

· 药学前沿 ·

## 靶向 cGAS-STING 信号通路药物的研究进展

梅家豪, 洪泽, 王琛\*

(中国药科大学生命科学与技术学院 中国药科大学天然药物活性组分与药效国家重点实验室, 南京 210009)

**摘要** 病原微生物的入侵和细胞受损导致细胞质中 DNA 异常聚集, 环化核苷酸合成酶(cGAS)通过识别细胞质中的 DNA, 催化生成第二信使 2', 3'-cGAMP, 将信号传递给下游干扰素基因刺激因子(STING), 诱导转录因子 IRF3 和 NF- $\kappa$ B 入核, 表达和分泌 I 型干扰素等炎症因子, 进而激活机体固有免疫和适应性免疫反应。cGAS-STING 信号通路调控紊乱将导致病原体感染, 以及肿瘤和自身免疫疾病等多种疾病发生和发展, 因此靶向 cGAS 和 STING 蛋白进行的药物开发具有十分重要的临床价值。本文讨论 cGAS-STING 信号通路的最新研究进展以及其在不同疾病中发挥的功能, 并总结目前已报道的调节 cGAS 和 STING 的小分子化合物, 为后续相关的药物研发提供理论参考。

**关键词** cGAS; STING; 小分子化合物; 固有免疫; 药物研发; 进展

**中图分类号** R392; R914.2 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2020)03-0249-11

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.20200301

引用本文 梅家豪, 洪泽, 王琛. 靶向 cGAS-STING 信号通路药物的研究进展[J]. 中国药科大学学报, 2020, 51(3): 249–259.

Cite this article as: MEI Jiahao, HONG Ze, WANG Chen. Advances of drugs in targeting cGAS-STING signaling pathway[J]. J China Pharm Univ, 2020, 51(3): 249–259.

## Advances of drugs in targeting cGAS-STING signaling pathway

MEI Jiahao, HONG Ze, WANG Chen\*

State Key Laboratory of Natural Medicines, School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

**Abstract** Invasion of pathogenic microorganisms and cell damage lead to abnormal accumulation of DNA in the cytoplasm. Cyclic GMP-AMP synthase (cGAS) catalyzes the generation of second messenger 2', 3'-cGAMP by recognizing DNA in the cytoplasm, transmitting signals to downstream stimulators of interferon gene (STING). STING induces the translocation of transcription factors IRF3 and NF- $\kappa$ B into the nucleus to express and secrete inflammatory factors such as type I interferon, which activate the body's innate and adaptive immune responses. Many studies have indicated that disturbance of cGAS-STING pathway regulation leads to the occurrence and development of various diseases such as microbial infection, tumor and autoimmune diseases. Therefore, the development of drugs targeting cGAS and STING proteins is of great clinical value. This paper reviews the latest research progress of cGAS-STING pathway and its roles in different diseases, and summarizes the small-molecule compounds that have been reported to regulate cGAS and STING, in order to provide theoretical reference for future cGAS-STING pathway-related drug discovery.

**Key words** cGAS; STING; small-molecule compounds; innate immunity; drug discovery; advances

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81672029)

收稿日期 2019-11-24 \* 通信作者 Tel: 025-86185395 E-mail: cwang1971@cpu.edu.cn

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 81672029)

固有免疫系统是人体免疫系统的第一道防线,可以迅速识别外源病原体入侵,并且诱导巨噬细胞和自然杀伤细胞对病原体进行吞噬和降解,同时释放大量的干扰素和炎症因子,促进树突状细胞对抗原的递呈作用,进而激活适应性免疫,形成长期的免疫记忆<sup>[1]</sup>。在固有免疫系统中,机体能通过细胞上存在的模式识别受体(pattern recognition receptors, PRRs),比如Toll样受体(Toll-like receptors, TLRs),RIG-I样受体(RIG-I-like receptors, RLRs),NOD样受体(NOD-like receptors, NLRs),DNA感受器等,特异性识别微生物表达的病原相关的分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMPs),比如脂多糖(lipopolysaccharide, LPS),单链核糖核苷酸(single strand ribonucleic acid, ssRNA),双链脱氧核糖核酸(double strand deoxyribonucleic acid, dsDNA)等,调控下游细胞因子的表达和释放<sup>[1]</sup>。

环化核苷酸合成酶(cyclic GMP-AMP synthase, cGAS)就是一种位于细胞质中的dsDNA识别受体,和下游主要调节蛋白干扰素基因刺激因子(stimulator of interferon genes, STING)介导了细胞质DNA引起的固有免疫反应。DNA-cGAS-STING信号通路的激活促进细胞内I型干扰素

(interferons, IFNs)与肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor, TNF- $\alpha$ )和白介素6(interleukin 6, IL-6)等炎症因子的表达和分泌<sup>[2]</sup>。越来越多的研究表明,cGAS-STING信号通路在病原体感染、肿瘤和自身免疫疾病等疾病中充当重要角色。本文将对近年来cGAS-STING信号通路的最新研究进展和靶向cGAS和STING蛋白的激动剂和抑制剂开发进行综述,为后续研究提供理论参考。

## 1 cGAS-STING信号通路

人源cGAS由522个氨基酸组成,相对分子质量大小为60 kD,位于N末端的130-155 aa为非保守序列,功能研究尚不明确,而155-522 aa构成了cGAS的C末端核酸转移酶结构域,含有一个位于中心的催化区域和分散在两侧的阳离子表面区域<sup>[3]</sup>。cGAS通过上述区域与双链DNA螺旋中的脱氧核糖磷酸骨架以2:2的形式结合成多聚体。此外,cGAS上的锌指区域通过离子键进一步稳定其与DNA的结合<sup>[4]</sup>。DNA的结合能诱导cGAS核酸转移酶催化区域的结构重排,进而以ATP和GTP为底物催化形成2'-5'和3'-5'环状GAMP分子(cyclic GMP-AMP),即2',3'-cGAMP(图1-A)<sup>[3]</sup>。值得注意的是cGAS对DNA的识别并不依赖于

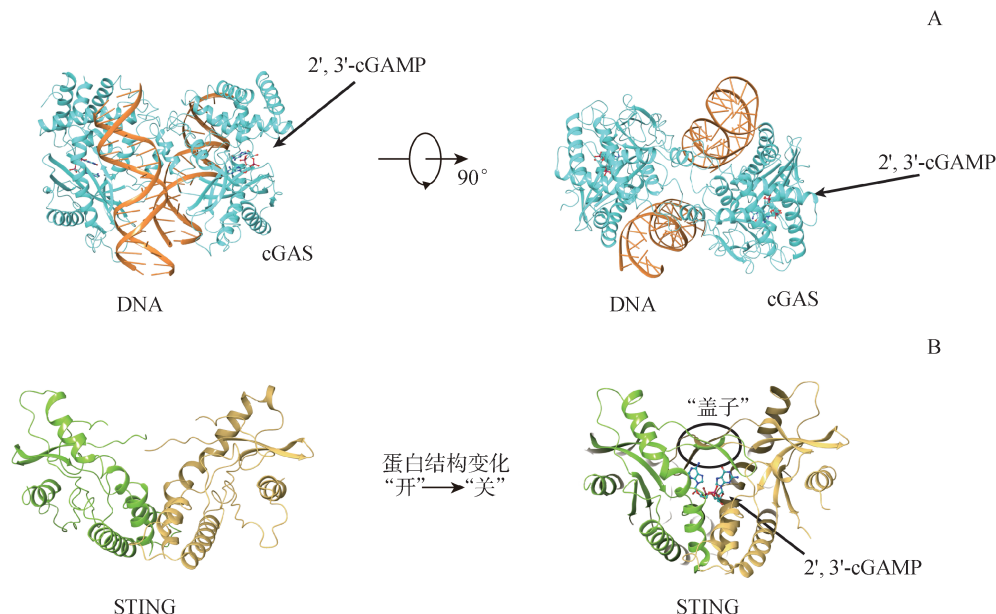


图1 环化核苷酸合成酶(cGAS)和干扰素基因刺激因子(STING)的蛋白结构

A: cGAS-dsDNA-2',3'-cGAMP复合物结构(PDB code: 4LEZ); B: 左边为静息状态下STING C末端结构域(CTD区域)的蛋白结构(PDB code: 4EMU),右边是STING结合2',3'-cGAMP的蛋白结构(PDB code: 4KSY),结合2',3'-cGAMP后,STING CTD区域发生构象变化,形成特殊的“盖子”结构

DNA 序列的特异性,长链 DNA (>45 bp) 能更高效地激活 cGAS 酶活,且病原体入侵、线粒体受损或基因组不稳定性导致的细胞质中 DNA 聚集都能导致 cGAS 激活<sup>[5]</sup>。

2',3'-cGAMP 在与下游受体蛋白 STING 结合后完成信号的传递<sup>[6]</sup>。人源 STING 蛋白由 379 个氨基酸组成,包含 N 端 4 次跨膜区 (N terminal transmembrane domain, NTD, 1-137 aa), 环化核苷酸结合区域 (cyclic dinucleotides binding domain, CBD, 138-340 aa) 和 C 末端尾巴 (C terminal tail, CTT, 341-379 aa)<sup>[7]</sup>。静息状态下 STING 蛋白以同源二聚体形式存在,两个分子的 NTD 相互交错将蛋白锚定在内质网膜内,CBD 区域在细胞质中形成“V”形口袋用于识别 2',3'-cGAMP。2',3'-cGAMP 的结合诱导 STING 蛋白的空间构象由“V 形”向“U”形口袋转变,且口袋顶部的开口处形成帽子结构促进 STING 二聚体形成四聚体和多聚复合物 (图 1-B),多聚化的 STING 蛋白脱离内质网向高尔基体转移并在此过程中以其 CTT 区域招募 TANK 结合激酶 (TANK-binding kinase, TBK1),TBK1 在与 STING 多聚体结合后发生自磷酸化 (172 位丝氨酸发生磷酸化,S172),激活其激酶活性后催化 STING 蛋白的磷酸化 (366 位丝氨酸发生磷酸化,S366),磷酸化后的 STING 蛋白进一步以其 CTT 区域招募转录因子干扰素调节因子 3 (interferon regulatory factors 3, IRF3),促进 IRF3 磷酸化 (396 位丝氨酸发生磷酸化,S396) 和二聚化入核,激活 I 型 IFNs 相关基因的表达<sup>[8-9]</sup>。同时 STING 将信号传给肿瘤坏死因子受体相关蛋白 6 (TNF receptor associated factor 6, TRAF6),激活经典核因子  $\kappa$ B (nuclear factor kappa-B, NF- $\kappa$ B) 信号通路,诱导 TNF- $\alpha$  和 IL-6 等炎症因子释放<sup>[2]</sup>。与 2',3'-cGAMP 类似,细菌的代谢产物环鸟苷二磷酸 (cyclic diguanylate monophosphate, c-di-GMP) 和环腺苷二磷酸 (cyclic diadenylate monophosphate, c-di-AMP) 分子也能结合到 STING 的 CBD 区域,诱导信号通路的激活<sup>[10]</sup>。cGAS-STING 信号通路的信号传递过程见图 2。

## 2 cGAS-STING 信号通路紊乱与疾病

在机体的抗病毒、抗细菌方面,cGAS-STING 信号通路发挥着重要作用。但是细菌和病毒已经

进化出一系列逃逸机制,抑制了固有免疫信号通路的激活。Su 等<sup>[11]</sup>发现,2 型人类免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus-2, HIV-2) 的毒力蛋白 X (viral protein X, Vpx) 可以和 STING 结合,选择性抑制 cGAS-STING 信号通路介导的下游经典 NF- $\kappa$ B 信号通路,减少 TNF- $\alpha$  和 IL-6 等炎症因子释放。Aguirre 等<sup>[12]</sup>发现登革热病毒的非结构蛋白 2B (non-structural protein 2B, NS2B) 可以靶向并引起 cGAS 溶酶体降解,使其不能识别感染过程中泄露的线粒体 DNA,抑制了 I 型 IFNs 表达和释放。正是因为 cGAS-STING 信号通路在抗病原微生物中可以发挥重要作用,所以开发靶向 STING 的免疫佐剂已逐渐成为研究热点。

cGAS-STING 信号通路通过促进 I 型 IFNs, TNF- $\alpha$  和 IL-6 等炎症因子表达,一方面能诱导细胞产生大量干扰素刺激基因 (interferon-stimulated genes, ISGs),而另一方面能促进树突细胞向 T 细胞呈递抗原,加强抗肿瘤免疫<sup>[13]</sup>。但是肿瘤细胞能从多个层面抑制 cGAS-STING 信号通路从而逃避免疫监察。通过生物信息学研究发现,在肾癌、乳腺癌、肺癌、肝癌等多种人肿瘤细胞系中,cGAS 和 STING 的基因通过表观遗传学降低了翻译效率,而且在蛋白水平通常是以不能行使正常功能的突变体形式存在<sup>[14]</sup>。而且 Wu 等<sup>[15]</sup>发现肿瘤细胞中人上皮生长因子受体 2 (human epidermal growth factor receptor 2, HER2) 可以招募 RAC- $\beta$  丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (RAC-beta serine/threonine-protein kinase, AKT),抑制 STING 信号通路,促进了肿瘤发展。同时也有研究发现如果 NF- $\kappa$ B 信号通路过度激活,炎症反应会参与肿瘤的发生、转移、免疫逃逸以及肿瘤微环境中的血管生成,促进肿瘤的恶化<sup>[16]</sup>。比如致癌物二羟甲基丁酸 (dimethylolbutanoic acid [2, 2-bis (hydroxymethyl) butyric acid], DMBA) 会导致表皮角质细胞核 DNA 发生损伤,并使其释放到细胞质,从而激活细胞内的 cGAS-STING 信号,促进皮肤的癌变<sup>[17]</sup>。还有在肺癌细胞的脑转移模型中,在转移到脑部的肺癌细胞中,细胞质中的 DNA 可以激活 cGAS,而生成的 2',3'-cGAMP 能通过 Gap Junction 向大脑部的星形胶质细胞转移,进一步激活 cGAS-STING 信号通路,诱导 I 型 IFNs 和 TNF- $\alpha$  等炎症因子表达和释放,而释放的炎症因子会通过旁分泌的方式,

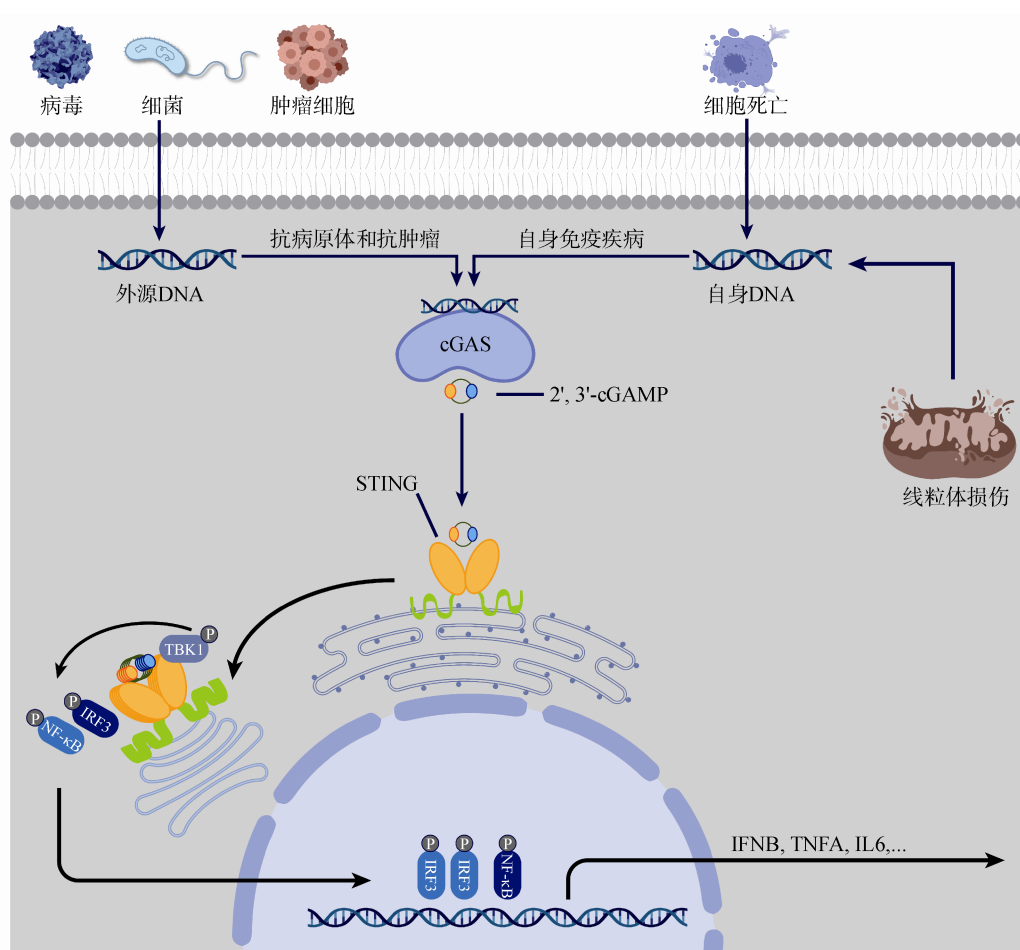


图2 cGAS-STING 信号通路示意图

外源 DNA 和内源 DNA 激活 cGAS, 生成第二信使 2',3'-cGAMP。2',3'-cGAMP 与下游受体蛋白 STING 结合后, 引起 STING 向高尔基体转移, 并发生多聚化, 招募 TBK1, 转录因子 IRF3 和 NF-κB, 促进 IRF3 和 NF-κB 磷酸化和二聚化入核, 激活炎症因子相关基因转录。TBK1: TANK 结合激酶; IRF3: 干扰素调节因子 3; NF-κB: 核因子 κB; IFNβ: 干扰素 β 基因; TNFα: 肿瘤坏死因子 α 基因; IL6: 白介素 6 基因

作用于肿瘤细胞上, 促进了肿瘤细胞的生长<sup>[18]</sup>。综上, cGAS-STING 信号通路在肿瘤发生、发展和转移过程中发挥重要作用, 而且在大部分的肿瘤模型中, 在细胞和动物水平已经证实 cGAS-STING 信号通路能够发挥很好的抗肿瘤免疫作用, 但是不同肿瘤中 STING 激动剂的安全性和有效性需要谨慎评价。

机体内 STING 信号通路的持续异常激活能导致多种自身免疫疾病。第一类是因基因突变导致细胞内核酸代谢酶功能异常, 比如 *TREX1*, *RNASEH2A*, *SAMHD1* 等基因发生突变, 促进 DNA 在细胞质中的聚集, 诱导炎症细胞因子的持续释放, 导致自身免疫疾病发生<sup>[19-21]</sup>。此类疾病包括 AGS 综合征 (Aicardi-Goutieres syndrome, AGS)、系统性红斑狼疮 (systemic lupus erythematosus, SLE)

等<sup>[22]</sup>。另一类是由编码 STING 蛋白发生 V147L, N154S 和 V155M 等点突变 (第 147 位缬氨酸突变成亮氨酸, 第 154 位天冬酰胺突变成丝氨酸, 第 155 位缬氨酸突变成甲硫氨酸), 导致 STING 蛋白不依赖上游 2',3'-cGAMP 即可持续激活, 促进炎症因子持续表达和释放, 导致组织损伤<sup>[23]</sup>。在临床上发现此类患者早发于婴儿时期, 主要表现为皮肤红疹和呼吸急促, 发热, 外周血管病变, 肺部炎症和血液中存在自身抗核抗体等, 此类疾病也被统一命名为诱发于婴儿时期的 STING 相关血管病变 (STING-associated vasculopathy with onset in infancy, SAVI)。

除了上述疾病外, 近年来人们发现越来越多的代谢与炎症疾病与 cGAS-STING 信号通路调控密切相关。在急性胰腺炎模型中, 坏死组织泄露



的外源 DNA 会诱导胰腺中的巨噬细胞分泌大量炎症因子,造成组织损伤,而这一现象在 cGAS 和 STING 基因敲除小鼠中均有改善<sup>[24]</sup>。在 *DNASE2* 双等位基因突变的患者中,研究人员发现 I 型 IFNs 过度表达,有核红细胞数量增加,同样在 cGAS 和 STING 基因敲除小鼠中疾病症状得到缓解,也说明了由 cGAS-STING 介导的 I 型 IFNs 分泌可能参与了血液生成<sup>[25]</sup>。在帕金森病小鼠模型

中,人们发现由于缺少 E3 泛素连接酶 parkin (E3 ubiquitin-protein ligase parkin, PRKN) 和蛋白激酶 PINK1 (serine/threonine-protein kinase PINK1),受损线粒体中渗露的 DNA 可能诱导炎症因子释放,而在小鼠模型中将 STING 蛋白进行基因敲除,可以减慢疾病发展<sup>[26]</sup>。目前已与 cGAS-STING 信号通路相关的疾病见表 1。

表 1 与 cGAS-STING 信号通路相关的疾病

疾 病	疾病模型或临床特征	cGAS/STING KO 是否改善疾病	异常 DNA 来源	参考文献
肿瘤	DMBA 诱发的皮肤癌小鼠模型	STING KO 改善	细胞核 DNA	[17]
肿瘤转移	不同的肿瘤转移小鼠模型	STING KO 改善	细胞核 DNA	[18,27]
系统性红斑狼疮	患者外周血单核细胞中 2',3'-cGAMP 含量上升	NA	NA	[28]
SAVI	患者 I 型 IFNs 表达量增加	NA	NA	[23]
AGS 综合征	<i>Trex1</i> <sup>-/-</sup> , <i>RnaseH2</i> <sup>-/-</sup> , <i>Samhd1</i> <sup>-/-</sup> 小鼠模型;患者 I 型 IFNs 表达量增加	cGAS/STING KO 改善	细胞核 DNA	[20]
急性胰腺炎	雨蛙素小鼠模型	cGAS/STING KO 改善	NA	[24]
帕金森症	<i>Prkn</i> <sup>-/-</sup> , <i>Pink1</i> <sup>-/-</sup> 运动耗竭小鼠模型	STING KO 改善	线粒体 DNA	[26]
多发性关节炎/新生儿贫血	<i>Dnase2a</i> <sup>-/-</sup> 小鼠模型;患者 <i>DNASE2A</i> 双等位基因突变	cGAS/STING KO 改善	细胞外和细胞核 DNA	[19,25,29]
年龄相关性黄斑变性	Alu 转录本诱发的 RPE 死亡	cGAS/STING KO 改善	线粒体 DNA	[30]
酒精性肝疾病	慢性 ALD 小鼠模型	STING KO 改善	NA	[31]
肝纤维化	CCl <sub>4</sub> 注射小鼠模型	STING KO 改善	NA	[32]
心肌梗死	结扎小鼠模型	cGAS/STING KO 改善	细胞外 DNA	[33]
非酒精性脂肪肝	MCD 小鼠模型, HFD 小鼠模型	STING KO 改善	线粒体 DNA	[34]
败血症	内毒素休克小鼠模型;盲肠结扎穿孔小鼠模型	STING KO 改善	NA	[35]

KO: 基因敲除; NA: 无法获取; DMBA: 二羟甲基丁酸; SAVI: 诱发于婴儿时期的 STING 相关血管病变; RPE: 视网膜色素上皮细胞; ALD: 酒精性肝疾病; MCD: 蛋氨酸胆碱缺乏饮食; HFD: 高脂饮食

3 靶向 cGAS-STING 信号通路的药物研发

鉴于 cGAS-STING 信号通路在疾病的发生发展中发挥的重要作用,而且一些免疫佐剂如铝盐、明矾和壳聚糖等能够通过诱导细胞死亡或线粒体损伤导致细胞质内的 DNA 聚集进而激活 cGAS-STING 信号通路,促进机体的免疫功能<sup>[36-37]</sup>,所以靶向 cGAS 和 STING 蛋白的药物开发也逐渐成为研究热点。

3.1 cGAS 抑制剂

目前,直接靶向 cGAS 的激动剂还没有报道,虽然一些金属离子(例如锰离子、锌离子等)可以增加 cGAS 的酶活,但所需的有效浓度过高且易在体内产生毒性不利于后续药物研发<sup>[38]</sup>。因此,有关抑制剂的研发较多。Vincent 等<sup>[39]</sup>通过建立体

外 cGAS 酶活检测方法,高通量筛选出的化合物 RU. 521 能高效且特异性地抑制 cGAS 酶活。在小鼠单核巨噬细胞(RAW 264.7)的体外模型中 RU. 521 对下游 I 型 IFNs 表达的半数抑制率(IC<sub>50</sub>)为 700 nmol/L。共结晶结构表明, RU. 521 通过占据 cGAS 的催化位点影响 2',3'-cGAMP 合成,从而发挥抑制作用。进一步的研究表明 RU. 521 对鼠源 cGAS 酶活性的抑制要显著高于人源 cGAS 蛋白,所以该研究团队用新的实验方法筛选出了高效抑制人源 cGAS 酶活性的先导化合物 G140 和 G150,且在人原代巨噬细胞体外模型中, G150 表现出良好的生物学活性(IC<sub>50</sub>为 600 nmol/L)<sup>[40]</sup>。此外, Hall 等<sup>[41]</sup>以荧光法检测 2',3'-cGAMP 的产生为依据进行高通量筛选,筛选出的化合物 PF-06928215 与人源 cGAS 蛋白的亲和力为 0.2 μmol/L,对外源

cGAS酶活的半数抑制率为4.9  $\mu\text{mol/L}$ 。但是在细胞实验中, PF-06928215并不能抑制DNA诱导细胞内IFN- $\beta$ 表达,这可能与化合物细胞透膜能力和与血浆蛋白结合能力有关。

除了全新发现的小分子抑制剂,一些已经上市的药物也被发现有类似的功能。An等<sup>[42]</sup>通过cGAS和DNA的结构数据,进行计算机模拟筛选,发现了一系列抗疟疾药物,比如喹啉因(quinacrine, QC)、羟氯喹(hydroxychloroquine, HCQ)等,可以阻碍cGAS和DNA相互结合,抑制I型IFNs表达。但是在后续实验中发现,这些化合物可能会插入DNA中,并在10  $\mu\text{mol/L}$ 浓度下就会出现明显细胞死亡,所以抗疟疾药物用于抑制I型IFNs的安全性还有待考虑。在QC和HCQ的基础上,该研究团队优化一系列抗疟疾药物衍生物并筛选出具有高效生物活性和细胞安全性化合物X6。实验证明,化合物X6在*Trex1*<sup>-/-</sup>小鼠的骨髓来源的巨噬细胞(bone marrow-derived macrophage, BMDM)和SLE患者的外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)中能显著下调ISGs表达<sup>[43]</sup>。由于没有具体的结构学和药理学数据,利用抗疟疾药物用于治疗自身免疫性疾病的具体机制,有待进一步实验研究。Liu等<sup>[44]</sup>发现,茶多酚中的表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin gallate, EGCG)可以通过抑制GTP酶激活蛋白1(GTPase-activating protein SH3 domain-binding protein 1, G3BP1)蛋白活性,间接抑制cGAS和DNA结合。同一团队的Dai等<sup>[45]</sup>发现,乙酰水杨酸可以直接乙酰化cGAS,抑制下游I型IFNs生成,并且在*Trex1*<sup>-/-</sup>小鼠体内和AGS患者来源的成纤维

细胞中都有明显的抑制炎症效果。

综上,现有针对cGAS酶活区域的结构或者cGAS/DNA复合物的结构进行设计筛选的化合物具有较弱的生物活性,所以建立起一个具有高通量、高灵敏度的检测平台,获得更加全面的蛋白质结构数据,将极大促进靶向cGAS的小分子研究进程。而且,越来越多的数据证明,通过影响蛋白质翻译后修饰过程,可以有效调控蛋白质介导的信号转导,所以开发靶向蛋白翻译后修饰的化合物也是未来的研究方向。

### 3.2 STING激动剂

由于STING信号通路的激活促进下游I型IFNs的表达在抗病毒免疫和抗肿瘤免疫中发挥着重要的作用,所以靶向STING蛋白激动剂开发一直是该领域的研究热点。STING激动剂的研究主要集中在环化核苷酸(cyclic dinucleotides, CDNs)类似物的优化和新型小分子激动剂的筛选。CDNs最早在细菌中发现,是由腺嘌呤核糖核苷酸(adenosine monophosphate, AMP)和鸟嘌呤核糖核苷酸(guanosine monophosphate, GMP)通过经典磷酸二酯键连接形成的环化二鸟嘌呤c-di-GMP和环化二腺嘌呤c-di-AMP或者cGAMP。由cGAS催化生成的2', 3'-cGAMP是哺乳动物体内唯一已知的CDNs。相对于3', 3'-cGAMP和其他的CDNs, 2', 3'-cGAMP和STING具有更强的亲和力,在解离常数( $K_d$ )方面,比c-di-GMP, 3', 2'-cGAMP和3', 3'-cGAMP低99%,比2', 2'-cGAMP低98%<sup>[46]</sup>。2', 3'-cGAMP以非共价的形式结合到STING二聚体形成的口袋内,诱导STING蛋白的变构激活。天然存在的环化核苷酸化学结构式见图3。

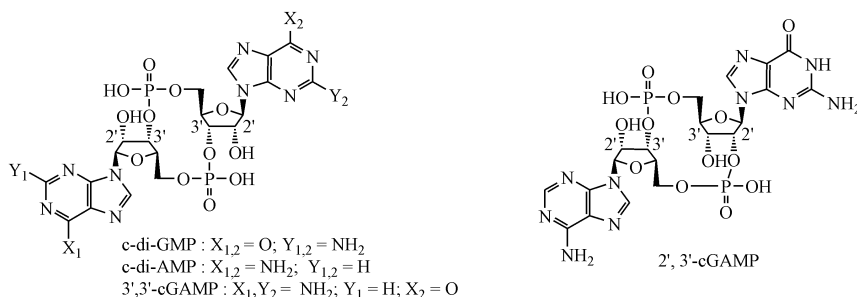


图3 天然环化核苷酸化学结构式

CDNs可以在肿瘤微环境中促进CD8<sup>+</sup> T细胞活化,产生持续的杀伤肿瘤效果,是一类十分具有

临床潜力的抗肿瘤化合物<sup>[47-48]</sup>。目前已经有多种CDNs进入临床前或临床研究(表2)。有关STING

激动剂的药物化学性质和生物学效应在其他综述中已详细讨论,在这里不再赘述<sup>[49]</sup>。

表 2 处于临床前和临床研究阶段的新颖 STING 激动剂

化合物	研发公司	靶点	给药方式	参考文献或临床编号
ADU-S100/MIW815	Aduro Biotech	STING	it	NCT02675439
ADU-S100/WIW815+PDR001	Aduro Biotech	STING + PD-1	it + iv	NCT03172936
MK-1454	Merck	STING	it	NCT03010176
GSK3745417	GSK	STING	iv	NCT03843359
BMS986301	BMS	STING	it	SITC 2018 P525
ExoSTING	Codiak BioSciences	STING	it	SITC 2018 P618
MV-626	Mavupharma	ENPP1	ip	SITC 2018 P410
STACT-TREX1	Actym Therapeutics	TREX1	it, iv	SITC 2018 P235
SYN-STING	Synlogic	STING	iv	SITC 2018 P624
SB11285	Spring Bank Pharmaceuticals	STING	ip, it, iv	AACR 2017 P-A25
CRD-100	Curadev Pharma	STING	it	[50]
GSK532	GSK	STING	iv	[51]
Liposomal cGAMP-NP	UNC-Chapel Hill	STING	iv	[52]
SRCB-0001	GSK	STING	po	[51]

it:瘤内注射; iv: 静脉注射; ip: 腹腔注射; po:口服;SITC 2018:肿瘤免疫治疗学会 2018 年度会议; AACR 2017:美国肿瘤研究协会 2017 年肿瘤免疫和免疫治疗会议; PD-1:程序性死亡蛋白 1; ENPP1:核苷酸内焦磷酸酶/磷酸二酯酶 1; TREX1:脱氧核糖核酸酶 3

3. 3 STING 抑制剂

近年来研究发现 STING 的异常激活导致的免疫功能紊乱能诱发 AGS、SLE 和 SAVI 等自身免疫疾病,这也使得研究者开始重视 STING 抑制剂的开发。Merck 公司的 Siu 等<sup>[53]</sup>通过 ALIS (automated ligand identification system, ALIS) 系统筛选出了靶向 STING 蛋白的小分子抑制剂 Compound 18。共结晶结构表明 Compound 18 结合在 STING 的 CBD 口袋内,并竞争性抑制 2',3'-cGAMP 与蛋白的结合。在人单核细胞 (THP-1) 内,Compound 18 抑制 2',3'-cGAMP 诱导细胞 IFN-β 基因表达的 IC<sub>50</sub> 为 11 μmol/L。此外在植物环肽化合物库中筛选发现紫菀根茎的天然提取物 Astin C 能通过阻止 STING 对下游转录因子 IRF3 的招募,抑制多种刺激物诱导的 STING 信号通路的激活<sup>[54]</sup>。在小鼠胚胎成纤维细胞 (MEFs) 和人源肺部成纤维细胞 (IMR90) 中 Astin C 对 IFN-β 基因表达的 IC<sub>50</sub> 为分别为 4 和 10 μmol/L,且在自身免疫疾病模型 *Trex1*<sup>-/-</sup> 小鼠体内注射 Astin C 分子能显著改善小鼠多组织器官的免疫损伤。

除了上述靶向 STING 蛋白 CBD 区域的小分子抑制剂外,靶向抑制 STING N 端跨膜区内半胱氨酸的棕榈酰化修饰的小分子抑制剂也逐渐成为研究热点。Mukai 等<sup>[55]</sup>报道,STING 蛋白 N 端结构域的 88 位和 91 位半胱氨酸(后面分别缩写为 Cys88 和 Cys91)的棕榈酰化修饰为 STING 蛋白激活所必须,且其在细胞抗病毒免疫过程中发挥着重要作用。随后 Hansen 等<sup>[56]</sup>报道在病毒入侵细胞时产生的内源硝基脂肪酸 (NO<sub>2</sub>-FAs) 能与 Cys88 和 Cys91 共价结合,阻止 STING 蛋白棕榈酰化,抑制 STING 信号通路激活。在 SAVI 患者来源的成纤维细胞中,NO<sub>2</sub>-FAs 能显著抑制疾病伴随的 I 型 IFNs 及相关炎症因子表达。此外,Haag 等<sup>[57]</sup>在体外筛选化合物发现硝基咪唑衍生物 C-178 和 C-176 可以共价结合鼠源 STING 蛋白的中 Cys91 位点,抑制 STING 棕榈酰化,阻断下游信号传递。进一步他们筛选出化合物 H-151,以相同的方式共价结合人源 STING,抑制 I 型 IFNs 表达,上述化合物在 *Trex1*<sup>-/-</sup> 小鼠中都能显著改善自身免疫疾病的进展。靶向 cGAS 和 STING 蛋白的抑制剂见表 3 和图 4。

表3 cGAS-STING信号通路抑制剂的炎症抑制活性

化合物	靶点	实验对象	参考文献
RU.521	鼠源 cGAS	<i>Trex1</i> <sup>-/-</sup> 小鼠	[39]
G150	人源 cGAS	<i>Trex1</i> <sup>-/-</sup> 小鼠	[40]
PF-06928215	人源 cGAS	无体内抑制活性	[41]
HCQ	cGAS分子对接	无体内验证数据	[42]
X6	cGAS分子对接	<i>Trex1</i> <sup>-/-</sup> 小鼠	[43]
EGCG	G3BP1-cGAS相互作用	<i>Trex1</i> <sup>-/-</sup> 小鼠和AGS患者	[44]
Aspirin	cGAS乙酰化	<i>Trex1</i> <sup>-/-</sup> 小鼠和AGS患者	[45]
Compound 18	STING CBD结合口袋	无数据	[53]
Astin C	STING-IRF3相互作用	<i>Trex1</i> <sup>-/-</sup> 小鼠	[54]
NO <sub>2</sub> -FAs	STING棕榈酰化	<i>Trex1</i> <sup>-/-</sup> 小鼠和来源于SAVI患者的细胞	[56]
C-176, C-178	鼠源STING棕榈酰化	<i>Trex1</i> <sup>-/-</sup> 小鼠	[57]
H-151	人源STING棕榈酰化	<i>Trex1</i> <sup>-/-</sup> 小鼠	[57]

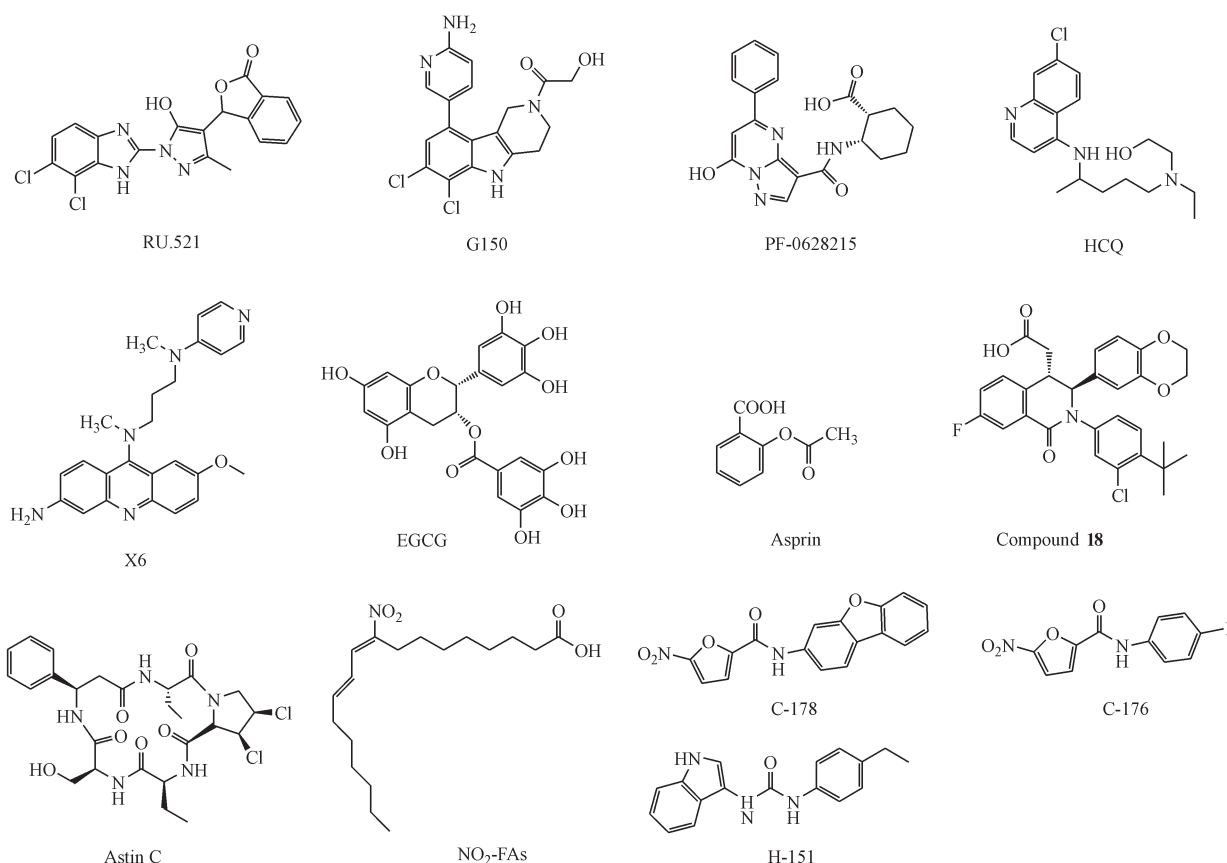


图4 cGAS-STING信号通路抑制剂

#### 4 总结和展望

作为固有免疫系统的重要组成部分, cGAS-STING信号通路在维持机体的稳态过程中发挥着重要作用。相应的 cGAS-STING 功能的紊乱导致机体免疫功能的异常会诱发包括肿瘤、自身免疫

疾病在内的多种疾病。迄今为止, 研究人员通过多种筛选方法发现了多种新型的靶向调控 cGAS 或 STING 蛋白功能的小分子激动剂或抑制剂, 且这些化合物在临床前的研究中也表现出很好的生物学活性。但是, 研究者也发现了现有小分子中存在的一些问题, 例如 cGAS 的抑制剂抗疟疾药物



衍生物的细胞毒性,STING 激动剂 CDNs 类似物的细胞通透性差且易被降解,靶向 STING 蛋白半胱氨酸的共价抑制剂具有脱靶作用以及在筛选化合物过程中发现的种属特异性问题等。因此,靶向 cGAS 和 STING 的新颖激动剂和抑制剂依然有待开发,筛选出具有更好生物活性的先导化合物,为临床研究提供更多的候选分子。

靶向调控 cGAS-STING 信号通路的小分子化合物在多种疾病的治疗中都具有显著疗效。比如在小鼠多种肿瘤模型中,STING 激动剂与 PD-1 (programmed cell death protein 1, PD-1) 或者 PD-L1 (programmed cell death 1 ligand 1, PD-L1) 抑制剂联用能协同促进机体的抗肿瘤免疫且在体内能形成长期的免疫记忆,有效地控制肿瘤复发;在自身免疫疾病治疗中,AGS 和 SAVI 等罕见病并没有有效的治疗药物,临床上目前以使用 Janus 激酶抑制剂为主控制疾病进展,与其相比靶向 cGAS 或 STING 的抑制剂不仅能控制 I 型 IFNs 诱导的组织损伤,还能控制 TNF- $\alpha$  和 IL-6 等炎症因子导致的组织炎症。此外靶向 STING 蛋白的抑制剂也能改善 STING 异常激活导致的 T, B 细胞和内皮细胞等多种细胞死亡<sup>[58]</sup>。

此外,在开发调控 cGAS-STING 信号通路的激动剂或抑制剂时,其潜在的药物不良反应值得关注。比如在利用 STING 激动剂进行肿瘤免疫治疗,很可能爆发“免疫风暴”,过度激活的免疫系统导致机体损伤甚至死亡<sup>[2]</sup>。在使用抑制剂治疗自身免疫疾病时,过度抑制 STING 信号通路抑制剂将导致机体免疫系统低下,使病原体感染和肿瘤发生的风险显著增加。因此,在药物开发中还应注意给药的剂量和周期,尽量避免潜在的药物不良反应发生。

越来越多的研究表明,除了发挥固有免疫功能外,cGAS 和 STING 蛋白还能在疾病中独立发挥作用。比如:当 DNA 发生损伤时,cGAS 可以入核干扰 DNA 同源重组修复过程,促进肿瘤生长,而这一过程不依赖于 STING;在白血病中,激活 STING 将通过 IRF3, p53 或线粒体介导的细胞凋亡信号通路,促进肿瘤细胞凋亡<sup>[58-60]</sup>。同时,Caspase 蛋白家族以及 microRNA 都可以和固有免疫信号通路发生相互作用,暗示它们也可能影响 DNA 识别信号的转导<sup>[61-62]</sup>。所以在不同疾病的发展中对 cGAS 和

STING 蛋白功能进行更加深入研究,将有助于更好地指导靶向药物开发。

## 参 考 文 献

- [1] Wu J, Chen ZJ. Innate immune sensing and signaling of cytosolic nucleic acids[J]. *Annu Rev Immunol*, 2014, **32**(1): 461-488.
- [2] Ablasser A, Chen ZJ. cGAS in action: expanding roles in immunity and inflammation[J]. *Science*, 2019, **363**(6431): eaat8657.
- [3] Civril F, Deimling T, De CC, et al. Structural mechanism of cytosolic DNA sensing by cGAS [J]. *Nature*, 2013, **498**(7454): 332-337.
- [4] Zhang X, Wu J, Du F, et al. The cytosolic DNA sensor cGAS forms an oligomeric complex with DNA and undergoes switch-like conformational changes in the activation loop [J]. *Cell Rep*, 2014, **6**(3): 421-430.
- [5] Andreeva L, Hiller B, Kostrewa D, et al. cGAS senses long and HMGB/TFAM-bound U-turn DNA by forming protein-DNA ladders[J]. *Nature*, 2017, **549**(7672): 394-398.
- [6] 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.
- [7] Shang G, Zhu D, Li N, et al. Crystal structures of STING protein reveal basis for recognition of cyclic di-GMP [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2012, **19**(7): 725-727.
- [8] Zhao B, Du F, Xu P, et al. A conserved PLPLRT/SD motif of STING mediates the recruitment and activation of TBK1 [J]. *Nature*, 2019, **569**(7758): 718-722.
- [9] Zhao B, Shu C, Gao X, et al. Structural basis for concerted recruitment and activation of IRF-3 by innate immune adaptor proteins [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2016, **113**(24): E3403-E3412.
- [10] Burdette DL, Monroe KM, Sotelo TK, et al. STING is a direct innate immune sensor of cyclic di-GMP[J]. *Nature*, 2011, **478**(7370): 515-518.
- [11] Su J, Rui Y, Lou M, et al. HIV-2/SIV Vpx targets a novel functional domain of STING to selectively inhibit cGAS-STING-mediated NF- $\kappa$ B signalling[J]. *Nat Microbiol*, 2019, **4**(12): 2552-2564.
- [12] Aguirre S, Luthra P, Sanchez MT, et al. Dengue virus NS2B protein targets cGAS for degradation and prevents mitochondrial DNA sensing during infection[J]. *Nat Microbiol*, 2017, **2**(5): 17037.
- [13] Woo SR, Furtess MB, Corrales L, et al. STING-dependent cytosolic DNA sensing mediates innate immune recognition of immunogenic tumors[J]. *Immunity*, 2014, **41**(5): 830-842.
- [14] Konno H, Yamauchi S, Berglund A, et al. Suppression of STING signaling through epigenetic silencing and missense

- mutation impedes DNA damage mediated cytokine production [J]. *Oncogene*, 2018, **37**(15): 2037–2051.
- [15] Wu S, Zhang Q, Zhang F, *et al.* HER2 recruits AKT1 to disrupt STING signalling and suppress antiviral defence and anti-tumour immunity [J]. *Nat Cell Biol*, 2019, **21**(8): 1027–1040.
- [16] Elinav E, Nowarski R, Thaiss CA, *et al.* Inflammation-induced cancer: crosstalk between tumours, immune cells and microorganisms[J]. *Nat Rev Cancer*, 2013, **13**(11): 759–771.
- [17] Ahn J, Xia T, Konno H, *et al.* Inflammation-driven carcinogenesis is mediated through STING [J]. *Nat Commun*, 2014, **5**(1): 5166.
- [18] Chen Q, Boire A, Jin X, *et al.* Carcinoma-astrocyte gap junctions promote brain metastasis by cGAMP transfer[J]. *Nature*, 2016, **533**(7604): 493–498.
- [19] Gao D, Li T, Li XD, *et al.* Activation of cyclic GMP-AMP synthase by self-DNA causes autoimmune diseases [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2015, **112**(42): E5699–E5705.
- [20] Crow YJ, Chase DS, Lowenstein SJ, *et al.* Characterization of human disease phenotypes associated with mutations in TREX1, RNASEH2A, RNASEH2B, RNASEH2C, SAMHD1, ADAR, and IFIH1 [J]. *Am J Med Genet Part A*, 2015, **167**(2): 296–312.
- [21] Coquel F, Silva MJ, Técher H, *et al.* SAMHD1 acts at stalled replication forks to prevent interferon induction [J]. *Nature*, 2018, **557**(7703): 57–61.
- [22] Crow YJ, Manel N. Aicardi – Goutières syndrome and the type I interferonopathies [J]. *Nat Rev Immunol*, 2015, **15**(7): 429–440.
- [23] Liu Y, Jesus AA, Marrero B, *et al.* Activated STING in a vascular and pulmonary syndrome [J]. *N Engl J Med*, 2014, **371**(6): 507–518.
- [24] Zhao Q, Wei Y, Pandol SJ, *et al.* STING signaling promotes inflammation in experimental acute pancreatitis [J]. *Gastroenterology*, 2018, **154**(6): 1822–1835.
- [25] Rodero MP, Tesser A, Bartok E, *et al.* Type I interferon-mediated autoinflammation due to DNase II deficiency [J]. *Nat Commun*, 2017, **8**(1): 2176.
- [26] Sliter DA, Martinez J, Hao L, *et al.* Parkin and PINK1 mitigate STING-induced inflammation [J]. *Nature*, 2018, **561**(7722): 258–262.
- [27] Bakhom SF, Ngo B, Laughney AM, *et al.* Chromosomal instability drives metastasis through a cytosolic DNA response [J]. *Nature*, 2018, **553**(7689): 467–472.
- [28] An J, Durcan L, Karr RM, *et al.* Expression of cyclic GMP-AMP synthase in patients with systemic lupus erythematosus [J]. *Arthritis Rheumatol*, 2017, **69**(4): 800–807.
- [29] Ahn J, Gutman D, Saijo S, *et al.* STING manifests self DNA-dependent inflammatory disease [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2012, **109**(47): 19386–19391.
- [30] Kerur N, Fukuda S, Banerjee D, *et al.* cGAS drives noncanonical-inflammasome activation in age-related macular degeneration [J]. *Nat Med*, 2018, **24**(1): 50–61.
- [31] Petrasek J, Iracheta VA, Csak T, *et al.* STING-IRF3 pathway links endoplasmic reticulum stress with hepatocyte apoptosis in early alcoholic liver disease [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2013, **110**(41): 16544–16549.
- [32] Iracheta VA, Petrasek J, Gyongyosi B, *et al.* Endoplasmic reticulum stress-induced hepatocellular death pathways mediate liver injury and fibrosis via stimulator of interferon genes [J]. *J Biol Chem*, 2016, **291**(52): 26794–26805.
- [33] King KR, Aguirre AD, Ye YX, *et al.* IRF3 and type I interferons fuel a fatal response to myocardial infarction [J]. *Nat Med*, 2017, **23**(12): 1481–1487.
- [34] Yu Y, Liu Y, An W, *et al.* STING-mediated inflammation in Kupffer cells contributes to progression of nonalcoholic steatohepatitis [J]. *J Clin Invest*, 2018, **129**(2): 546–555.
- [35] Zeng L, Kang R, Zhu S, *et al.* ALK is a therapeutic target for lethal sepsis [J]. *Sci Transl Med*, 2017, **9**(412): eaan5689.
- [36] Marichal T, Ohata K, Bedoret D, *et al.* DNA released from dying host cells mediates aluminum adjuvant activity [J]. *Nat Med*, 2011, **17**(8): 996–1002.
- [37] Carroll EC, Jin L, Mori A, *et al.* The vaccine adjuvant chitosan promotes cellular immunity via DNA sensor cGAS-STING-dependent induction of type I interferons [J]. *Immunity*, 2016, **44**(3): 597–608.
- [38] Wang C, Guan Y, Lv M, *et al.* Manganese increases the sensitivity of the cGAS-STING Pathway for double-stranded DNA and is required for the host defense against DNA viruses [J]. *Immunity*, 2018, **48**(4): 675–687.
- [39] Vincent J, Adura C, Gao P, *et al.* Small molecule inhibition of cGAS reduces interferon expression in primary macrophages from autoimmune mice [J]. *Nat Commun*, 2017, **8**(1): 1–12.
- [40] Lama L, Adura C, Xie W, *et al.* Development of human cGAS-specific small-molecule inhibitors for repression of dsDNA-triggered interferon expression [J]. *Nat Commun*, 2019, **10**(1): 2261.
- [41] Hall J, Brault A, Vincent F, *et al.* Discovery of PF-06928215 as a high affinity inhibitor of cGAS enabled by a novel fluorescence polarization assay [J]. *PLoS One*, 2017, **12**(9): e0184843.
- [42] An J, Woodward JJ, Sasaki T, *et al.* Cutting Edge: Antimalarial drugs inhibit IFN- $\beta$  production through blockade of cyclic GMP-AMP synthase-DNA interaction [J]. *J Immunol*, 2015, **194**(9): 4089–4093.
- [43] An J, Woodward JJ, Lai W, *et al.* Inhibition of cyclic GMP-AMP synthase using a novel antimalarial drug derivative in Trex1-deficient mice [J]. *Arthritis Rheumatol*, 2018, **70**(11): 1807–1819.
- [44] Liu ZS, Cai H, Xue W, *et al.* G3BP1 promotes DNA binding

- and activation of cGAS [J]. *Nat Immunol*, 2019, **20** (1): 18–28.
- [45] Dai J, Huang YJ, He X, *et al*. Acetylation blocks cGAS activity and inhibits self-DNA-induced autoimmunity [J]. *Cell*, 2019, **176**(6): 1447–1460.
- [46] Zhang X, Shi H, Wu J, *et al*. Cyclic GMP-AMP containing mixed phosphodiester linkages is an endogenous high-affinity ligand for STING[J]. *Mol Cell*, 2013, **51**(2): 226–235.
- [47] Nakamura T, Miyabe H, Hyodo M, *et al*. Liposomes loaded with a STING pathway ligand, cyclic di-GMP, enhance cancer immunotherapy against metastatic melanoma [J]. *J Control Release*, 2015, **216**: 149–157.
- [48] Smith TT, Moffett HF, Stephan SB, *et al*. Biopolymers codelivering engineered T cells and STING agonists can eliminate heterogeneous tumors[J]. *J Clin Invest*, 2017, **127**(6): 2176–2191.
- [49] Ji LY, Hao J, Wang GC, *et al*. Recent research advances in STING agonists for cancer immunotherapy [J]. *J China Pharm Univ*(中国药科大学学报), 2020, **51**(1): 1–9.
- [50] Banerjee M, Middya S, Basu S, *et al*. Abstract B43: novel small-molecule human STING agonists generate robust type I interferon responses in tumors [C]. Tumor Microenvironment: American Association for Cancer Research, 2018: B43–B43.
- [51] Ramanjulu JM, Pesiridis GS, Yang J, *et al*. Design of amido-benzimidazole STING receptor agonists with systemic activity [J]. *Nature*, 2018, **564**(7736): 439–443.
- [52] Cheng N, Watkins SR, Junkins RD, *et al*. A nanoparticle-incorporated STING activator enhances antitumor immunity in PD-L1 – insensitive models of triple-negative breast cancer[J]. *JCI Insight*, 2018, **3**(22): e120638.
- [53] Siu T, Altman MD, Baltus GA, *et al*. Discovery of a novel cGAMP competitive ligand of the inactive form of STING [J]. *ACS Med Chem Lett*, 2019, **10**(1): 92–97.
- [54] Li S, Hong Z, Wang Z, *et al*. The cyclopeptide Astin C specifically inhibits the innate immune CDN sensor STING [J]. *Cell Rep*, 2018, **25**(12): 3405–3421.
- [55] Mukai K, Konno H, Akiba T, *et al*. Activation of STING requires palmitoylation at the Golgi[J]. *Nat Commun*, 2016, **7** (1): 11932.
- [56] Hansen L, Buchan GJ, Rühl M, *et al*. Nitro-fatty acids are formed in response to virus infection and are potent inhibitors of STING palmitoylation and signaling[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2018, **115**(33): E7768–E7775.
- [57] Haag SM, Gulen MF, Reymond L, *et al*. Targeting STING with covalent small-molecule inhibitors [J]. *Nature*, 2018, **559** (7713): 269–273.
- [58] Gulen MF, Koch U, Haag SM, *et al*. Signalling strength determines proapoptotic functions of STING [J]. *Nat Commun*, 2017, **8**(1): 427.
- [59] Liu H, Zhang H, Wu X, *et al*. Nuclear cGAS suppresses DNA repair and promotes tumorigenesis [J]. *Nature*, 2018, **563** (7729): 131–136.
- [60] Tang CH, Zundell JA, Ranatunga S, *et al*. Agonist-mediated activation of STING induces apoptosis in malignant B cells[J]. *Cancer Res*, 2016, **76**(8): 2137–2152.
- [61] Yu YH, Xu ZM, Zeng H, *et al*. Advances in the study of relationship between Caspases and innate immunity [J]. *J China Pharm Univ*(中国药科大学学报), 2019, **50**(5): 622–630.
- [62] Yang RC, Duan FP, Chao JH, *et al*. Advances of microRNA activity in innate immunity [J]. *J China Pharm Univ*(中国药科大学学报), 2017, **48**(4): 396–406.