

靶向 PD-1/PD-L1 的新策略：降解剂、双功能分子及共价抑制剂

王志杰^{1,2}, 廖晓彤², 郭霞^{1*}, 陈建军^{2**}

(¹ 南方医科大学深圳医院, 深圳 518100; ² 南方医科大学药学院, 广州 510515)

摘要 靶向细胞程序性死亡受体-1 (programmed cell death protein-1, PD-1) / 细胞程序性死亡配体-1 (programmed cell death ligand-1, PD-L1) 已成为最具前景的肿瘤免疫治疗靶点之一。目前, PD-1/PD-L1 单克隆抗体药物及小分子抑制剂都面临着相应的发展瓶颈, 许多研究者尝试探索不同的策略以阻断 PD-L1/PD-L1 通路, 期望改善肿瘤治疗的效果。本文总结了靶向 PD-L1 的降解剂、双功能分子及共价抑制剂, 旨在为 PD-1/PD-L1 药物的开发提供有益的思路。

关键词 PD-1/PD-L1; 肿瘤免疫; 降解剂; 双功能分子; 共价抑制剂

中图分类号 R914; R730.3 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2024)01-0005-10

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.2023112702

引用本文 王志杰, 廖晓彤, 郭霞, 等. 靶向 PD-1/PD-L1 的新策略: 降解剂、双功能分子及共价抑制剂 [J]. 中国药科大学学报, 2024, 55(1): 5–14.

Cite this article as: WANG Zhijie, LIAO Xiaotong, GUO Xia, *et al.* New strategies for targeting PD-1/PD-L1: degraders, bifunctional molecules and covalent inhibitors[J]. *J China Pharm Univ*, 2024, 55(1): 5–14.

New strategies for targeting PD-1/PD-L1: degraders, bifunctional molecules and covalent inhibitors

WANG Zhijie^{1,2}, LIAO Xiaotong², GUO Xia^{1*}, CHEN Jianjun^{2**}

¹Shenzhen Hospital, Southern Medical University, Shenzhen 518100; ²School of Pharmaceutical Sciences, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract Programmed cell death protein-1 (PD-1) / programmed cell death ligand-1 (PD-L1) has been considered to be one of the most promising targets for tumor immunotherapy. At present, both monoclonal antibody drugs and small molecule inhibitors targeting PD-1/PD-L1 are facing bottlenecks. Numerous researchers have tried to explore different strategies to block the PD-L1/PD-L1 pathway, hoping to improve the effects of tumor immunotherapy. This review focuses on the degraders, bifunctional molecules and covalent inhibitors that target PD-L1, aiming to provide inspiring insights for the development of anti-PD-1/PD-L1 drugs.

Key words PD-1/PD-L1; tumor immunotherapy; degraders; bifunctional molecules; covalent inhibitors

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 82173668, No.82373706)

恶性肿瘤是 21 世纪最大的健康和发展挑战之一, 严重威胁着人类的生命健康, 已成为“全球头号杀手”之一。据世界卫生组织国际癌症研究机构 (International Agency for Research on Cancer, IARC)、中国国家癌症中心和美国癌症协会等多个机构统计, 肿瘤的发病率和病死率正在逐年上升。根据

IARC 发布的全球最新癌症负担数据显示: 2020 年全球癌症新发病例 1929 万例, 其中中国 457 万例, 占全球 23.7%, 位居全球第一; 全球癌症死亡病例 996 万例, 其中中国 300 万例, 占全球 30%, 也位居全球第一^[1-2]。肿瘤的预防与治疗已成为世界范围内公共卫生卫生中的研究热点。随着对肿瘤不断

收稿日期 2023-11-27 通信作者 *Tel: 0755-23360150 E-mail: guoxia0504_sz@163.com

**Tel: 020-62789423 E-mail: jchen21@smu.edu.cn

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 82173668, No.82373706)

深入的研究,肿瘤的治疗经历了三大突破性进展,即“肿瘤治疗的三次革命”。第一次革命的放疗与化疗在杀伤肿瘤细胞的同时,连带杀伤正常的人体细胞,给患者带来了巨大的副作用。第二次革命的靶向治疗能够精准地瞄准并打击致癌蛋白,从而特异性地杀灭肿瘤细胞而对正常细胞的影响较小,但肿瘤患者在接受分子靶向治疗后的一定时间内会出现耐药性,从而影响疗效。在放化疗和靶向治疗无法战胜肿瘤的情况下,人们开始将目光转向了人体内的免疫系统,从而诞生了第三次革命的免疫治疗,相关药物的开发成为了目前抗肿瘤药物研究的主流之一^[3–6]。

肿瘤免疫治疗通过激活人体自身免疫系统以对抗肿瘤,具有能够治疗多种类型肿瘤、治疗已经转移的晚期肿瘤、防止肿瘤细胞进化出耐药性从而降低复发率等优势^[3,6]。作为一个热点研究领域,多种免疫治疗策略不断涌现,并且部分已表现出显著的临床疗效,包括免疫检查点阻断剂、过继细胞疗法和肿瘤疫苗等。正常生理条件下,免疫细胞能够识别并杀伤肿瘤细胞,但肿瘤细胞能够通过多种机制逃避免疫系统的监视,发生免疫逃逸,该过程中免疫检查点发挥着重要的作用^[6–8]。细胞程序性死亡受体-1(programmed cell death protein-1, PD-1)/细胞程序性死亡配体-1(programmed cell death ligand-1, PD-L1)是重要的免疫检查点共抑制分子,介导了多种肿瘤细胞的免疫逃逸。抑制 PD-1/PD-L1 通路的肿瘤免疫疗法近年来发展迅速,表现出巨大的临床治疗优势和应用前景^[9–10]。

PD-1 是一种由 288 个氨基酸组成的 I 型跨膜蛋白,包括膜外的 IgV 和 IgC 区域、跨膜区域和膜内区域,主要表达于多种免疫细胞,如 B 细胞、T 细胞、自然杀伤细胞、树突状细胞和肿瘤浸润淋巴细胞等^[11]。PD-L1 作为 PD-1 的内源性配体也属于 I 型

跨膜蛋白,包括与 PD-1 结合的膜外 IgV 区域、跨膜区域和膜内区域,常常表达于多种肿瘤细胞,如黑色素瘤、结肠癌、肺癌、胰腺癌、卵巢癌等^[12–13]。在正常生理条件下,PD-1/PD-L1 通路的主要功能是调节免疫反应的强度至适当的水平,从而使机体能够成功地完成免疫反应,同时避免有害的影响。然而在肿瘤微环境中,肿瘤细胞表面的 PD-L1 与 T 细胞表面的 PD-1 相互作用,导致效应 T 细胞功能降低,抑制抗肿瘤免疫应答,从而使肿瘤得以生长。阻断 PD-1 与 PD-L1 的结合,能够恢复 T 细胞活性,增强机体杀灭肿瘤的能力(图 1)。因此靶向 PD-1/PD-L1 的药物研究如火如荼^[13–16]。

目前,多款单克隆抗体类 PD-1/PD-L1 抑制剂已被批准用于多种肿瘤的治疗,例如,PD-1 单抗 pembrolizumab 已被美国食品药品监督管理局(FDA)批准用于黑色素瘤、头颈部鳞状细胞癌、非小细胞肺癌、三阴性乳腺癌、膀胱癌、经典型霍奇金淋巴瘤等肿瘤的治疗,PD-1 单抗 nivolumab 已被 FDA 批准用于尿路上皮癌、鳞状非小细胞肺癌、结直肠癌、黑色素瘤、肝癌等肿瘤的治疗,PD-L1 单抗 atezolizumab 已被批准用于尿路上皮癌和非小细胞肺癌的治疗,此外还有 camrelizumab、durvalumab、toripalimab 等均已获批上市。然而,抗体类药物存在免疫相关不良反应、组织和肿瘤渗透性差、药物代谢性质差和生产成本高等问题,阻碍了其更广泛的临床应用^[17–18]。小分子抑制剂有望克服抗体类药物的缺陷,近年来获得了广泛关注并发展迅速。国内外多个制药公司、科研院所、大学等机构相继报道了不同结构的小分子 PD-1/PD-L1 抑制剂(图 2),如 MAX-10181、INCB086550、BMS-202、NP-19 等^[19–22]。共晶结构解析阐明了小分子抑制剂的作用模式,这些化合物作用于 PD-L1 胞外区域的表面,诱导 PD-L1 发生二聚化,化合物与疏水空腔形状的

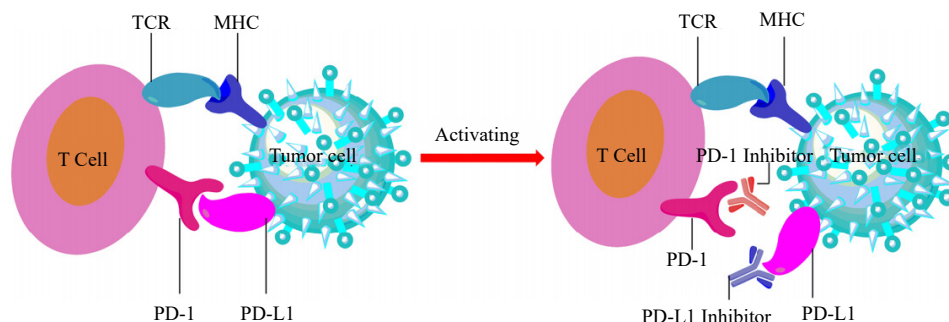


Figure 1 Mechanism of inhibiting the PD-1/PD-L1 pathway in tumor immunotherapy^[15]

TCR: T-cell receptor; MHC: Major histocompatibility complex; PD-1: Programmed cell death protein-1; PD-L1: Programmed cell death ligand-1

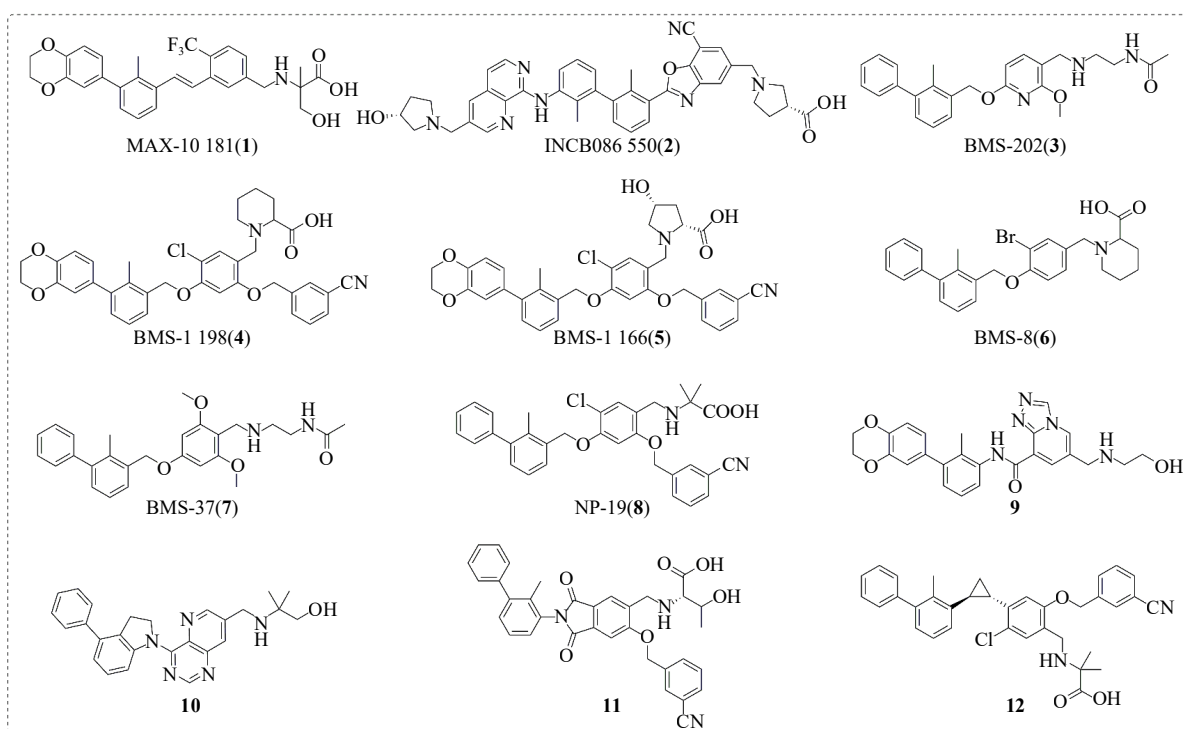


Figure 2 Chemical structures of the representative PD-1/PD-L1 inhibitors

二聚化 PD-L1 结合。二聚化后的 PD-L1/PD-L1 相互作用表面与 PD-1/PD-L1 相互作用表面高度相似, 导致 PD-1 和 PD-L1 无法正常相互作用, 最终阻断 PD-1/PD-L1 信号通路^[23]。尽管 PD-1/PD-L1 小分子抑制剂取得了较大的进展, 但与抗体类药物相比, 其发展远远滞后, 目前仅有少数的小分子抑制剂进入临床试验。此外肿瘤患者对 PD-1/PD-L1 疗法的临床响应率仅为 40%^[24]。除了临床响应率低, 继发性耐药也严重影响了 PD-1/PD-L1 药物的治疗效果^[25-27]。多项研究表明, 联合疗法, 即 PD-1/PD-L1 药物与其他疗法(如化疗、放疗、血管生成抑制剂、其他的免疫检查点抑制剂、靶向药物、干扰素基因激动剂、表观遗传药物等)联合使用, 表现出了优越的抗肿瘤效果以及更高的响应率。然而, 联合疗法时常面临着复杂的药物-药物相互作用、药代动力学性质难以预测、不良反应大和患者依从性差等问题^[14,16,24,28]。因此, 许多研究者尝试寻找其他不同的策略开发靶向 PD-1/PD-L1 通路的药物, 以改善基于 PD-1/PD-L1 药物的治疗效果。例如, 降解剂以降解致病蛋白为作用机制, 较抑制剂具有高活性、高选择性等优势; 双靶向药物在有望保留联合疗法协同抗肿瘤作用机制的同时, 避免上述联合疗法的弊端; 共价抑制剂通过与靶蛋白形成共价键发挥作用, 能够提高药物与靶蛋白的结合力及结合时

间, 从而具有更强的药效。本文综述了靶向 PD-1/PD-L1 的新策略, 包括 PD-L1 降解剂、双功能分子和共价抑制剂, 为基于 PD-1/PD-L1 的药物开发提供参考。

1 PD-L1 降解剂

近年来, 蛋白水解靶向嵌合体 (proteolysis-targeting chimeras, PROTAC) 技术和溶酶体靶向嵌合体 (lysosome-targeting chimeras, LYTAC) 技术被广泛关注, 它们分别利用泛素-蛋白酶体系统和溶酶体通路降解靶蛋白, 在肿瘤治疗领域表现出显著的潜力^[29]。基于这两项技术, 研究者报道了多种靶向 PD-L1 的降解剂。

2020 年, 本课题组根据 BMS-8、BMS-1233、BMS-1198 和泊马度胺的结构, 首次报道了一系列靶向 PD-1/PD-L1 通路的 PROTAC 分子^[30]。其中, 多个化合物对 PD-1/PD-L1 相互作用具有明显的抑制活性。进一步 Western blot 分析发现偶联 BMS-1198 和泊马度胺的化合物 P22 (**13**, 图 3-A) 通过溶酶体途径诱导 PD-L1 的降解, 这与经典的 PROTAC 分子依赖于泛素-蛋白酶体系统的降解机制不同。

2021 年, Wang 等^[31]基于 BMS-37 和沙利度胺的结构, 设计了一个 PROTAC 分子 21a (**14**, 图 3-B)。Western blot 分析表明化合物 21a 在多种肿瘤细胞

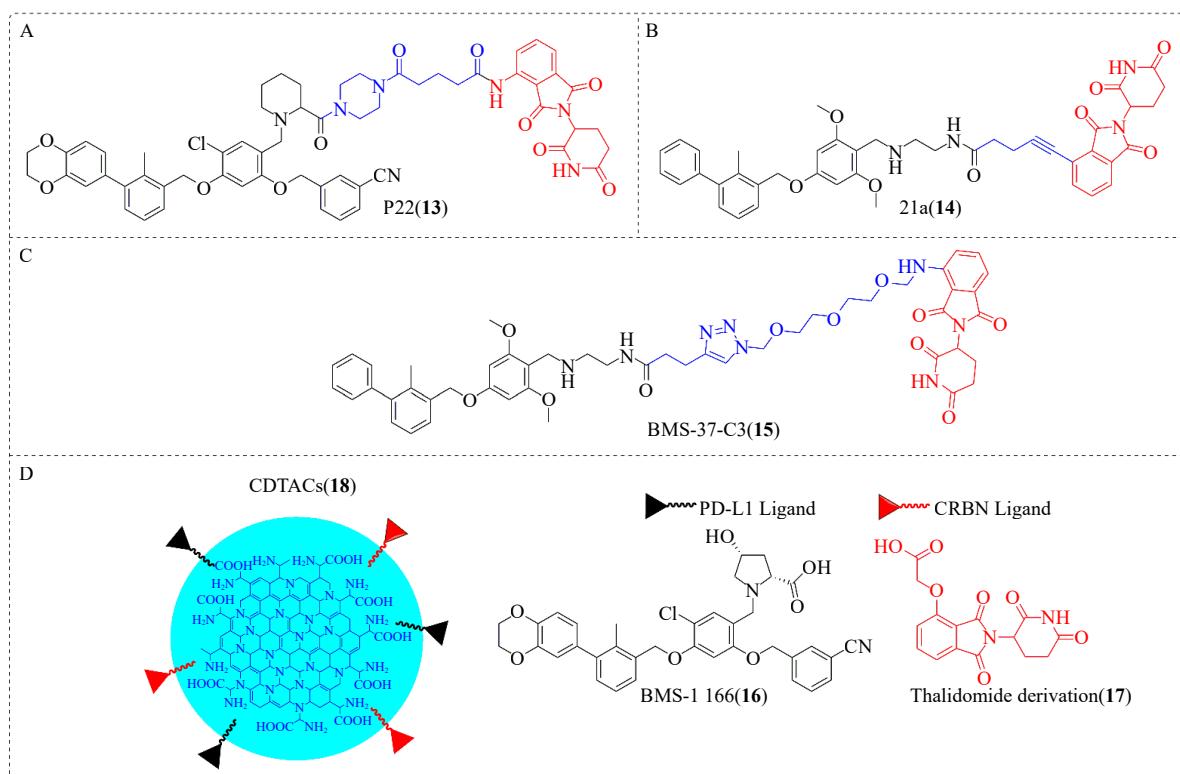


Figure 3 PROTACs (A, B and C) and CDTACs (D) for targeting PD-L1 degradation. The ligands of PD-L1 are shown in black; the ligands of E3 ubiquitin ligase are shown in red; the linkers are shown in blue

CDTAC: Carbon-dot-based proteolysis-targeting chimeras; PD-L1: Programmed cell death ligand-1; CRBN: Cereblon

(包括 MC-38、Skno-1、Kasumi-1、HL-60、MCF-7、MB-49、SW-480 和 PC-3 细胞)中都能有效诱导泛素-蛋白酶体途径的 PD-L1 降解。此外,在皮下移植 MC-38 细胞的 C57BL/6 小鼠模型中,静脉注射化合物 21a 表现出明显的抗肿瘤活性。

最近,基于不同的 PD-L1 配体和 E3 连接酶配体(CRBN、VHL、cIAP 和 MDM2),Liu 等^[32]设计了 4 个系列的 PROTAC 分子。其中,偶联 BMS-37 和泊马度胺的化合物 BMS-37-C3(**15**,图 3-C)表现出最强的 PD-L1 降解活性,降解能力依赖于泛素-蛋白酶体系统。流式细胞分析发现 BMS-37-C3 也降低了 B16-F10 和 A375 细胞膜上的 PD-L1 表达水平。此外,在 T 细胞和 A375 细胞共培养模型中,BMS-37-C3 增强了 T 细胞对 A375 细胞的杀伤能力。

在 PROTAC 的基础上,Su 等^[33]通过将 BMS-1166 和沙利度胺偶联到碳点(carbon-dot, CD)的氨基上,设计了能够降解细胞膜 PD-L1 的 PROTAC 分子(CDTACs)(**18**,图 3-D)。CDTACs 首先与细胞膜上的 PD-L1 结合并通过内吞到溶酶体,然后 PD-L1 被降解,CDTACs 则被释放。在细胞质中,

CDTACs 与新合成的 PD-L1 结合,并诱导 PD-L1 泛素化,最终导致 PD-L1 被蛋白酶体降解。

同样在 PROTAC 的基础上,Cotton 等^[34]开发了一类基于抗体的 PROTAC(antibody-based PROTAC, AbTAC),其通过招募细胞膜上的 E3 泛素连接酶从而降解细胞膜蛋白。他们利用 PD-L1 抗体 atezolizumab 和细胞膜上的 E3 泛素连接酶 RNF43 的重组抗体,设计了一个双特异性抗体 AC-1。Western blot 实验表明,在 MDA-MB-231 细胞中,AC-1 通过溶酶体和 RNF43 依赖的方式有效诱导 PD-L1 降解。此外,在 HCC827 和 T24 细胞中,AC-1 也都明显诱导了 PD-L1 降解,表明该技术广泛的细胞适用性。

不同于典型的 PROTAC,Banik 等^[35]开发的 LYTAC(**19**)能够通过溶酶体途径降解细胞膜外和细胞膜蛋白(图 4)。LYTAC 是一种异双功能分子,包括 3 个部分:与靶蛋白结合的小分子或抗体、与细胞表面溶酶体靶向受体(cell-surface lysosome-targeting receptor, LTR)结合的配体以及连接二者的连接子。在 LYTAC 作用下,靶蛋白与 LYTAC

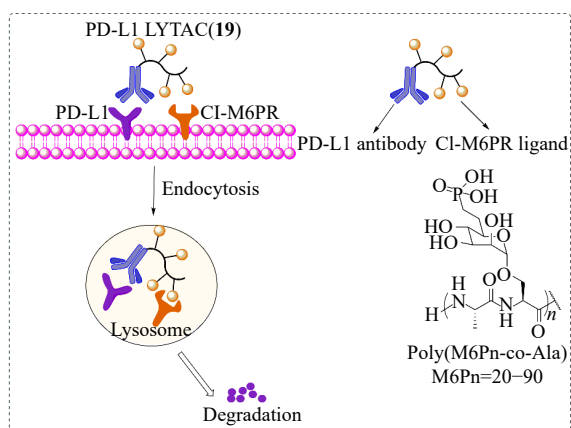


Figure 4 Mechanism of degrading PD-L1 by LYTAC

LYTAC: Lysosome-targeting chimeras; CI-M6PR: Cation-independent mannose-6-phosphate receptor

和 LTR 形成三元复合物, 随后发生内吞和溶酶体降解。基于以上原理, Banik 等^[35] 利用非阳离子依赖性甘露糖-6-磷酸受体 (cation-independent mannose-6-phosphate receptor, CI-M6PR) 作为细胞表面的 LTR, 将 PD-L1 抗体 atezolizumab 与 CI-M6PR 的配体糖多肽 (glycopolypeptide) 偶联, 获得了靶向 PD-L1 的 LYTAC, 其在 MDA-MB-231 和 HDLM-2 细胞株中均通过溶酶体途径明显降低了细胞膜 PD-L1 的水平。

与 LYTAC 相似, Zheng 等^[36] 利用整合素促进的溶酶体降解策略 (integrin-facilitated lysosomal degradation, IFLD), 设计了能够降解细胞外和细胞

膜蛋白的 IFLD 分子 (20~22, 图 5)。IFLD 分子包括靶蛋白配体、整合素配体和连接子。在 IFLD 分子作用下, 靶蛋白与 IFLD 分子和整合素形成三元复合物, 随后发生内吞和溶酶体降解。Zheng 等^[36] 设计了一种环肽 cRGD 作为整合素 $\alpha_v\beta_3$ 的配体, 通过不同的连接子将其与 BMS-8 偶联, 得到了 3 个靶向 PD-L1 的 IFLD 分子。其中, BMS-L1-RGD 在 MDA-MB-231 细胞中表现出最强的 PD-L1 降解活性。此外, 在移植 B16-F10 细胞的 C57BL/6J 小鼠模型中, BMS-L1-RGD 显著抑制了肿瘤生长, 并诱导 PD-L1 降解。

2 基于 PD-L1 的双功能分子

2.1 PD-L1/CXCL12 双靶点抑制剂

趋化因子配体 12 (C-X-C motif chemokine ligand 12, CXCL12) 是一种由基质细胞产生的重要趋化因子。CXCL12 与其受体 (例如 CXCR4 或 CXCR7) 结合会触发多个下游信号分子 (例如 PI3K、AKT、MEK/ERK 等) 的激活, 并对趋化性、基因表达、细胞迁移和增殖等方面产生重大影响。CXCL12 还可抑制 T 细胞浸润, 在肿瘤免疫逃逸中发挥着至关重要的作用^[37-39]。因此, CXCL12 已成为肿瘤免疫治疗的潜在靶点之一。此外, 研究表明 PD-1/PD-L1 和 CXCL12/CXCR4 通路的双重阻断具有协同抗肿瘤的效果, 能够通过解除肿瘤微环境中的免疫抑制提高卵巢癌小鼠的生存期^[40]。为此, 本课题组最近

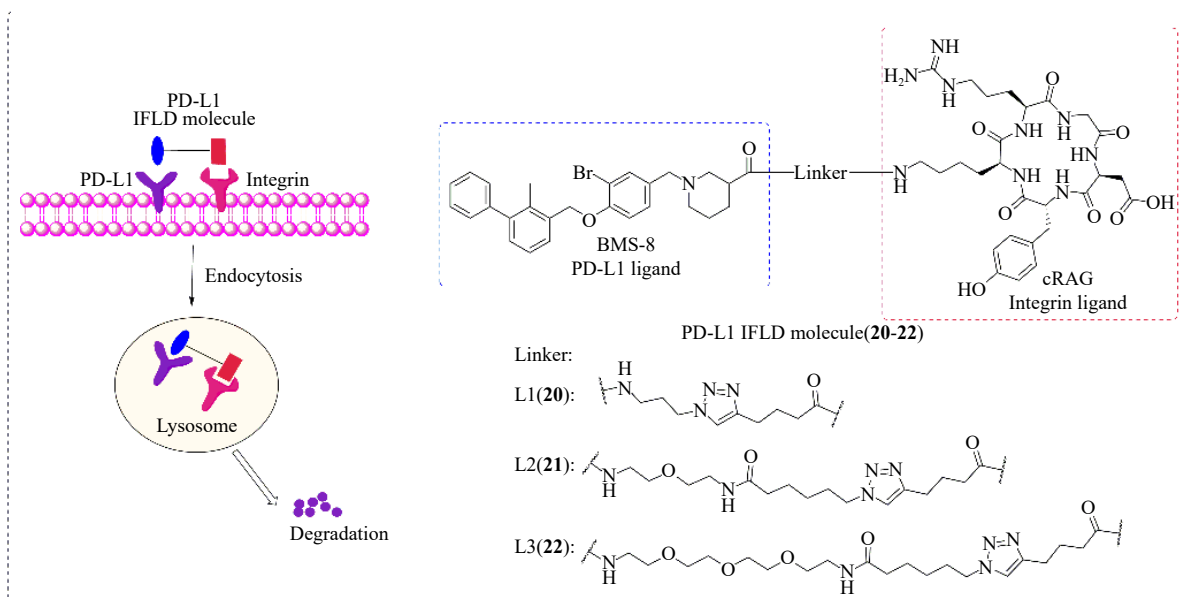


Figure 5 Mechanism of degrading PD-L1 by IFLD molecules

IFLD: Integrin-facilitated lysosomal degradation

设计了一系列 PD-L1/CXCL12 双靶点抑制剂。其中, 化合物 CP21(**23**, 图 6) 表现出最强的 PD-1/PD-L1 抑制活性, 同时对 CXCL12 具有较高的亲和力。在 Jurkat T/HepG2 细胞共培养模型中, CP21 剂量依赖地诱导了 HepG2 细胞死亡。在移植 B16-F10 细胞和 CT-26 细胞的小鼠模型中, CP21 都表现出了显著的抗肿瘤活性^[41]。

2.2 PD-L1/HDAC 双靶点抑制剂

组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase, HDAC)是表观遗传学的重要靶点之一, 在细胞迁移、增殖、分化、基因调控、转录和转移等许多生理和病理过程中起着重要作用^[42–43]。有研究表明, HDAC6 能够上调肿瘤微环境中 PD-L1 的表达, 导致免疫逃逸。抑制或敲除 HDAC6 可以降低 STAT3 的磷酸化水平, 减少肿瘤组织中 PD-L1 的表达, 并提高肿瘤免疫治疗的应答率^[44]。目前, 已经有几种 HDAC6 抑制剂正在进行抗肿瘤的临床前或临床试验研

究。然而, HDAC6 抑制剂单一治疗效果有限, 常与 PD-1/PD-L1 抗体联合使用, 或设计成双靶点/多靶点药物。例如, HDAC6 抑制剂(如 ACY-1215 和 ACY-241)与 PD-1 抗体(如 nivolumab)联合使用的疗法已进入临床研究(NCT02635061)。2021 年, Bian 等^[45]设计了一系列的 PD-L1/HDAC6 双靶点抑制剂。其中, 化合物 Bian-10(**24**, 图 6)表现出最强的 PD-1/PD-L1 和 HDAC6 抑制活性。在移植 CT26 细胞的小鼠模型中, Bian-10 表现出强效的抗肿瘤活性, 且优于 BMS202(PD-1/PD-L1 抑制剂)和 SAHA(HDAC 抑制剂)单一治疗的效果。

2.3 PD-L1/IDO1 双靶点抑制剂

吲哚胺-2,3-双加氧酶 1(indoleamine 2,3-dioxygenase 1, IDO1)能够将色氨酸转化为犬尿氨酸, 而色氨酸的耗竭和犬尿氨酸的聚积能够诱导 T 细胞失活, 抑制免疫系统, 因此 IDO1 已被证明为肿瘤免疫治疗的潜在靶点^[46]。同时抑制 IDO1 和阻

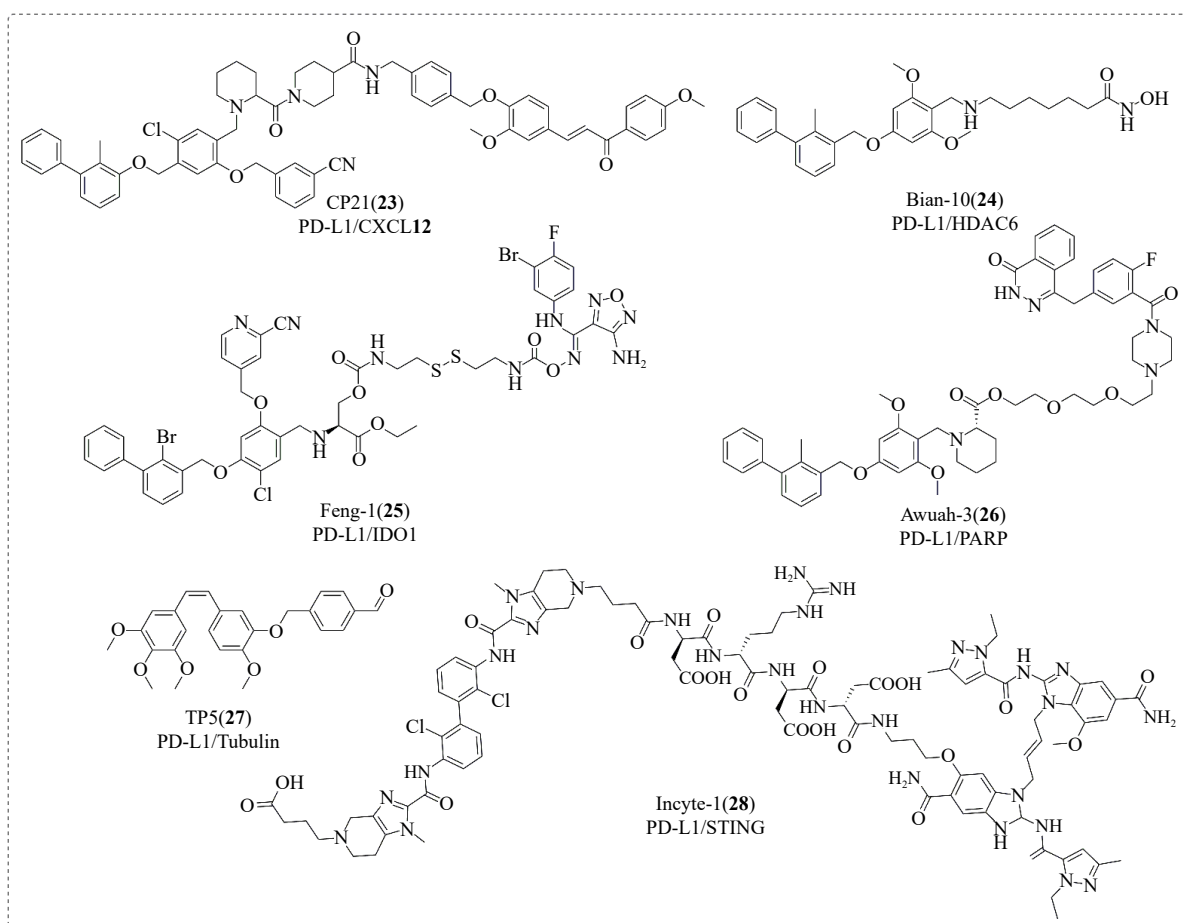


Figure 6 PD-L1-based bifunctional molecules

CXCL12: C-X-C motif chemokine ligand 12; HDAC6: Histone deacetylase 6; IDO1: Indoleamine 2,3-dioxygenase 1; PARP: Poly ADP-ribose polymerase; STING: Stimulator of interferon genes

断 PD-1/PD-L1 通路能够提高抗肿瘤免疫效果^[47-48]。2021 年, Feng 等^[49] 通过利用可裂解的二硫键连接子设计合成了一系列 PD-L1/IDO1 双靶向小分子前药。在肿瘤微环境或肿瘤细胞内, 这些前药的二硫键断裂, 释放出 PD-L1 抑制剂和 IDO1 抑制剂, 因此有望在实现协同抗肿瘤作用的同时, 有效降低药物的靶点副作用。在移植 CT26 细胞的小鼠模型中, 化合物 Feng-1 (**25**, 图 6) 有效抑制了肿瘤生长, 并且优于单独使用 PD-L1 抑制剂或 IDO1 抑制剂的组别。机制研究发现, 当小鼠接受化合物 Feng-1 治疗时, 脾脏内调节性 T 细胞(CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) 数量减少, 表明双靶点化合物 Feng-1 可通过抑制 IDO1 活性有效地抑制调节性 T 细胞的产生。

2.4 PD-L1/PARP 双靶点抑制剂

最近的一项研究发现, 聚腺苷二磷酸核糖聚合酶 (poly ADP-ribose polymerase, PARP) 抑制剂和 PD-1/PD-L1 抑制剂联合使用比单药治疗具有更好的抗肿瘤效果, 机制研究表明, PARP 抑制剂通过失活 GSK3 β 上调 PD-L1, 导致肿瘤细胞发生免疫逃逸^[50]。目前, 多个联合使用 PD-1/PD-L1 抗体 (如 tislelizumab、durvalumab) 和 PARP 抑制剂 (如 BGB-290、olaparib、niraparib) 的疗法已进入了临床研究 (NCT02660034、NCT02484404、NCT02657889)。此外, Ofori 等^[51] 设计了 PD-L1/PARP 双靶点抑制剂 (**26**, 图 6), 在 MDA-MB-231 细胞中都显著诱导了 PD-L1 的降解。与 PARP 抑制剂和 PD-L1 抑制剂单靶点药物相比, 这些双靶点抑制剂对多种肿瘤细胞都表现出更强的抗增殖活性。

2.5 PD-L1/tubulin 双靶点抑制剂

微管由 α -微管蛋白 (tubulin) 和 β -tubulin 组成, 已被确定为一个有效的肿瘤治疗靶点。研究表明, 微管在机体免疫反应中扮演着重要的角色, 联合使用 tubulin 抑制剂和 PD-1/PD-L1 抗体, 可以通过增加肿瘤的抗原呈递和增强效应 T 细胞的浸润实现协同的抗肿瘤作用^[52-53]。2020 年, 本课题组设计了一系列 combretastatin A-4 (CA-4) 的衍生物作为 PD-L1/tubulin 双靶点抑制剂^[54]。其中, TP5 (**27**, 图 6) 对多种肿瘤细胞 (HepG2、MC38, 等) 都表现出了最强的抗增殖活性。机制研究证明了 TP5 能够有效抑制 tubulin 聚合, 抑制 HepG2 细胞的迁移和集落形成, 诱导凋亡并阻滞细胞周期在 G₂/M 期。此外, TP5 具有中度的抗 PD-1/PD-L1 活性。在移植 B16-F10

细胞的人源化 PD-1 C57BL/6J-*Pdcd1^{em1(hPDCD1)/Smoc}* 小鼠模型中, TP5 有效抑制了肿瘤生长。

2.6 PD-L1/STING 双靶向分子

干扰素基因刺激因子 (stimulator of interferon genes, STING) 是一种重要的信号适配分子, 能够通过响应与组织或细胞损伤相关的某些危险信号, 对抗感染威胁^[55]。研究发现在肿瘤微环境中, cGAS-STING 通路的激活能够诱导免疫细胞如自然杀伤细胞 (NK 细胞) 和 T 细胞浸润, 从而产生抗肿瘤反应, 抑制肿瘤进展。因此, STING 已成为先天免疫系统中一个令人关注的靶点。STING 激动剂具有作为肿瘤免疫治疗药物的潜力, 可作为肿瘤疫苗佐剂, 也可与免疫检查点抑制剂 (如抗 CTLA-4 免疫疗法、抗 PD-L1 免疫疗法或 CAR-T 细胞疗法) 联用以进一步提高其治疗效果^[14,55-56]。最近, Incyte 公司公开了一系列 PD-L1/STING 双靶向化合物用于免疫治疗^[57]。这些化合物由 3 部分组成: 结合到细胞表面 PD-L1 并诱导 PD-L1 内化的 PD-L1 抑制剂部分, 活化 STING 的 STING 激动剂部分和肽类模拟连接基团 (**28**, 图 6)。机制研究表明, PD-L1 抑制剂部分不仅可以阻断 PD-1/PD-L1 的相互作用, 还可以在靶细胞群内诱导 PD-L1 内化。这个内化过程又可以选择性地将 STING 激动剂递送到表达 PD-L1 的细胞, 从而实现对肿瘤的双重靶向作用。STING 激动剂的一个主要不良反应是引发细胞因子风暴的发生, 而 PD-L1/STING 双靶向分子可将 STING 激动剂特异性靶向肿瘤微环境, 从而避免全身性毒性。

3 PD-L1 共价抑制剂

共价药物通过共价键与靶蛋白结合, 与传统药物的非共价相互作用相比, 具有多种更加理想的药物特性, 如增加的生化效率和效力、延长的作用时间、减少给药剂量和给药频率、完全失活靶点并有可能抑制难以成药的靶点。2020 年, Li 等^[58] 通过遗传密码扩增, 将一个潜在的生物反应性氨基酸氟磺酸盐-L-酪氨酸 (FSY) 融合到 PD-1 中, 利用接近激活反应疗法 (proximity-enabled reactive therapeutics, PERx), 设计了一个靶向 PD-L1 的共价分子。只有当 PD-1 与 PD-L1 相互靠近时, FSY 才与 PD-L1 的 His69 发生共价结合, 从而阻断 PD-1 与 PD-L1 的结合。体外实验中, FSY 提高了 T 细胞活化水平。体内研究表明 FSY 具有显著的抗肿瘤活性。

4 总结与展望

靶向 PD-1/PD-L1 通路的免疫疗法已被证明是一种治疗肿瘤的有效策略,吸引着持续的研究兴趣。其中,抑制 PD-1/PD-L1 相互作用的抗体药物已表现出临床疗效,但固有缺陷阻碍了其进一步的发展。小分子药物有望克服抗体药物的缺陷,但其发展滞后。现在的 PD-1/PD-L1 小分子抑制剂的药代动力学性质普遍较差,这可能是由于这些分子的疏水性较高所致。此外,PD-1/PD-L1 的结合界面较为平坦和疏水,这也给小分子药物的开发增加了难度。因此,利用不同的策略开发靶向 PD-1/PD-L1 通路的各种药物尤为重要。

PD-L1 降解剂首先与 PD-L1 结合,然后通过泛素-蛋白酶体系统或溶酶体途径降解 PD-L1。理论上,PROTAC 用于降解细胞内蛋白,但 PD-L1 是从细胞质到细胞膜不断循环和更新的,因此仍然有必要开发靶向 PD-L1 的 PROTAC 分子。此外,设计结合 PD-L1 细胞内区域的分子将有可能实现利用 PROTAC 降解细胞膜上的 PD-L1。与 PROTAC 不同,LYTAC 和 IFLD 策略通过利用细胞膜上的转运蛋白降解了细胞膜 PD-L1。探索更多的转运蛋白及其配体将加速相关技术的发展。诱导 PD-L1 内化并降解的小分子抑制剂仍处于早期研发阶段,尚缺乏有效的设计策略。基于 PD-L1 的双功能分子通过同时靶向相关的肿瘤信号分子,有望通过协同作用提高抗肿瘤效果,但如何巧妙地设计化合物以实现双靶点作用是一大挑战。目前仅有复星医药的 PD-L1/FGFR 双靶向小分子抑制剂进入临床试验,仍需要更多的机制研究、药效评价及安全性评估等以加速基于 PD-L1 的双功能分子的研究。另外,PD-L1 共价抑制剂有望提高化合物与 PD-L1 的结合力,延长作用时间,但目前相关的研究报道较少。总的来说,开发不同的策略靶向 PD-1/PD-L1 通路是目前该领域研究中的热点,有望提高肿瘤免疫治疗的效果,给肿瘤患者带来希望。

References

- [1] Siegel RL, Miller KD, Wagle NS, *et al.* Cancer statistics, 2023[J]. *CA Cancer J Clin*, 2023, **73**: 17-48.
- [2] Ugai T, Sasamoto N, Lee HY, *et al.* Is early-onset cancer an emerging global epidemic? Current evidence and future implications[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2022, **19**(10): 656-673.
- [3] Zhang YY, Zhang ZM. The history and advances in cancer immunotherapy: understanding the characteristics of tumor-infiltrating immune cells and their therapeutic implications[J]. *Cell Mol Immunol*, 2020, **17**(8): 807-821.
- [4] Fang YL, Yu AH, Ye L, *et al.* Research progress in tumor targeted immunotherapy[J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2021, **18**(8): 1067-1090.
- [5] Lee YT, Tan YJ, Oon CE. Molecular targeted therapy: treating cancer with specificity[J]. *Eur J Pharmacol*, 2018, **834**: 188-196.
- [6] Rui R, Zhou LQ, He SM. Cancer immunotherapies: advances and bottlenecks[J]. *Front Immunol*, 2023, **14**: 1212476.
- [7] Tan SZ, Li DP, Zhu X. Cancer immunotherapy: pros, cons and beyond[J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, **124**: 109821.
- [8] Wu YR, Yang ZC, Cheng K, *et al.* Small molecule-based immunomodulators for cancer therapy[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2022, **12**(12): 4287-4308.
- [9] Lin QY, Wang XW, Hu Y. The opportunities and challenges in immunotherapy: insights from the regulation of PD-L1 in cancer cells[J]. *Cancer Lett*, 2023, **569**: 216318.
- [10] Wu Q, Jiang L, Li SC, *et al.* Small molecule inhibitors targeting the PD-1/PD-L1 signaling pathway[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2021, **42**(1): 1-9.
- [11] Chen WS, Huang Y, Pan WT, *et al.* Strategies for developing PD-1 inhibitors and future directions[J]. *Biochem Pharmacol*, 2022, **202**: 115113.
- [12] Ghosh C, Luong G, Sun Y. A snapshot of the PD-1/PD-L1 pathway[J]. *J Cancer*, 2021, **12**(9): 2735-2746.
- [13] Zhao X, Bao YL, Meng B, *et al.* From rough to precise: PD-L1 evaluation for predicting the efficacy of PD-1/PD-L1 blockades[J]. *Front Immunol*, 2022, **13**: 920021.
- [14] Yi M, Zheng XL, Niu MK, *et al.* Combination strategies with PD-1/PD-L1 blockade: current advances and future directions[J]. *Mol Cancer*, 2022, **21**(1): 28.
- [15] Cheng BB, Xiao Y, Xue MM, *et al.* Recent advances in the development of PD-L1 modulators: degraders, downregulators, and covalent inhibitors[J]. *J Med Chem*, 2020, **63**(24): 15389-15398.
- [16] Zou W, Luo X, Gao MY, *et al.* Optimization of cancer immunotherapy on the basis of programmed death ligand-1 distribution and function[J]. *Br J Pharmacol*, 2023. doi: [10.1111/bph.16054](https://doi.org/10.1111/bph.16054).
- [17] Yang J, Hu LQ. Immunomodulators targeting the PD-1/PD-L1 protein-protein interaction: from antibodies to small molecules[J]. *Med Res Rev*, 2019, **39**(1): 265-301.
- [18] Jiang MZ, Liu M, Liu GD, *et al.* Advances in the structural characterization of complexes of therapeutic antibodies with PD-1 or PD-L1[J]. *MAbs*, 2023, **15**(1): 2236740.
- [19] Sasmal P, Kumar Babasahib S, Prashantha Kumar BR, *et al.*

- Biphenyl-based small molecule inhibitors: novel cancer immunotherapeutic agents targeting PD-1/PD-L1 interaction[J]. *Bioorg Med Chem*, 2022, **73**: 117001.
- [20] Song ZL, Liu B, Peng X, *et al.* Design, synthesis, and pharmacological evaluation of biaryl-containing PD-1/PD-L1 interaction inhibitors bearing a unique difluoromethyleneoxy linkage[J]. *J Med Chem*, 2021, **64**(22): 16687-16702.
- [21] Sun CL, Cheng Y, Liu XJ, *et al.* Novel phthalimides regulating PD-1/PD-L1 interaction as potential immunotherapy agents[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2022, **12**(12): 4446-4457.
- [22] Shaabani S, Huizinga HPS, Butera R, *et al.* A patent review on PD-1/PD-L1 antagonists: small molecules, peptides, and macrocycles (2015-2018)[J]. *Expert Opin Ther Pat*, 2018, **28**(9): 665-678.
- [23] Zak KM, Grudnik P, Guzik K, *et al.* Structural basis for small molecule targeting of the programmed death ligand 1 (PD-L1)[J]. *Oncotarget*, 2016, **7**(21): 30323-30335.
- [24] Wu ML, Huang QR, Xie Y, *et al.* Improvement of the anti-cancer efficacy of PD-1/PD-L1 blockade via combination therapy and PD-L1 regulation[J]. *J Hematol Oncol*, 2022, **15**(1): 24.
- [25] Sun JY, Zhang DK, Wu SQ, *et al.* Resistance to PD-1/PD-L1 blockade cancer immunotherapy: mechanisms, predictive factors, and future perspectives[J]. *Biomark Res*, 2020, **8**: 35.
- [26] Yuan Y, Adam A, Zhao C, *et al.* Recent advancements in the mechanisms underlying resistance to PD-1/PD-L1 blockade immunotherapy[J]. *Cancers*, 2021, **13**(4): 663.
- [27] Pang K, Shi ZD, Wei LY, *et al.* Research progress of therapeutic effects and drug resistance of immunotherapy based on PD-1/PD-L1 blockade[J]. *Drug Resist Updat*, 2023, **66**: 100907.
- [28] Tang Q, Chen Y, Li XJ, *et al.* The role of PD-1/PD-L1 and application of immune-checkpoint inhibitors in human cancers[J]. *Front Immunol*, 2022, **13**: 964442.
- [29] Xue Y, Bolinger AA, Zhou J. Novel approaches to targeted protein degradation technologies in drug discovery[J]. *Expert Opin Drug Discov*, 2023, **18**(4): 467-483.
- [30] Cheng BB, Ren YC, Cao H, *et al.* Discovery of novel resorcinol diphenyl ether-based PROTAC-like molecules as dual inhibitors and degraders of PD-L1[J]. *Eur J Med Chem*, 2020, **199**: 112377.
- [31] Wang YB, Zhou YY, Cao S, *et al.* In vitro and in vivo degradation of programmed cell death ligand 1 (PD-L1) by a proteolysis targeting chimera (PROTAC)[J]. *Bioorg Chem*, 2021, **111**: 104833.
- [32] Liu Y, Zheng MZ, Ma ZL, *et al.* Design, synthesis, and evaluation of PD-L1 degraders to enhance T cell killing activity against melanoma[J]. *Chin Chem Lett*, 2023, **34**(5): 107762.
- [33] Su W, Tan MX, Wang ZH, *et al.* Targeted degradation of PD-L1 and activation of the STING pathway by carbon-dot-based PROTACs for cancer immunotherapy[J]. *Angew Chem Int Ed*, 2023, **62**(11): e202218128.
- [34] Cotton AD, Nguyen DP, Gramespacher JA, *et al.* Development of antibody-based PROTACs for the degradation of the cell-surface immune checkpoint protein PD-L1[J]. *J Am Chem Soc*, 2021, **143**(2): 593-598.
- [35] Banik SM, Pedram K, Wisnovsky S, *et al.* Lysosome-targeting chimaeras for degradation of extracellular proteins[J]. *Nature*, 2020, **584**(7820): 291-297.
- [36] Zheng JW, He WY, Li J, *et al.* Bifunctional compounds as molecular degraders for integrin-facilitated targeted protein degradation[J]. *J Am Chem Soc*, 2022, **144**(48): 21831-21836.
- [37] Mousavi A. CXCL12/CXCR4 signal transduction in diseases and its molecular approaches in targeted-therapy[J]. *Immunol Lett*, 2020, **217**: 91-115.
- [38] Zhou WQ, Guo SC, Liu ML, *et al.* Targeting CXCL12/CXCR4 axis in tumor immunotherapy[J]. *Curr Med Chem*, 2019, **26**(17): 3026-3041.
- [39] Mehrpour M. The contributory roles of the CXCL12/CXCR4/CXCR7 axis in normal and malignant hematopoiesis: a possible therapeutic target in hematologic malignancies[J]. *Eur J Pharmacol*, 2022, **920**: 174831.
- [40] Zeng Y, Li BH, Liang YY, *et al.* Dual blockade of CXCL12-CXCR4 and PD-1-PD-L1 pathways prolongs survival of ovarian tumor-bearing mice by prevention of immunosuppression in the tumor microenvironment[J]. *FASEB J*, 2019, **33**(5): 6596-6608.
- [41] Cheng BB, Wang W, Liu T, *et al.* Bifunctional small molecules targeting PD-L1/CXCL12 as dual immunotherapy for cancer treatment[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, **8**(1): 91.
- [42] Ramaiah MJ, Tangutur AD, Manyam RR. Epigenetic modulation and understanding of HDAC inhibitors in cancer therapy[J]. *Life Sci*, 2021, **277**: 119504.
- [43] Shen C, Li M, Duan YJ, *et al.* HDAC inhibitors enhance the anti-tumor effect of immunotherapies in hepatocellular carcinoma[J]. *Front Immunol*, 2023, **14**: 1170207.
- [44] Yussuf Khamis M, Wu HP, Ma Q, *et al.* Overcome the tumor immunotherapy resistance by combination of the HDAC6 inhibitors with antitumor immunomodulatory agents[J]. *Bioorg Chem*, 2021, **109**: 104754.
- [45] Bian JL, Bi XL, Wang M, *et al.* Dual PD-1/PD-L1 & HDACs inhibitors, and their preparation methods and applications: CN113387840A [P]. 2021-09-14.
- [46] Anu RI, Shiu KK, Khan KH. The immunomodulatory role of IDO1-Kynurenine-NAD⁺ pathway in switching cold tumor microenvironment in PDAC[J]. *Front Oncol*, 2023, **13**: 1142838.
- [47] Abdulla M, Alexsson A, Sundström C, *et al.* PD-L1 and IDO1 are potential targets for treatment in patients with primary diffuse large B-cell lymphoma of the CNS[J]. *Acta Oncol*, 2021, **60**(4): 531-538.

- [48] Liang XW, Gao HW, Xiao J, *et al.* Abrine, an IDO1 inhibitor, suppresses the immune escape and enhances the immunotherapy of anti-PD-1 antibody in hepatocellular carcinoma[J]. *Front Immunol*, 2023, **14**: 1185985.
- [49] Feng ZQ, Chen XG, Zhou C, *et al.* Compounds contained disulfur bond, their preparation methods and pharmaceutical compositions and applications: CN115073442A[P]. 2022-09-20.
- [50] Jiao SP, Xia WY, Yamaguchi H, *et al.* PARP inhibitor upregulates PD-L1 expression and enhances cancer-associated immunosuppression[J]. *Clin Cancer Res*, 2017, **23**(14): 3711-3720.
- [51] Ofori S, Awuah SG. Small-molecule poly(ADP-ribose) polymerase and PD-L1 inhibitor conjugates as dual-action anti-cancer agents[J]. *ACS Omega*, 2019, **4**(7): 12584-12597.
- [52] Page DB, Bear H, Prabhakaran S, *et al.* Two may be better than one: PD-1/PD-L1 blockade combination approaches in metastatic breast cancer[J]. *NPJ Breast Cancer*, 2019, **5**: 34.
- [53] Hayashi H, Nakagawa K. Combination therapy with PD-1 or PD-L1 inhibitors for cancer[J]. *Int J Clin Oncol*, 2020, **25**(5): 818-830.
- [54] Yang XC, Cheng BB, Xiao Y, *et al.* Discovery of novel CA-4 analogs as dual inhibitors of tubulin polymerization and PD-1/PD-L1 interaction for cancer treatment[J]. *Eur J Med Chem*, 2021, **213**: 113058.
- [55] Zhang H, You QD, Xu XL. Targeting Stimulator of interferon genes (STING): a medicinal chemistry perspective[J]. *J Med Chem*, 2020, **63**(8): 3785-3816.
- [56] Samson N, Ablasser A. The cGAS-STING pathway and cancer[J]. *Nat Cancer*, 2022, **3**(12): 1452-1463.
- [57] Wu LX, Li ZW, Yao WQ. PD-L1/STING Conjugates and methods of use: US11596692[P]. 2023-03-07.
- [58] Li QK, Chen Q, Klauser PC, *et al.* Developing covalent protein drugs via proximity-enabled reactive therapeutics[J]. *Cell*, 2020, **182**(1): 85-97. e16.



[专家介绍] 郭霞, 医学博士, 药学博士后, 南方医科大学肿瘤学研究员, 南方医科大学博士生导师, 博士后导师, 深圳市高层次人才。南方医科大学深圳医院科技创新部部长, 深圳市病毒肿瘤学重点实验室副主任, 一直致力于病毒相关肿瘤以及肿瘤免疫代谢微环境、肿瘤表观遗传相关的研究工作。承担了肿瘤相关方面的多项课题, 包括国家自然科学基金 3 项, 霍英东创新性基础基金项目 1 项, 国家博士后基金 1 项、深圳市科创委面上项目 2 项等, 以第一或通信作者在 *Advanced Science*(IF:15.1)、*Cancer Letter*(IF:9.7)、*J Exp Clin Cancer Res*(IF:12.5)、*Int J Biol Sci*(IF:9.2)、*PLOS Pathogens*(IF:6.7)、*Biosensor and Bioelectronics*(IF:12.6) 等期刊发表了 30 余篇, 专利 3 项, 获得省科技进步三等奖。



[专家介绍] 陈建军, 教授, 博士生导师, 2017 年入选中组部青年海外高层次人才, 南方医科大学药学院药物化学系主任、药物设计与发现研究创新群体主任, 曾在美国担任正式教职(Tenure-track)。主要研究方向为肿瘤/免疫小分子调节剂的设计与发现。主持美国 NIH SC3、中国国家自然科学基金面上项目等 6 项国家级课题。在 *STTT*、*APSB*、*J Med Chem*、*Pharmacol Res* 等高水平期刊发表 SCI 论文 120 余篇;2021-2023 连续 3 年入选全球前 2% 科学家。申请和授权 30 多项中外专利, 转让 5 项。担任 *J Med Chem* 编委、药学报(*APSB*)青年编委、广东省药学会药物化学委员会副主任委员等学术兼职。主导发现的原创小分子候选药物在美国进入多项临床研究并申请 EUA; 主持发明的 20 多个工具化合物被 MCE、陶素、InvivoChem 等公司收录并进行全球销售。