

干扰素基因刺激蛋白(STING)激动剂环二核苷酸类化合物的合成及活性研究进展

王天洋^a 李艳梅^{*,a,b,c}^(a) 清华大学化学系 生命有机磷化学及化学生物学教育部重点实验室 北京 100084)^(b) 北京脑重大疾病研究院 北京 100069)^(c) 清华大学合成与系统生物学研究中心 北京 100084)

摘要 环二核苷酸是环磷酸鸟苷-腺苷酸合成酶-干扰素基因刺激因子(cGAS-STING)天然免疫信号通路的激动剂,目前主要发现了四种天然的环二核苷酸 STING 激动剂. 近年来随着 cGAS-STING 通路作用机制的进一步揭示,激活 STING 通路以进行免疫治疗已成为当前的研究热点. 对环二核苷酸进行衍生化修饰以提升其药物活性及成药性已成为推动其临床应用的重要手段. 在此,总结了近年来 STING 激动剂环二核苷酸类化合物的合成及活性研究进展.

关键词 环磷酸鸟苷-腺苷酸合成酶-干扰素基因刺激因子(cGAS-STING); 环二核苷酸; 化学合成; 生物合成; 药物活性

Progress on the Synthesis and Activity of Cyclic Dinucleotides as Stimulator of Interferon Gene (STING) Agonists

Wang, Tianyang^a Li, Yan-Mei^{*,a,b,c}^(a) Key Lab of Bioorganic Phosphorus Chemistry & Chemical Biology, Department of Chemistry, Tsinghua University, Beijing 100084)^(b) Beijing Institute for Brain Disorders, Beijing 100069)^(c) Center for Synthetic and Systems Biology, Tsinghua University, Beijing 100084)

Abstract Cyclic dinucleotide is the agonist of cyclic guanosine-adenosine synthase-stimulator of interferon genes (cGAS-STING) innate immune signal pathway. At present, four kinds of natural STING cyclic dinucleotide agonists have been discovered. In recent years, with the revelation of the mechanism of cGAS-STING pathway, the activation of STING pathway for immunotherapy has become a hot topic. The modification of cyclic dinucleotides to improve their drug activities and properties has become an important means to promote their application in clinical treatment. Here, the important progress in the synthesis and activity of cyclic dinucleotides as STING agonists in recent years is reviewed.

Keywords cyclic guanosine-adenosine synthase-stimulator of interferon genes (cGAS-STING); cyclic dinucleotide; chemical synthesis; biosynthesis; drug activity

干扰素基因刺激蛋白(STING)是调控天然免疫信号通路的重要蛋白,在免疫细胞中广泛表达. STING 蛋白在结合内源或外源环二核苷酸(CDNs)化合物后,诱导 I 型干扰素和促炎细胞因子的表达,从而引起免疫活化^[1]. 随着免疫治疗领域的迅速发展^[2],利用环二核苷酸类 STING 激动剂来调控 STING 信号通路已成为免疫治疗的新途径^[3],天然环二核苷酸激动剂及其类似物的合成由于其重要应用价值也成为近年来的研究热点^[4]. 本文

综述了作为 STING 激动剂的环二核苷酸类化合物的研究进展,重点介绍了环二核苷酸类化合物的合成方法及药物活性研究的最新进展.

1 天然环二核苷酸激动剂

天然环二核苷酸激动剂的结构中有两个核苷,两个核苷由两个磷酸二酯键连接. 在细菌中,所有天然 CDN 的两个核苷都是由两个 3'-5'-磷酸二酯键连接,通

* Corresponding author. E-mail: liym@mail.tsinghua.edu.cn

Received November 30, 2022; revised January 17, 2023; published online January 22, 2023.

Project supported by the National Key R&D Program of China (Nos. 2018YFA0507600, 2019YFA0904200) and the National Natural Science Foundation of China (Nos. 22237003, 92053108).

国家重点研发计划(Nos. 2018YFA0507600, 2019YFA0904200)和国家自然科学基金(Nos. 22237003, 92053108)资助项目.

常表示为 3',3'-CDNs; 在哺乳动物细胞中发现的唯一内源性环二核苷酸 STING 激动剂是 2',3'-环磷酸鸟苷-腺苷 (2',3'-cGAMP), 它由一个 2'-5'-磷酸二酯键和一个 3'-5'-磷酸二酯键连接^[5]. 到目前为止, 在天然来源中主要有四种可激活 STING 蛋白的 CDNs 化合物被发现, 分别为 3',3'-CDG (c-di-GMP, **1**)、3',3'-CDA (c-di-AMP, **2**)、3',3'-cGAMP (**3**)和 2',3'-cGAMP (**4**, 图 1). 最近在细菌中发现了更多类别的 CDN, 如 3',3'-c-UAMP、3',3'-CDU 和 3',3'-cUCMP, 此外还在细菌中发现了环三核苷酸 c-AMP-GMP^[6].

自第一个天然 CDN 第二信使 3',3'-CDG 被报道以来, 进一步的研究发现 3',3'-CDG 调节着细菌的运动能力、生物膜的形成、毒力及细胞周期的进展等, 但具体的分子调节机制并不清晰. 之后的研究发现鸟苷酸环化酶(DGC)调控着细菌内 3',3'-CDG 的合成, 而磷酸二酯酶(PDE)控制 3',3'-CDG 的降解. 2008 年, 人们从枯草芽孢杆菌中发现了 3',3'-CDA^[6]. 在细菌中, 3',3'-CDA 与许多细胞活动有关, 如细胞壁形成、细胞的形态及细菌的致病性等. 3',3'-cGAMP 于 2013 年在霍乱弧菌中被发现, 之后 2',3'-cGAMP 于哺乳动物细胞中被发现^[5].

2',3'-cGAMP 在哺乳动物先天免疫途径中起着重要作用, 负责胞质 DNA 的监测. 2013 年, 陈志坚等^[7]发现病毒感染的免疫细胞内存在 2',3'-cGAMP, 该结构能激活免疫细胞产生 I 型干扰素(IFN-I, 包括 IFN- α 、IFN- β 、IFN- ϵ 、IFN- κ 和 IFN- ω 等). 2',3'-cGAMP 由环状 GMP-AMP 合成酶(cGAS)合成, 胞质 DNA 与 cGAS 结合后激活 cGAS 催化合成 2',3'-cGAMP. 与 2',3'-cGAMP 结合并

被激活后, STING 蛋白会招募 TBK1 (TANK binding-kinase 1)蛋白对 STING 蛋白和 IRF3 (Interferon regulatory factor 3)进行磷酸化修饰, 最终引起 IFN-I 的产生^[8].

之后四种主要的天然环二核苷酸(3',3'-CDG、3',3'-CDA、3',3'-cGAMP 和 2',3'-cGAMP)被相继确定为 STING 蛋白的配体, 环二核苷酸通过 cGAS-STING 通路引发固有免疫的详细机制也逐渐清晰^[1]. 环二核苷酸激动剂显示出显著的免疫佐剂活性, 可有效活化免疫细胞, 引起免疫应答^[9], 可用于抗肿瘤及抗病毒等免疫治疗. 从此掀起了通过设计合成环二核苷酸类化合物激活 STING 通路进行免疫调控的热潮^[10].

2 环二核苷酸类化合物的化学合成

2.1 天然环二核苷酸激动剂的化学合成

环二核苷酸化学合成中的关键问题是磷酸二酯键的有效形成和保护基(包括碱基、核糖的羟基和磷酸基团的保护基等)的使用. 环二核苷酸中两个核苷的连接和环化可以通过液相合成和固相合成实现. 近年来, 天然环二核苷酸激动剂 3',3'-CDG、3',3'-CDA、3',3'-cGAMP 和 2',3'-cGAMP 的多种合成方法被开发出来.

固相合成环二核苷酸避免了反应中间产物的分离, 相较而言更加方便. 在固相合成中, 首先将第一个亚磷酸酰胺通过磷酸二酯键偶联到树脂上. 之后第二个亚磷酸酰胺的偶联和二核苷酸的环化很容易完成. 2008 年, Sintim 等^[11]采用简单固相合成法通过全自动 DNA 合成仪合成了 3',3'-CDG, 在第一代合成方法中(Scheme 1), 两步偶联需要使用不同的亚磷酸酰胺. 合成路线相对繁琐. 因此,

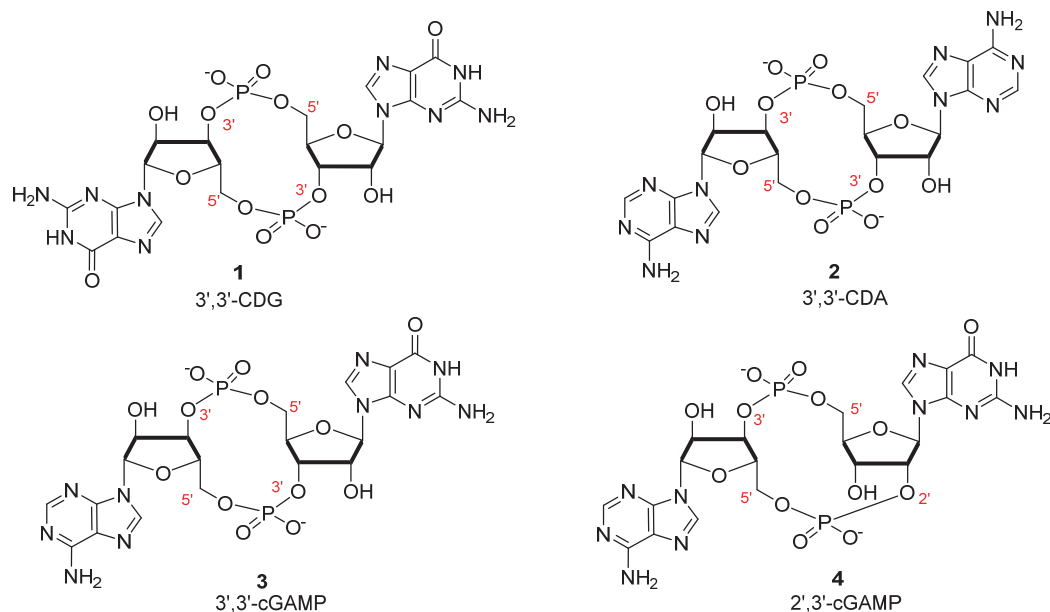
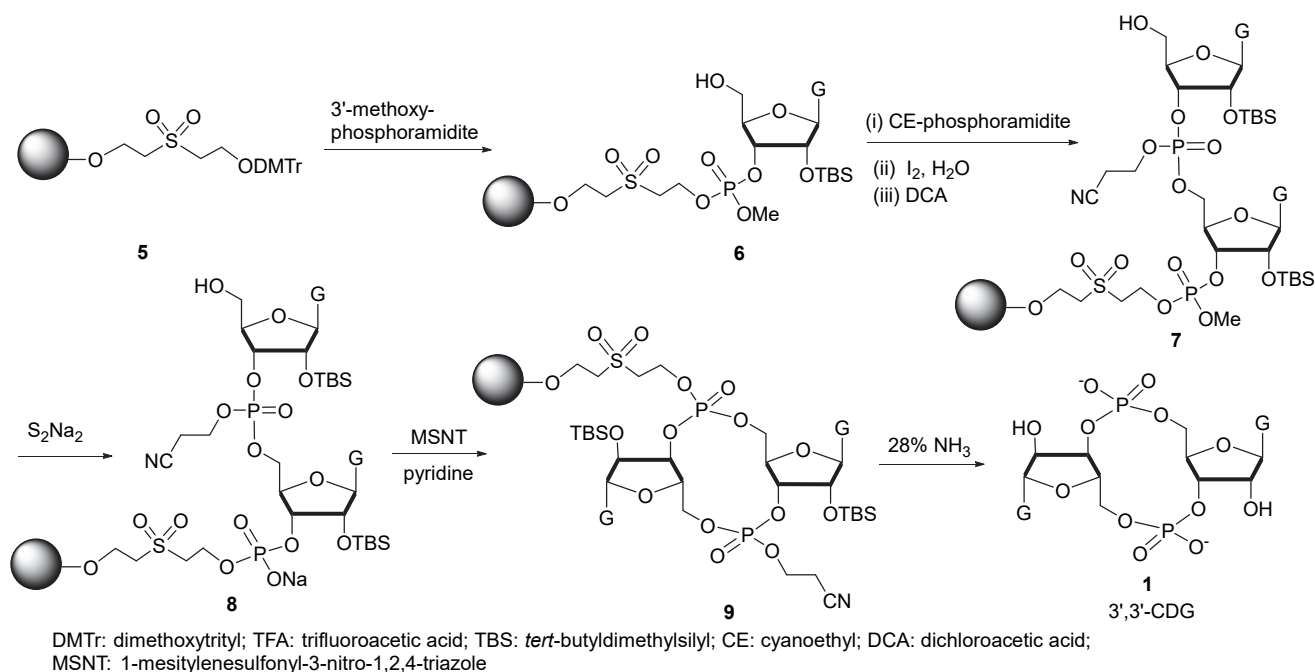


图 1 四种主要的天然 STING 激动剂环二核苷酸
Figure 1 Structure of the four natural cyclic dinucleotides as STING Agonists

他们进行了路线优化. 在改进的二代固相合成法中 (Scheme 2), 两步偶联使用相同的亚磷酰胺, 获得受保护的二核苷酸 **10**. 将二核苷酸从树脂上切下后, 使用 1-(均三甲苯基-2-磺基)-3-硝基-1,2,4-三唑 (MSNT) 作为缩合剂形成磷酸二酯键得到被保护的环二核苷酸 **12**, 脱保护后得到 3',3'-CDG. 然而, 固相合成仅适用于小规模 CDN 的制备, 与液相合成法相比, 反应时间也相对较长.

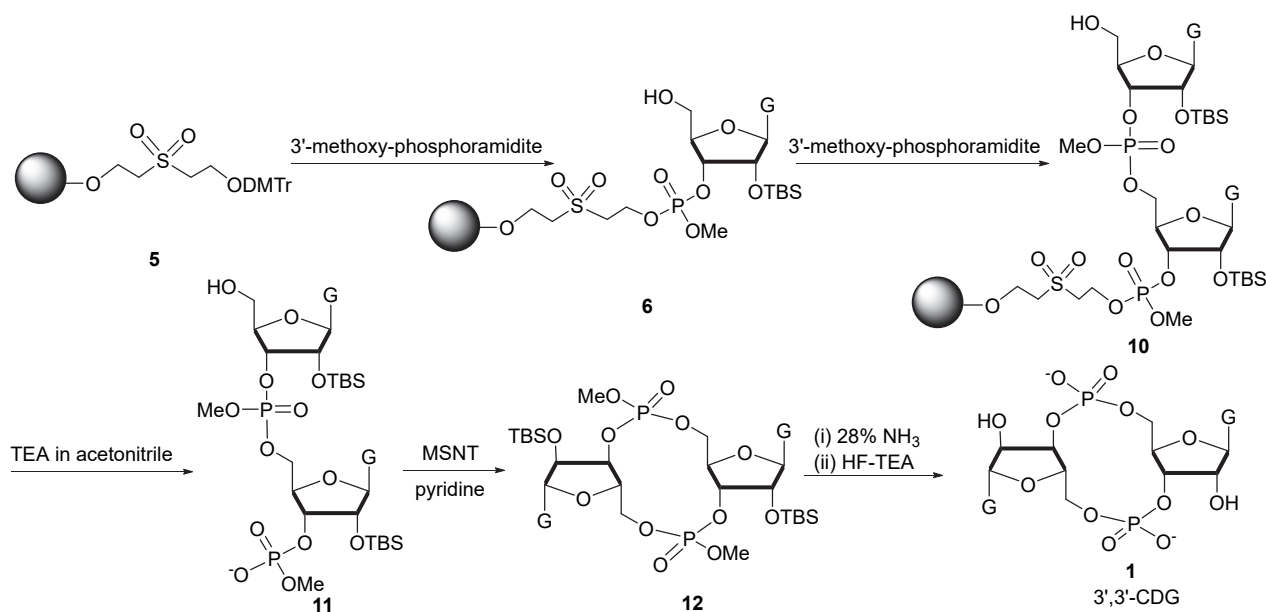
2003 年, Kawai 等^[12]使用亚磷酰胺法经过十步反应液相合成了 3',3'-CDG. 该方法从核昔亚磷酰胺出发, 使用磷酸三酯法进行环化. 将烯丙氧基和烯丙基分别用于保护鸟嘌呤碱基和磷酸基团, 完成环化后在中性条件下通过钨催化可同时脱去所有保护基 (Scheme 3).

2010 年, Jones 等^[13]报道了一锅法合成 3',3'-CDG 的路线 (Scheme 4). 该合成路线从市售的鸟昔亚磷酰胺出



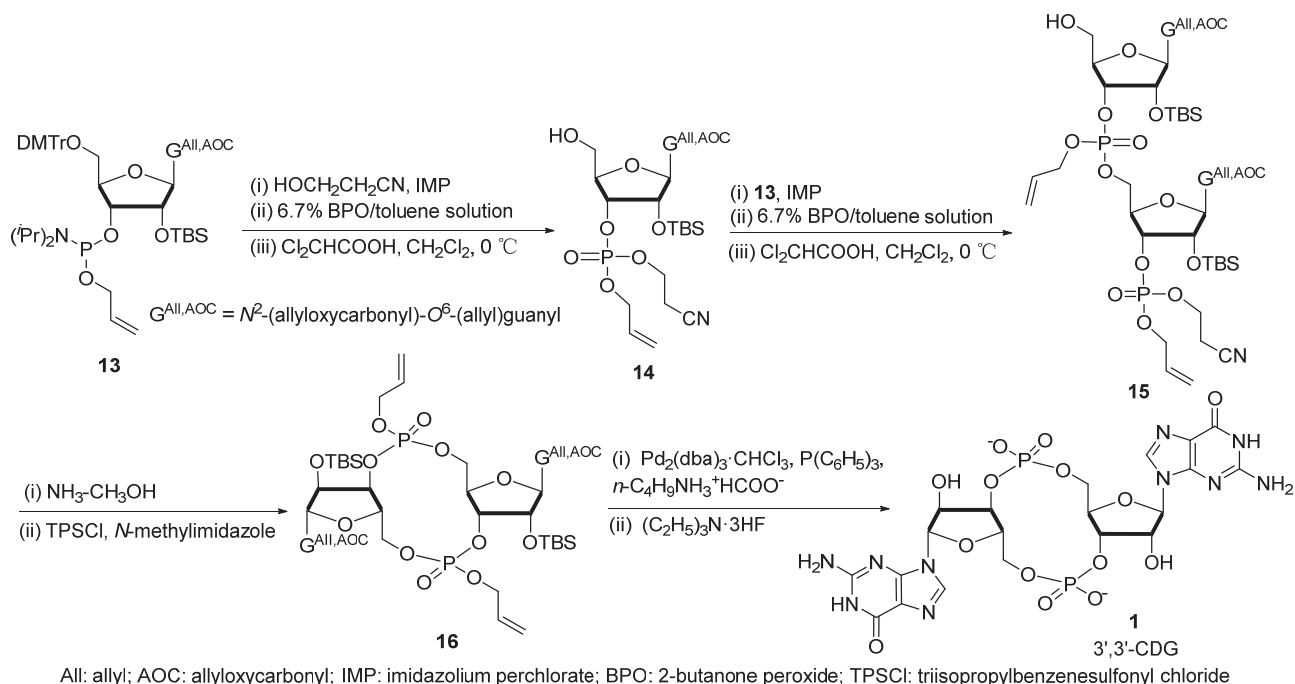
图式 1 利用 DNA 合成仪合成 3',3'-CDG

Scheme 1 Programmed synthesis of 3',3'-CDG on a DNA synthesizer

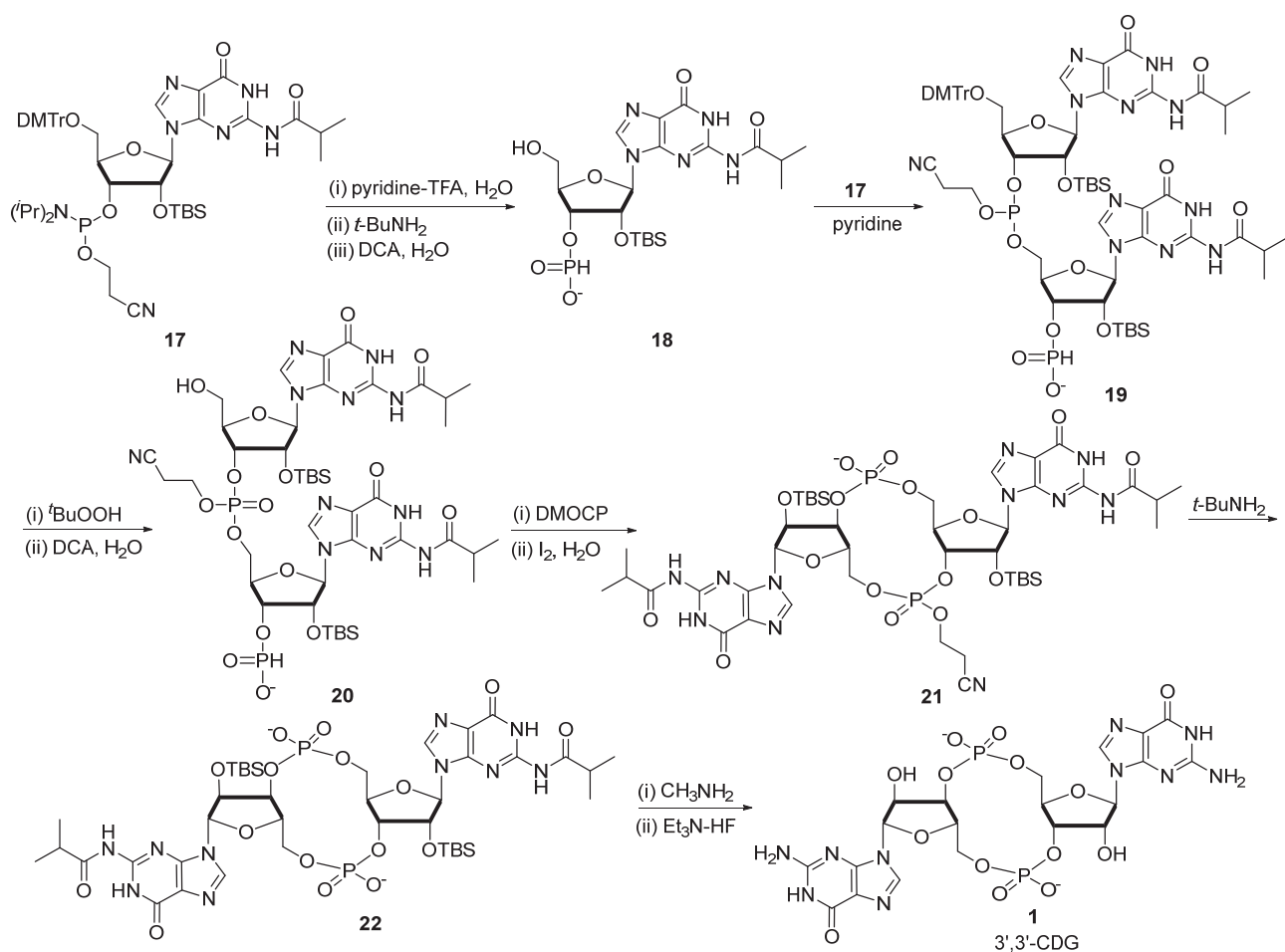


图式 2 第二代 3',3'-CDG 固相合成法

Scheme 2 Second-generation solid-phase synthesis of 3',3'-CDG



图式 3 液相合成 3',3'-CDG
Scheme 3 Solution-phase synthesis of 3',3'-CDG



图式 4 一锅法液相合成 3',3'-CDG
Scheme 4 One-flask synthesis of 3',3'-CDG

发, 在同一体系内完成了包括脱保护在内的所有反应步骤. 首先将第一部分鸟苷亚磷酸酰胺水解得到 H-磷酸酯, 再用叔丁胺处理以脱去氰乙基保护基, 将溶液浓缩除去叔丁胺后用二氯乙酸脱去 5'-OH 的 DMTr 保护基, 得到 H-磷酸酯 **18**. 在之后与另一分子鸟苷亚磷酸酰胺的偶联中, 以 H 原子作为磷酸保护基, 减少了额外的保护和去保护步骤, 得到核苷亚磷酸三酯 **19**. 使用过氧叔丁醇氧化核苷亚磷酸酯 **19** 后, 脱去 5'-端羟基的保护基. 加入 5,5-二甲基-2-氯-1,3,2-二氧磷杂己内酰磷酸酯(DMOCP) 进行环化, 再用碘进行氧化得到受保护的环二核苷酸 **21**, 进一步脱保护后即可得到 3',3'-CDG. 一锅法大大提高了 CDN 的合成效率, 可通过重结晶从混合物中分离出最终产物. 该方法也以其方便高效的优势后续被普遍应用于 CDN 类化合物的合成.

2013 年, Patel 等^[14]采用 Jones 的一锅法合成了 2',3'-cGAMP. 他们结合结构、化学、体外生化和体内细胞检测等技术证明, 与细菌合成的第二信使为 3',3'-cGAMP 不同, 哺乳动物合成的第二信使为 2',3'-cGAMP, 并研究了哺乳动物细胞合成 2',3'-cGAMP 的分子机制.

2017 年, Hartig 等^[15]采用 Jones 的一锅法合成了三种天然环二核苷酸 3',3'-CDG、3',3'-CDA、3',3'-cGAMP, 以及将核糖核苷替换为其他天然存在的核糖核苷的 3',3'-CDN, 并通过诱导 I 型干扰素的产生, 比较了他们的免疫刺激活性.

李艳梅等在前期 MUC1 糖肽肿瘤疫苗的工作^[16]基础上, 采用 Jones 的方法合成了 3',3'-CDG, 并将其作为佐剂应用于 MUC1 糖肽肿瘤疫苗^[17], 证明了利用 CDN 类化合物激活 STING 通路可使 MUC1 糖肽疫苗引起高水平的体液和细胞免疫反应.

2019 年, Beaucage 等^[18]报道了一种改进的亚磷酸酰胺法用于合成 3',3'-CDG. 该方法基于一种 5'-O-甲酸酯保护基, 使用 1,8-二氮杂双环[5.4.0]十一碳-7-烯(DBU)作为亲核试剂, 选择性地 5'-O-甲酸酯保护基团从二核

苷酸亚磷酸酰胺中间体上脱下, 继而进一步完成环化缩合. 基于市售的核糖核苷原料, 以 36% 的产率合成了 3',3'-CDG.

2.2 天然环二核苷酸激动剂衍生物的化学合成

在天然环二核苷酸激动剂的临床转化过程中, CDN 较差的稳定性和细胞膜通透性等缺陷限制了其治疗效果. 基于天然结构进行化学修饰是提高 CDN 成药性的有效手段. 目前 CDN 衍生物的主要修饰类型包括磷酸二酯键的修饰、桥连方式的替换、碱基和糖基的修饰及替换等(图 2). 具体来讲, 可以对天然环二核苷酸的磷酸二酯键进行磷硫代修饰或将其替换为酰胺键、三唑、硫脲或胍基等基团; 将天然环二核苷酸的碱基进行杂原子修饰或替换为其他碱基; 将天然环二核苷酸的糖环替换为碳环或将糖环上的羟基替换为氢原子、氟原子或烷氧基等. 这些修饰策略也常常被组合应用, 通过在天然环二核苷酸激动剂结构的基础上进行衍生化修饰, 目前已有多种新型环二核苷酸 STING 激动剂被合成出来.

2.2.1 硫代磷酸酯衍生物

天然环二核苷酸激动剂的磷酸二酯键易被生物体内的磷酸酯酶水解, 从而失去激活 STING 通路的活性. 研究证明利用硫原子取代桥联磷酸酯中的氧原子可以提高 CDN 的抗磷酸二酯酶和核酶水解的能力^[19], 同时可以提升细胞对 CDN 分子的摄取效率. 其中, CDN 硫代磷酸酯衍生物又分为环外磷硫代和环内磷硫代(图 3).

2.2.1.1 环外硫代磷酸酯衍生物

2006 年, Hayakawa 等^[20]报道了单硫代 3',3'-CDG 的合成, 在所述液相合成 3',3'-CDG (Scheme 3)方法的基础上, 他们将核苷亚磷酸酰胺与磷酸酯缩合, 用双-[3-(三乙氧基硅)丙基]四硫化物(TEST)替代过氧化二苯甲酰(BPO)氧化缩合产物, 得到硫代磷酸酯; 环化脱保护后得到单硫代 3',3'-CDG (**23**, 图 3), 但他们没有分离产物中的非对映体.

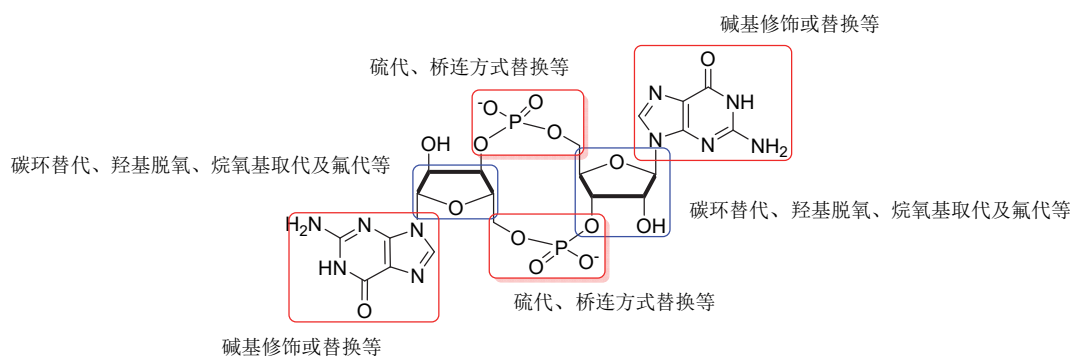


图 2 CDN 衍生物的结构修饰
Figure 2 Structural modifications of CDN

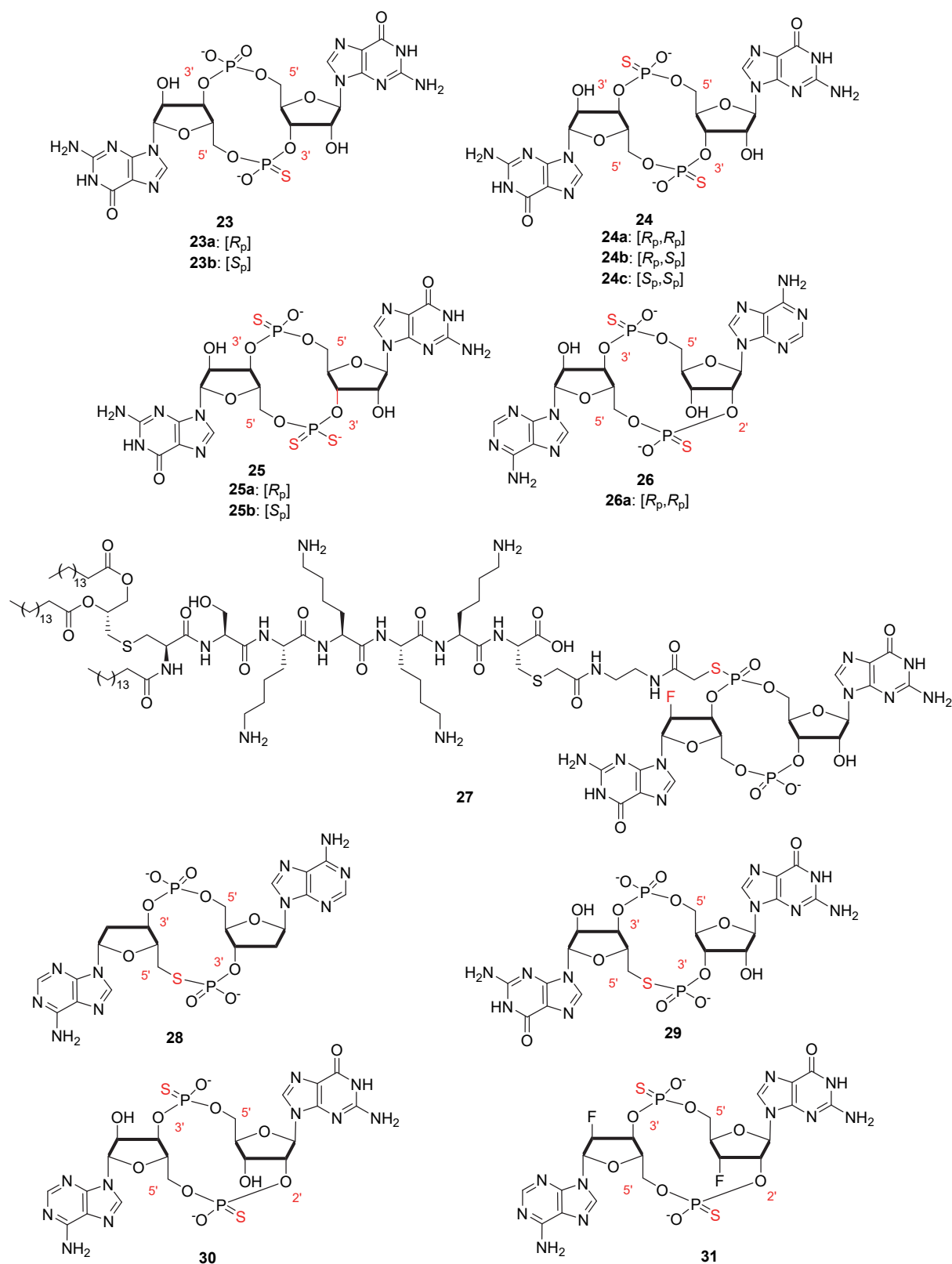


图3 硫代磷酸酯环二核苷酸结构式

Figure 3 Structural formula of thiophosphate CDNs

2008 年, Chen 等^[21]通过改良的 H-磷酸酯法合成了 3',3'-CDG 的单硫代磷酸酯和双硫代磷酸酯类似物。他们使用 *N*-(2-氰乙基)硫代邻苯二甲酰亚胺处理 H-磷酸

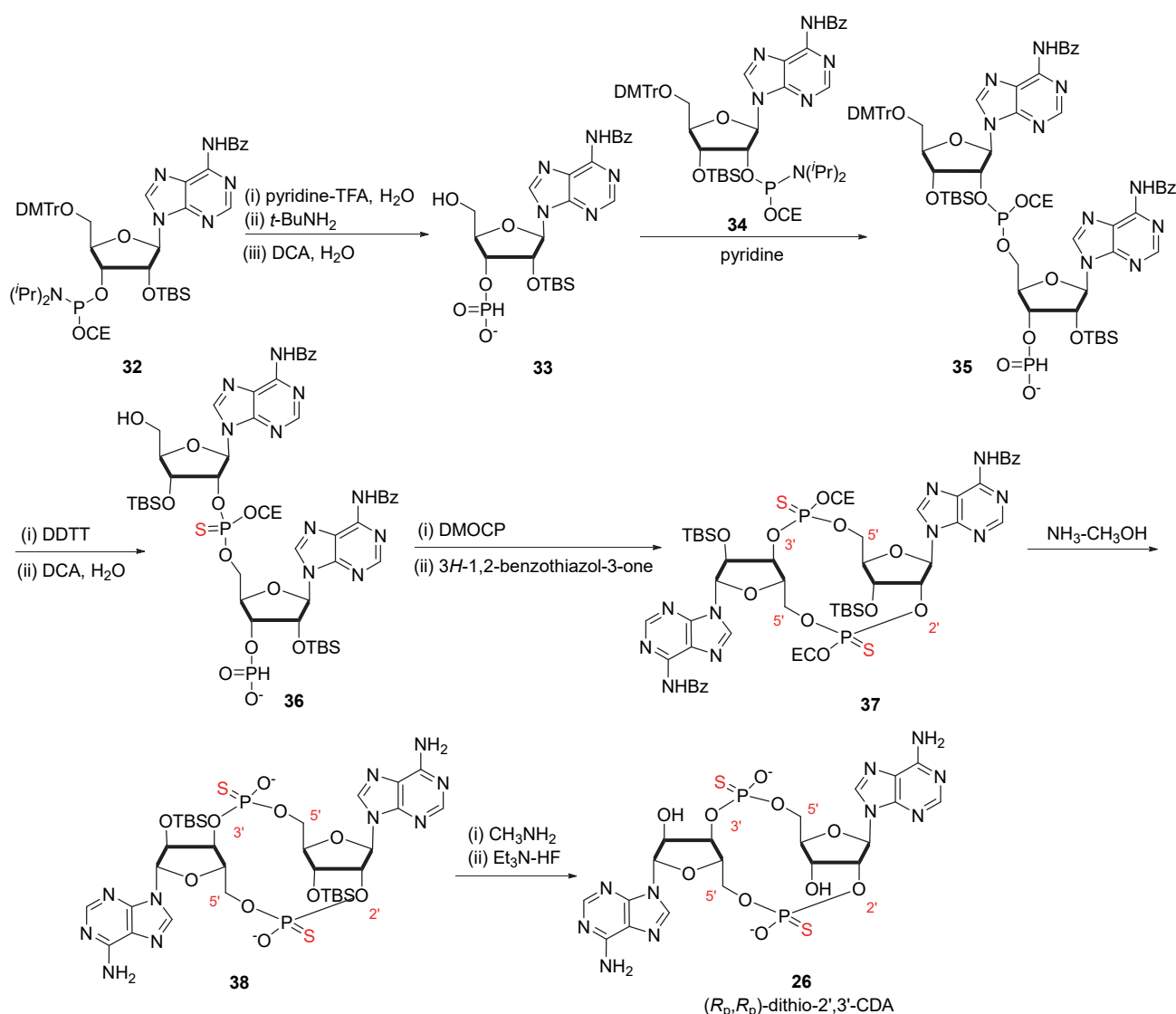
酯, 得到硫代磷酸盐三酯, 进一步转化为线性二核苷 H-磷酸酯。将线性二核苷 H-磷酸酯环化脱保护后即得到单硫代 3',3'-CDG (23)和双硫代 3',3'-CDG (24, 图 3)。

2009年, Jones等^[22]制备了7个3',3'-CDG的硫代磷酸酯类似物(所有单、双和三硫代磷酸酯的非对映体), 并实现了非对映体的分离. 第一步将市售的鸟苷亚磷酸酰胺与鸟苷H-磷酸酯或H-硫代磷酸酯偶联, 随后氧化或硫化偶联生成的亚磷酸酯, 再使用吸附在硅胶上的硫酸氢钠将5'-端羟基脱保护. 将线型二核苷酸环化后再用碘和水进行氧化或用硫进行硫化, 最后脱保护并通过手性高效液相色谱(HPLC)分离出每个非对映体 **23a**, **23b**, **24a**, **24b**, **24c**, **25a**, **25b**(图3). 需多次重复纯化得到光学纯的产物, 总产率不超过10%.

2010年, Jones等^[13]采用一锅法制备了双硫代3',3'-CDG. 该反应仅需在一锅法制备3',3'-CDG(Scheme 4)的基础上, 将试剂从氧化试剂改为硫化试剂[如使用如*N,N*-二甲基-*N'*-(3-硫代-3*H*-1,2,4-二噻唑-5-基)甲脒(DDTT)或3*H*-1,2-苯并二硫醇-3-酮]即可获得双硫代

3',3'-CDG (**24**). 最终产品通过结晶分离, 不需要经离子交换或反相 HPLC 纯化. 在制备过程中, 可通过硅胶柱分离被保护的硫代磷酸酯非对映体 **24a** 和 **24b**, 再进行脱保护, 从而实现双硫代 3',3'-CDG 非对映异构体的分离.

2015年, Gajewski等^[23]采用 Jones 的一锅法合成了(*R_p*,*R_p*)-dithio-2',3'-CDN、(*R_p*,*R_p*)-dithio-3',3'-CDN等磷硫酰化衍生物(其中碱基为G、A等)并探究了其活性(Scheme 5), 筛选出了具有良好免疫激活能力的(*R_p*,*R_p*)-dithio-2',3'-CDA (**26a**, 也被称为ADU-S100, 图3). 实验结果表明, 与四种主要的天然CDNs相比, 化合物**26a**具有更好的激活STING通路的效果. 在小鼠肿瘤模型中, 化合物**26a**显示出强大的抗肿瘤免疫作用, 目前该化合物已进入临床研究阶段.



图式5 一锅法液相合成(*R_p*,*R_p*)-dithio-2',3'-CDA
Scheme 5 One-flask synthesis of (*R_p*,*R_p*)-dithio-2',3'-CDA

传统上采用基于 P(III) 的策略来合成环二核苷酸类化合物. 2018 年, Baran 和 Schmidt 等^[24]发明了一种基于柠檬烯的 P(V) 试剂(ψ 试剂)用于非对映选择性的硫代磷酸酯的合成(Scheme 6), 并应用该方法合成了硫代环二核苷酸. 具体反应机制来讲, 首先第一个核苷与 ψ 试剂反应取代掉 $\text{C}_6\text{F}_5\text{S}$ 基团, P 手性中心的构型第一次发生翻转, 随后在 DBU 作用下实现手性核苷酸间的偶联, P 手性中心的构型再次翻转, 从而获得立体专一性的产物.

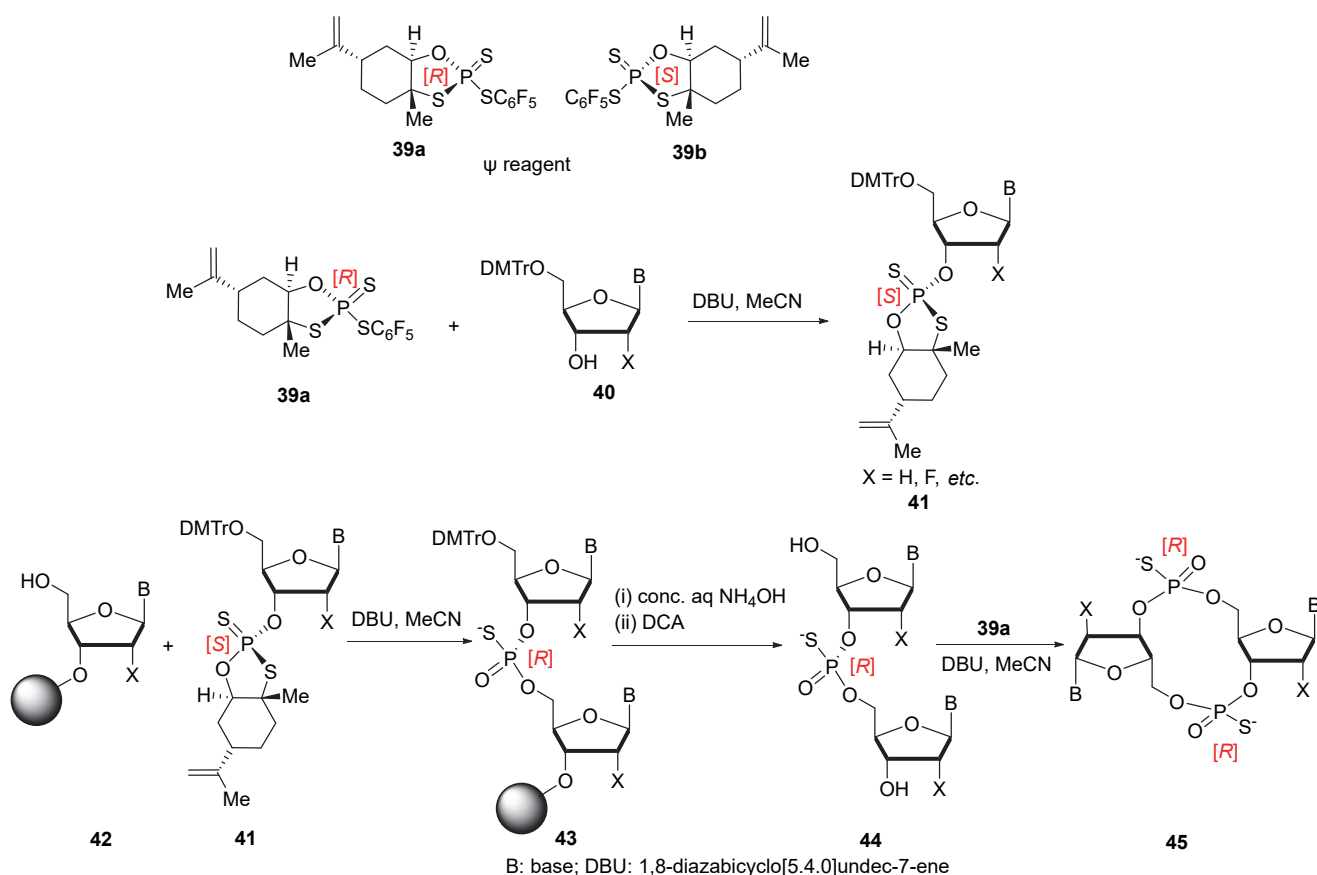
对于环二核苷酸的合成, Baran 等设计了分步法和协同法两种方法. 对于分步法, 首先将 ψ 试剂与核苷的 3'-羟基或 5'-羟基进行反应, 然后将其与结合在树脂上的另一份核苷的羟基进行反应得到线型二核苷酸. 将二核苷酸从树脂上切下, 通过 ψ 试剂进行第二次偶联, 10 min 内完成反应获得目标环二核苷酸. 而协同法则在一步内直接从线性二核苷酸二醇环化得到两种非对映异构体, 3'-羟基和 5'-羟基的反应性差别决定了非对映异构体的比例. 这两种方法也都可以以类似的程序进行. 通过控制 ψ 试剂的立体构型可以直接控制所合成环二核苷酸的构型. 与之前的合成方法相比, 该路线反应步骤更少, 且不需要后续分离非对映异构体, 具有良

好的规模化合成 CDN 化合物的潜力.

2020 年, 李艳梅等^[25]将 3',3'-CDG 硫代磷酸酯的磷硫键与 TLR1/2 (toll-like receptor 1/2) 的激动剂 Pam_3CSK_4 进行偶联(Scheme 7), 合成了一种可协同激活 STING 和 TLR 通路的联合佐剂分子 $\text{Pam}_3\text{CSK}_4\text{-CDG}^{\text{SF}}$ (27, 图 3). Pam_3CSK_4 有三个棕榈酰基, 它们可以介导位于抗原呈递细胞外膜上的 TLR1/2 的激活, 而且还提供了较好的疏水性, 可以改善 CDN 偶联物的细胞通透性. $\text{Pam}_3\text{-CSK}_4\text{-CDG}^{\text{SF}}$ 与模型抗原鸡卵白蛋白(OVA)混合后, 可增强抗原呈递细胞活化, 促进抗原提呈, 诱导抗原特异性免疫应答, 促进炎性细胞因子的产生. 与单独的 CDN 分子相比, 显著提升了免疫活化的能力和抗肿瘤效果, 这种基于磷硫键进行衍生修饰的方法及联合佐剂的策略为 CDN 的设计及应用提供了新的思路.

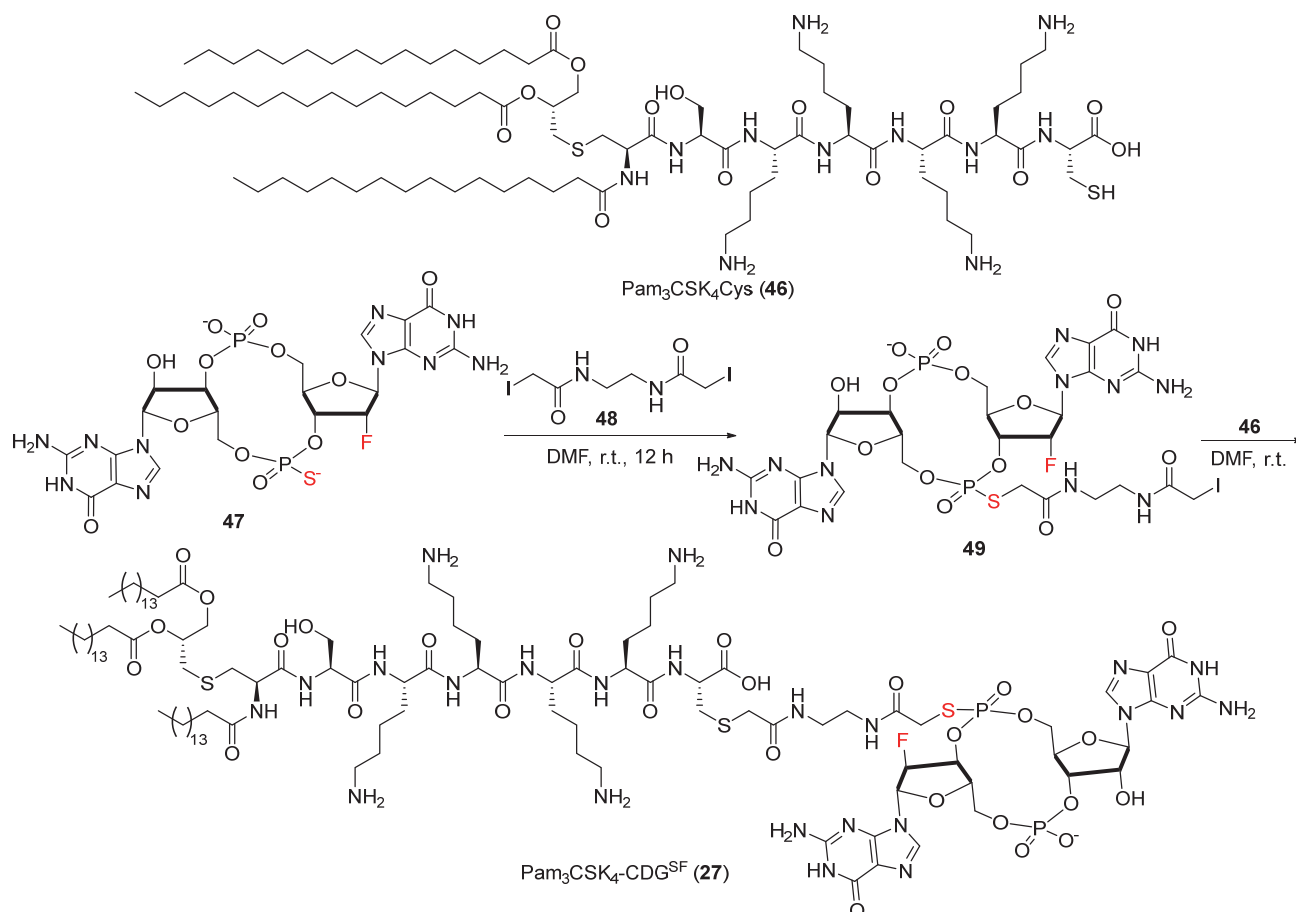
2.2.1.2 环内硫代磷酸酯衍生物

2002 年, Kool 等^[26]使用固相合成法合成了 5'-环内硫代磷酸酯连接的环二脱氧核苷酸(Scheme 8). 该路线首先将亚磷酸酰胺 50 连接在固相载体上形成亚磷酸三酯 51, 再用 3*H*-1,2-苯并二硫醇-3-酮-1,1-二氧化物硫化亚磷酸三酯 51 得到硫代磷酸三酯, 将 5'-羟基脱保护后

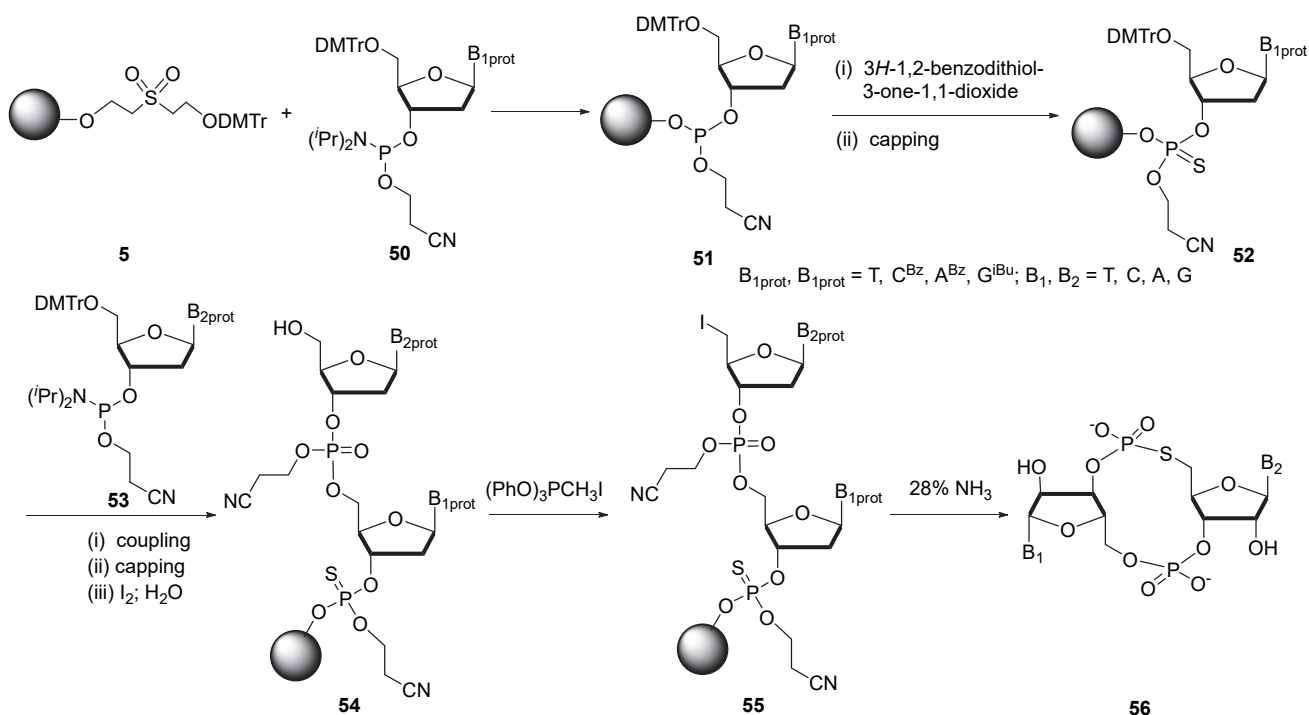


图式 6 基于 P(V) ψ 试剂手性合成环二核苷酸硫代磷酸酯

Scheme 6 Stereocontrolled phosphorothioate synthesis of CDNs based on the P(V) ψ reagent platform



图式 7 Pam₃CSK₄-CDG^{SF} 的合成
Scheme 7 Synthesis of Pam₃CSK₄-CDG^{SF}



图式 8 环内硫代磷酸酯连接的环二脱氧核苷的合成
Scheme 8 Synthesis of cyclic oligodeoxynucleotides bearing a phosphorothioate linkage

与亚磷酸胺 **52** 偶联, 对偶联产物的 5'-羟基进行碘代得到二核苷 **55**. 在室温下用浓氢氧化铵处理 24 h 一步完成碱基的脱保护、与固相载体的分离以及二核苷的环化(通过 S_N2 取代反应). 总的来讲, 通过在常规固相合成 CDN 路线的基础上增加碘化步骤, 采用取代反应环化得到了多种 5'-环内硫代磷酸酯连接的环二脱氧核苷酸, 例如化合物 **28**(图 3), 但他们并未对其生物活性进行评估.

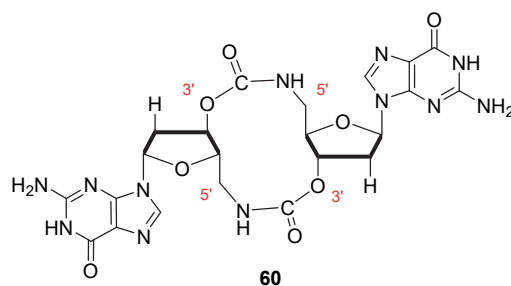
2011 年, Sintim 等^[27]采用上述碘化后取代的策略对 3',3'-CDG 中的磷酸二酯键进行环内磷硫代(Scheme 9), 得到了一种 3',3'-CDG 类似物 *endo*-S-c-di-GMP (**29**). 他们发现环内磷硫代可以抑制磷酸二酯酶对 3',3'-CDG 的水解, 但 *endo*-S-c-di-GMP 不具有 3',3'-CDG 调节 WspR(一种鸟苷酸环化酶, 控制 3',3'-CDG 的合成)水平的作用. 由于当时 STING 通路研究尚不够深入, 他们未对 *endo*-S-c-di-GMP 激活 STING 通路的功能进行表征.

2.2.2 磷酸酯桥连方式的替换

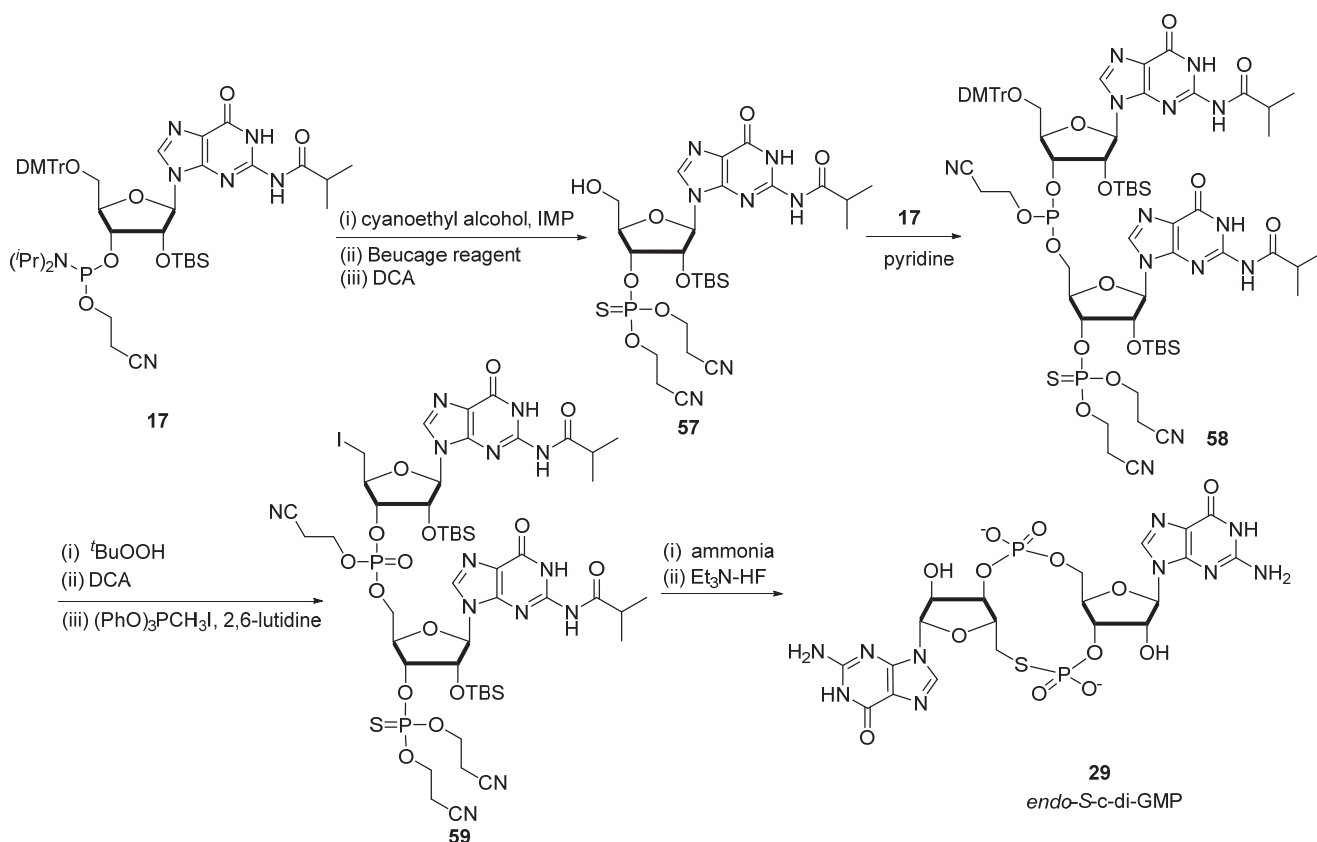
除前述对磷酸酯进行环内磷硫代以改变 CDN 的桥连方式外, 还有很多研究直接用酰胺键、三唑、硫脲及胍基等基团替换磷酸酯, 合成环二核苷酸类似物, 以期达到抗磷酸二酯酶水解及改善环二核苷酸药物活性的目的. 总体而言, 对环二核苷酸中的磷酸二酯键进行替

换可以提升其稳定性, 但可能会影响环二核苷酸的构型和激活 STING 蛋白的能力.

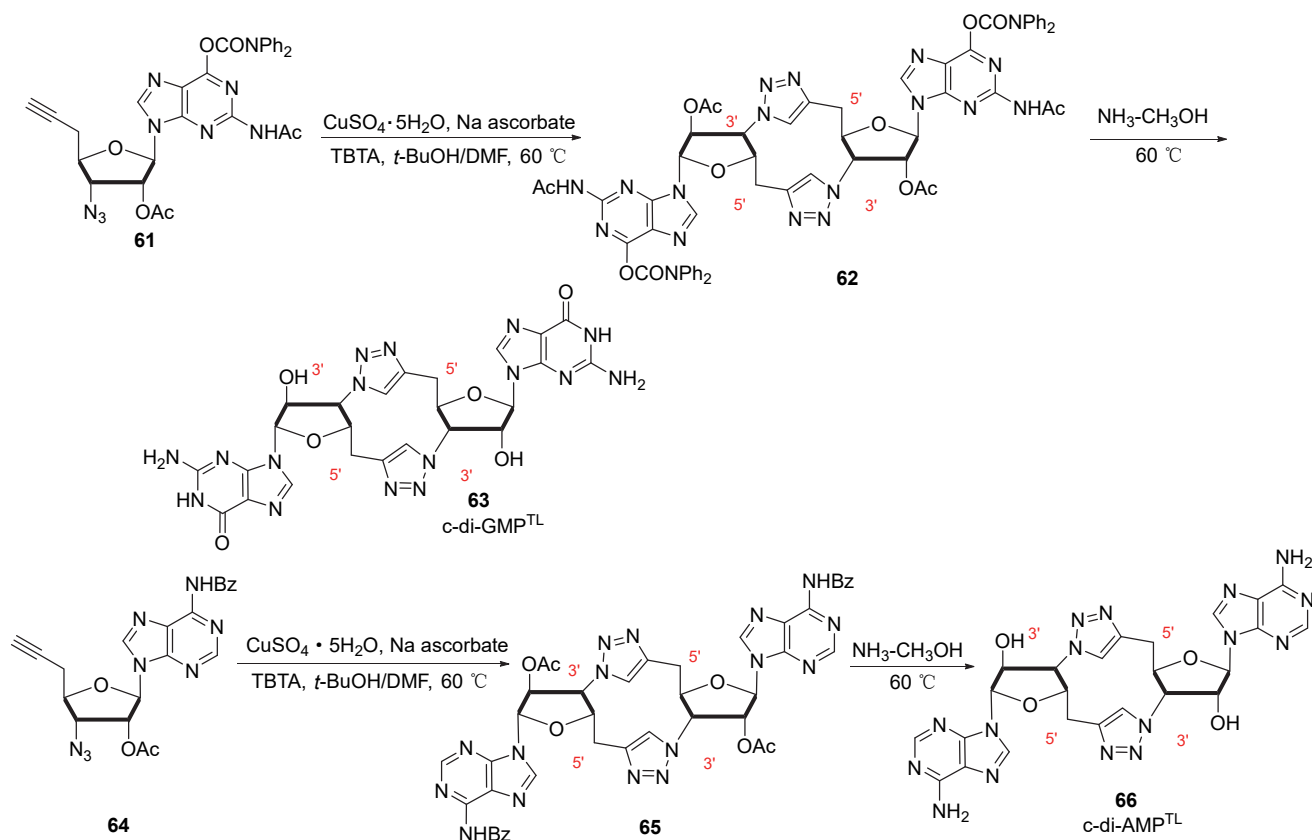
2008 年, 基于氨基甲酸酯在抗菌药物中替代磷酸二酯骨架的良好潜力, Miller 等^[28]将 CDN 的磷酸二酯替换为非水解性氨基甲酸酯, 同时将核糖上的羟基替换为氢, 合成了化合物 **60**, 以提高 CDN 的稳定性和膜渗透性. 他们通过氨基甲酸酯与酶的分子对接模拟验证了该类似物替代环二核苷酸发挥活性的潜力.



2014 年, Isobe 等^[29]报道了三唑替代磷酸二酯骨架的环二核苷酸类似物 c-di-GMP^{TL} (**63**)和 c-di-AMP^{TL} (**66**)的合成(Scheme 10). 三唑骨架的合成通过铜催化下叠氮基团与炔基的环加成反应实现, 脱去保护基团后即可得到目标 CDN 类似物 c-di-GMP^{TL} 和 c-di-AMP^{TL}. 但其激活 STING 通路的能力未被深入研究.



图式 9 *endo*-S-c-di-GMP 的合成
Scheme 9 Synthesis of *endo*-S-c-di-GMP

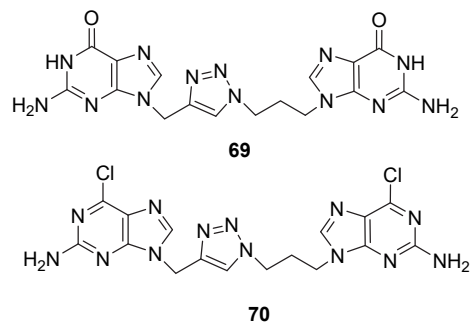
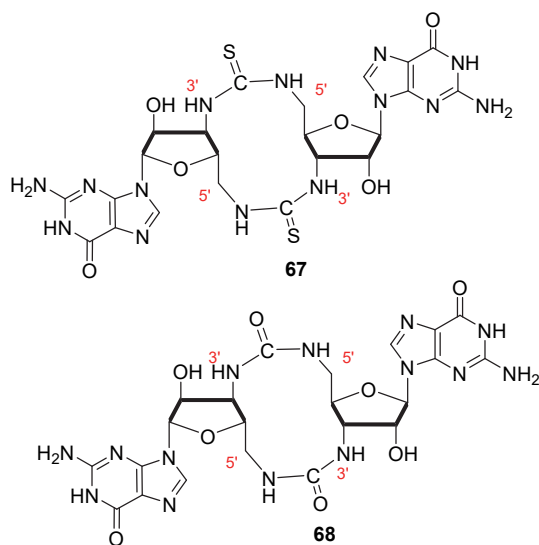


图式 10 c-di-GMP^{TL} 和 c-di-AMP^{TL} 的合成
Scheme 10 Synthesis of c-di-GMP^{TL} and c-di-AMP^{TL}

2014 年, Jones 等^[30]报道了将 3',3'-CDG 的磷酸二酯键替换为硫脲基、脲基、碳二亚胺和胍基的环二核苷酸类似物的合成. 他们使用 THP-1-DualTM 细胞评估了硫脲基及脲基替换 3',3'-CDG 磷酸二酯键的化合物 **67** 及化合物 **68** 激活 STING 信号通路的能力^[31], 研究结果表明两种天然环二核苷酸类似物也具有激活 STING 通路的

能力, 具有一定抗肿瘤治疗的潜力, 但其激活 STING 通路的能力较天然内源性环二核苷酸激动剂更弱, 两种类似物对 NF- κ B 通路(nuclear factor kappa-B, 可被 STING 激动剂如细胞内源性环二核苷酸激活的) IC₅₀ 值分别为 25.4 和 22.2 μ mol/L.

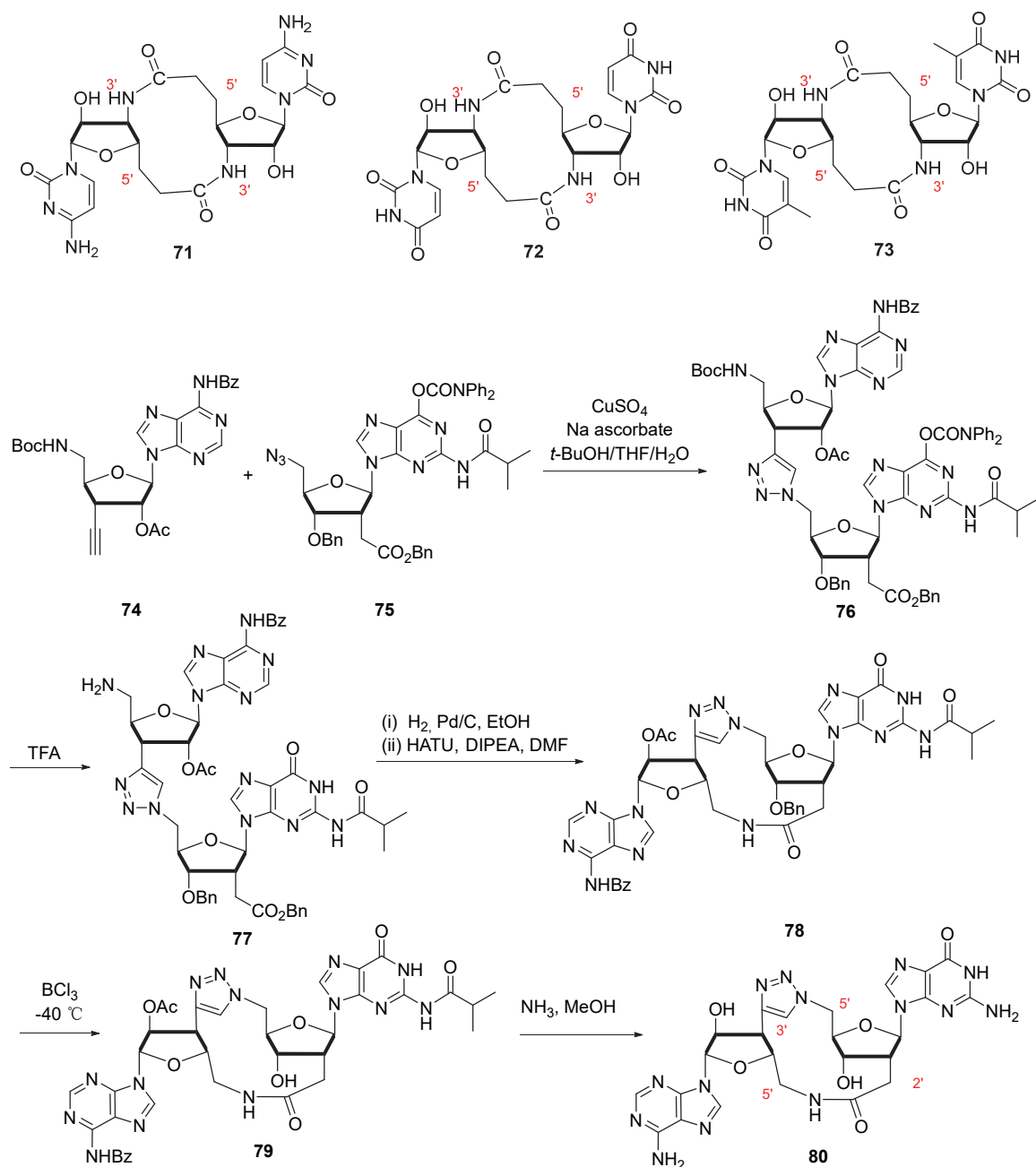
2015 年, Cutruzzola 等^[32]用中性和稳定的三唑类连接物代替 3',3'-CDG 的带电和可水解的磷酸二酯键, 通过点击化学反应合成了一系列环二核苷酸类似物. 但与 2014 年 Isobe 的工作不同, 他们使用单一三唑类似物连接核苷使其形成线型二核苷而非环状化合物, 发现了两种 CDN 类似物 DCI061 (**69**)和 DCI058 (**70**)可抑制 DGC 酶(控制细菌内 3',3'-CDG 的合成)的活性, 用于阻碍 3',3'-CDG 在细菌细胞中的信号传递.



2017 年, Chakraborty 等^[33]开发了一种简便的合成 C_2 对称环二核苷酸类似物的方法, 以酰胺键替代天然的磷酸二酯键, 合成了一系列含有全嘧啶碱基(胞嘧啶、尿嘧啶和胸腺嘧啶)的 CDN 类似物: c-di-CMP 类似物化合物 **71**、c-di-UMP 类似物化合物 **72** 和 c-di-TMP 类似物化合物 **73**, 合成的关键步骤为利用不同的嘧啶碱基对一种常见中间体进行 Vorbreggen 糖基化反应, 但将该路线应用于嘧啶碱基时, 未能得到相对应的 CDN 类似物。

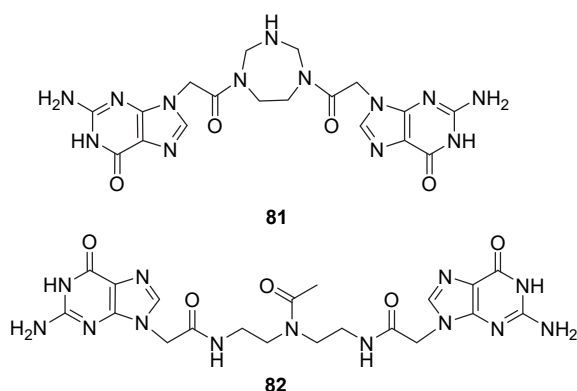
2019 年, Carell 等^[34]报道了一种 2',3'-cGAMP 类似物

(**80**)的合成(Scheme 11), 该类似物的两个核苷由酰胺键和三氮唑连接。首先基于 CuI 催化的点击化学反应建立了三氮唑连接, 进而通过内酰胺化反应实现环化。他们通过纳米差示扫描荧光法(nanoDSF)分析和对重组 hSTING L139(人源 STING AA139-379)及 mSTING L138(鼠源 STING AA138-378)的热去折叠分析, 在体外测试了化合物 **80** 与 STING 蛋白的结合能力。用相对亲和力较高的天然 STING 激动剂 2',3'-cGAMP 和相对亲和力较低天然激动剂 3',3'-cGAMP 作为阳性对照, 未能检测到化合物 **80** 与 hSTING 或 mSTING 的结合。

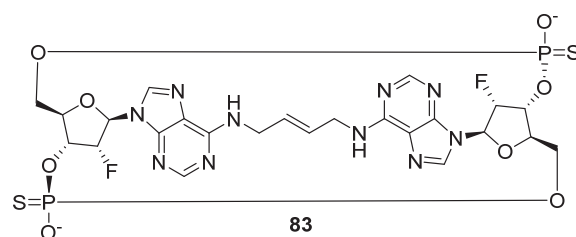


图式 11 化合物 **80** 的合成
Scheme 11 Synthesis of compound **80**

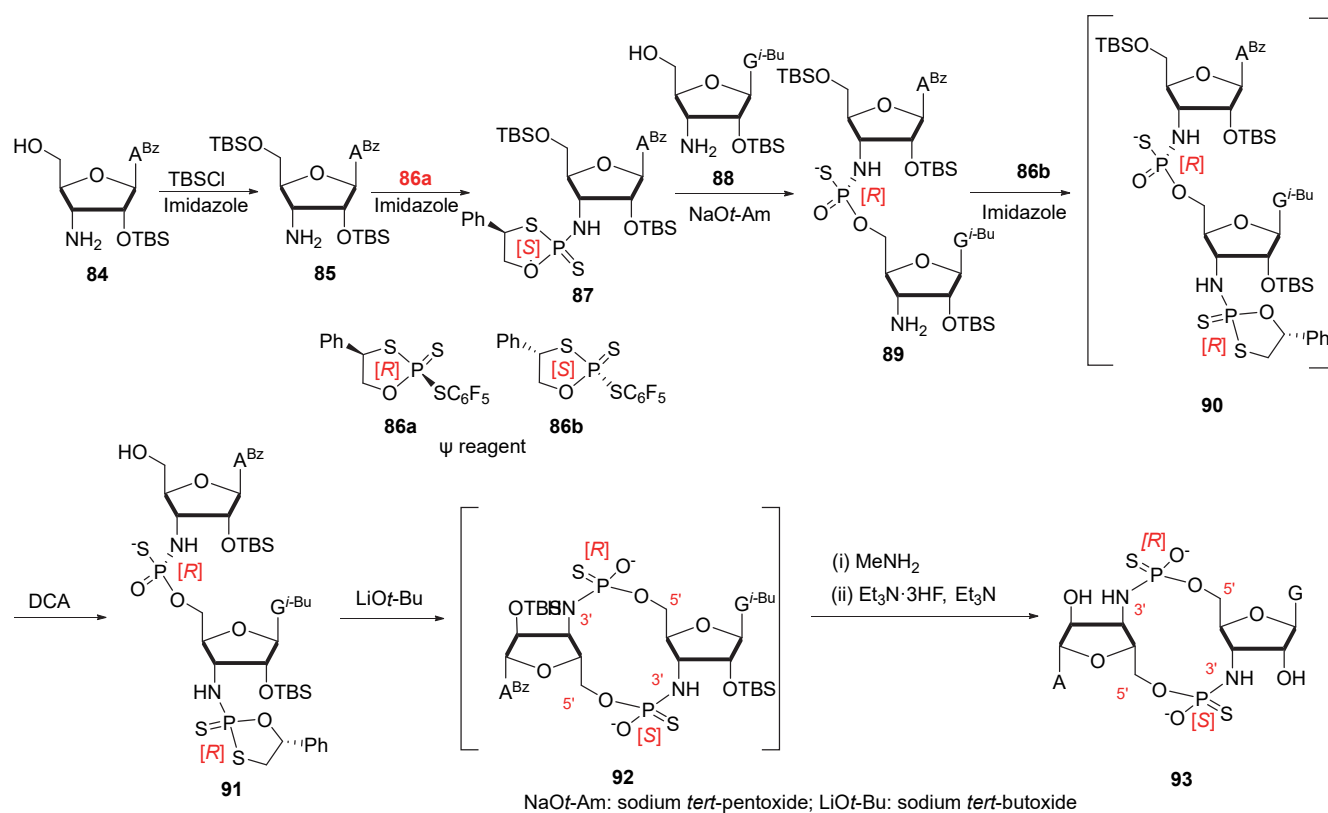
2021 年, Demizu 等^[35]通过缩合反应及烷基化反应在胺骨架上引入碱基, 开发了基于胺结构的 3',3'-CDG 衍生物, 并探究了它们作为生物膜抑制剂的作用(生物膜的形成会影响抗生素对病原菌的疗效). 他们发现不含磷酸二酯键骨架和糖基的环状和线型胺类分子对两种革兰氏阳性菌株(即金黄色葡萄球菌和变形链球菌)显示出生物膜抑制活性. 2022 年, 他们^[36]报道了这些胺骨架的 CDN 类似物对 STING 通路的激活能力, 研究结果显示, 环状结构化合物 **81**(其环状胺结构含有两个鸟嘌呤)具有激活 STING 通路的能力(但激活能力弱于 2',3'-cGAMP), 而线性结构化合物 **82**则显示出拮抗活性.



2021 年, Sarwar 等^[37]基于天然环二核苷酸激动剂的骨架, 在核酸碱基之间额外引入跨环大环桥来锁定环状二核苷酸的生物活性 U 形构象, 合成了新型大环状 STING 激动剂(MBSA). 与常规的二核苷酸类化合物合成路线相比, 他们在碱基上通过 Mitsunobu 反应引入烯烃, 并通过烯烃复分解反应实现额外跨环桥环的引入. 新设计的 MBSA 如 E7766(临床候选药物, 化合物 **83**)在所有主要的人类 STING 突变体中表现出广泛的激活活性. E7766 在小鼠肝脏转移性肿瘤模型中显示出强大的抗肿瘤活性和持久的免疫记忆反应.



2022 年, Schmidt 等^[24]在基于 P(V)试剂合成硫代 CDN 方法的基础上, 开发了利用 P(V)试剂合成硫代磷酸酰胺骨架 CDN 衍生物的方法(Scheme 12), 合成了一种硫代磷酸酰胺骨架的 3',3'-cGAMP (**93**)^[38]. 他们首先基于



图式 12 一种含有两个手性硫代磷酸酰胺键的环二核苷酸(CDN)激动剂的合成

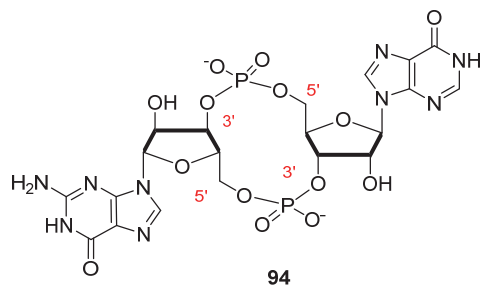
Scheme 12 Synthesis of a cyclic dinucleotide (CDN) STING agonist containing two chiral thiophosphoramidate linkages

环氧苯乙烷合成了 ψ 试剂, 并发现 ψ 试剂优先与5'-羟基而不是与3'-氨基发生反应, 将 ψ 试剂与5'-羟基保护的氮杂核苷的氨基反应, 再与另一分子氮杂核苷的5'-羟基反应可实现磷酸胺键的形成, 最终的环化以相同的机制实现。

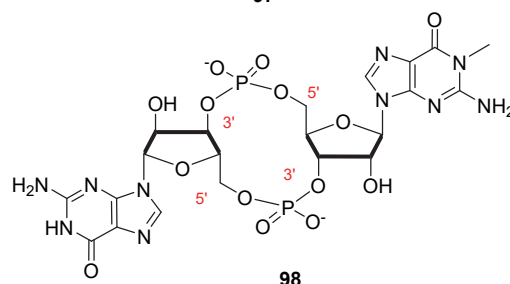
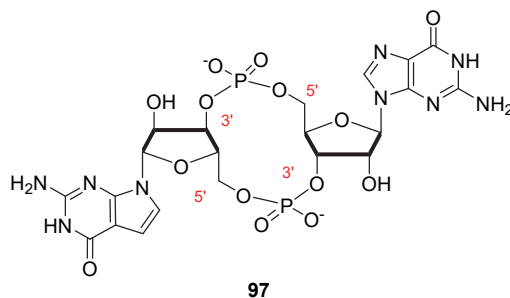
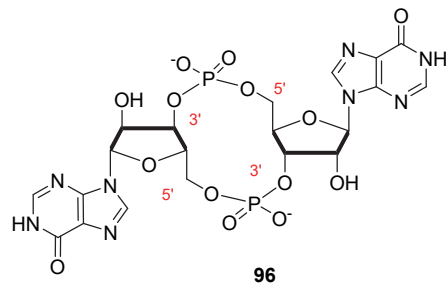
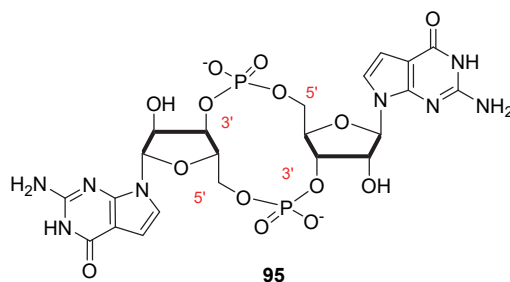
2.2.3 碱基的修饰和替换

四种主要的天然环二核苷酸激动剂中只存在 A 和 G 两种碱基. 考虑到碱基结构不同可能会影响 STING 蛋白与环二核苷酸的结合能力进而影响其激活免疫信号通路的能力, 近年来许多工作尝试对天然环二核苷酸的碱基进行修饰或将其替换为其他碱基, 合成了一系列新的环二核苷酸衍生物, 并评估了其生物活性. 此外, 通过碱基的修饰和替换可能会使环二核苷酸产生本征荧光, 为环二核苷酸在生物体内的研究提供新的工具. 碱基修饰或替换的环二核苷酸激动剂的合成方法与天然环二核苷酸激动剂的合成方法基本一致, 仅需将反应物的碱基进行替换。

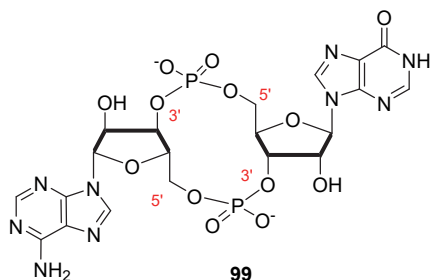
2006 年, Hayakawa 等^[20]将 3',3'-CDG 的一个鸟嘌呤碱基替换为次黄嘌呤, 合成了碱基替换的 3',3'-CDG 类似物化合物 **94**. 合成方法与他们同时报道的单硫代 3',3'-CDG 的合成方法基本一致, 仅需将原料进行替换, 并在对二核苷亚磷酸酯中间体进行氧化时不使用硫化试剂而使用氧化试剂过氧化丁酮. 中间体中的氰乙基和对硝基苯乙基(NPE)保护基可在吡啶中使用 DBU (10 equiv.)高效脱除。



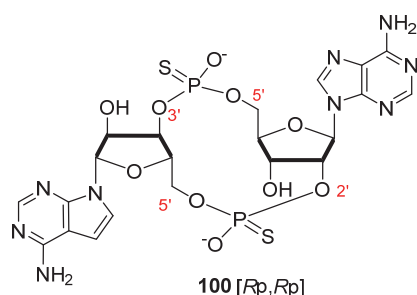
2011 年, Strobel 等^[39]采用固相合成法合成了一系列 3',3'-CDG 类似物的结构, 包括几个碱基替换或修饰的 CDN, 如 c-di-c⁷GMP (**95**, 3',3'-CDG 两个碱基 7 号 N 替换为 C), c-di-IMP (**96**, 3',3'-CDG 的两个碱基替换为次黄嘌呤), c-c⁷G-GMP (**97**, 3',3'-CDG 的一个碱基的 7 号位 N 替换为 C), c-N¹mG-GMP (**98**, 3',3'-CDG 的一个碱基的 1 号位 N 修饰甲基)等. 3',3'-CDG 在细菌内也可作为配体识别特定的核糖开关(特定的 RNA 序列), Strobel 等利用合成的系列 3',3'-CDG 衍生物研究了碱基对 3',3'-CDG 结合核糖开关的影响。



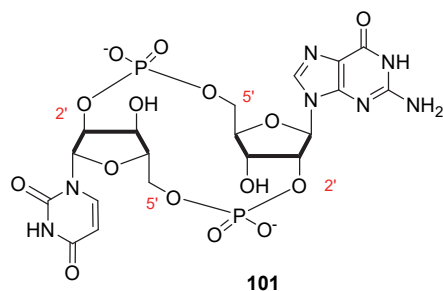
2016 年, Lioux 等^[40]报道了组成核苷为鸟苷和腺苷的环二核苷酸, 基于母体分子 3',3'-cAIMP (**99**), 他们设计、合成了 11 个 cAIMP 类似物, 这些 cAIMP 类似物在糖基(核糖、2'-脱氧核糖或 2'-F-2'-脱氧核糖)、连接方式(2',2'; 2',3'; 3',3'; 或 3',2')和磷酸酯修饰(双磷酸二酯或双硫代磷酸酯)方面存在差异. 他们在两种哺乳动物细胞系 RAW 264.7(鼠巨噬细胞, 用于诱导 IRF 途径)和 THP-1(人白血病单核细胞, 用于诱导 IRF 和 NF- κ B 途径)中体外评估了所有 11 种类似物激活 STING 通路的活性. 他们还发现其中部分化合物在来自健康供体的人体血液中离体诱导产生 I 型 IFN 和促炎细胞因子的能力优于 2',3'-cGAMP. 同时, 他们证实了将 CDN 的核糖变为脱氧核糖、对羟基进行氟代以及对磷酸二酯键进行硫代修饰将提升 CDN 对酶促降解的抵抗力。



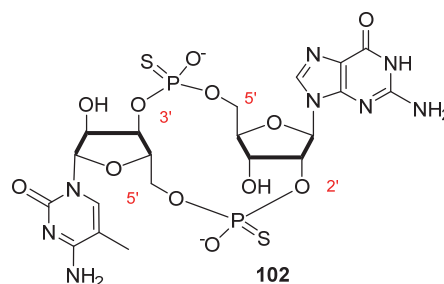
2019 年, Francesco 等^[41]采用 Jones 的一锅法合成了一系列 2',3'-CDA 类似物, 发现对碱基进行修饰的 IACS-8779(磷酸酯双硫取代同时将 A 碱基的一个 N 替换为 CH 的 2',3'-CDA, **100**)在体外显示出与已进入临床研究阶段的双硫代 3',3'-CDA 具有同样良好的激活 STING 通路的能力, 并在 B16 黑色素瘤小鼠模型中显示出很强的系统抗肿瘤活性。



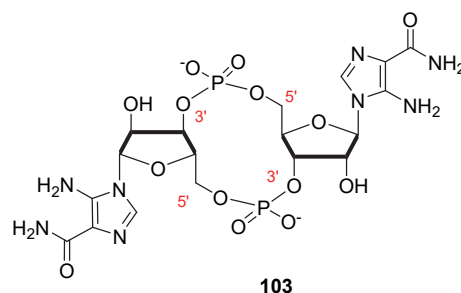
2020 年, 席真等^[42]报道了 36 个 CDN 的设计和合成, 包含四个碱基(A、G、C、U)和两种磷酸酯连接方式(2'-5'连接和 3'-5'连接)的任何组合方式(如 3',3'-CDU, 2',3'-CDU, 2',2'-CDU, c[G(2',5')A(3',5')], c[G(3',5')A(2',5')]等). 他们通过双荧光素酶报告基因系统评价了这些 CDN 对 IFN- β 的诱导作用, 发现野生型 hSTING 及其两种突变体(HAQ 和 AQ)对 CDN 刺激表现出较强的反应, 而 hSTING-R232H 突变体和 R293Q 突变体对 CDN 刺激的反应相对较弱. 他们发现 2',2'-cGUMP (**101**)对所有 hSTING 突变体都表现出优异的活性, 甚至与内源性 STING 配体 2',3'-cGAMP 相当. 此外, 实验结果表明含有两个 3'-5'磷酸二酯的 3',3'-CDN 比含有两个 2'-5'磷酸二酯的 2',2'-CDN 和含有一个 2'-5'和一个 3'-5'磷酸二酯的 2',3'-CDN 具有更高的血清和水解酶稳定性.



2020 年, 王孝伟等^[43]通过改进的一锅法策略合成了一系列 2',3'-CDNs. 他们建立了一个基于表面等离子体共振(SPR)的结合实验, 以评估所合成的 CDNs 与 hSTING 的结合亲和力. 使用这种方法, 他们筛选出一种新型 CDN 化合物 **102**(双磷硫代, 两个碱基分别为 G 碱基及 5-甲基胞嘧啶), 与 2',3'-cGAMP ($K_D=0.543 \mu\text{mol/L}$)相比, 化合物 **102** 与 hSTING 具有更高的亲和力 ($K_D=38 \text{ nmol/L}$). 同时, 细胞实验证实, 与 2',3'-cGAMP 相比, 化合物 **102** 能更好地促进免疫细胞中 I 型 IFN 和其他促炎症细胞因子的表达. 此外, 化合物 **102** 的体外抗酶切能力也优于 2',3'-cGAMP.

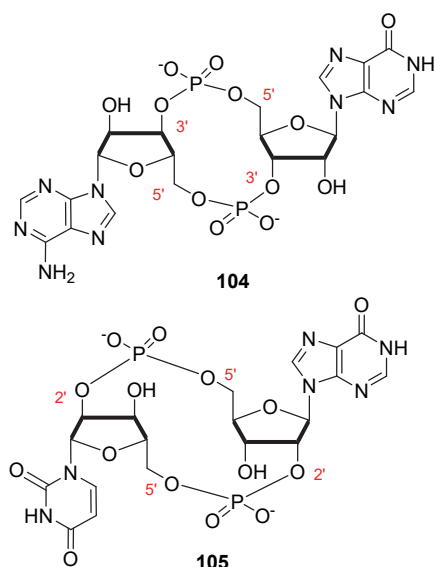


2021 年, Minakawa 等^[44]报道了 c-di-ZMP (103) 的合成。c-di-ZMP 由两个 5-氨基-4-咪唑甲酰胺核苷酸(Z-核苷酸)通过两个磷酸二酯连接而成。基于磷酸二胺法用 N^1 -二硝基苯基黄嘌呤(Hxa^{DNP}-base)构建 CDN 骨架, 随后经 Hxa^{DNP}-base 的开环反应得到目标化合物 c-di-ZMP。

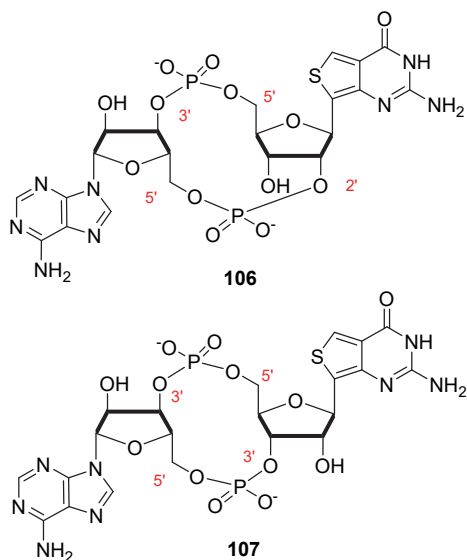


2021 年, 席真等^[45]基于次黄嘌呤与四个天然碱基(A、G、C 和 U)和三类磷酸二酯连接骨架(3',3'、2',3'和 2',2')的组合, 采用磷酸三酯法共合成了 19 种含肌苷(次黄嘌呤核苷)的 CDNs. 他们采用 HEK293T 细胞和 THP-1 细胞系评价了合成的 CDN 类似物诱导 IFN- β 表达的能力. 发现所有含有次黄嘌呤和嘌呤环(G、A 或 I)的 3',3'-CDN 均表现出优异的活化 hSTING-WT、HAQ 突变体和 AQ 突变体的能力, 所有含有肌苷的 3',3'-CDN 均不能激活 R232H 突变体. 对于 R293Q 突变体, 合成的 3',3'-CDN 中只有化合物 **104** 具有很强的激活能力. 而对于 2',3'-CDN 和 2',2'-CDN, 嘌呤环的引入仍然强烈激活了所有 hSTING 突变体, 与天然环二核苷酸相比表现出

更高的活性. 对于 2',3'-CDN 和 2',2'-CDN, 肌苷和嘌呤核苷的存在有利于 CDN 与 hSTING 蛋白的 Y167 和 R238 残基发生堆积作用, 由次黄嘌呤和嘧啶构建的几种 CDN(如 2',2'-cIUMP, **105**)也能激活所有 hSTING 突变体.



2022 年, Ploetz 等^[46]报道了合成具有本征荧光的环状二核苷酸 2',3'-c^hGAMP (**106**)和 3',3'-c^hGAM (**107**)的路线, 适用于大规模合成. 他们检测了这两种环二核苷酸与小鼠和人类 STING 蛋白的结合特性, 确认了其生物活性. 双光子成像显示 2',3'-c^hGAMP 可被人源 THP-1 细胞摄取并诱导单核细胞中干扰素的产生. 但荧光 2',3'-c^hGAMP 类似物的细胞应用(包括细胞内跟踪和下游监测)强烈依赖于所选细胞系的自体荧光, 且 2',3'-c^hGAMP 与 hSTING 蛋白的结合亲和力较天然环二核苷酸激动剂更低. 这些缺陷仍需要进一步解决.

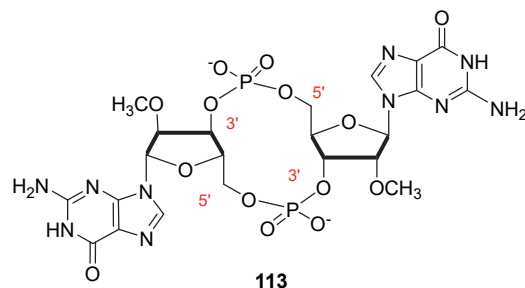


2.2.4 糖基的修饰和替换

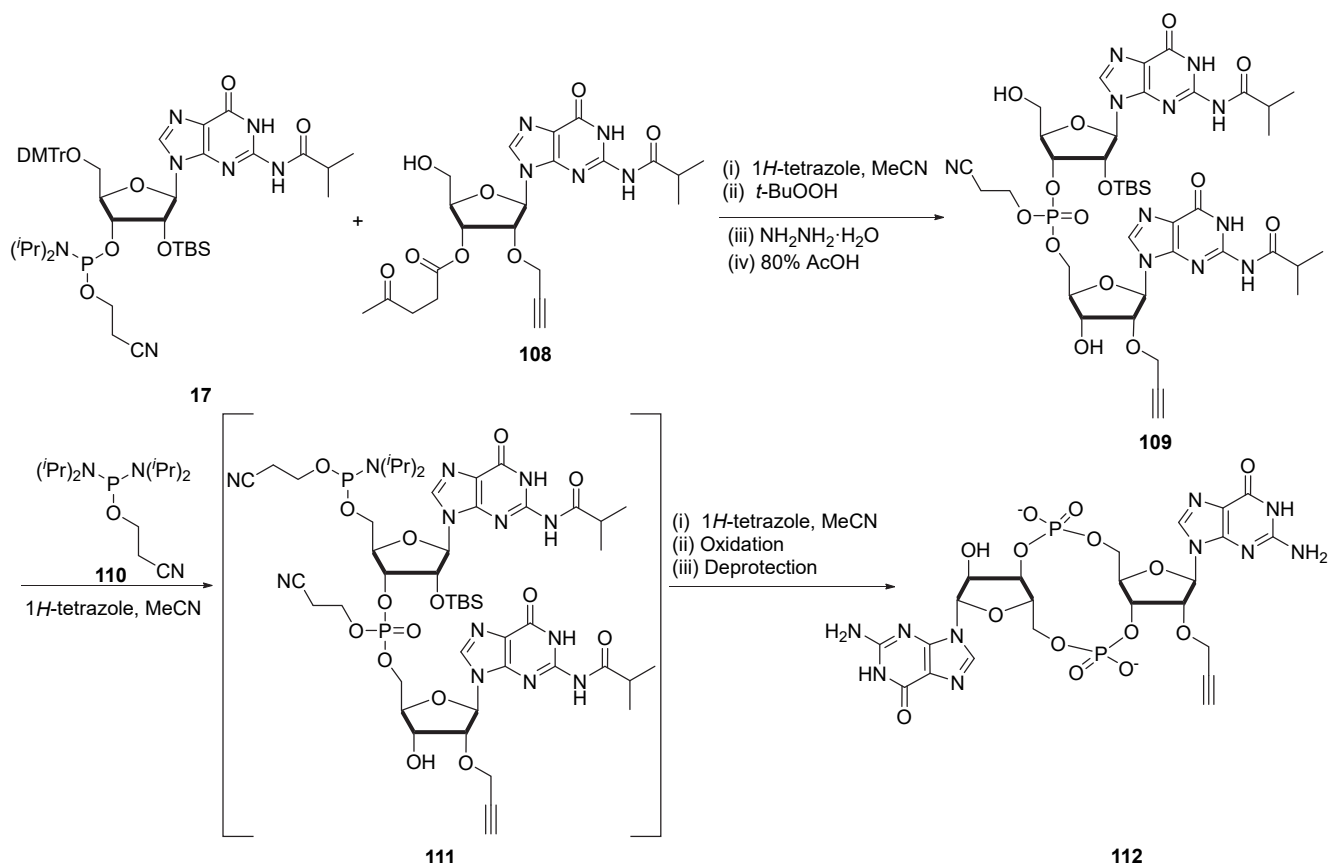
通过对天然环二核苷酸激动剂的糖基进行修饰和替换, 可能会有效提升环二核苷酸的膜渗透性和抗酶降解能力. 例如将天然环二核苷酸糖基上的羟基进行氟代可有效提升其亲脂性, 进而提升其被细胞摄取的效率. 将糖基上的羟基替换为氢或氟等也可以提升其对酶促降解的抵抗力. 此外, 也可以将糖基替换为碳环或在糖环内引入杂原子. 通过对 CDN 中的糖基进行修饰和替换可能会有效提升其成药性.

2010 年, Beaucage 等^[47]报道了基于亚磷酸胺合成 3',3'-CDG 类似物的方法(Scheme 13). 他们使用 1*H*-四氮唑活化核苷亚磷酸胺 **17**, 再与另一核苷 **108** 的 5'-羟基偶联得到亚磷酸三酯中间体, 对中间体进行氧化后再将 3'-和 5'-端羟基脱保护. 用市售的 P(III)试剂 2-氰乙基-*N,N,N,N*-四异丙基亚磷酸二胺和 1*H*-四氮唑对 5'-端羟基进行亚磷酸化, 进一步与 2'-羟基偶联实现环化. 将环化后的亚磷酸三酯氧化后脱保护, 得到 3',3'-CDG 类似物 **112**. 通过对环二核苷酸糖基上的羟基进行烷基官能团的衍生, 可进一步将 CDN 与叠氮基修饰的化合物进行偶联, 为 CDN 的衍生化修饰提供了有用的路线.

2011 年, Strobel 等^[48]采用固相法合成了糖环 2'-OH 甲氧基取代的 3',3'-CDG 类似物 **113**. 有几种细菌物种含有两种类型的 3',3'-CDG 结合核糖开关, 它们以高亲和力结合第二信使并调节不同的下游基因. 与 c-di-GMP-I 核糖开关的识别模式完全不同, 在与 c-di-GMP-II 核糖开关结合时, 3',3'-CDG 的鸟嘌呤碱基通过非规范配对被识别, 并且磷酸二酯骨架不与 RNA 接触. 他们利用所合成的 3',3'-CDG 类似物 **113** 与 c-di-GMP-II RNA 的选择性结合, 设计了一种选择性靶向单一核糖开关的工具分子.

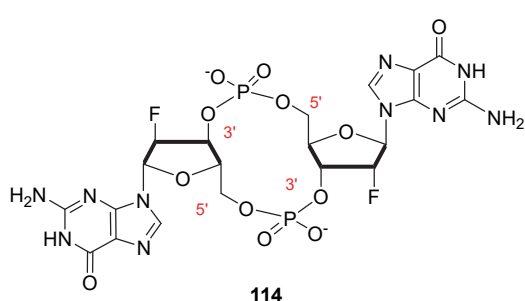


2013 年, Sintim 等^[49]合成了一种糖环 2'-OH 氟代的 3',3'-CDG 类似物 **114**, 并利用核磁共振扩散序谱(DOSY NMR)研究了其与几种效应蛋白(如 DGC 酶和 PDE 酶)的结合, 发现氟代可以提升 3',3'-CDG 的膜渗透性. 此外, 他们发现 2'-F 的 3',3'-CDG 类似物与 DGCs 的结合能力比天然 3',3'-CDG 更强(4 倍), 但 3',3'-CDG 与 PDEs 的结合比 2'-F-c-di-GMP 更强(10 倍).

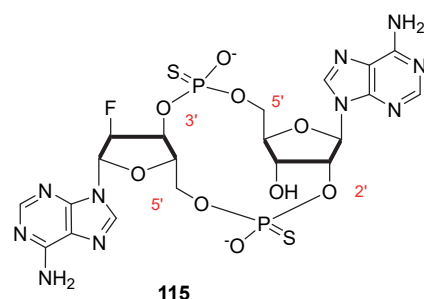


图式 13 亚磷酰胺环化合成 3',3'-CDG 类似物

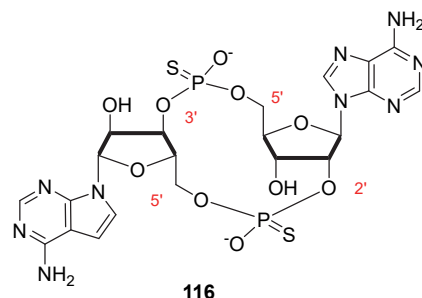
Scheme 13 Synthesis of 3',3'-CDG analogue synthesis based on phosphoramidite cyclization



114



115

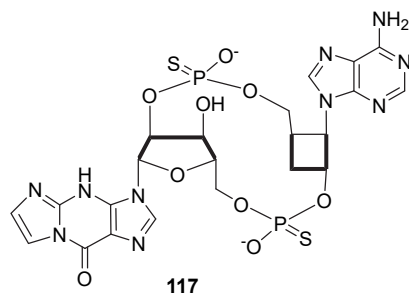


116

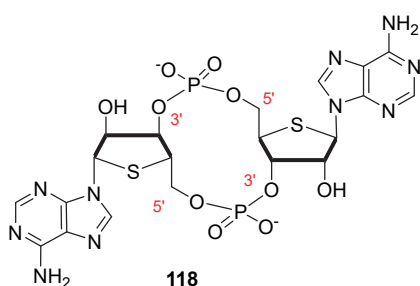
2019 年, Francesco 等^[41]报道了两种高效的环二核苷酸 STING 激动剂 IACS-8803 (**115**)和 IACS-8779 (**116**)的合成. 两种化合物在 2',3'-cGAMP 的结构基础上进行了化学修饰: IACS-8803 在 2',3'-CDA 的基础上进行了单氟双硫修饰, IACS-8779 则在 2',3'-CDA 的结构基础上进行了磷酸酯双硫取代修饰, 并将 A 碱基的一个 N 替换为 CH. 与已进入临床研究阶段的 ADU-S100 (**26a**)相比, 它们在体外显示出更强的激活 STING 通路的能力, 并在 B16 黑色素瘤小鼠模型中显示出显著的系统抗肿瘤反应.

2021 年, Kempson 等^[50]使用 ψ 试剂法合成了一种新型非天然硫代磷酸盐环状二核苷酸 BMT-390025 (**117**),

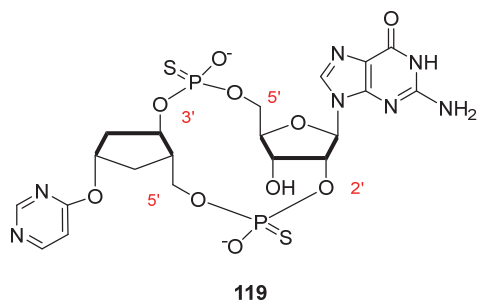
该结构在 2',2'-cGAMP 的基础上替换了 G 碱基, 将与 A 碱基相连的糖环替换为四元碳环, 并进行了双磷硫代修饰. 路线避免了使用 P(III)试剂可能导致的外消旋, 以及色谱分离的频繁使用, 以 15% 的总收率得到了克级的产物.



2021 年, Minakawa 等^[51]采用亚磷酰胺法合成了 c-4'-S-diAMP 类似物 **118**, 其呋喃糖环上的氧原子被硫原子取代. 由此得到的 c-4'-S-diAMP 具有激活 STING 通路的长效活性.



2021 年, Vyskocil 等^[52]报道了一种双磷硫代碳环嘧啶环二核苷酸 STING 激动剂 **119** 的合成及生物活性评估. 该环二核苷酸类似物的两个碱基分别为鸟嘌呤与嘧啶, 同时核糖的一个糖环被替换为碳环, 修饰后的 CDN 具有更好的全身静脉给药的能力, 可激活 CD8⁺ 细胞毒性 T 细胞产生适应性免疫反应, 表现出优异的抗肿瘤效果.



2021 年, 李艳梅等^[53]报道了一种单氟单硫代 3',3'-CDG (CDG^{SF}, **47**) 的合成, 衍生化修饰显著提升了 3',3'-CDG 体内激发免疫活性的能力, 并在小鼠层面呈现出优于双硫代 3',3'-CDG 的抗肿瘤活性. 他们还首次将 STING 类激动剂用于 SARS-CoV-2 疫苗^[53a,54], 证明了 CDG^{SF} 可引发很强的体液免疫和细胞免疫, 克服了常用疫苗佐剂铝佐剂的缺点, 显示出环二核苷酸类 STING 激动剂的新应用前景.

3 环二核苷酸类化合物的酶促合成

3.1 天然环二核苷酸激动剂的酶促合成

鉴于环二核苷酸类化合物的化学合成路线较为复杂, 而环二核苷酸本身就可由微生物及哺乳动物合成, 天然环二核苷酸的酶促合成一直以来就被研究人员们所关注. 利用生物体内的二核苷酸环化酶催化三磷酸腺苷 (ATP) 或三磷酸鸟苷 (GTP) 等三磷酸核苷反应即可实现环二核苷酸的生物合成 (Scheme 14). 与化学合成相比, 酶促合成环二核苷酸的条件相对温和, 合成路线也相对简单, 但目前酶促合成环二核苷酸的反应规模仍较小, 应用也较为受限.

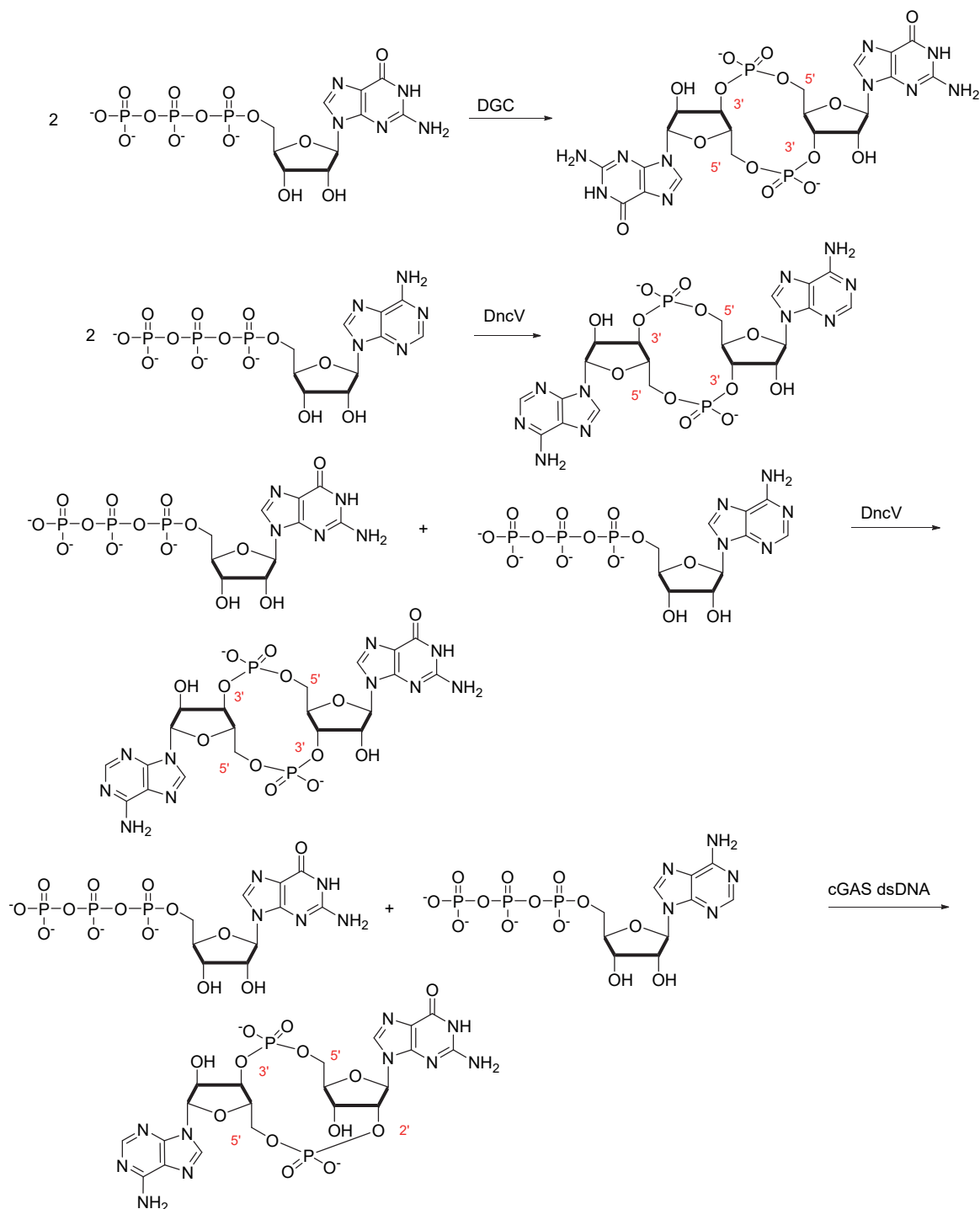
在细菌内, 3',3'-CDG 由 DGC 酶催化合成, 但通过 DGC 酶体外合成 3',3'-CDG 存在蛋白质不稳定及产物抑制较强等缺点. 2009 年, Liang 等^[55]报道了具有更高热稳定性的嗜热 DGC 酶结构域 (tDGC) 蛋白的表达和鉴定, 同时通过调控保守残基的突变, 显著减轻了产物抑制的问题. 利用突变体 tDGC, 他们通过优化的酶反应和产物纯化程序实现了百毫克级的 3',3'-CDG 的制备.

2018 年, Strobel 等^[56]报道了一种通过酶促反应简便合成 3',3'-CDN 的新方法, 采用环状 AMP-GMP 合成酶 (DncV) 合成了 3',3'-CDG、3',3'-CDA 及 3',3'-cGAMP. 他们利用 DncV 的混杂性, 并使用不同的二价离子进一步优化了其催化能力, 构建了一个在糖、碱基和磷酸骨架上进行修饰的环二核苷酸类似物的扩展文库. 在非有机溶剂条件下合成了 3',3'-CDG 和 3',3'-cGAMP 的衍生物, 如 2-氨基糖取代环二核苷酸类似物和硫代磷酸酯环二核苷酸类似物等.

2019 年, Zhu 等^[57]报道了基于微生物合成 3',3'-CDG、3',3'-cGAMP 及 2',3'-cGAMP 的方法. 该方法主要包括两个部分: 通过在大肠杆菌中高效表达合适的 DncV 和其他相关蛋白来合成 CDN, 再采用 STING 亲和层析、大孔吸附树脂和 C18 反相液相色谱等工艺来进一步纯化细菌产生的 CDN.

2019 年, Rosenthal 等^[58]利用无细胞蛋白质合成 (CFPS) 系统进行预筛选, 探究了来源于高等生物的 cGAS 基因能否在细菌表达系统中高效表达. 他们通过大肠杆菌表达系统合成了来源于高等生物的 cGAS 酶, 随后对 cGAS 酶进行纯化并将其用于 2',3'-cGAMP 的合成. 证实了普氏马、裸鼠、白头鹰和斑马鱼的 cGAS 同系物能够催化 ATP 和 GTP 转化为 2',3'-cGAMP.

2021 年, Rosenthal 等^[59]开发了一个多级酶联法合成系统, 实现了在单一反应体系中从 GTP 和廉价的腺苷以及多磷酸盐生物催化合成 2',3'-cGAMP. 他们利用来自酿酒酵母的腺苷激酶 (ScADK)、约翰逊酸杆菌的多磷酸激酶 (AjPPK2) 和瓜子菌的多磷酸激酶 (SmPPK2) 构



图式 14 生物催化合成环二核苷酸激动剂
Scheme 14 Biocatalyzed synthesis of CDN

建了多级酶联系统,用于从腺苷合成 ATP,并将 ATP 合成系统与 cGAS 酶联用,以实现从腺苷合成 2',3'-cGAMP. 2',3'-cGAMP 的合成速率与单步反应中达到的最大反应速率相当. 每摩尔腺苷可获得约 0.08 mol 2',3'-cGAMP, 产率与化学合成相当.

2021 年,朱德裕等^[60]报道了一种实用经济的酶法合成 3',3'-CDA 的路线,使用来自霍乱弧菌的二核苷酸

环化酶 DncV,制备了克级的 3',3'-CDA. 该方法主要包括四个步骤: DncV 固定化树脂的制备、3',3'-CDA 的酶法合成、使用大孔吸附树脂 SP207 进行纯化以及使用旋转蒸发和冻干进行干燥. 根据反应中投入的 ATP 计算 3',3'-CDA 的总产率,约为 80%. 该方法易于在实验室中进行,可以在克级规模上制备 c-di-AMP,并有大规模工业生产的潜力.

3.2 基于天然环二核苷酸结构的衍生物的酶促合成

由于天然环二核苷酸激动剂较差的成药性, CDN 衍生物的酶促合成相较天然 CDN 而言更加重要. 近年来, CDN 衍生物的微生物合成和多级酶联法合成也取得了重要的进展和突破.

2014 年, Li 等^[19]基于小鼠 cGAS(残基 147~507)蛋白在鲑鱼睾丸 DNA (htDNA)存在下催化 ATP α S 和 GTP 合成了一种抗水解的 2',3'-cGAMP 的双硫代磷酸酯类似物(2',3'-cG α S α MP, **30**). 与 2',3'-cGAMP 相比, 化合物 **30** 在体外与 hSTING 有类似的亲和力, 在诱导人类 THP-1 单核细胞分泌 IFN- β 方面的效力强十倍, 并利用鼠源细胞证明了双磷硫代修饰可提升 CDN 的抗水解能力, 进而提高其激活免疫反应的效力.

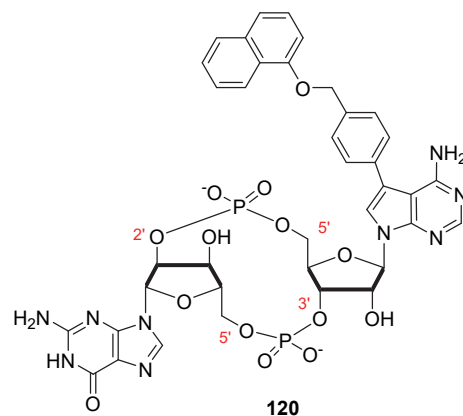
2015 年, Zinchenko 等^[61]采用 DGC 酶催化 araGTP 或 dGTP, 分别合成了 c-di-araGMP 和 c-di-dGMP. 反应 18 h 后产物收率达到 95%以上, 纯化产率约 80%, 具有用于 CDN 大规模生产的潜力.

2019 年, Birkuš 等^[62]利用人、小鼠和鸡的 cGAS 酶制备了 33 个 2',3'-CDN, 并在细胞层面测试了这些 CDN 对不同的 STING 突变体的亲和力. 他们制备的 33 个 2',3'-CDN 均可刺激人外周血单核细胞(PBMC)分泌 IFN α 、IFN γ (II型 IFN)和 TNF α (tumor necrosis factor- α), 与它们激活 cGAS-STING 通路的能力一致, 同时也发现 CDN 降低了单核细胞的活力, 但不影响 T 淋巴细胞.

2021 年, Birkuš 等^[63]又探究了来自霍乱弧菌(DncV)、苏云金芽孢杆菌(btDisA)、大肠杆菌(dgcZ)和马立叶热菌(tDGC)四种细菌的二核苷酸合酶的底物特异性, 利用这些酶合成了 24 个 3',3'-CDN. 他们发现 tDGC 和 dgcZ 酶优先利用 GTP 作为底物, btDisA 则偏好利用 ATP 作为底物. DncV 可用于催化 3',3'-CDA、3',3'-CDG 和 3',3'-cGAMP 的合成, 但可能无法利用某些修饰后的 GTP 和 ATP 作为底物.

2022 年, Birkuš 等^[64]又报道了 7-脱氮嘌呤 CDN 的设计、合成以及生物学评估. 他们采用小鼠 cGAS 酶和细菌二核苷酸合成酶合成了一系列 CDN. 由于酶无法识别一些修饰后的底物, 部分 CDN 衍生物无法仅通过酶促反应合成, 他们同时采用了全合成或酶法合成与化学合成结合的手段. 发现碱基上含有大的芳香取代基的 CDN(如化合物 **120**)具有最好的诱导细胞因子和趋化因子的能力. 同时, 解析了四种新型 CDN 与 hSTING 蛋白络合物的 X 射线结构, 观察到化合物 **120** 的芳香取代基与 hSTING 蛋白 Tyr240 之间存在 π - π 堆积作用, 进而稳定了 CDN-STING 络合物. 芳香族取代基增加了环二核苷酸的亲脂性, 从而提升了其通过细胞膜的能力.

2020 年, Lütz 等^[65]基于人 cGAS 的底物混杂性, 利

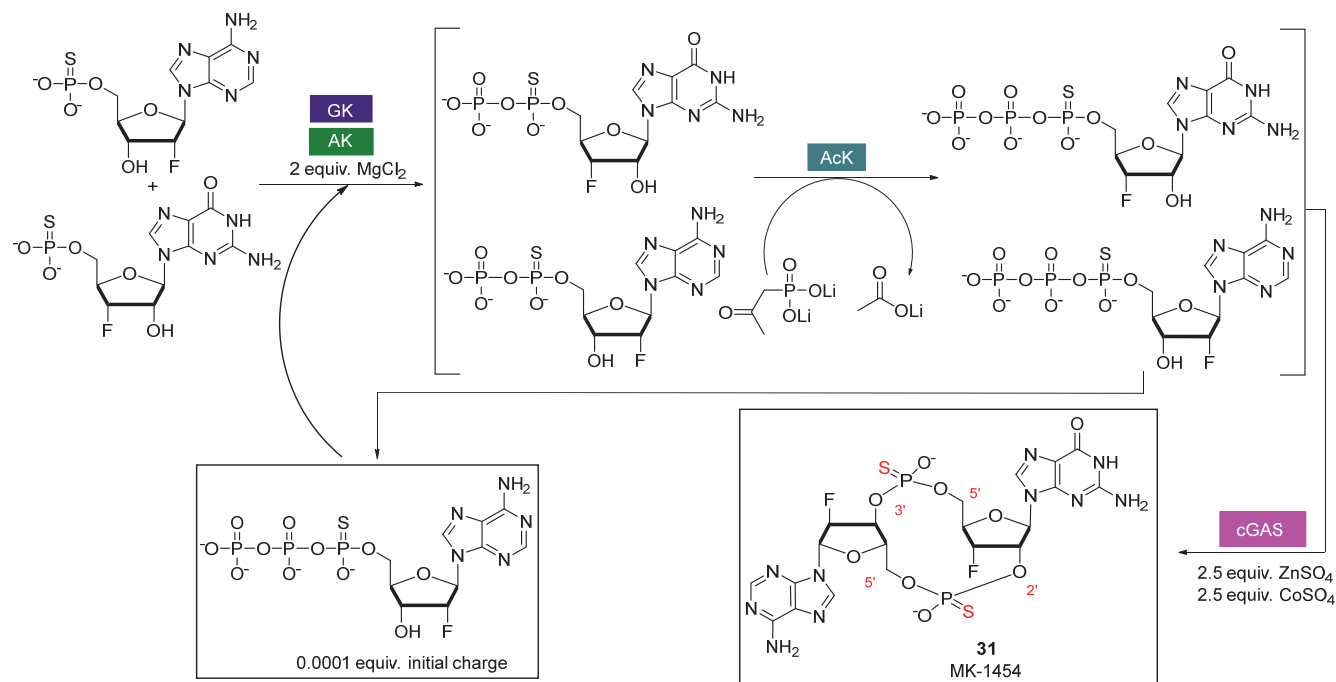


用在碱基、核糖或 α -磷酸的不同位置选择修饰的 ATP 和 GTP 衍生物, 合成了一系列 2',3'-cGAMP 类似物. 他们发现全长人 cGAS 蛋白不能催化 2'-F-ATP 或 6-S-GTP 的转化, 而截短的人 cGAS 蛋白能够显著催化这些转化的进行. 该结果表明截断和全长 cGAS 可能具有不同的功能.

2022 年, McIntosh 等^[66]报道了 MK-1454 (**31**)的酶促合成方法(Scheme 15). MK-1454 是一种处于临床研究阶段的高效 STING 激活剂, 由两种非天然单硫代磷酸核苷酸以非对映选择性的方式在一锅级联反应中组装而成. 首先在生物催化下合成两种硫代三磷酸核苷酸, 然后在工程动物 cGAS 酶的催化下实现硫代三磷酸核苷酸的偶联和环化. 对于硫代三磷酸核苷酸的合成, 他们设计了三种激酶, 开发了一个非天然的辅因子循环系统, 其中硫代三磷酸核苷酸可作为自身合成的辅因子. 由于天然的 cGAS 对于硫代三磷酸核苷酸的反应性较差, 他们通过对 cGAS 的定向进化和对金属辅因子的筛选有效提升了硫代三磷酸核苷酸偶联及环化的效率. 利用酶的选择性, 在不使用保护基团或手性辅助剂的条件下合成了 MK-1454 的单一非对映异构体. 这项研究所采用的定向进化和调整酶辅助因子的策略, 提升了生物催化合成的效率, 展示了使用生物合成方法来发现和制造复杂非天然分子的强大能力.

4 结论与展望

近年来环二核苷酸类化合物合成方法的开发已经取得了一定进展, 而基于天然环二核苷酸激动剂进行衍生化修饰显著改善了其成药性, 这也进一步推动了环二核苷酸类化合物在免疫治疗中的临床应用^[67]. 但目前仍有许多问题亟待解决: 如修饰后的环二核苷酸类化合物的代谢稳定性仍较差, 被细胞摄取的效率及利用率较低, 临床研究中给药方式大多仍局限于瘤内给药, 以及环二核苷酸的大规模工业合成仍相对受限等. 通过新型



图式 15 酶促级联合成环二核苷酸硫代磷酸酯 MK-1454

Scheme 15 Cascade process to MK-1454 from nucleotide monothiophosphates without isolated intermediates

环二核苷酸类似物的理性设计合成^[68]、高效递送体系的开发以及联合疗法的应用,进一步解决环二核苷酸类激动剂临床应用中存在的挑战,可能会为免疫治疗的发展带来新的突破。

References

- [1] Barber, G. N. *Nat. Rev. Immunol.* **2015**, *15*, 760.
- [2] Li, W. H.; Wu, J. J.; Wu, L.; Zhang, B. D.; Hu, H. G.; Zhao, L.; Li, Z. B.; Yu, X. F.; Li, Y. M. *Biomaterials* **2021**, *273*, 120788.
- [3] Wu, J. J.; Zhao, L.; Hu, H. G.; Li, W. H.; Li, Y. M. *Med. Res. Rev.* **2020**, *40*, 1117.
- [4] Li, W. H.; Li, Y. M. *Chem. Rev.* **2020**, *120*, 11420.
- [5] Danilchanka, O.; Mekalanos, J. J. *Cell* **2013**, *154*, 962.
- [6] Shang, M.; Lu, K.; Guan, W.; Cao, S.; Ren, M.; Zhou, C. *Chem-MedChem* **2022**, *17*, e202100671.
- [7] Wu, J.; Sun, L.; Chen, X.; Du, F.; Shi, H.; Chen, C.; Chen, Z. J. *Science* **2013**, *339*, 826.
- [8] Sun, L.; Wu, J.; Du, F.; Chen, X.; Chen, Z. J. *Science* **2013**, *339*, 786.
- [9] Su, J. Y.; Li, W. H.; Li, Y. M. *Chem. Soc. Rev.* **2022**, *51*, 7944.
- [10] Wang, Z.; Xi, Z. *Tetrahedron* **2021**, *87*, 132096.
- [11] Kiburu, I.; Shurer, A.; Yan, L.; Sintim, H. O. *Mol. Biosyst.* **2008**, *4*, 518.
- [12] Hayakawa, Y.; Nagata, R.; Hirata, A.; Hyodo, M.; Kawai, R. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 6465.
- [13] Gaffney, B. L.; Veliath, E.; Zhao, J.; Jones, R. A. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 3269.
- [14] Gao, P.; Ascano, M.; Wu, Y.; Barchet, W.; Gaffney, B. L.; Zillinger, T.; Serganov, A. A.; Liu, Y.; Jones, R. A.; Hartmann, G.; Tuschl, T.; Patel, D. J. *Cell* **2013**, *153*, 1094.
- [15] Wang, C.; Sinn, M.; Stifel, J.; Heiler, A. C.; Sommershof, A.; Hartig, J. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 16154.
- [16] (a) Cai, H.; Huang, Z. H.; Shi, L.; Sun, Z. Y.; Zhao, Y. F.; Kunz, H.; Li, Y. M. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2012**, *51*, 1719.
(b) Huang, Z. H.; Shi, L.; Ma, J. W.; Sun, Z. Y.; Cai, H.; Chen, Y. X.; Zhao, Y. F.; Li, Y. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 8730.
- (c) Cai, H.; Chen, M. S.; Sun, Z. Y.; Zhao, Y. F.; Kunz, H.; Li, Y. M. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2013**, *52*, 6106.
- (d) Cai, H.; Sun, Z. Y.; Chen, M. S.; Zhao, Y. F.; Kunz, H.; Li, Y. M. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2014**, *53*, 1699.
- [17] Wu, J. J.; Li, W. H.; Chen, P. G.; Zhang, B. D.; Hu, H. G.; Li, Q. Q.; Zhao, L.; Chen, Y. X.; Zhao, Y. F.; Li, Y. M. *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 9655.
- [18] Grajkowski, A.; Takahashi, M.; Kaczyński, T.; Srivastava, S. C.; Beaucage, S. L. *Tetrahedron Lett.* **2019**, *60*, 452.
- [19] Li, L.; Yin, Q.; Kuss, P.; Maliga, Z.; Millan, J. L.; Wu, H.; Mitchison, T. J. *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *10*, 1043.
- [20] Hyodo, M.; Sato, Y.; Hayakawa, Y. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 3089.
- [21] Yan, H.; Wang, X.; KuoLee, R.; Chen, W. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 5631.
- [22] Zhao, J.; Veliath, E.; Kim, S.; Gaffney, B. L.; Jones, R. A. *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids* **2009**, *28*, 352.
- [23] (a) Corrales, L.; Glickman, L. H.; McWhirter, S. M.; Kanne, D. B.; Sivick, K. E.; Katibah, G. E.; Woo, S. R.; Lemmens, E.; Banda, T.; Leong, J. J.; Metchette, K.; Dubensky, T. W. Jr.; Gajewski, T. F. *Cell Rep.* **2015**, *11*, 1018.
(b) Fu, J.; Kanne, D. B.; Leong, M.; Glickman, L. H.; McWhirter, S. M.; Lemmens, E.; Metchette, K.; Leong, J. J.; Lauer, P.; Liu, W.; Sivick, K. E.; Zeng, Q.; Soares, K. C.; Zheng, L.; Portnoy, D. A.; Woodward, J. J.; Pardoll, D. M.; Dubensky, T. W. Jr.; Kim, Y. *Sci. Transl. Med.* **2015**, *7*, 283ra52.
- [24] Knouse, K. W.; deGruyter, J. N.; Schmidt, M. A.; Zheng, B.; Vantourout, J. C.; Kingston, C.; Mercer, S. E.; McDonald, I. M.; Olson, R. E.; Zhu, Y.; Hang, C.; Zhu, J.; Yuan, C.; Wang, Q.; Park, P.; Eastgate, M. D.; Baran, P. S. *Science* **2018**, *361*, 1234.
- [25] (a) Hu, H. G.; Wu, J. J.; Zhang, B. D.; Li, W. H.; Li, Y. M. *Bioconjug. Chem.* **2020**, *31*, 2499.
(b) Li, W. H.; Su, J. Y.; Li, Y. M. *Acc. Chem. Res.* **2022**, *55*, 2660.
- [26] Smietana, M.; Kool, E. T. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, *41*, 3704.
- [27] Wang, J.; Zhou, J.; Donaldson, G. P.; Nakayama, S.; Yan, L.; Lam, Y. F.; Lee, V. T.; Sintim, H. O. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 9320.
- [28] Kline, T.; Jackson, S. R.; Deng, W.; Verlinde, C. L.; Miller, S. I. *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids* **2008**, *27*, 1282.

- [29] Fujino, T.; Okada, K.; Isobe, H. *Tetrahedron Lett.* **2014**, *55*, 2659.
- [30] Gaffney, B. L.; Jones, R. A. *Org. Lett.* **2014**, *16*, 158.
- [31] Glick, G. D.; Ghosh, S.; Roush, W. R.; Olhava, E. J.; Jones, R. *WO 2018045204*, **2018**.
- [32] Fernicola, S.; Torquati, I.; Paiardini, A.; Giardina, G.; Rampioni, G.; Messina, M.; Leoni, L.; Del Bello, F.; Petrelli, R.; Rinaldo, S.; Cappellacci, L.; Cutruzzola, F. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 8269.
- [33] Pal, C.; Chakraborty, T. K.; *Asian J. Org. Chem.* **2017**, *6*, 1421.
- [34] Dialer, C. R.; Stazzoni, S.; Drexler, D. J.; Muller, F. M.; Veth, S.; Pichler, A.; Okamura, H.; Witte, G.; Hopfner, K. P.; Carell, T. *Chemistry* **2019**, *25*, 2089.
- [35] Ikeda, K.; Yanase, Y.; Hayashi, K.; Hara-Kudo, Y.; Tsuji, G.; Demizu, Y. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2021**, *32*, 127713.
- [36] Yanase, Y.; Tsuji, G.; Nakamura, M.; Shibata, N.; Demizu, Y. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 6847.
- [37] Kim, D. S.; Endo, A.; Fang, F. G.; Huang, K. C.; Bao, X.; Choi, H. W.; Majumder, U.; Shen, Y. Y.; Mathieu, S.; Zhu, X.; Sanders, K.; Noland, T.; Hao, M. H.; Chen, Y.; Wang, J. Y.; Yasui, S.; TenDyke, K.; Wu, J.; Ingersoll, C.; Loiacono, K. A.; Hutz, J. E.; Sarwar, N. *ChemMedChem* **2021**, *16*, 1740.
- [38] Zheng, B.; Hang, C.; Zhu, J.; Purdum, G. E.; Sezen-Edmonds, M.; Treitler, D. S.; Yu, M.; Yuan, C.; Zhu, Y.; Freitag, A.; Guo, S.; Zhu, G.; Hritzko, B.; Paulson, J.; Shackman, J. G.; He, B. L.; Fu, W.; Tai, H. C.; Ayers, S.; Park, H.; Eastgate, M. D.; Cohen, B.; Rogers, A.; Wang, Q.; Schmidt, M. A. *J. Org. Chem.* **2022**, *87*, 1934.
- [39] Shanahan, C. A.; Gaffney, B. L.; Jones, R. A.; Strobel, S. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 15578.
- [40] Lioux, T.; Mauny, M. A.; Lamoureux, A.; Bascoul, N.; Hays, M.; Vernejoul, F.; Baudru, A. S.; Boularan, C.; Lopes-Vicente, J.; Qushair, G.; Tiraby, G. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 10253.
- [41] Ager, C. R.; Zhang, H.; Wei, Z.; Jones, P.; Curran, M. A.; Di Francesco, M. E. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2019**, *29*, 126640.
- [42] Wang, Z.-H.; Zhao, C.-C.; Zhang, Q.-Z.; Wang, C.-L.; Zhang, H.; Ma, D.-J.; Wang, D.-W.; Wen, X.; Li, L.-Y.; Xi, Z. *Sci. China: Chem.* **2020**, *63*, 534.
- [43] Xie, X.; Liu, J.; Wang, X. *Molecules* **2020**, *25*, 5285.
- [44] Tarashima, N. S.; Kumanomido, Y.; Nakashima, K.; Tanaka, Y.; Minakawa, N. *J. Org. Chem.* **2021**, *86*, 15004.
- [45] Wang, Z.; Zhao, C.; Wang, C.; Zhang, H.; Ma, D.; Zhang, Q.; Wen, X.; Li, L.; Xi, Z. *Bioorg. Med. Chem.* **2021**, *29*, 115899.
- [46] Veth, S.; Fuchs, A.; Ozdemir, D.; Dialer, C.; Drexler, D. J.; Knechtel, F.; Witte, G.; Hopfner, K. P.; Carell, T.; Ploetz, E. *ChemBioChem* **2022**, *23*, e202200005.
- [47] Grajkowski, A.; Cieslak, J.; Gapeev, A.; Schindler, C.; Beaucage, S. L. *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 2147.
- [48] Smith, K. D.; Shanahan, C. A.; Moore, E. L.; Simon, A. C.; Strobel, S. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, *108*, 7757.
- [49] Zhou, J.; Watt, S.; Wang, J.; Nakayama, S.; Sayre, D. A.; Lam, Y. F.; Lee, V. T.; Sintim, H. O. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 4396.
- [50] Kempson, J.; Zhang, H.; Hou, X.; Cornelius, L.; Zhao, R.; Wang, B.; Hong, Z.; Oderinde, M. S.; Pawluczyk, J.; Wu, D. R.; Sun, D.; Li, P.; Yip, S.; Smith, A.; Caceres-Cortes, J.; Aulakh, D.; Sarjeant, A. A.; Park, P. K.; Harikrishnan, L. S.; Qin, L. Y.; Dodd, D. S.; Fink, B.; Vite, G.; Mathur, A. *J. Org. Chem.* **2021**, *86*, 8851.
- [51] Saito-Tarashima, N.; Kinoshita, M.; Igata, Y.; Kashiwabara, Y.; Minakawa, N. *RSC Med. Chem.* **2021**, *12*, 1519.
- [52] Vyskocil, S.; Cardin, D.; Ciavarri, J.; Conlon, J.; Cullis, C.; England, D.; Gershman, R.; Gigstad, K.; Gipson, K.; Gould, A.; Greenspan, P.; Griffin, R.; Gulavita, N.; Harrison, S.; Hu, Z.; Hu, Y.; Hata, A.; Huang, J.; Huang, S. C.; Janowick, D.; Jones, M.; Kolev, V.; Langston, S. P.; Lee, H. M.; Li, G.; Lok, D.; Ma, L.; Mai, D.; Malley, J.; Matsuda, A.; Mizutani, H.; Mizutani, M.; Molchanova, N.; Nunes, E.; Pusalkar, S.; Renou, C.; Rowland, S.; Sato, Y.; Shaw, M.; Shen, L.; Shi, Z.; Skene, R.; Soucy, F.; Stroud, S.; Xu, H.; Xu, T.; Abu-Yousif, A. O. Zhang, J. *J. Med. Chem.* **2021**, *64*, 6902.
- [53] (a) Wu, J. J.; Zhao, L.; Han, B. B.; Hu, H. G.; Zhang, B. D.; Li, W. H.; Chen, Y. X.; Li, Y. M. *Chem. Commun.* **2021**, *57*, 504.
(b) Zhang, B. D.; Wu, J. J.; Li, W. H.; Hu, H. G.; Zhao, L.; He, P. Y.; Zhao, Y. F.; Li, Y. M. *Nano Res.* **2022**, *15*, 6328.
- [54] Wu, J.-J.; Chen, F.-Y.; Han, B.-B.; Zhang, H.-Q.; Zhao, L.; Zhang, Z.-R.; Li, J.-J.; Zhang, B.-D.; Zhang, Y.-N.; Yue, Y.-X.; Hu, H. G.; Li, W. H.; Zhang, B.; Chen, Y. X.; Guo, D. S.; Li, Y. M. *CCS Chem.* **2022**, DOI: 10.31635/ccschem.022.202201859.
- [55] Rao, F.; Pasunooti, S.; Ng, Y.; Zhuo, W.; Lim, L.; Liu, A. W.; Liang, Z. X. *Anal. Biochem.* **2009**, *389*, 138.
- [56] Launer-Felty, K. D.; Strobel, S. A. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, 2765.
- [57] Lv, Y.; Sun, Q.; Wang, X.; Lu, Y.; Li, Y.; Yuan, H.; Zhu, J.; Zhu, D. *Front Microbiol.* **2019**, *10*, 2111.
- [58] Rolf, J.; Siedentop, R.; Lutz, S.; Rosenthal, K. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *21*, 105.
- [59] Becker, M.; Nikel, P.; Andexer, J. N.; Lutz, S.; Rosenthal, K. *Biomolecules* **2021**, *11*, 590.
- [60] Sun, Q.; Lv, Y.; Zhang, C.; Wu, W.; Zhang, R.; Zhu, C.; Li, Y. Y.; Yuan, H.; Zhu, J.; Zhu, D. *Enzyme Microb. Technol.* **2021**, *143*, 109700.
- [61] Shchokolova, A. S.; Rymko, A. N.; Kvach, S. V.; Shabunya, P. S.; Fatykhava, S. A.; Zinchenko, A. I. *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids* **2015**, *34*, 416.
- [62] Novotna, B.; Vanekova, L.; Zavrel, M.; Budesinsky, M.; Dejmek, M.; Smola, M.; Gutten, O.; Tehrani, Z. A.; Pimkova Polidarova, M.; Brazdova, A.; Liboska, R.; Stepanek, I.; Vavrina, Z.; Jandusik, T.; Nencka, R.; Rulisek, L.; Boura, E.; Brynda, J.; Pav, O.; Birkuš, G. *J. Med. Chem.* **2019**, *62*, 10676.
- [63] Novotna, B.; Hola, L.; Stas, M.; Gutten, O.; Smola, M.; Zavrel, M.; Vavrina, Z.; Budesinsky, M.; Liboska, R.; Chevrier, F.; Dobias, J.; Boura, E.; Rulisek, L.; Birkus, G. *Biochemistry* **2021**, *60*, 3714.
- [64] Vavřina, Z.; Perliková, P.; Milisavljević, N.; Chevrier, F.; Smola, M.; Smith, J.; Dejmek, M.; Havlíček, V.; Buděšínský, M.; Liboska, R.; Vanekova, L.; Brynda, J.; Boura, E.; Rezacova, P.; Hocek, M.; Birkus, G. *J. Med. Chem.* **2022**, *65*, 14082.
- [65] Rosenthal, K.; Becker, M.; Rolf, J.; Siedentop, R.; Hillen, M.; Nett, M.; Lütz, S. *ChemBioChem* **2020**, *21*, 3225.
- [66] McIntosh, J. A.; Liu, Z.; Andresen, B. M.; Marzizarani, N. S.; Moore, J. C.; Marshall, N. M.; Borra-Garske, M.; Obligation, J. V.; Fier, P. S.; Peng, F.; Forstater, J. H.; Winston, M. S.; An, C.; Chang, W.; Lim, J.; Huffman, M. A.; Miller, S. P.; Tsay, F. R.; Altman, M. D.; Lesburg, C. A.; Steinhuebel, D.; Trotter, B. W.; Cumming, J. N.; Northrup, A.; Bu, X.; Mann, B. F.; Biba, M.; Hiraga, K.; Murphy, G. S.; Kolev, J. N.; Makarewicz, A.; Pan, W.; Farasat, I.; Bade, R. S.; Stone, K.; Duan, D.; Alvizo, O.; Adpressa, D.; Guetschow, E.; Hoyt, E.; Regalado, E. L.; Castro, S.; Rivera, N.; Smith, J. P.; Wang, F.; Crespo, A.; Verma, D.; Axnanda, S.; Dance, Z. E. X.; Devine, P. N.; Tschaen, D.; Canada, K. A.; Bulger, P. G.; Sherry, B. D.; Truppo, M. D.; Ruck, R. T.; Campeau, L. C.; Bennett, D. J.; Humphrey, G. R.; Campos, K. R.; Maddess, M. L. *Nature* **2022**, *603*, 439.
- [67] (a) Le Naour, J.; Zitvogel, L.; Galluzzi, L.; Vacchelli, E.; Kroemer, G. *Oncoimmunology* **2020**, *9*, 1777624.
(b) Motedayen Aval, L.; Pease, J. E.; Sharma, R.; Pinato, D. J. *J. Clin. Med.* **2020**, *9*, 3323.
- [68] Luo, Z.; Liang, X.; He, T.; Qin, X.; Li, X.; Li, Y.; Li, L.; Loh, X. J.; Gong, C.; Liu, X. *J. Am. Chem. Soc.* **2022**, *144*, 16366.

(Zhao, C.)