

环二核苷酸类似物研究进展

陈长坡, 闫佳音, 牛美, 曹冠洋, 李飒, 毕晶晶, 董文佩, 蒋涛, 辛鹏洋

(河南师范大学 化学化工学院, 河南 新乡 453007)

摘要:环二核苷酸是由两个核苷单磷酸通过两个磷酸二酯键连接而成的环状分子.环二核苷酸最早在细菌中被发现,是细菌中普遍存在的第二信使,在调节细菌的生理功能和抗噬菌体感染等方面发挥重要作用.人体免疫系统在病原核酸的刺激下可合成环二核苷酸,该分子作为第二信使与干扰素基因刺激因子(STING)结合,激活下游信号通路,并最终诱导干扰素分泌,启动抗感染免疫响应.环二核苷酸及其类似物是感染性疾病及肿瘤免疫治疗的先导化合物,也是具有良好应用前景的免疫佐剂.对环二核苷酸的发现、环二核苷酸的生物功能等进行了简单回顾,总结了环二核苷酸结构修饰的基本策略及环二核苷酸类似物的结构多样性.

关键词:环二核苷酸;第二信使;免疫递质;类似物;免疫治疗

中图分类号:O629.74

文献标志码:A

天然环二核苷酸(cyclic dinucleotide, CDN)是由两个核苷单磷酸(NMP)通过两个磷酸二酯键环和而成的环状二核苷酸分子,按其来源可分为两类(图 1):(1)微生物来源的环二核苷酸,包括 3',3'-环二鸟苷酸(3',3'-c-di-GMP,化合物 1)^[1],3',3'-环二腺苷酸(3',3'-c-di-AMP,化合物 2)^[2]及 3',3'-环鸟苷腺苷酸(3',3'-cGAMP,化合物 3)^[3].微生物来源的上述 CDN 是细菌的第二信使,在细菌生理平衡状态的维持及生理过程的调控中发挥重要作用^[4];(2)人体内由环鸟苷腺苷酸合成酶(cyclic guanosine monophosphate adenosine monophosphate synthase,以下简称 cGAS)合成的 2',3'-环鸟苷腺苷酸(2',3'-cGAMP,化合物 4)^[5-7].该环二核苷酸与干扰素基因刺激因子(stimulator of interferon genes,以下简称 STING)结合,激活下游信号的级联反应,最终诱导 I 型干扰素和其他细胞因子的产生,启动免疫应答.

cGAS-STING 信号通路是人体核酸免疫防御机制的核心组成部分^[8].感染人体的病原微生物产生的 3',3'-c-di-AMP,3',3'-c-di-GMP 或 3',3'-cGAMP,病原微生物在人体内释放的 DNA 被 cGAS 识别后合成的 2',3'-cGAMP,都可与 STING 蛋白结合,激活抗感染免疫响应^[9].肿瘤放疗化疗产生的凋亡细胞引起局部核酸积累、肿瘤的坏死组织、辐射及紫外线引起的 DNA 损伤,可激活 cGAS-STING 信号通路^[10].核酸酶 TREX1 突变导致的细胞内 DNA 代谢异常,可被 cGAS-STING 识别,刺激 I 型干扰素及相关炎症因子的产生,是 Aicardi-Goutières 综合征^[11]、系统性红斑狼疮的分子病理基础,已发现系统性红斑狼疮患者外周血中 2',3'-cGAMP 浓度比正常人高出 15% 以上^[12].因此,STING 抑制剂是具有潜在研究价值的自身免疫疾病的治疗药物.一些非核苷类化合物,如黄酮类化合物 DMXAA, CMA 以及设计合成的小分子化合物等也是 STING 蛋白的激动剂,可在小鼠肿瘤模型中诱导 I 型干扰素的分泌,产生抗肿瘤免疫活性.因此, cGAS-STING 信号通路的发现,将细菌及人体来源的环二核苷酸的刺激-应答模式整合了起来(图 2)^[13].

虽然第一个环二核苷酸发现于 1987 年^[1],随后又陆续在细菌中发现了 3',3'-c-di-AMP,3',3'-cGAMP,并在 CDN 类似物的合成方面进行了一些探索,但这一领域并没有引起学术界的广泛重视,直到 2013 年,多个研究组确证了环二核苷酸是 cGAS-STING 信号通路的免疫递质^[6,8,14],以及更多的研究发现环二核苷酸可作为有效的免疫佐剂^[15],并且在肿瘤免疫治疗方面具有良好的开发应用前景^[16],与环二核苷酸相关的研究

收稿日期:2021-04-23;修回日期:2021-05-30.

基金项目:国家自然科学基金(21977025;U1604285);大学生创新创业项目(201910476001).

作者简介(通信作者):陈长坡(1967—),男,河南方城人,河南师范大学教授,博士,博士生导师,主要研究方向为核酸药物化学、生物缀合物化学,E-mail:andychen2005@163.com.

才在过去的数年间,得到了学术界和制药工业界的关注^[17],目前已有多个环二核苷酸类似物进入临床前或临床研究^[18-19].

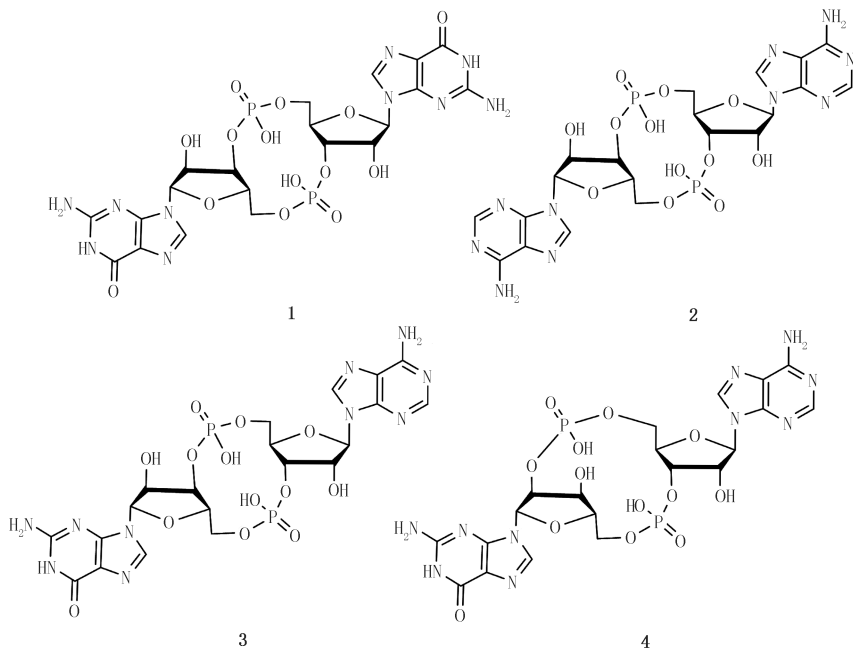


图1 现已发现的天然环二核苷酸

Fig. 1 Previously found cyclic dinucleotides containing purine bases

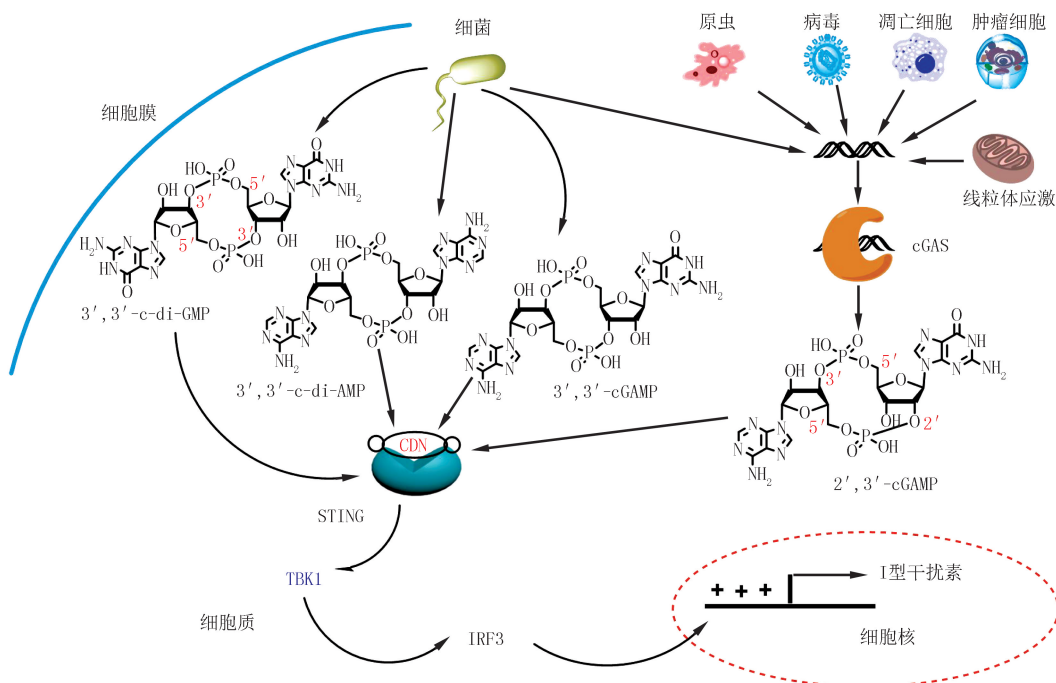


图2 cGAS-STING信号通路示意图

Fig. 2 The cGAS-STING signal pathway

近年来,关于环二核苷酸作为微生物第二信使及作为免疫递质的分子机制都有很全面的评述,CLIVIO等^[20]及南开大学的XI等^[21]对环二核苷酸类似物的化学合成策略进行了系统的总结,多个研究小组对以cGAS-STING信号通路为靶点的药物设计的最新进展进行了评述^[22-24].本文对环二核苷酸的生物学功能进行了简单回顾,重点对环二核苷酸类似物主要结构类型进行总结,并对设计合成新的环二核苷酸类似物提出

了一些想法和建议。

1 环二核苷酸的生物功能

环二核苷酸作为第二信使参与调控细菌的多种重要生理过程^[25],在高等生物的核酸免疫机制中发挥重要作用^[26],同时与人的多种疾病状态有直接的联系^[27]。随着研究的深入,人们发现环二核苷酸也是细菌抗病毒免疫的重要免疫递质,最新的研究证实微生物和高等生物以环二核苷酸为第二信使的抗病毒免疫信号机制存在着进化上的联系^[28]。

1.1 3',3'-c-di-GMP 的生物功能

1987年,文献[1]报道在研究木葡糖醋酸杆菌(*Gluconacetobacter xylinus*)的过程中,发现了生命体中的第一个 CDN,该化合物是细菌纤维素合成酶的激活因子。随着研究的深入,在多种革兰氏阴性细菌如绿脓杆菌(*Caulobacter crescentus*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)、霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)和一些革兰氏阳性菌如枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、单核增生性李斯特杆菌(*Listeria monocytogenes*)等发现了 3',3'-c-di-GMP。3',3'-c-di-GMP 的重要功能是调控细菌运动状态和静息状态之间的转换,同时也参与细胞周期及细菌致病因子的调控^[25]。

1.2 3',3'-c-di-AMP 的生物功能

2008年,文献[29]报道在研究 DNA 完整性扫描蛋白 A(DisA)的晶体结构时偶然发现了 3',3'-c-di-AMP。进一步研究发现该 CDN 在多种古细菌及细菌中存在,并具有重要的生理功能,如参与调控细菌脂肪酸合成、钾离子转运、细胞壁的稳态及生物膜的形成等^[30]。

1.3 3',3'-cGAMP 的生物功能

2012年,文献[3]报道在霍乱弧菌中首次发现了 3',3'-cGAMP。此前仅有 3',3'-cGAMP 与核糖开关结合而调控细菌电生理过程的报道^[4,31],最新的研究发现,霍乱弧菌中的环二核苷酸环合酶 DncV 是人体 cGAS 的结构和功能同源蛋白,可识别侵入噬菌体核酸并合成 3',3'-cGAMP 作为第二信使,变构激活下游磷脂酶活性,降解细菌自身膜结构,使细菌生长停滞或启动自杀性抗病毒免疫机制^[28]。细菌 cGAS-STING 信号通路的发现,表明细菌和人体抗病毒机制存在进化上的联系^[32]。

1.4 2',3'-cGAMP 的生物功能

2013年,多个研究团队几乎同时在哺乳动物细胞中发现了 2',3'-cGAMP^[5-7]。该化合物是 cGAS-STING 信号通路的第二信使,在哺乳动物及人类抗感染、抗肿瘤、自身炎症疾病、自身免疫疾病、衰老等病理生理过程中发挥作用(图 2),最近的评述可参见文献[33]。

1.5 天然 CDN 与 cGAS-STING 信号通路

随着对 cGAS-STING 信号通路研究的深入,人们发现上述 4 种天然环二核苷酸都可作为激动剂与 STING 结合,激活下游信号转导机制,启动免疫应答。特别是 CDN 抗肿瘤免疫活性的确证,激起了学术界和制药工业界的广泛关注。人们在环二核苷酸类似物的设计与合成方面做了大量的工作,相关研究工作不但扩展和深化了对 cGAS-STING 相关分子机制的认识,也为基于 CDN 及其类似物的新药研究提供了支撑。

2 环二核苷酸的结构修饰

目前对环二核苷酸的结构修饰主要集中在磷酸二酯键部分的硫代或替代,核糖环部分羟基的去除或替代以及碱基的修饰等^[20,23](图 3)。

2.1 磷酸二酯键的化学修饰

对磷酸二酯键部分的硫代修饰是在寡核苷酸药物研究过程中发展完善的,由于硫代可提高寡核苷酸抗磷酸二酯酶及核酸酶降解能力,现已有多个硫代寡核苷酸药物被批准用于临床^[34]。对 CDN 的磷酸二酯键进行硫代修饰是提高其稳定性、亲脂性和调控生物活性的重要途径。文献[35]利用酶法合成了 2',3'-cGAMP(化合物 4)的单硫代和双硫代类似物(图 4,化合物 5、6、7),发现 ENPP1 特异性水解 2',3'-cGAMP。在 THP-1 细胞裂解液中,与未硫代的 3',3'-cGAMP 及 2',3'-cGAMP 相比,双硫代 2',3'-cG^sA^sMP(化合物 6)的稳定

性得到显著提高。 $2',3'\text{-cG}^{\text{S}}\text{A}^{\text{S}}\text{MP}$ 能够与 ENPP1 结合抑制 $2',3'\text{-cGAMP}$ 的水解,表明此双硫代类似物能够作为竞争性抑制剂起作用.文献[36]合成了 Endo-硫代 CDN 类似物(图 4,化合物 **8**),并评价了 Endo-硫代 CDN 及天然 CDN 与其受体亲和力的差异.

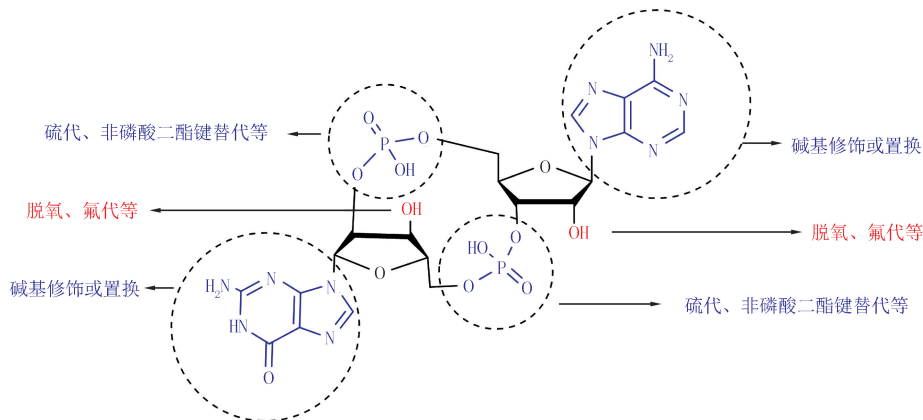


图3 环二核苷酸的结构修饰位点

Fig.3 The possible functional groups of CDN for chemical modification

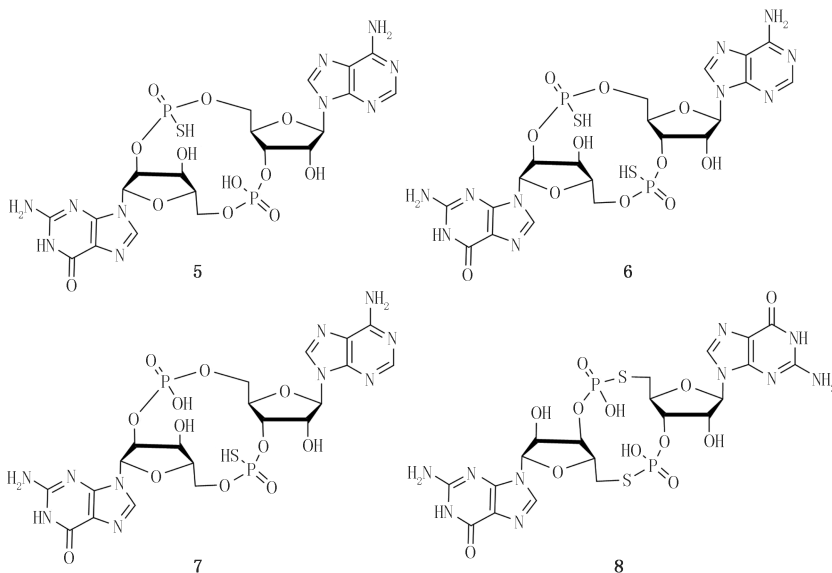


图4 硫代 $2',3'\text{-cGAMP}$ 类似物及Endo-硫代CDN

Fig.4 Phosphorothioated $2',3'\text{-cGAMP}$ and endo-S CDN analogues

由于硫代磷酸二酯键具有手性,硫代 CDN 是各种非对映异构体的混合物.GAFFNEY 等^[37]最早报道了 H-亚磷酸/亚磷酰胺法合成硫代 CDN 的方法,并利用 HPLC 分离得到了单一手性异构体纯的 CDN 类似物(图 5,化合物 **9**、**10**).为考察手性纯的硫代 CDN 对其生物活性的影响,CORRALES 等^[16]利用上述方法合成并分离得到手性纯的 CDN 类似物(图 5,化合物 **11**、**12**).细胞实验结果表明,硫代 Rp, Rp- $2',3'\text{-c-di-AMP}$ (化合物 **11**)的活性显著提高,并且对已知的 5 种人体 STING 变体都有活性.上述手性纯的 CDN 类似物都是通过 HPLC 拆分得到的,利用手性催化剂立体选择性的合成手性纯 CDN 类似物也在最近取得了突破性进展^[38-39],立体选择性地合成了化合物 **13**、**14** 等 CDN 类似物(图 5).

硼烷基磷酸二酯键在寡核苷酸研究中得到了系统探讨^[40-41],该策略也被用于 CDN 类似物的合成.2018 年, Janssen Biotech 公司发布了硼烷代磷酸 CDN 的类似物的专利^[42](图 6,化合物 **15**~**17**),两个 $2'\text{-}5'$ 磷酸二酯键被硼烷修饰的化合物 **15**、**16** 在含 ENPP1 的 FBS 溶液中孵育 4 h,活性下降不到 10%,而 $3'\text{-}5'$ 磷酸二酯键被硼烷修饰的化合物 **17**,同样条件下活性下降 75%以上,表明 ENPP1 可选择性降解 $2'\text{-}5'$ 磷酸二酯键,硼烷代 $2'\text{-}5'$ 磷酸二酯键提高了 CDN 类似物抗 ENPP1 降解能力.

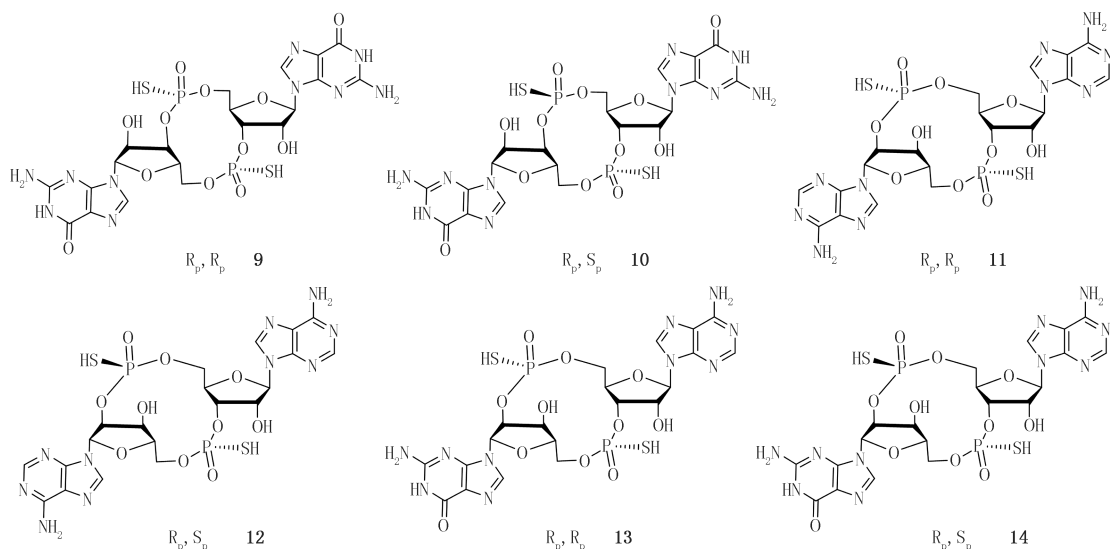


图5 手性纯二硫代CDN类似物

Fig. 5 Diphenylphosphorothioated CDN analogues of stereochemical purity

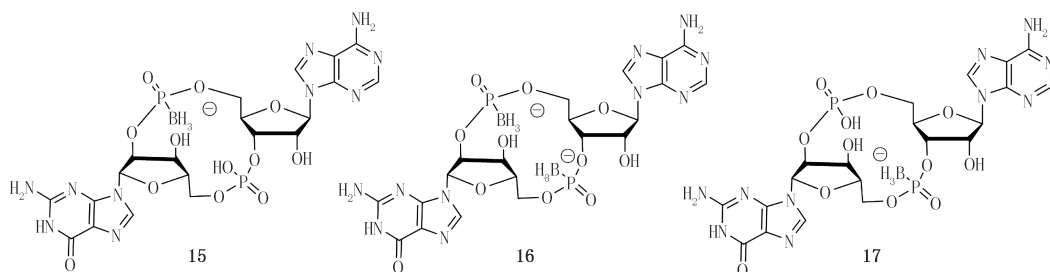


图6 含硼烷代磷酸二酯键的新型CDN类似物

Fig. 6 Boranophosphates CDN analogues

2014年,GAFFNEY等^[43]首次报道了用硫脲基、脲基、胍基和碳二亚胺代替磷酸二酯键连接的 *c*-di-GMP类似物(图7,化合物 **18**~**22**),以提高 *c*-di-GMP类似物在磷酸二酯酶中的稳定性。IFM Therapeutics 公司的一个专利^[44]中报道了脲及硫脲模块取代磷酸二酯键的环二腺苷酸类似物的激活 THP-1 细胞 NF- κ B 信号通路的 EC₅₀ 值分别为 25.4 μ mol/L、22.2 μ mol/L(图7,化合物 **23**、**24**)。

HUISGEN等^[45]报道的 1,3-偶极环加成反应,经 SHARPLESS等^[46]改进后被称为点击反应(click reaction),由于其具有产率高、合成反应快速、反应条件温和及与多种官能团兼容等优点,广泛应用于核苷、寡核苷酸及相关药物合成研究。ISOBE等^[47]报道了用三氮唑结构单元代替磷酸二酯键部分得到了 *c*-di-GMP 和 *c*-di-AMP 的类似物 *c*-di-GMPTL(化合物 **25**)和 *c*-di-AMPTL(化合物 **26**)(图8)。由于三氮唑对骨架十二元环的构象限制,使得设计合成的类似物构象和天然环二核苷酸平展构象相似。

2.2 核糖的化学修饰

对天然 CDN 分子中的核糖部分进行结构改造,是合成 CDN 类似物的又一策略。核糖化学修饰包括脱氧、氟代、用其他结构替换等。KHORANA等^[48]最早报道了合成的环二脱氧胸苷酸(化合物 **27**),随后陆续有研究者发表了环二脱氧胞苷酸(化合物 **28**)^[49]、环脱氧胸苷脱氧鸟苷酸的合成方法(化合物 **29**)^[50](图9)。

将核苷(酸)2'或3'位的 OH 替换为 F 是相关药物研究中的常用策略。文献^[36]以 N-异丁酰基-2'-F 鸟苷亚磷酸胺为起始原料,采用 Jones 一锅法合成了 2'-F-CDG(图10,化合物 **30**),该研究组同时合成了 2'-OMe CDN 类似物(图10,化合物 **31**),并考察了此类化合物对微生物生物膜形成的影响。

利用碳环或其他结构取得核糖是核苷(酸)结构改造的重要策略。葛兰素史克(GSK)研究人员的一项专利^[51]申请披露了新型 CDN,包括用环戊烷取代一个或两个核糖环及核糖羟基被氟取代的 CDN 类似物(图11,化合物 **32**~**35**),部分化合物是有效的乙型肝炎表面抗原(HbsAg)的免疫佐剂。上海弘翔生物科技有限

公司的专利^[52]公开了碳环取代核糖环的 CDN 类似物(图 11, 化合物 36~37).

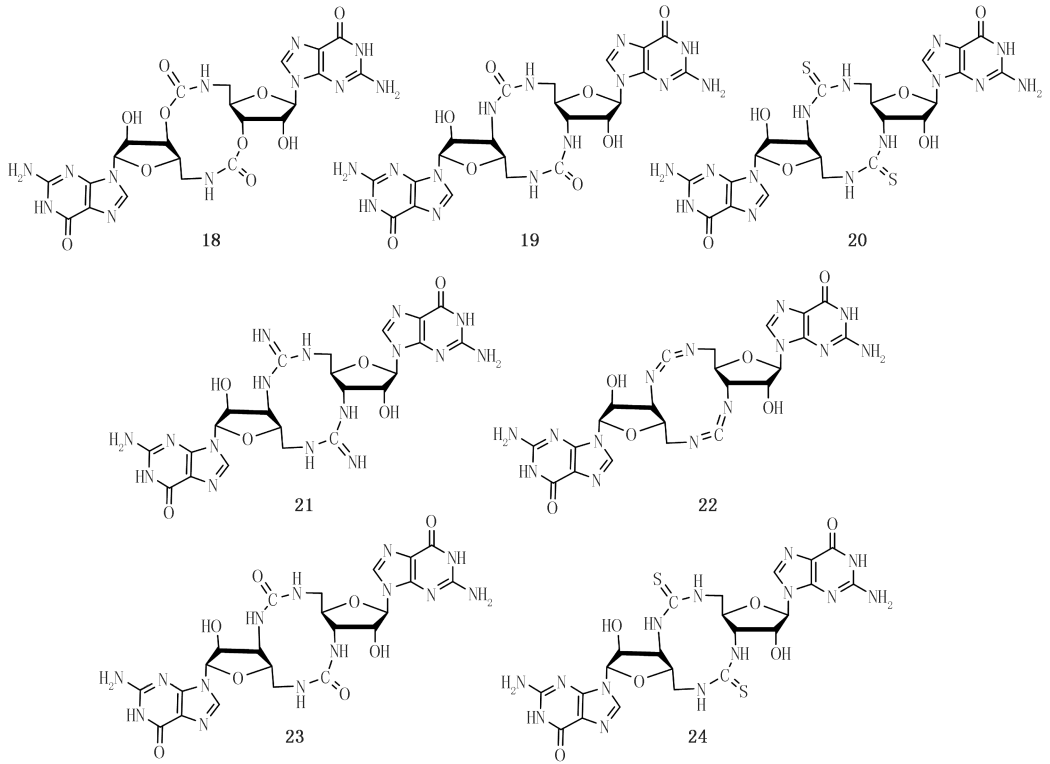


图7 用硫脲基、脲基、胍基和碳二亚胺连接的环二核苷酸类似物

Fig.7 CDN analogues with phosphodiester linkages replaced by carbamate, thiourea, urea, guanidine, carbodiimide groups

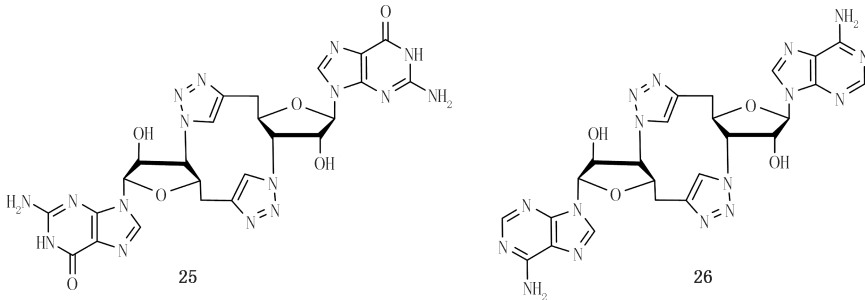


图8 含三氮唑的c-di-GMPTL和c-di-AMPTL

Fig.8 Analogues of c-di-GMP with phosphodiester linkages replaced with triazoles

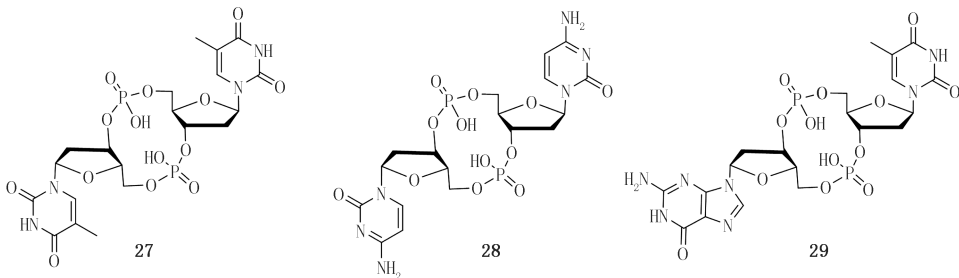


图9 早期报道的脱氧 CDN

Fig.9 Synthesized deoxy CDN before CDN found in microbials

利用锁核酸(LNA)策略合成的寡核苷酸已经进入临床试验,这一策略被用于 CDN 类似物的合成^[53-54](图 12, 化合物 38~41).

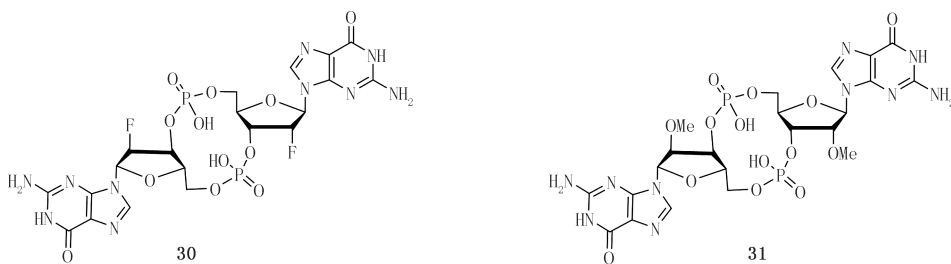


图10 2'-脱氧-2'-氟代及2'-甲氧基取代的CDN类似物

Fig.10 Chemical structures of 2'-deoxy-2'-fluoro/2'-methoxyl CDNs

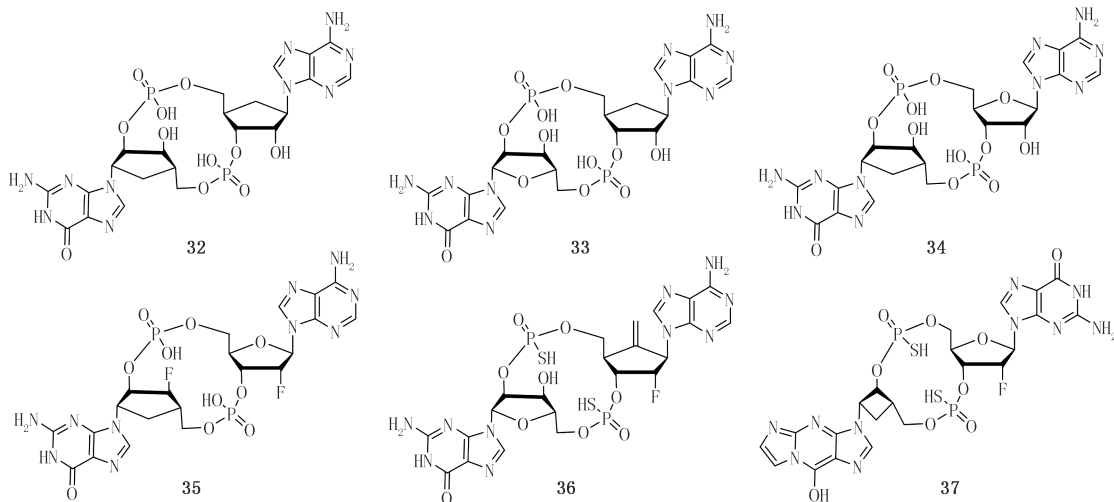


图11 含碳环核苷模块的CDN类似物

Fig.11 CDN analogues with tetrahydrofuran replaced by carbocycles

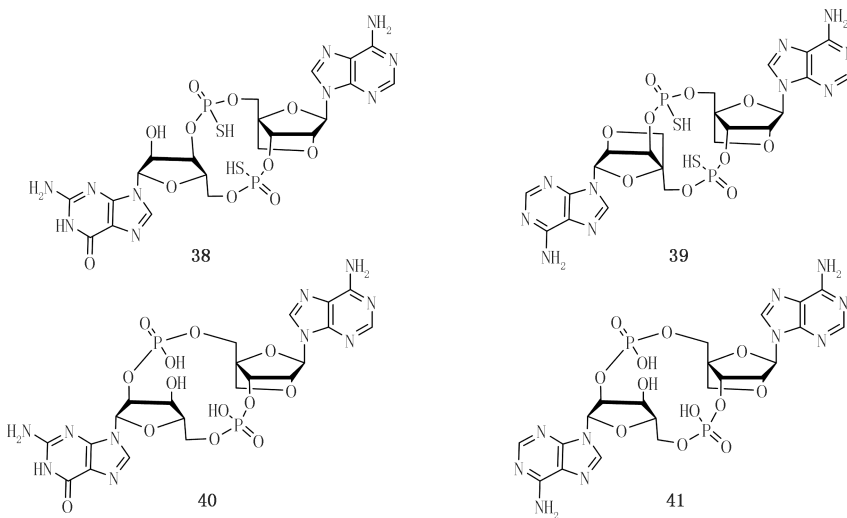


图12 含锁核苷酸单体的CDN类似物

Fig.12 CDN analogues containing locked nucleosides

2.3 碱基的化学修饰

生物体利用体内无处不在的 NTP(N=A,U,G,C)作为底物合成天然环二核苷酸,而利用化学方法将非天然碱基或碱基类似物替代 CDN 中的天然碱基,是制备 CDN 类似物的重要途径。

LIOUX 课题组^[55]报道了由腺苷和肌苷组成的 CDN 类似物,作者合成了 2'-5'磷酸二酯键和 3'-5'磷酸二酯键不同组合的 cAIMP 类似物(图 13,化合物 42~45)。

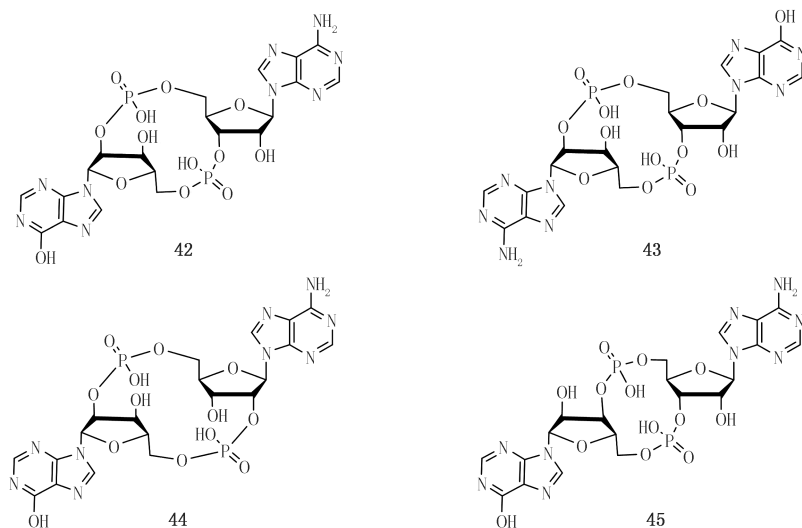


图13 2'-5'磷酸二酯键和3'-5'磷酸二酯键不同组合的cAMP类似物

Fig.13 cAMP with different combination of 2'-5' and 3'-5' phosphodiester bonds

2017年,文献[56]报道合成了含A,U,C,G的所有3',3'-CDN,包括3种天然存在的CDN及另外7种此前未见报道的CDN(见图14,化合物46~52).作者使用适配体荧光测定和在线探测评估新CDN和GEMM核糖开关变体的结合亲和力.通过诱导I型干扰素(IFN)评估CDN的免疫刺激作用,发现c-ACMP(化合物47)为新的免疫刺激剂.

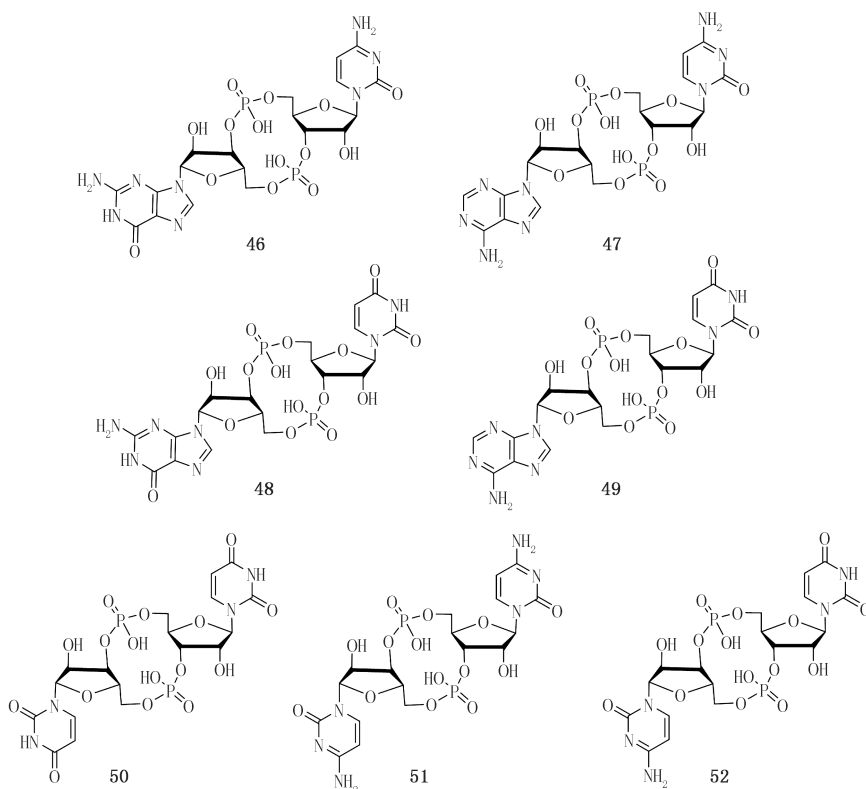


图14 部分以3',5'-磷酸二酯键连接的含A,U,C,G的CDN类似物

Fig.14 3',5'-CDN analogues containing A,U,C,G

最近,文献[57-58]报道了通过磷酸三酯法合成的由A,G,C和U核苷单磷酸通过2',5'-磷酸二酯键和3',5'-磷酸二酯键组成的36种CDN,以及肌苷与A,U,G和C核苷单磷酸通过2',5'-磷酸二酯键和

3',5'-磷酸二酯键连接构成的 19 种环二核苷酸类似物(图 15,化合物 **53**~**55**),并对这些化合物的生物活性和酶稳定性进行了测试。

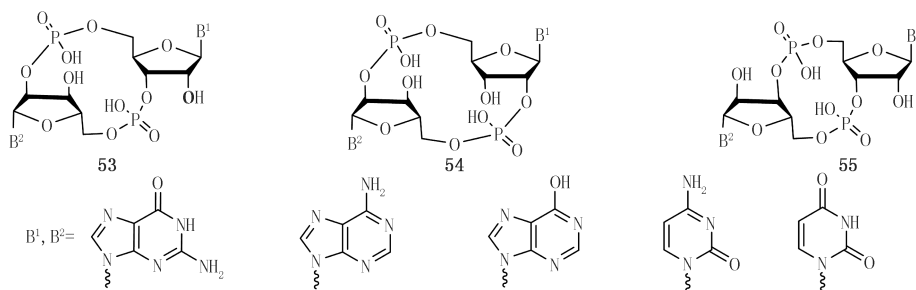


图 15 2',5'和3',5'磷酸二酯键连接的A,G,C,U,I组合的CDN类似物

Fig. 15 2',5'-CDN and 3',5'-CDN analogues containing A,G,C,U,I

对 CDN 中的天然碱基直接进行化学修饰,是合成 CDN 类似物的另一重要手段.文献[59]利用铑催化的卡宾转移反应直接活性修饰 CDN 嘌呤碱基的环外氨基,得到了一系列 CDN 类似物(图 16,化合物 **56**~**58**).光催化交联结合质谱分析发现叠氮苯基修饰的 c-di-GMP 保持了对 c-di-GMP 受体 DgrA 的亲合力。

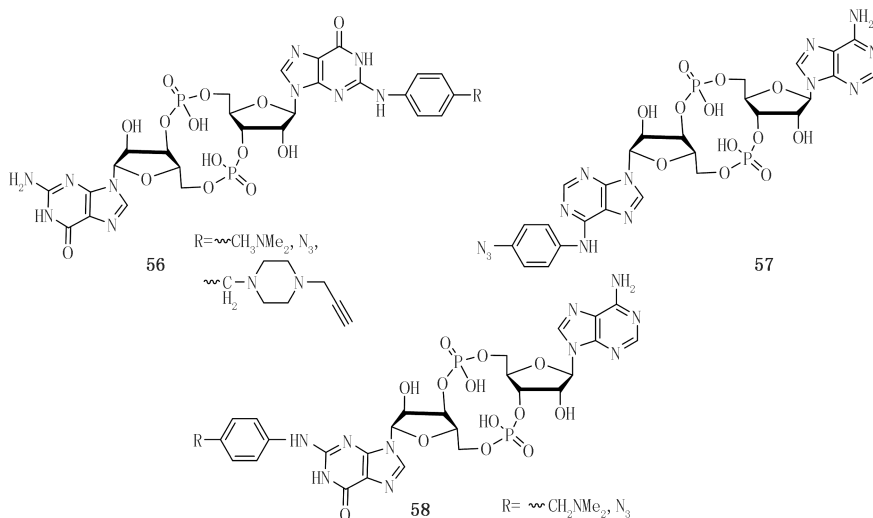


图 16 利用铑催化卡宾转移直接化学修饰嘌呤的环外氨基得到的 CDN 类似物

Fig. 16 CDN analogues prepared using Rh catalyzed carbene transfer protocol

2.4 CDN 的多位点修饰

由于 CDN 机构复杂,人们目前对 CDN 及其类似物的构效关系尚无确定的规律性认识.基于 CDN 及其类似物在动物肿瘤免疫治疗及作为免疫佐剂等研究中令人满意的生物活性,多个制药公司都投入巨资进行 CDN 多位点修饰,以期得到活性更好、适于临床开发的化合物.相关专利^[53,60]中将糖环的结构改造如 2'-F、2'-脱氧、四氢噻吩替换四氢咪喃等与非天然碱基杂环进行组合,得到 348 个 2',3'-CDN 类似物.部分化合物(图 17,化合物 **59**~**61**)在细胞实验和肿瘤动物模型中多表现出比天然 CDN 更好的生物活性。

核糖化学修饰与 Endo-硫代磷酸二酯键组合,得到了一类新型的 CDN 类似物.SMIETANA 等^[61]利用固相磷酸三酯法合成了含 A,T,C,G 的脱氧 CDN 类似物(图 18,化合物 **62**).文献[62]合成了 Endo-硫代与氟代核糖双位点修饰的 CDN,发现此类结构改造可影响与天然 CDN 受体的亲和力(图 18,化合物 **63**~**65**).

对环腺苷肌苷酸(cAIMP)的核糖和磷酸二酯键部分同时进行结构修饰,如硫代磷酸修饰及 2'-OH 氟代,得到一系列 cAIMP 类似物^[55](部分化合物见图 19,化合物 **66**~**71**).作者评估了 cAIMP 类似物在人类血液、小鼠和人类 APC 细胞系中的活性,结果表明二硫代的 2'-脱氧-2'-氟代-3',3'-cAIMP(化合物 **68**)(人血 I 型 IFN 反应的 EC₅₀ = 0.4 μmol/L)比未氟代 cAIMP 类似物和 2',3'-cGAMP 更有效.显示多位点修饰在提高化合物生物活性方面的协同效应。

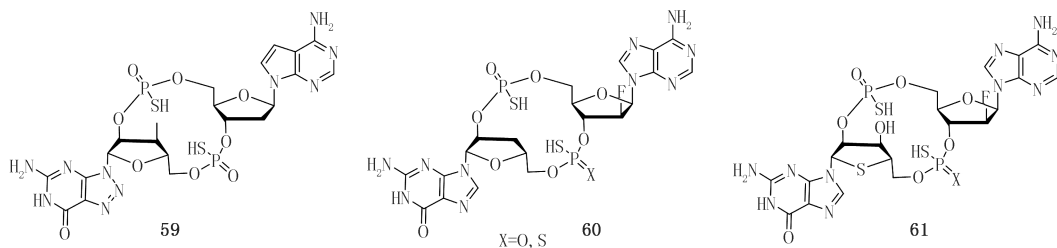


图17 整合糖环、碱基和硫代修饰的新型CDN结构

Fig.17 CDN analogues integrating chemical modifications of nucleobases, ribose and phosphodiester linkages

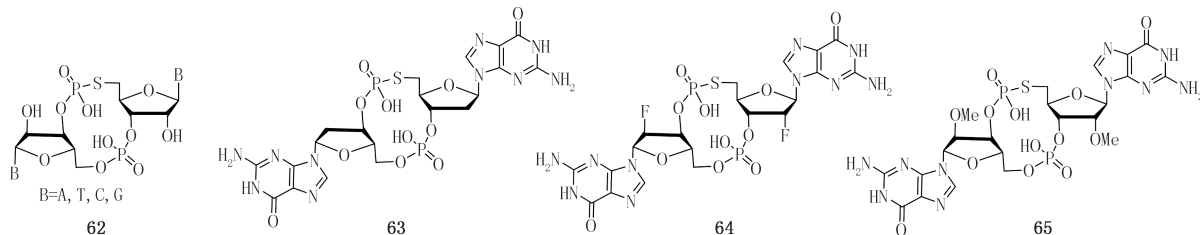


图18 Endo-硫代磷酸二酯键与核糖修饰的组合策略

Fig.18 CDN analogues containing endo-S phosphodiester linkage and chemically modified riboses

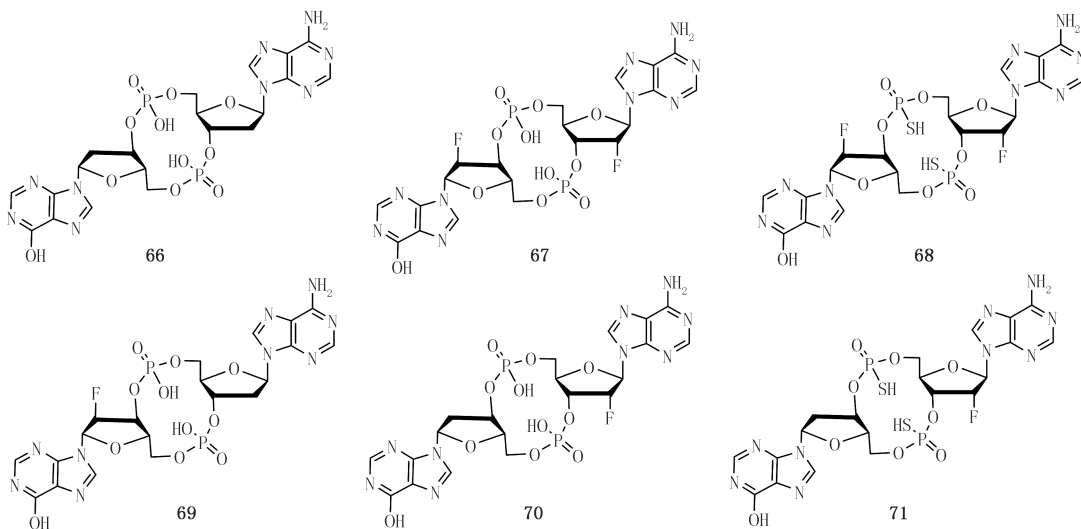


图19 多位点修饰的cAIMP类似物

Fig.19 cAIMP analogues with chemical modification of multiple functional groups

有趣的是, BMS公司申请的专利^[63]中报道了乙炔基及吡啶乙炔基替代碱基的无碱基CDN类似物(图20, 化合物72、73), 虽然化合物72作为STING激动剂的活性不如cGAMP, 但化合物73的活性显著高于cGAMP. 文献^[64]报道了将环戊烷替换硫代CDN的核糖得到的化合物74和75诱导THP-1分泌IFN的 EC_{50} 均小于 $1 \mu\text{mol/L}$ (图20, 化合物74、75).

KLINE等^[65]用甲酰胺酯模块替代磷酸二酯键制备了2'-脱氧CDN类似物(图21, 化合物76). 分子对接结果表明, 该类似物能够以合适的构象与c-di-GMP的受体结合. PAL等^[66]合成了以酰胺键连接的仅含嘧啶碱基的CDN类似物(图21, 化合物77-79).

3 环二肽核酸及其类似物

基于肽核酸的成功先例, 文献^[67]报道了以(2-氨基乙基)-甘氨酸为骨架的环二核苷酸类似物(图22, 化

合物 80~82),但未进行相关生物活性的研究.

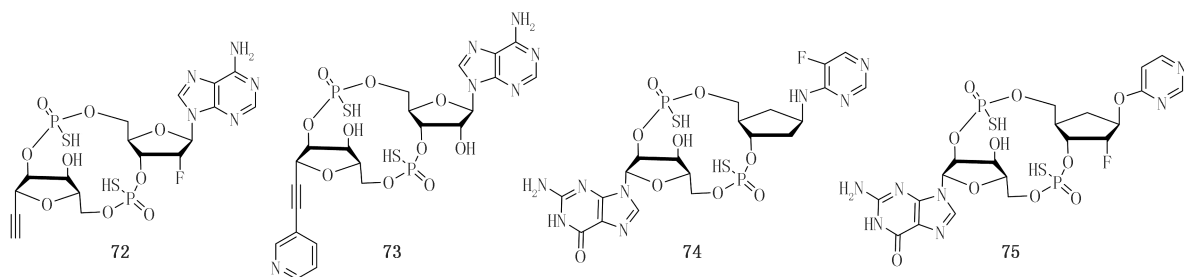


图20 含炔基及环戊烷的硫代CDN类似物

Fig. 20 CDN analogues containing alkyne and cyclopentane

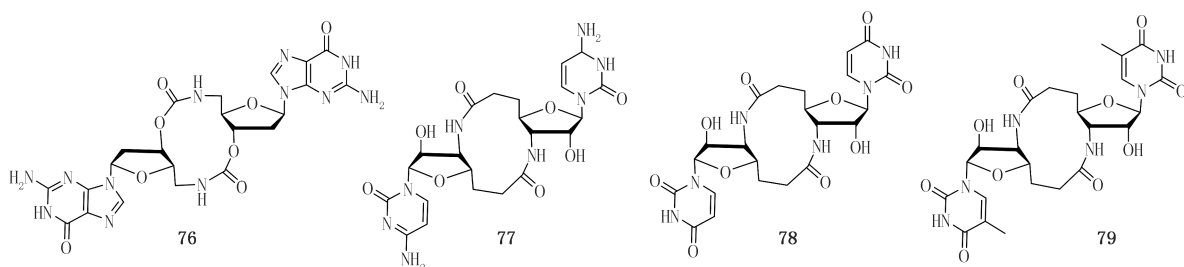


图21 氨甲酸酯键/酰胺键替代磷酸二酯键的脱氧及含C/T/U的CDN类似物

Fig. 21 Deoxy and C/T/U containing CDN analogues with phosphodiester linkages replaced by carbamate or amide linkages

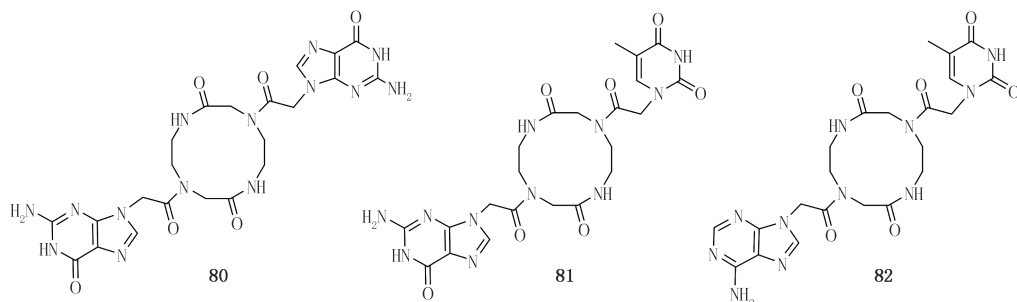


图22 由肽核酸单体合成的CDN类似物

Fig. 22 CDN analogues composed of peptide nucleic acid monomers

天然 CDN 及其类似物合成路线步骤多,合成一次只能合成一个目标产物.如果首先构建核糖-磷酸骨架或利用其他分子骨架,在分子骨架上引入碱基或碱基类似物,则可高通量地合成 CDN 类似物^[66].IKEDA 等^[68]以环多胺为分子骨架,合成环二鸟苷酸类似物,并对其抑制细菌生物膜形成的活性进行了考察,部分化合物可抑制大肠杆菌、金黄色葡萄球菌生物膜的形成(图 23,化合物 83、84).

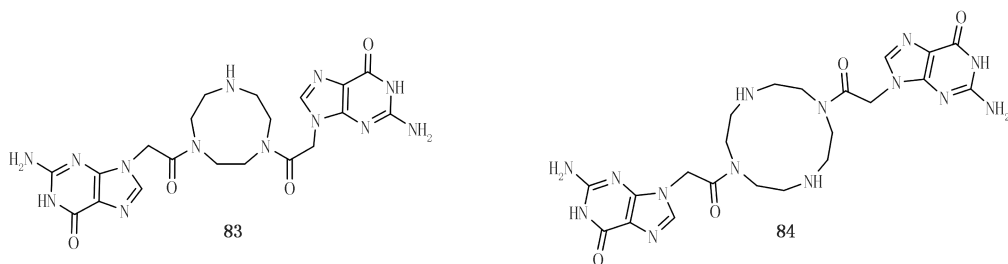


图23 以环多胺为骨架的CDN类似物

Fig. 23 CDN analogues with macrocyclic amines as skeletons

4 其他类型的环二核苷酸类似物

2014年, KINZIE等^[69]参照环二吗啉在寡核苷酸合成中的成功经验, 设计合成了基于环二吗啉的分子骨架(图24), 并尝试在骨架上引入保护的腺嘌呤, 但最终并没有得到目标产物. 可能是分子骨架上的叔胺与路易斯酸发生的配位反应导致引入碱基的失败.

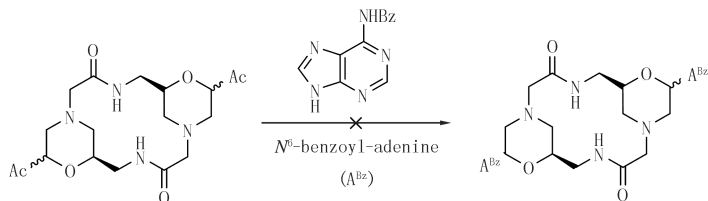


图24 环二吗啉骨架合成CDN的尝试

Fig. 24 Exploration to convert cyclic dimeric methyl morpholinide to CDN analogues based on macrocyclic skeleton

5 结论与展望

虽然距第一个天然环二核苷酸发现已经过去了三十多年, 但直到2013年cGAS-CDN-STING信号通路的发现, 特别是STING与感染疾病、肿瘤及自身免疫疾病的联系的确立, 环二核苷酸及其类似物的设计、合成及活性研究才引起了学术界和工业界的广泛关注, 现已有数个CDN类似物进入临床试验, 还有多个CDN类似物处于临床前研究阶段.

最近, 在细菌的抗噬菌体免疫机制研究中发现, 某些细菌的CDN合成酶可以合成含尿嘧啶及胞嘧啶的环二核苷酸^[70](图1、2), 虽然这些化合物在微生物中被发现之前已被合成, 但这些新型CDN的生物功能及在人体免疫系统的作用等有待进一步深入研究(图25, 化合物48~51).

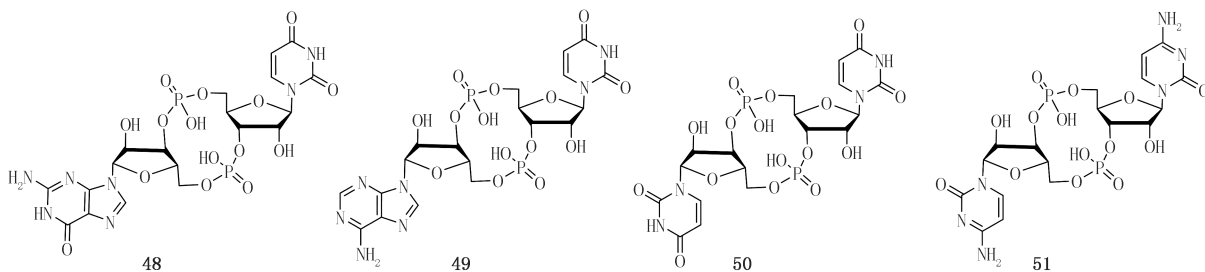


图25 最新发现的微生物合成的含嘧啶碱基的CDN

Fig. 25 The structure of the most recently found microbial pyrimidine-containing CDNs

尽管含天然碱基的核苷亚磷酸酯单体已商业化, 但合成CDN及其类似物路线长, 一次只能合成一个目标化合物; 合成含非天然碱基的CDN类似物需要从合成核苷酸单体开始, 更增加了CDN类似物合成的难度; 基于核糖-磷酸分子骨架的合成策略为CDN类似物的合成提供了新思路, 但糖苷化一步收率低, 限制了其应用; 不含磷酸二酯键的CDN大环类似物合成困难, 难以提供大量的化合物供活性筛选等. 基于上述问题, 认为如下思路值得进一步探讨, 一是构建含适当官能团的核糖-磷酸或大环分子骨架, 通过分子骨架上的官能团引入碱基或碱基类似物; 二是将靶向STING的小分子化合物与STING相互作用的构效信息整合到CDN类似物设计与合成中.

过去的近十年见证了CDN及其类似物的发展, 希望本文能为相关研究人员提供关于CDN类似物结构修饰的基本策略, 从而有助于新的活性更好的CDN的类似物的设计与合成. 最终开发出基于CDN的临床治疗药物, 为人类健康服务.

参 考 文 献

- [1] ROSS P, WEINHOUSE H, ALONI Y, et al. Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid[J]. *Nature*, 1987, 325(6101): 279-281.
- [2] R MLING U. Great times for small molecules; c-di-AMP, a second messenger candidate in Bacteria and Archaea[J]. *Science Signaling*, 2008, 1(33): pe39.
- [3] DAVIES B W, BOGARD R W, YOUNG T S, et al. Coordinated regulation of accessory genetic elements produces cyclic di-nucleotides for *V cholerae* virulence[J]. *Cell*, 2012, 149(2): 358-370.
- [4] OPOKU-TEMENG C, ZHOU J, ZHENG Y, et al. Cyclic dinucleotide (c-di-GMP, c-di-AMP, and cGAMP) signalings have come of age to be inhibited by small molecules[J]. *Chemical Communications (Cambridge, England)*, 2016, 52(60): 9327-9342.
- [5] GAO P, ASCANO M, WU Y, et al. Cyclic[G(2', 5')pA(3', 5')p] is the metazoan second messenger produced by DNA-activated cyclic GMP-AMP synthase[J]. *Cell*, 2013, 153(5): 1094-1107.
- [6] ZHANG X, SHI H P, WU J X, et al. Cyclic GMP-AMP containing mixed phosphodiester linkages is an endogenous high-affinity ligand for STING[J]. *Molecular Cell*, 2013, 51(2): 226-235.
- [7] ABLASSER A, GOLDECK M, CAVLAR T, et al. cGAS produces a 2'-5'-linked cyclic dinucleotide second messenger that activates STING[J]. *Nature*, 2013, 498(7454): 380-384.
- [8] DINER E J, BURDETTE D L, WILSON S C, et al. The innate immune DNA sensor cGAS produces a noncanonical cyclic dinucleotide that activates human STING[J]. *Cell Reports*, 2013, 3(5): 1355-1361.
- [9] LIU Y J, LU X, QIN N, et al. STING, a promising target for small molecular immune modulator: a review[J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2021, 211: 113113.
- [10] DENG L F, LIANG H, XU M, et al. STING-dependent cytosolic DNA sensing promotes radiation-induced type I interferon-dependent antitumor immunity in immunogenic tumors[J]. *Immunity*, 2014, 41(5): 843-852.
- [11] CROW Y J, MANEL N. Aicardi-Goutières syndrome and the type I interferonopathies[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2015, 15(7): 429-440.
- [12] AN J, DURCAN L, KARR R M, et al. Expression of cyclic GMP-AMP synthase in patients with systemic lupus erythematosus[J]. *Arthritis & Rheumatology*, 2017, 69(4): 800-807.
- [13] DANILCHANKA O, MEKALANOS J J. Cyclic dinucleotides and the innate immune response[J]. *Cell*, 2013, 154(5): 962-970.
- [14] GAO D X, WU J X, WU Y T, et al. Cyclic GMP-AMP synthase is an innate immune sensor of HIV and other retroviruses[J]. *Science*, 2013, 341(6148): 903-906.
- [15] GOGOI H, MANSOURI S, JIN L. The age of cyclic dinucleotide vaccine adjuvants[J]. *Vaccines*, 2020, 8(3): 453.
- [16] CORRALES L, GLICKMAN L H, MCWHIRTER S M, et al. Direct activation of STING in the tumor microenvironment leads to potent and systemic tumor regression and immunity[J]. *Cell Reports*, 2015, 11(7): 1018-1030.
- [17] RYAN C. STING fever is sweeping through the cancer immunotherapy[J]. *C&EN News*, 2018, 96: 24-26.
- [18] MOTEDAYEN AVAL L, PEASE J E, SHARMA R, et al. Challenges and opportunities in the clinical development of STING agonists for cancer immunotherapy[J]. *Journal of Clinical Medicine*, 2020, 9(10): 3323.
- [19] LE NAOUR J, ZITVOGEL L, GALLUZZI L, et al. Trial watch: STING agonists in cancer therapy[J]. *Oncology*, 2020, 9(1): 1777624.
- [20] CLIVIO P, COANTIC-CASTEX S, GUILLAUME D. (3'-5')-cyclic dinucleotides: synthetic strategies and biological potential[J]. *Chem Rev*, 2013, 113(10): 7354-7401.
- [21] WANG Z H, XI Z. Chemical evolution of cyclic dinucleotides: Perspective of the analogs and their preparation[J]. *Tetrahedron*, 2021, 87: 132096.
- [22] WU J J, ZHAO L, HU H G, et al. Agonists and inhibitors of the STING pathway: Potential agents for immunotherapy[J]. *Medicinal Research Reviews*, 2020, 40(3): 1117-1141.
- [23] ZHANG H, YOU Q D, XU X L. Targeting Stimulator of interferon genes (STING): a medicinal chemistry perspective[J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2020, 63(8): 3785-3816.
- [24] DING C Y, SONG Z L, SHEN A C, et al. Small molecules targeting the innate immune cGAS-STING-TBK1 signaling pathway[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2020, 10(12): 2272-2298.
- [25] KALIA D, MEREY G, NAKAYAMA S, et al. Nucleotide, c-di-GMP, c-di-AMP, cGMP, cAMP, (p)ppGpp signaling in bacteria and implications in pathogenesis[J]. *Chemical Society Reviews*, 2013, 42(1): 305-341.
- [26] VERRIER E R, LANGEVIN C. Cyclic guanosine monophosphate-adenosine monophosphate synthase (cGAS), a multifaceted platform of intracellular DNA sensing[J]. *Frontiers in Immunology*, 2021, 12: 637399.
- [27] ABLASSER A, CHEN Z J. cGAS in action: Expanding roles in immunity and inflammation[J]. *Science*, 2019, 363(6431): eaat8657. DOI:

- 10.1126/science.aat8657.
- [28] COHEN D, MELAMED S, MILLMAN A, et al. Cyclic GMP-AMP signalling protects bacteria against viral infection[J]. *Nature*, 2019, 574(7780): 691-695.
- [29] WITTE G, HARTUNG S, BÜTTNER K, et al. Structural biochemistry of a bacterial checkpoint protein reveals diadenylate cyclase activity regulated by DNA recombination intermediates[J]. *Molecular Cell*, 2008, 30(2): 167-178.
- [30] KRASTEVA P V, SONDERMANN H. Versatile modes of cellular regulation via cyclic dinucleotides[J]. *Nature Chemical Biology*, 2017, 13(4): 350-359.
- [31] KELLENBERGER C A, WILSON S C, HICKEY S F, et al. GEMM-I riboswitches from *Geobacter* sense the bacterial second messenger cyclic AMP-GMP[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(17): 5383-5388.
- [32] MILLMAN A, MELAMED S, AMITAI G, et al. Diversity and classification of cyclic-oligonucleotide-based anti-phage signalling systems[J]. *Nature Microbiology*, 2020, 5(12): 1608-1615.
- [33] LIU K F, LAN Y Q, LI X L, et al. Development of small molecule inhibitors/agonists targeting STING for disease[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2020, 132: 110945.
- [34] SMITH C I E, ZAIN R. Therapeutic oligonucleotides; state of the art[J]. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 2019, 59(1): 605-630.
- [35] LI L Y, YIN Q, KUSS P, et al. Hydrolysis of 2'3'-cGAMP by ENPP1 and design of nonhydrolyzable analogs[J]. *Nature Chemical Biology*, 2014, 10(12): 1043-1048.
- [36] ZHOU J, WATT S, WANG J X, et al. Potent suppression of c-di-GMP synthesis via I-site allosteric inhibition of diguanylate cyclases with 2'-F-c-di-GMP[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2013, 21(14): 4396-4404.
- [37] GAFFNEY B L, VELIATH E, ZHAO J W, et al. One-flask syntheses of c-di-GMP and the [rp, rp] and [rp, sp] thiophosphate analogues[J]. *Organic Letters*, 2010, 12(14): 3269-3271.
- [38] FEATHERSTON A L, KWON Y, POMPEO M M, et al. Catalytic asymmetric and stereodivergent oligonucleotide synthesis[J]. *Science*, 2021, 371(6530): 702-707.
- [39] KNOUSE K W, DEGRUYTER J N, SCHMIDT M A, et al. Unlocking P(V): Reagents for chiral phosphorothioate synthesis[J]. *Science*, 2018, 361(6408): 1234-1238.
- [40] LI P, SERGUEEVA Z A, DOBRIKOV M, et al. Nucleoside and oligonucleoside boranophosphates: chemistry and properties[J]. *Chemical Reviews*, 2007, 107(11): 4746-4796.
- [41] MCCUEN H B, NOÉ, SIERZCHALA A B, et al. Synthesis of mixed sequence borane phosphonate DNA[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2006, 128(25): 8138-8139.
- [42] ZHONG B, SUN L, SHI H, et al. Cyclic di-nucleotide compounds and methods of use: US Patent 10,519,188[P]. 2019-12-31.
- [43] GAFFNEY B L, JONES R A. Synthesis of c-di-GMP analogs with thiourea, urea, carbodiimide, and guanidinium linkages[J]. *Organic Letters*, 2014, 16(1): 158-161.
- [44] GLICK G D, GHOSH S, ROUSH W R, et al. Cyclic dinucleotide analogs for treating conditions associated with sting (stimulator of interferon genes) activity: US Patent Application 16/328,992[P]. 2019-11-14.
- [45] HUISGEN R, SZEIMIES G, MBIUS L. 1,3-dipolare cycloadditionen, XXXII. kinetik der additionen organischer azide an CC-mehrfachbindungen[J]. *Chemische Berichte*, 1967, 100(8): 2494-2507.
- [46] KOLB H C, FINN M G, SHARPLESS K B. Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2001, 40(11): 2004-2021.
- [47] FUJINO T, OKADA K, ISOBE H. Conformational restriction of cyclic dinucleotides with triazole-linked cyclophane analogues[J]. *Tetrahedron Letters*, 2014, 55(16): 2659-2661.
- [48] TENER G M, KHORANA H G, MARKHAM R, et al. Studies on polynucleotides. II. 1 the synthesis and characterization of linear and cyclic thymidine Oligonucleotides 2[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1958, 80(23): 6223-6230.
- [49] KHORANA H G, TURNER A F, VIZSOLYI J P. Studies on polynucleotides. IX. 1 experiments on the polymerization of mononucleotides. certain protected derivatives of deoxycytidine-5' phosphate and the synthesis of deoxycytidine Polynucleotides 2[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1961, 83(3): 686-698.
- [50] FERRIS J P, KAMALUDDIN. Oligomerization reactions of deoxyribonucleotides on montmorillonite clay: The effect of mononucleotide structure on phosphodiester bond formation[J]. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere*, 1989, 19(6): 609-619.
- [51] BIGGADIKE K, CHAMPIGNY A C, COE D M, et al. Preparation of cyclic dinucleotides as modulators of STING: US20180186828[P]. 2015-02-02.
- [52] BIGGADIKE K, CHAMPIGNY A C, COE D M, et al. Cyclic dinucleotides useful for the treatment of inter alia cancer: US Patent 10,047,115[P]. 2018-08-14.
- [53] ALTMAN M D, ANDRESEN B, CHANG W, et al. Cyclic dinucleotide compounds as STING agonists: WO2017027646A1[P]. 2017-02-16.

- [54] KANNE D B, NDUBAKU C O, BRUML J R, et al. Locked nucleic acid cyclic dinucleotide compounds and uses thereof: US Patent Application 16/315,612[P]. 2019-06-20.
- [55] LIOUX T, MAUNY M A, LAMOUREUX A, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of novel cyclic adenosine-inosine monophosphate(cAIMP) analogs that activate Stimulator of interferon genes (STING) [J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2016, 59(22): 10253-10267.
- [56] WANG C H, SINN M, STIFEL J, et al. Synthesis of all possible canonical(3'-5'-linked)cyclic dinucleotides and evaluation of riboswitch interactions and immune-stimulatory effects[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2017, 139(45): 16154-16160.
- [57] WANG Z H, ZHAO C C, WANG C L, et al. Synthesis and biological evaluation of all possible inosine-mixed cyclic dinucleotides that activate different hSTING variants[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2021, 29: 115899.
- [58] WANG Z H, ZHAO C C, ZHANG Q Z, et al. Design, synthesis and systematic evaluation of all possible cyclic dinucleotides(CDNs) that activate human Stimulator of interferon genes(STING) variants[J]. *Science China Chemistry*, 2020, 63(4): 534-545.
- [59] FEI N, HÄUSSINGER D, BLÜMLI S, et al. Catalytic carbene transfer allows the direct customization of cyclic purine dinucleotides[J]. *Chemical Communications*, 2014, 50(62): 8499.
- [60] CEMERSKI S, CUMMING J N, FLATELAND L M, et al. Cyclic dinucleotide sting agonists for cancer treatment: US2018118665[P]. 2018-06-28.
- [61] SMIETANA M, KOOL E T. Efficient and simple solid-phase synthesis of short cyclic oligodeoxynucleotides bearing a phosphorothioate linkage[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2002, 41(19): 3704-3707.
- [62] ZHOU J, SAYRE D A, WANG J, et al. Endo-Sc-di-GMP analogues-polymorphism and binding studies with class I riboswitch[J]. *Molecules*, 2012, 17(11): 13376-13389.
- [63] FINK B E, ZHAO Y, CHEN L, et al. Cyclic dinucleotides as anticancer agents: WO2019079261A1[P]. 2019-04-25.
- [64] VYSKOCIL S, CIAVARRI J, CULLIS C, et al. Sting modulator compounds, and methods of making and using: US Patent Application 16/762,710[P]. 2021-06-10.
- [65] KLINE T, JACKSON S R, DENG W, et al. Design and synthesis of bis-carbamate analogs of cyclic bis-(3'-5')-diguanylic acid(c-di-GMP) and the acyclic dimer PGPG[J]. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, 2008, 27(12): 1282-1300.
- [66] PAL C, CHAKRABORTY T K. Synthesis of amide-linked cyclic dinucleotide analogues with pyrimidine bases[J]. *Asian Journal of Organic Chemistry*, 2017, 6(10): 1421-1427.
- [67] VERHEIJEN J C, GROTENBREG G M, HART DE RUYTER L, et al. An expeditious liquid-phase synthesis of cyclic peptide nucleic acids[J]. *Tetrahedron Letters*, 2000, 41(20): 3991-3995.
- [68] IKEDA K, YANASE Y, HAYASHI K, et al. Amine skeleton-based c-di-GMP derivatives as biofilm formation inhibitors[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2021, 32: 127713.
- [69] KINZIE C R, STEELE A D, PASCIOCCA S M, et al. Synthesis of cyclic dimeric methyl morpholinolide: a common synthetic precursor to cyclic dinucleotide analogs[J]. *Tetrahedron Letters*, 2014, 55(35): 4966-4968.
- [70] WHITELEY A T, EAGLESHAM J B, DE OLIVEIRA MANN C C, et al. Bacterial cGAS-like enzymes synthesize diverse nucleotide signals[J]. *Nature*, 2019, 567(7747): 194-199.

Research progress of cyclic dinucleotide analogues

Chen Changpo, Yan Jiayin, Niu Mei, Cao Guanyang, Li Sa, Bi Jingjing, Dong Wenpei, Jiang Tao, Xin Pengyang

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

Abstract: Cyclic dinucleotide (CDN) is a kind of macrocyclic molecules composed of two nucleoside monophosphates linked with two phosphodiester bonds. CDNs were firstly found in bacteria as second messengers to regulate many physiological functions and mediate antiphage response of bacteria. In response to exotic or intrinsic abnormal nucleic acid, human immune system can synthesize non-canonical CDN, which binds with stimulator of interferon genes (STING) to initiate the cascade of signal pathways to produce type I interferon, and activate immune responses. CDN and its analogues are agonists of STING, and have been involved in infectious diseases, tumor and autoimmune diseases. This article provided a brief review of the discovery and biofunctions of CDNs, and focused on the strategies of CDN structural modifications and structural diversity of CDN analogues.

Keywords: cyclic dinucleotide; secondary messenger; immunotransmitter; analogue; immunotherapy