Татарский**

НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;  
Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24, стр. 15

**Контакты:** Виктор Вячеславович Татарский [tatarskii@gmail.com](mailto:tatarskii@gmail.com)

*Wnt — один из важнейших сигнальных путей в клетке, необходимый для нормального эмбрионального развития, дифференцировки, поддержания фенотипа стволовых клеток, определения полярности клетки и миграции. Мутации в этом каскаде ассоциированы с опухолевым ростом (особенно с раком толстой кишки, лейкозами и гепатокарциномами), участвуют в поддержании опухолеиницирующих клеток и метастазировании. В последнее время проводят исследования ингибиторов сигнального пути Wnt в качестве противоопухолевых препаратов. Однако эти ингибиторы находятся только в ранних фазах клинических испытаний. В обзоре рассматриваются основные мишени таких противоопухолевых ингибиторов и их текущий статус в предклинических и клинических исследованиях.*

**Ключевые слова:** Wnt,  $\beta$ -катенин, опухолеиницирующие клетки, метастазирование

DOI: 10.17650/2313-805X-2016-3-1-28-31

## The Wnt signaling pathway: prospects for pharmacological regulation

**V.V. Tatarskiy**

Research Institute of Carcinogenesis, N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia;  
Build. 15, 24 Kashirskoe Shosse, Moscow, 115478, Russia

*Wnt cascade is one of the most important signal pathways in the cell, which is required for normal embryonic development, differentiation, maintenance of stem cell phenotype and migration. Mutations in this pathway are associated with tumor growth (especially with colon cancers, hepatocarcinomas and leukemias), where they participate in maintenance of tumor-initiating cells and metastasing. Because of that there is a considerable interest to develop inhibitors of Wnt pathway as anti-tumor agent. But this inhibitors are still only in early stages of clinical investigations. In this article we review the main targets for this anti-cancer agents and their preclinical and clinical status.*

**Key words:** Wnt,  $\beta$ -catenin, tumor-initiating cells, metastasis

### Введение

Wnt является одним из важнейших сигнальных путей в клетке, необходимым для нормального эмбрионального развития, дифференцировки, поддержания фенотипа стволовых клеток, определения полярности клетки и миграции. Мутации в этом каскаде связаны с опухолями (особенно с раком толстой кишки, гепатокарциномами и лейкозией), диабетом 2-го типа и нейродегенеративными заболеваниями. Особый интерес представляет роль Wnt в поддержании опухолеиницирующих клеток и метастазировании. В связи с этим в последнее время ведется обширный поиск ингибиторов сигнального пути Wnt в качестве противоопухолевых препаратов, однако до сих пор эти ингибиторы находятся только в ранних фазах клинических испытаний. В настоящем обзоре рассматриваются основные мишени таких противоопухолевых ингибиторов и их текущий статус в предклинических и клинических исследованиях.

### Сигнальный путь Wnt

В литературе выделяют 3 сигнальных пути в составе Wnt: канонический Wnt-каскад, контролирующий связывание  $\beta$ -катенина с транскрипционными факторами TCF/LEF, неканонический кальциевый каскад, в котором не участвует  $\beta$ -катенин, и каскад, контролирующий полярность клетки. Из 3 каскадов канонический наиболее хорошо изучен, особенно в контексте канцерогенеза.

У человека семейство Wnt-белков состоит из 19 белков, которые связываются с 15 рецепторами Фрицзлед (Frizzled, Fzd) или корецепторами LRP [1]. Wnt-лиганды являются гликопротеинами, для секреции которых необходимо добавление пальмитата к цистеиновым [2] и сериновым остаткам в эндоплазматическом ретикулуме (последняя реакция осуществляется белком поркупин (porcupine) [3]. Связывание Wnt-лиганда с Fzd приводит к рекрутированию белка дишевелд (disheveled, Dvl), который ингибирует фосфо-

рилирование  $\beta$ -катенина деградирующим комплексом (GSK3 $\beta$ , аксин-1 и APC). Фосфорилирование  $\beta$ -катенина деградирующим комплексом по серинам 33, 37 и треонину 41 вызывает его протеосомную деградацию; после ингибирования деградирующего комплекса Dvl количество  $\beta$ -катенина быстро увеличивается, после чего он транслоцируется в ядро. В ядре  $\beta$ -катенин связывается с транскрипционными факторами семейств TCF и LEF, вызывая транскрипцию своих зависимых генов, важнейшими из которых являются *c-Мус*, *циклин D*, *сурвивин*, *MMP7*, *MDR1* и *CD44* [4–6]. Наиболее важной для терапии является роль сигнального пути Wnt в поддержании фенотипа опухоленицирующих клеток и эпителиально-мезенхимального перехода, необходимых для метастазирования опухоли. Подавление экспрессии или делеции  $\beta$ -катенина ингибирует образование опухоленицирующих клеток в модели хронического миелолейкоза с экспрессией Bcr-Abl, острой миелоцитарной лейкемии [7] и опухолях молочной железы [8].

Активирующие мутации сигнального пути Wnt широко распространены в ряде опухолей. Это мутации компонентов деградирующего комплекса (APC, аксин), самого  $\beta$ -катенина, белков TCF (например, TCF7L2) и Wtx. Помимо мутаций нарушения передачи сигнала в каскаде происходят через изменения экспрессии ряда белков из-за эпигенетических трансформаций. По данным базы данных COSMIC, мутации APC наиболее характерны для опухолей толстой кишки, желудка, поджелудочной железы;  $\beta$ -катенина — для опухолей печени, мягких тканей, эндометрия, поджелудочной железы; аксина-1 — для опухолей печени и желчных протоков, Wtx — для опухолей почек и толстой кишки и TCF7L2 — для опухолей толстой кишки [9].

### Ингибиторы Wnt

Предклинические исследования показали, что ингибирование сигнального пути Wnt приводит к терапевтическому эффекту в ряде Wnt-зависимых опухолей. Разработка противоопухолевых соединений сосредоточена на ингибировании 4 частей каскада: пальмитировании Wnt-лигандов белком поркупин (ингибировании секреции), связывании Wnt-лигандов со своими рецепторами и корецепторами, предотвращении деактивации деградирующего комплекса и/или транслокации  $\beta$ -катенина в ядро и связывании  $\beta$ -катенина с другими компонентами транскрипционного комплекса. В настоящее время в базе данных ClinicalTrials.gov имеются ссылки на 42 клинических испытания, связанные с ингибированием сигнального пути Wnt.

Ингибирование синтеза Wnt — наиболее распространенная стратегия снижения активности Wnt-каскада. Главным достоинством ингибирования активности Wnt на этом уровне является низкая токсичность. В то время как остальные мишени в сигнальном пути Wnt зачастую связаны с другими сигнальными путями, поркупин специфично ингибирует секрецию Wnt с не-

большими побочными эффектами [10]. В настоящее время проводятся или планируются клинические испытания ингибитора поркупин Wnt974 у пациентов с аденокарциномой поджелудочной железы и раком толстой кишки с BRAF-мутациями и активирующими мутациями, приводящими к повышенному синтезу Wnt-лиганда (мутации RNF43 или RSPO) (NCT01351103), с раком толстой кишки с BRAF-мутациями в комбинации с BRAF-ингибитором LGX818 и EGFR-ингибитором цетуксимабом (NCT02278133), с плоскоклеточной карциномой головы и шеи (NCT02649530). Другой ингибитор поркупин — ETC-159 — находится в I фазе клинических испытаний против солидных опухолей (NCT02521844) [11]. Недостатками такого подхода являются невозможность терапии опухолей с мутациями, которые происходят ниже по каскаду, и неизбирательность ингибирования Wnt-лигандов (поркупин ингибирует секрецию всех Wnt-лигандов, однако не все из них имеют проонкогенные свойства).

Более специфичной стратегией считается ингибирование рецепторов и корецепторов Wnt. Такой подход позволяет подавить активность только тех Wnt-лигандов, которые способствуют росту опухоли, не затрагивая другие. Применяются как ингибиторы рецепторов и корецепторов, так и рецепторы-ловушки, связывающие Wnt-лиганды. Антитело OMP-18R5 связывается с 5 из 10 Fzd-рецепторов (Fzd1, Fzd2, Fzd5, Fzd7 и Fzd8), каждый из которых регулирует канонический Wnt-сигналинг. В предклинических испытаниях OMP-18R5 ингибировал рост ксенографтов, полученных из опухолей толстой кишки (без мутаций APC или  $\beta$ -катенина), поджелудочной железы, рака легкого и рака молочной железы, как при отдельном введении, так и в комбинации со стандартными химиотерапевтическими препаратами, такими как таксол, иринотекан, гемцитабин. Также OMP-18R5 значительно снижает туморогенность и частоту ремиссии опухолей на моделях животных, что позволяет рассчитывать на его эффективность против опухоленицирующих клеток [12]. В настоящее время проводятся или планируются 4 клинических исследования с OMP-18R5: I фазы против солидных опухолей (NCT01345201), I фазы в комбинации с паклитаксолом против метастатического рака молочной железы (NCT01973309), в комбинации с паклитаксолом и гемцитабином против рака поджелудочной железы (NCT02005315) и в комбинации с доцетаксолом против мелкоклеточного рака легкого (NCT01957007).

Также в стадии клинических испытаний находится рецептор-ловушка OMP-54F28 — участок Fzd8, конъюгированного с Fc-фрагментом иммуноглобулина G 1-го класса (IgG1). OMP-54F28 значительно снижает рост ксенографтов как при монотерапии, так и в комбинации с гемцитабином, а также уменьшает способность опухоли к метастазированию, туморогенность опухолей у мышей линий NOD и SCID и количество клеток, экспрессирующих CD44 [13]. По предварительным результатам I фазы клиниче-

ских испытаний препарат хорошо переносится в терапевтических концентрациях (NCT01608867) основные побочные эффекты связаны с ремоделированием костной ткани [14]. В настоящее время проводятся 3 других клинических испытания этого препарата в фазе Ib: в комбинации с сорафенибом против метастатической гепатокарциномы (NCT02069145), с гемцитабином и паклитакселом против рака поджелудочной железы (NCT02050178) и с паклитакселом и карбоплатином против рака яичника (NCT02092363).

Альтернативным подходом является использование нетоксичного антитела к Fzd10 — OTSA101. Само антитело слабо токсично, однако его конъюгат, меченный иттрием ( $^{90}\text{Y}$ ), обладает выраженным противоопухолевым эффектом в ксенографтной модели. В настоящее время проводится I фаза клинических испытаний на синовиальной саркоме (NCT01469975).

Ряд ингибиторов предотвращает взаимодействие Dvl с рецепторами Fzd: ингибиторы взаимодействия Pzd домена Dvl с Fzd — NSC668036 [15], 3289-8625 [16] — ингибируют этот сигнальный путь и замедляют рост опухолевых клеток в культуре. Однако их селективная активность против специфических Wnt-зависимых опухолей не показана, также как активность на моделях животных. Ни одно из таких соединений клинически не испытывают.

Ряд малых молекул направлен против деградирующего комплекса. Большой класс потенциальных противоопухолевых агентов стабилизирует аксин-1 через ингибирование ферментов танкиразы, которые стимулируют его протеосомную деградацию. Ингибирование танкиразы приводит к стабилизации деградирующего комплекса и деградации  $\beta$ -катенина даже при мутациях APC. Ряд этих молекул, такие как XAV-939, JW-55 и IWR, хорошо изучены в опухолевых и предклинических моделях, они вызывают остановку пролиферации  $\beta$ -катенинзависимых опухолей [17, 18]. Несмотря на это, ни один ингибитор танкиразы не находится в клинических испытаниях. Причинами этого, скорее всего, являются низкий терапевтический индекс и высокая токсичность для желудочно-кишечного тракта, приводящие к нарушению пролиферации столбовых клеток кишечника, воспалению и даже некрозу [19]. Одобренный антигельминтный препарат пирвиний памоат подавляет активность Wnt через активацию CK1, который, в свою очередь, активирует деградирующий комплекс и обладает противоопухолевой активностью против  $\beta$ -катенинзависимых клеточных линий [20], однако в клинических испытаниях у пациентов с опухолевыми новообразованиями он не проверялся. Противомаларийный препарат артезунат также предотвращает транслокацию  $\beta$ -катенина в ядро, замедляет рост  $\beta$ -катенинзависимых ксенографтов и метастазирование [21]. В настоящее время проводится II фаза его клинических испытаний в рамках неoadьювантной терапии опухолей толстой кишки (NCT02633098).

Инактивация экспрессии генов белков-ингибиторов сигнального пути Wnt распространена в различных опухолях и приводит к активации каскада. Использование демитилирующих агентов позволяет реактивировать промоторы таких генов и подавить активность сигнального пути Wnt в клетках [22]. В настоящее время проводится клиническое испытание демитилирования промоторов ряда таких генов (*APCDD1*, *AXIN2*, *DKK1*, *LGR5* и *ASCL2*) при действии демитилирующего агента децитабина (NCT01882660).

Взаимодействие  $\beta$ -катенина с партнерами в транскрипционном комплексе также считается мишенью для противоопухолевой терапии. Известно несколько классов молекул, которые предотвращают связывание  $\beta$ -катенина с TCF7L2 и одновременно подавляют рост  $\beta$ -катенинзависимых линий и ксенографтов, однако многие из этих молекул не обладают достаточной селективностью, и ни одну из них не испытывали клинически. Наиболее хорошо изученным является ингибирование взаимодействия кофактора транскрипции CREB-связывающего белка с  $\beta$ -катенином с помощью малой молекулы PRI-724 (и ее предшественника ICG-001) [23]. Этот белок — один из кофакторов транскрипции, и его взаимодействие с  $\beta$ -катенином необходимо для поддержания фенотипа опухолеиницирующих клеток [24], в то время как ингибирование этого взаимодействия приводит к дифференцировке таких клеток. Это соединение исследовали в 3 клинических испытаниях I фазы: против рака поджелудочной железы в комбинации с гемцитабином (NCT01764477) и против острой и хронической миелоидной лейкемии (NCT01606579). В исследовании I фазы на 18 пациентах была показана безопасность высоких доз препарата; зафиксировано прекращение роста опухоли у 3 пациентов и снижение экспрессии Wnt-зависимого гена *сурвивина* (NCT01302405) [25]. Планируют исследование PRI-724 во II фазе клинических испытаний против рака толстой кишки в комбинациях с бевацизумабом, 5-фторурацилом, оксалиплатином и лейковорином кальция (NCT02413853).

Отдельным подходом является модулирование неканонической части каскада Wnt или сигнальных путей, пересекающихся с каноническим каскадом. Так, анализ опухолевых линий с высокой активностью Wnt-каскада показал, что они зависят от комплекса  $\beta$ -катенина с транскрипционным фактором TBX5 и транскрипционным регулятором YAP1 и что дазатиниб, ингибитор киназы YES1, необходимой для функционирования этого комплекса, предотвращает пролиферацию  $\beta$ -катенинзависимых линий [26]. Неканонические части сигнального пути Wnt зачастую связаны с противоопухолевыми эффектами, например, активатор неканонического каскада Foxo5 — пептидный аналог Wnt5a — предотвращает метастазирование [27]; в настоящее время его исследуют в I фазе клинических испытаний против метастатических карцином молочной железы, толстой кишки и простаты (NCT02020291).

## Заключение

В последние 5 лет значительно ускорилось изучение роли сигнального пути Wnt в канцерогенезе, проводятся клинические испытания первых терапевтических соединений — ингибиторов Wnt. Однако внедрение этих агентов в клиническую практику зачастую ограничено высокой токсичностью препаратов для нормальных тканей и недостаточностью собственно ингиби-

рования Wnt для торможения роста опухолей. Очевидно, что требуются как исследования новых мишеней в этом сигнальном пути, так и подбор оптимальных комбинаций с имеющимися противоопухолевыми агентами. Результаты проводящихся в настоящее время клинических испытаний позволят определить перспективность фармакологической регуляции Wnt-каскада для противоопухолевой терапии.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- MacDonald B.T., He X. Frizzled and LRP5/6 receptors for Wnt/-catenin signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012;4(12):a007880.
- Willert K., Brown J.D., Danenberg E. et al. Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* 2003;423(6938):448–52.
- Takada R., Satomi Y., Kurata T. et al. Monounsaturated fatty acid modification of Wnt protein: its role in Wnt secretion. *Dev Cell* 2006;11(6):791–801.
- He T.C., Sparks A.B., Rago C. et al. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 1998;281(5382):1509–12.
- Tetsu O., McCormick F. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 1999;398(6726):422–6.
- Ashida K., Terada T., Kitamura Y. et al. Expression of E-cadherin, alpha-catenin, beta-catenin, and CD44 (standard and variant isoforms) in human cholangiocarcinoma: an immunohistochemical study. *Hepatology* 1998;27(4):974–82.
- Hu Y., Li S. Survival regulation of leukemia stem cells. *Cell Mol Life Sci* 2016;73(5):1039–50.
- Moumen M., Chiche A., Decraene C. et al. Myc is required for  $\beta$ -catenin-mediated mammary stem cell amplification and tumorigenesis. *Mol Cancer* 2013;12(1):132.
- Anastas J.N., Moon R.T. WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer. *Nat Rev Cancer* 2013;13(1):11–26.
- Liu J., Pan S., Hsieh M.H. et al. Targeting Wnt-driven cancer through the inhibition of Porcupine by LGK974. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110(50):20224–9.
- Madan B., Ke Z., Harmston N. et al. Wnt addiction of genetically defined cancers reversed by PORCN inhibition. *Oncogene* 2015.
- Gurney A., Axelrod F., Bond C.J. et al. Wnt pathway inhibition via the targeting of Frizzled receptors results in decreased growth and tumorigenicity of human tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012;109(29):11717–22.
- Le P.N., McDermott J. D., Jimeno A. Targeting the Wnt pathway in human cancers: Therapeutic targeting with a focus on OMP-54F28. *Pharmacol Ther* 2015;146:1–11.
- Smith D.C., Gordon M., Messersmith W. et al. A first-in-human Phase I study of anti-cancer stem cell (CSC) agent OMP-54F28 (FZD8-Fc) targeting the WNT pathway in patients with advanced solid tumors. *Mol Cancer Ther* 2013;12(11 Suppl):B79.
- Shan J., Shi D.-L., Wang J. et al. Identification of a specific inhibitor of the dishevelled PDZ domain. *Biochemistry* 2005;44(47):15495–503.
- Grandy D., Shan J., Zhang X. et al. Discovery and characterization of a small molecule inhibitor of the PDZ domain of dishevelled. *J Biol Chem* 2009;284(24):16256–63.
- Huang S.M., Mishina Y.M., Liu S., et al. Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes Wnt signalling. *Nature* 2009;461(7264):614–20.
- Waler J., Machon O., Tumova L. et al. A novel tankyrase inhibitor decreases canonical Wnt signaling in colon carcinoma cells and reduces tumor growth in conditional APC mutant mice. *Cancer Res* 2012;72(11):2822–32.
- Zhong Y., Katavolos P., Nguyen T. et al. Tankyrase inhibition causes reversible intestinal toxicity in mice with a therapeutic index < 1. *Toxicol Pathol* 2015;44(2):267–78.
- Thorne C.A., Hanson A.J., Schneider J. et al. Small-molecule inhibition of Wnt signaling through activation of casein kinase 1 $\alpha$ . *Nat Chem Biol* 2010;6(11):829–36.
- Li L.N., Zhang H.D., Yuan S.J. et al. Artesunate attenuates the growth of human colorectal carcinoma and inhibits hyperactive Wnt/beta-catenin pathway. *Int J Cancer* 2007;121(6):1360–5.
- Li K., Hu C., Mei C. et al. Sequential combination of decitabine and idarubicin synergistically enhances anti-leukemia effect followed by demethylating Wnt pathway inhibitor promoters and downregulating Wnt pathway nuclear target. *J Transl Med* 2014;12:167.
- Emami K.H., Nguyen C., Ma H. et al. A small molecule inhibitor of beta-catenin/CREB-binding protein transcription [corrected]. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101(34):12682–7.
- Lenz H.J., Kahn M. Safely targeting cancer stem cells via selective catenin coactivator antagonism. *Cancer Sci* 2014;105(9):1087–92.
- El-Khoueiry A.B. A phase I first-in-human study of PRI-724 in patients(pts) with advanced solid tumors. In *J Clin Oncol* 2013.
- Rosenbluh J., Nijhawan D., Cox A.G. et al.  $\beta$ -Catenin-driven cancers require a YAP1 transcriptional complex for survival and tumorigenesis. *Cell* 2012;151(7):1457–73.
- Säthholm A., Tuomela J., Rosenkvist J. et al. The Wnt-5a-derived hexapeptide Foxo-5 inhibits breast cancer metastasis in vivo by targeting cell motility. *Clin Cancer Res* 2008;14(20):6556–63.