

肿瘤免疫治疗靶点 CD73 及其抑制剂研究进展

王文泽¹, 陈跃鹏¹, 岑丽芳¹, 邹毅^{1,2*}, 徐云根^{1,2*} (1.中国药科大学药物化学系, 南京 211198; 2.江苏省药物分子设计与成药性优化重点实验室, 南京 211198)

摘要: 腺苷在多种疾病中具有免疫抑制作用, 而细胞表面的胞外-5'-核苷酸酶 (CD73) 是催化细胞外腺苷生成的限速酶。CD73 在调节性 T 细胞、B 细胞、巨噬细胞和自然杀伤细胞等多种免疫细胞中发挥重要的肿瘤免疫调节作用。在肿瘤微环境中, CD73 介导的腺苷途径在癌症恶化过程中发挥重要的信号传导功能, 使 CD73 成为一种新的免疫检查点。因此, 抑制 CD73 作为新型癌症免疫疗法的前景被广泛看好, 目前多种单克隆抗体和小分子抑制剂已处于临床研究阶段。本综述全面总结了 CD73 小分子抑制剂的研究进展, 可为新型 CD73 抑制剂的开发提供指导。

关键词: CD73; 腺苷; 小分子抑制剂; 癌症免疫治疗

中图分类号: R969 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2024)13-1864-15

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20230605

引用本文: 王文泽, 陈跃鹏, 岑丽芳, 等. 肿瘤免疫治疗靶点 CD73 及其抑制剂研究进展[J]. 中国现代应用药学, 2024, 41(13): 1864-1878.

Research Progress of Tumor Immunotherapy Target CD73 and Its Inhibitors

WANG Wenze¹, CHEN Yuepeng¹, CEN Lifang¹, ZOU Yi^{1,2*}, XU Yungen^{1,2*} (1.Department of Medicinal Chemistry, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China; 2.Jiangsu Key Laboratory of Drug Molecular Design and Optimization, Nanjing 211198, China)

ABSTRACT: Adenosine has been proved to have immunosuppressive effect in many different diseases, and the activity of ecto-5'-nucleotidase(CD73) on the cell surface is the rate-limiting step of extracellular adenosine production. CD73 has a profound and lasting impact on tumor immune regulation of regulatory T cells, B cells, macrophages and natural killer cells. CD73-mediated adenosine pathway is significant in signal transduction during cancer progression in tumor microenvironment, making CD73 a novel immune checkpoint. Therefore, CD73 inhibition is a emergent and promising strategy for cancer immunotherapy. At present, a variety of monoclonal antibodies and small molecule inhibitors have been in clinical development. This review comprehensively summarizes the frontier research progress of reported small molecule CD73 inhibitors, which can provide guidance for the investigation of novel CD73 inhibitors for cancer therapy.

KEYWORDS: CD73; adenosine; small molecule inhibitors; cancer immunotherapy

由于病因复杂、致死率高、缺乏治愈手段等原因, 癌症已成为全球主要的死亡原因并引发严重的公共卫生问题。在癌症的发生发展过程中, 肿瘤细胞可以通过多种机制逃避抗肿瘤免疫应答, 使癌症治疗面临严峻的挑战^[1]。

近年来, 肿瘤免疫疗法成为一个新兴领域, 其利用人体自身免疫系统来抵抗肿瘤细胞的异常增殖分化, 成为肿瘤治疗最具前景的研究方向之一。各种免疫检查点抑制剂在晚期癌症治疗中取得了较好的结果, 但仍有相当比例的患者在上述治疗中未获益, 这表明肿瘤微环境 (tumor microenvironment, TME) 中存在多种非冗余的免

疫抑制机制^[2-3]。其中, 腺苷作为抑制性免疫调节因子, 是肿瘤免疫逃逸的重要参与者, 在 CD39-CD73-A₂AR 信号通路介导的肿瘤生长、肿瘤血管生成、肿瘤转移和抑制性免疫微环境的形成方面发挥关键作用^[4-5], 这促进了靶向腺苷途径抑制剂的开发, 而 CD73 作为腺苷生成的限速酶, 其表达与不良肿瘤预后密切相关, 已成为新的免疫检查点和免疫干预的靶点^[2,6]。

1 CD39-CD73-A₂AR 信号通路

在正常生理条件下, 胞外三磷酸腺苷 (extracellular ATP, eATP) 的浓度极低, 在组织损伤或缺氧时 eATP 浓度迅速增加, 尤其在 TME 中

作者简介: 王文泽, 男, 硕士生 E-mail: shield@stu.cpu.edu.cn
徐云根, 男, 博士, 教授, 博导 E-mail: xyg64@126.com

*通信作者: 邹毅, 男, 博士, 副教授 E-mail: zouyi@cpu.edu.cn

浓度水平高^[7]。eATP可激活ATP受体(例如P2XR和P2YR)以促进炎症细胞因子释放,提供对先天性和适应性免疫反应至关重要的炎症信号。与之相反,eATP也可被水解为腺苷来抑制免疫反应^[4,8]。在腺苷通路中,外核苷三磷酸二磷酸水解酶1(NTPDase1,CD39)能与eATP和二磷酸腺苷(adenosine-diphosphate,ADP)结合,将其水解为腺嘌呤核糖核苷酸(adenosine monophosphate,AMP)^[8],进而被胞外-5'-核苷酸酶(ecto-5'-nucleotidase,CD73)水解为腺苷,CD39和CD73的协同作用导致原本由ATP诱导的促炎微环境转变为腺苷介导的抗炎微环境,因此它们可被视为“免疫开关”^[5,9-10]。

CD73介导产生的细胞外腺苷主要通过结合下游的4种腺苷受体(包括A₁、A_{2A}、A_{2B}和A₃受体)调控细胞内信号传导^[8,11],也可以通过平衡核苷转运蛋白(equilibrative nucleoside transporter,ENTs)将其转运至细胞内^[4]或在腺苷脱氨酶(adenosine deaminase,ADA,CD26)作用下代谢为肌苷^[12-13]。4种腺苷受体均是G蛋白偶联受体(G protein coupled receptor, GPCR),其中A₁R和A₃R优先与G_i蛋白偶联,与腺苷结合后抑制腺苷酸环化酶(adenylatecyclase, AC)和细胞内环

AMP(cAMP)的生成^[14],而A₂AR和A₂BR通常是与Gs蛋白偶联,增加细胞内cAMP积累,有助于腺苷介导的免疫抑制^[8]。腺苷结合A₂AR后可激活cAMP和蛋白激酶A(protein kinase A, PKA)介导的信号传导,从而抑制T细胞受体功能,并诱导调节性T细胞(regulatory T cells, Tregs)的形成,这是TME中腺苷发挥免疫抑制功能的重要机制。此外,磷脂酶C(phospholipase C, PLC)^[14]、丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)、磷脂酰肌醇3-激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)以及钾和钙离子通道也受腺苷的信号传导调节^[12,15],见图1。

2 CD73的结构与功能

CD73(EC3.1.3.5)是CD39-CD73-A₂AR信号通路的关键酶,它是由位于染色体6q14-21的NT5E基因(UniProt ID: P21589)编码的一种多功能跨膜糖蛋白,相对分子质量为70 kDa,由523个氨基酸组成^[16]。CD73通常位于细胞表面,但也可以可溶形式(soluble CD73, sCD73)存在于血浆中^[5,17]。CD73蛋白以非共价连接的同源二聚体形式存在^[18],通过糖基磷脂酰肌醇(glycosylphosphatidylinositol, GPI)锚定在细胞膜上^[19]。CD73基因进化高度保守,人源与大鼠、小鼠

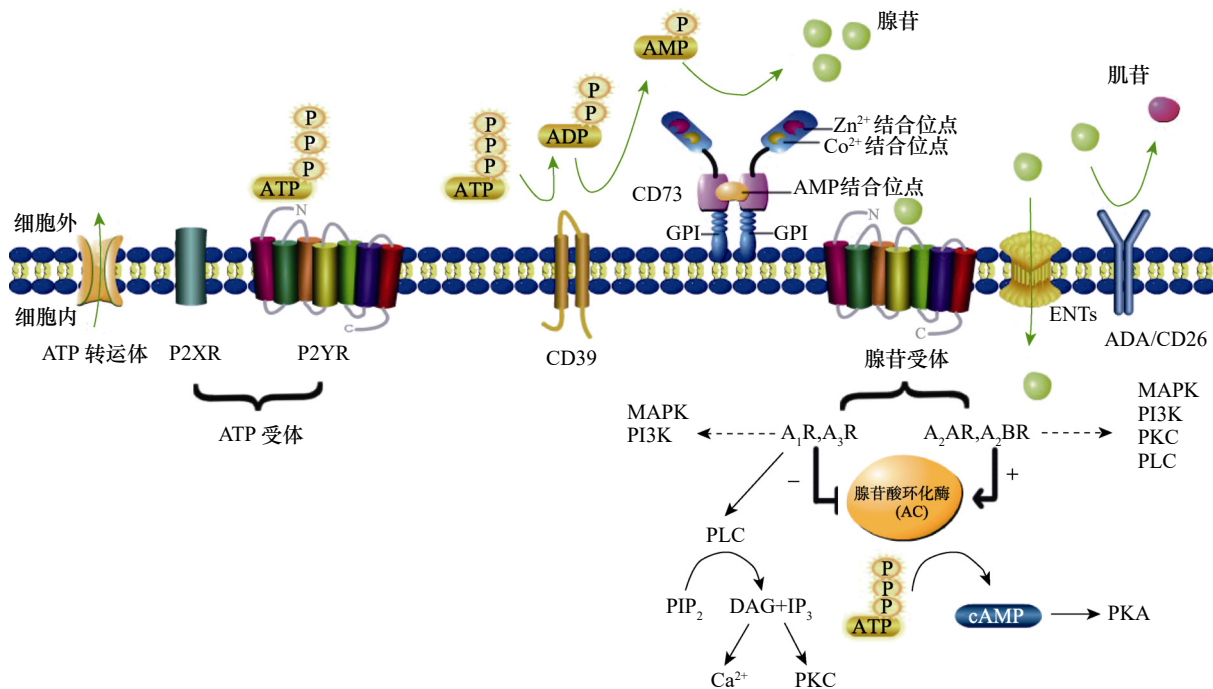


图1 CD39-CD73-A₂AR 信号通路

PKC-蛋白激酶C; DAG-甘油二酯; PIP₂-磷脂酰肌醇4,5-二磷酸; IP₃-肌醇三磷酸。

Fig. 1 CD39-CD73-A₂AR signaling pathway

PKC-protein kinase C; DAG-diacylglycerol; PIP₂-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate; IP₃-inositol trisphosphate.

基因的 cDNA 序列分别有 92% 和 86% 的同源性^[20]。

人源 CD73 前体蛋白由 574 个氨基酸残基组成^[16]，当 N 端第 1-26 位氨基酸和 C 端第 550-574 位氨基酸被剪切后形成成熟的 CD73 蛋白，其由 N 端和 C 端 2 个结构域组成，其中，N 端结构域 (27-317) 包含催化性二价锌离子结合位点和糖基化位点；C 端结构域 (337-549) 含有底物结合位点，通过第 523 位丝氨酸作为锚定位点利用 GPI 锚定在细胞外膜^[21-22]。N 端和 C 端结构域之间通过一个 α 螺旋 (318-336) 连接，这使得其可以形成较大幅度的结构域移动，在开放和闭合的 2 种构象之间转换^[23]，见图 2。当 CD73 从开放构象转换为闭合构象时，活性结合位点得以暴露，与底物 AMP 进行结合，从而催化 AMP 及其类似物的水解^[24]。

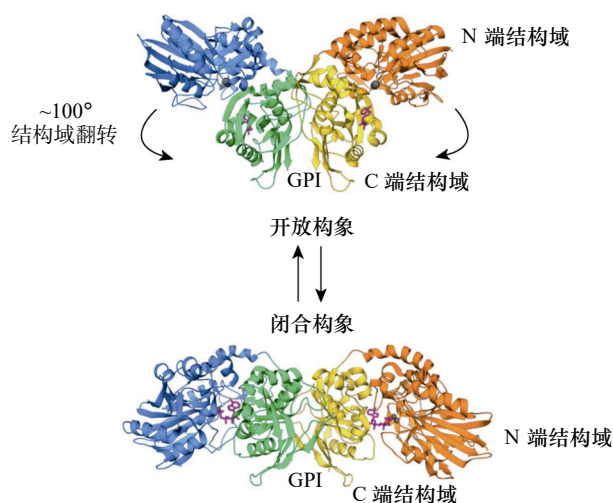


图 2 CD73 蛋白结构的开放构象 (PDB: 4H2G) 与闭合构象 (PDB: 4H2I) 的转换

Fig. 2 Conversion of open conformation(PDB: 4H2G) and closed conformation(PDB: 4H2I) of CD73 protein structure

2.1 CD73 催化机制

在开放状态下，CD73 与其催化产物腺苷结合，且结合位点远离催化位点和 Zn^{2+} ，由此说明，开放状态是酶促反应的产物腺苷从 CD73 解离的状态。CD73 催化 AMP 生成腺苷的可能机制^[14,25]：①AMP 与开放状态的酶结合，嘌呤环与 F417 和 F500 的 π - π 堆叠相互作用极大促进复合物的形成；②CD73 经历亚基构象转变到闭合状态；③在闭合状态下，AMP 的磷酸基团暴露并与催化位点结合，从而进行酶促反应；④酶促反应结束后构象转换为开放状态，腺苷从 CD73 上解离。

2.2 CD73 的生理功能

CD73 属于核苷酸酶，广泛表达于包括淋巴细胞、内皮细胞、上皮细胞、成纤维细胞和神经胶质细胞等在内的多种人体组织细胞^[3]，并发挥其酶与非酶途径的功能^[26]，一方面 CD73 催化 5'-AMP 水解产生腺苷，另一方面 CD73 可作为细胞黏附分子 (cell adhesion molecule, CAM) 和细胞外基质分子 (extracellular matrix molecules, ECM) 的膜受体发挥作用^[20,27]。此外，有研究证明，CD73 与上皮离子交换、液体转运、组织缺氧、维持组织屏障和血小板功能等密切相关^[2,20]。

CD73 的表达受到缺氧诱导因子 (hypoxia-inducible factor, HIF)、转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)、表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR)、蛋白激酶 B(Akt)、 β -连环蛋白 (β -catenin)、干扰素 (interferon, IFN) 等分子的调控^[3,28]，其中行使转录因子功能的 HIF-1 最为关键^[5,29]。研究表明，在缺氧条件下过表达的 CD73 参与多种病理过程，并且与许多癌症的肿瘤侵袭性、转移和患者生存率降低密切相关^[30-31]。

研究揭示了 CD73 除了行使其核苷酸酶 (AMPase) 的催化功能，还可以通过非酶途径产生其他重要的生理功能^[2]，主要包括：①通过充当共刺激信号分子激活 T 细胞^[14,32]；②促进淋巴细胞附着于内皮诱导整合素簇^[33]；③通过 GPI 锚定依赖机制使白血病细胞抗凋亡^[34]；④抗体连接后诱导内皮和淋巴细胞蛋白磷酸化^[35]；⑤通过膜聚集和内化作用抑制乳腺癌细胞的转移^[36]；⑥参与调节包括运动、记忆、睡眠、体温和伤害感受等中枢神经系统功能^[20,37-40]；⑦调节星形胶质细胞的迁移和对损伤的反应^[41]；⑧作为上皮-间质转化 (epithelial mesenchymal transition, EMT) 调节器，促进胆囊癌和黑色素瘤 ECM 上的细胞相互作用和迁移^[42-43]；⑨通过激活 VEGF/Akt 和 EGFR/Akt 通路增加增殖和迁移^[44]。

3 CD73 与 TME

TME 是一个高度动态的环境，它由癌细胞、基质细胞、浸润免疫细胞、细胞因子、血管和肿瘤衍生代谢物组成^[45]。TME 中存在多种免疫抑制机制，从而使肿瘤逃避免疫系统的攻击，而 CD39-CD73- A_2AR 信号通路是其中发挥主要作用的机制之一^[4,9]。研究发现，CD73 在多种类型癌症

的 TME 细胞上过度表达, 如乳腺癌、黑色素瘤、前列腺癌、大肠癌、头颈癌、胃癌、白血病、胆囊癌、胶质母细胞瘤和卵巢癌等^[14,30,46-49]。CD73 催化产生的腺苷可通过结合于 4 种腺苷受体来发挥促肿瘤作用, 表现为肿瘤新生血管形成、肿瘤细胞增殖、促进肿瘤免疫逃逸和肿瘤转移等方面^[5,10], 在包括 Tregs、自然杀伤细胞 (natural killer cells, NK cells)、巨噬细胞在内的多种免疫细胞群中发挥着重要的免疫调节作用^[3,5], 见图 3。

在 TME 中, 通过 CD73 催化产生的细胞外腺苷可激活 A_2AR , 促进 Tregs($CD4^+CD25^+Foxp3^+$) 的增殖以及细胞毒性 T 淋巴细胞相关蛋白 4(cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4, CTLA-4) 和程序性死亡受体 1(programmed cell death protein 1, PD-1) 的表达, 从而协助肿瘤细胞逃避免疫监视^[3,50]。在 $CD73^{-/-}$ 小鼠模型中发现 Tregs 的免疫抑制功能受损, 肿瘤的生长速度较野生型小鼠也明显放缓^[51-52]。在体外实验中, 抑制人 Tregs 上的 CD73 同样降低了 Tregs 介导的免疫抑制^[53]。

TME 中的细胞外腺苷信号对高表达 CD73 的 NK 细胞的代谢、细胞因子产生和细胞毒性功能产生不利影响, 同时还可以促进肿瘤的转移^[30,50]。同时, 腺苷还可通过 cAMP 的积累阻碍单核细胞向巨噬细胞的分化^[54], 抑制巨噬细胞产生白介素-12(interleukin-12, IL-12)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、巨噬细胞炎性蛋白-1 α (macrophage inflammatory protein-1 α , MIP-1 α)、一氧化氮和超氧化物的能力, 从而降低巨噬细胞的促炎活性^[4,55]。

4 CD73 抑制剂研究进展

由于 CD73 在肿瘤免疫中的关键作用, 靶向 CD73 成为新型免疫疗法的研究热点。广泛的临床前研究已经证明, 以 CD39-CD73- A_2AR 信号通路为靶点的癌症疗法极具价值, 例如: 阻断腺苷生成 (CD39 和 CD73 抑制剂)、阻断腺苷与受体结合 (A_2AR 拮抗剂)、腺苷轴阻断剂的组合 (CD73 和 A_2AR 双靶阻断)、腺苷轴与 PD-1 双重阻断、腺苷轴和 CTLA-4 双重阻断、腺苷轴阻断联合放疗、化疗或其他靶向治疗等^[1,3,4,9,14,30,50]。

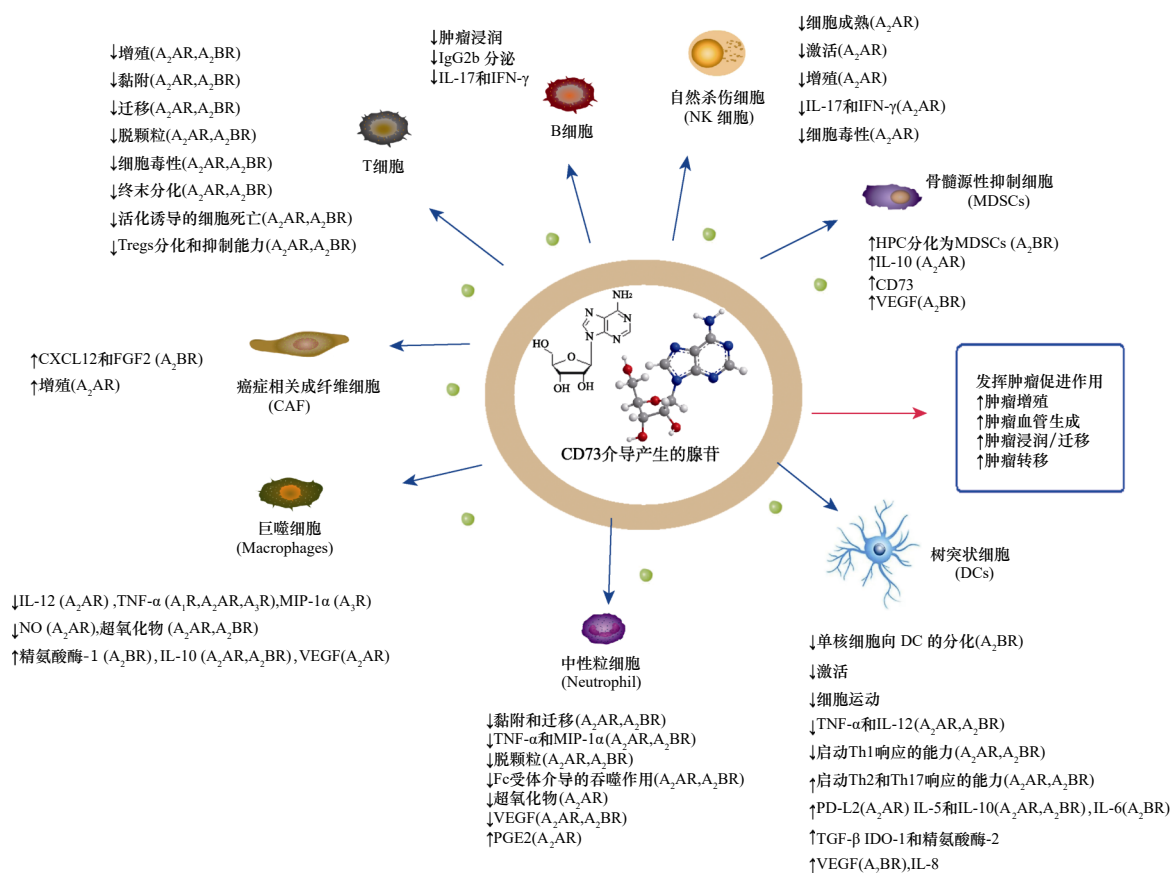


图 3 CD73 介导肿瘤微环境的免疫抑制^[1,4-5,9]

Fig. 3 CD73-mediated immunosuppression of tumor microenvironment^[1,4-5,9]

4.1 大分子 CD73 抑制剂研究进展

虽然目前尚无 CD73 抑制剂被批准上市，但是 CD73 单克隆抗体 (mAb) 已在临床前和早期临床研究中显示出较强的抗肿瘤作用^[3,56]。多项 CD73 单抗、CD73/CD20 双抗 (NZV930) 和 CD73/TGFβRII 双抗 (Dalutrafusp alfa) 正处于临床研究阶段，见表 1，并有 2 项已进入临床三期阶段 (Oleclumab 和 Mupadolimab/CPI-006)。其中阿斯利康公司研发的 Oleclumab 在治疗中发现存在钩状效应，即药物在某个浓度达到最大效果后，后续药物浓度增加反而使药效下降，单药疗效很可能受限于其给药剂量，其成药前景或受影响。

4.2 小分子 CD73 抑制剂的研究进展

相对于 CD73 抗体而言，小分子 CD73 抑制剂的研究进程稍显落后，大部分仍处于临床前阶段，进展较快的选择性小分子抑制剂 (AB680、CB-708/ ATG-037、ORIC-533) 均处于早期临床研究阶段，见表 2。与抗体药物相比，CD73 小分子抑制剂可能具有以下特点^[57]：①小分子可以很容

易地扩散穿过生理屏障，还可以作用于胞质中的 CD73，使其功能得到充分抑制；②几乎没有免疫原性；③大部分的小分子药物可以口服，给药方便。

4.2.1 α, β-亚甲基腺苷 5'-二磷酸 (α,β-methylene diphosphate 5-diphosphate, APCP) 的发现 Burger 等^[58]首次从猪小肠平滑肌中的分离出 CD73，并证明 ADP 是 CD73 的内源性配体。ATP 和 ADP 可竞争性地抑制 CD73 的活性^[59]，这是体内 CD73 控制的生理相关前馈机制，但在正常生理条件下，ATP 和 ADP 无法对 CD73 产生抑制作用，因为体内相关的水解酶会迅速地将 ATP 和 ADP 水解。当 ADP 结构中二磷酸基团被 α,β-亚甲基二磷酸基 (α,β-methylene diphosphate, PCP) 取代后，形成的 APCP 在 CD73 介导的腺苷生成中抑制效果更强，因为 α,β-亚甲基的存在使 APCP 对焦磷酸水解具有抗性。Naito 等^[60]进一步解释了其原理，在生理 pH 下，ADP 和 APCP 均在双离子形式时对 CD73 的抑制作用最强，而 APCP 更多以双离子形式存在。

表 1 CD73 抗体药物的临床试验信息

Tab. 1 Clinical trial information of CD73 antibody drug

抗体名称	机构名称	临床进度	适应证
Oleclumab	Medimmune (AstraZeneca)	III期	乳腺癌，结直肠癌，非小细胞肺癌，卵巢癌，胰腺癌，肉瘤
Mupadolimab	Corvus Pharmaceuticals	III期	头颈癌，非小细胞肺癌，口咽癌，COVID-19
Uliledlimab	I-Mab Biopharma 0.88	II期	乳腺癌，胃肠道癌，头颈癌，非小细胞肺癌症，卵巢癌，实体瘤
Dresbuxelimab	Akeso	II期	实体瘤，COVID-19
BMS986179	BMS	II期	实体瘤
JAB BX 102	Jacobio	II期	实体瘤
IPH5301	Innate	I期	实体瘤
NZV930	Novartis Surface Oncology	I期	实体瘤
Sym024	Symphogen	I期	实体瘤
INCA00186	Incyte	I期	胃肠道癌，鳞状细胞癌，实体瘤
Dalutrafusp alfa	Agenus Gilead	I期	实体瘤
PT199	Phanes Therapeutics	I期	三阴性乳腺癌，结直肠癌，食管癌，胃癌，头颈癌，肝癌，非小细胞肺癌，卵巢癌，胰腺癌，甲状腺癌，实体瘤
HLX23	Shanghai Henlius	I期	实体瘤
IBI325	Innovent	I期	实体瘤

表 2 CD73 小分子抑制剂的临床试验信息

Tab. 2 Clinical trial information of CD73 small molecule inhibitor

分子名称	机构名称	临床进度	适应证
AB680/Quemliclustat	Arcus Biosciences	I/II期	胰腺癌，前列腺癌，结直肠癌
CB-708/ATG-037	Calithera Biosciences	I期	实体瘤
ORIC-533	ORIC Pharmaceuticals	I期	多发性骨髓瘤，实体瘤
LY3475070	Eli Lilly	I期(已终止)	实体瘤

2012 年, Knapp 等^[22]解析了人 CD73 蛋白与 APCP 的共晶结构 (PDB: 4H2I), 其结合模式表明, 酶活性位点由 N 端和 C 端结构域界面、底物结合位点以及至关重要的双锌离子催化中心组成, APCP 在 CD73 封闭构象的活性位点内紧密结合, 并形成很多关键相互作用, 见图 4。①APCP 的核糖和腺嘌呤结构与附近的天冬氨酸 (D506) 和天冬酰胺 (N390) 残基之间通过氢键相互作用牢固定位; ②腺嘌呤环通过疏水的 π - π 堆叠作用定位在 2 个苯丙氨酸残基 (F417 和 F500) 之间; ③APCP 的双磷酸部分与活性位点精氨酸 (R354 和 R395)、天冬酰胺 (N245 和 N117) 和组氨酸 (H118) 残基的侧链形成氢键; ④PCP 基团与双锌离子催化中心配位结合。其中, PCP 基团和活性位点锌离子之间的相互作用对许多核苷类 CD73 抑制剂的抑制活性至关重要, 同时证明了锌离子对维持 CD73 催化功能的重要性^[61]。这些开创性工作使 APCP 成为科研过程中应用最广泛的 CD73 抑制剂, 为后续核苷类 CD73 抑制剂的发现奠定了基础。

4.2.2 核苷类小分子抑制剂 受到 APCP 结构的启发, 核苷类 CD73 小分子抑制剂成为研究热点, 它们大多是以糖 (通常是核糖或其衍生物) 为中心的类核苷酸结构, 在糖环 5'位置连接酸性基团, 并在 1 位与碱性杂环形成糖苷键。对此类化合物构效关系 (structure activity relationship, SAR) 的研究促进了后续核苷类 CD73 小分子抑制剂结构的发展。

在碱性杂环部分的改造中, Bhattarai 等^[62]在腺嘌呤的 2 位引入一系列取代基, SAR 证明腺嘌

呤部分 2 位小极性或亲脂性的取代基可以显著提高效力 (Cl>胍基>H>哌嗪基), 见图 5。在腺嘌呤 6 位氨基上引入了苄基并修饰后^[63], 发现了活性提高且代谢稳定的 PSB-12 489(5), 对人 CD73 的抑制常数 (inhibition constant, K_i) 达到了 $(0.318 \pm 0.020) \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 其共晶结构 (PDB: 6S7H) 显示出苄基与 CD73 的 L184 和 S185 残基形成了额外的疏水性相互作用, 证明在 C6 位氨基上使用疏水大基团占据该位置的大空腔是有利的^[64]。

将腺嘌呤更改为取代嘧啶及其类似物后^[65], 得到了活性提升的化合物 MRS4620[6, hCD73 $K_i=(0.436 \pm 0.078) \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$]^[66], 更惊喜的是, Arcus Biosciences 公司对嘌呤母核优化过程中发现了活性优异的化合物 AB680(Quemliclustat, 7)^[67-68], hCD73 K_i 达到了 $(0.005 \pm 0.003) \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 在 C6 位引入 4-氟- α -(S)-甲基苄胺可明显改善大鼠药动学 (pharmacokinetics, PK) 性质, 同时该化合物具有较低清除率和较长半衰期, 在人血 CD8⁺ T 细胞以及人外周血单核细胞 (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) 中均显示出优异的效力。已完成的 2 项 I 期临床试验 (NCT03677973^[69] 和 NCT04575311^[70]) 表明, AB680 静脉注射的半衰期为 74 h, 适合每 2 周给药 1 次, 同时在人体中显示出良好的 PK 和药效学 (pharmacodynamics, PD) 性质, 安全性良好。此外, 2021 年 Arcus 公司公布了临床试验 (I/Ib 期) 的部分结果, 显示 AB680 与化疗药物和抗 PD-1 抗体联用, 一线治疗胰腺癌可达到 41% 的客观缓解率 (objective response rate, ORR)。目前针对不同适应证的 II 期临床项目正在启动 (NCT05688

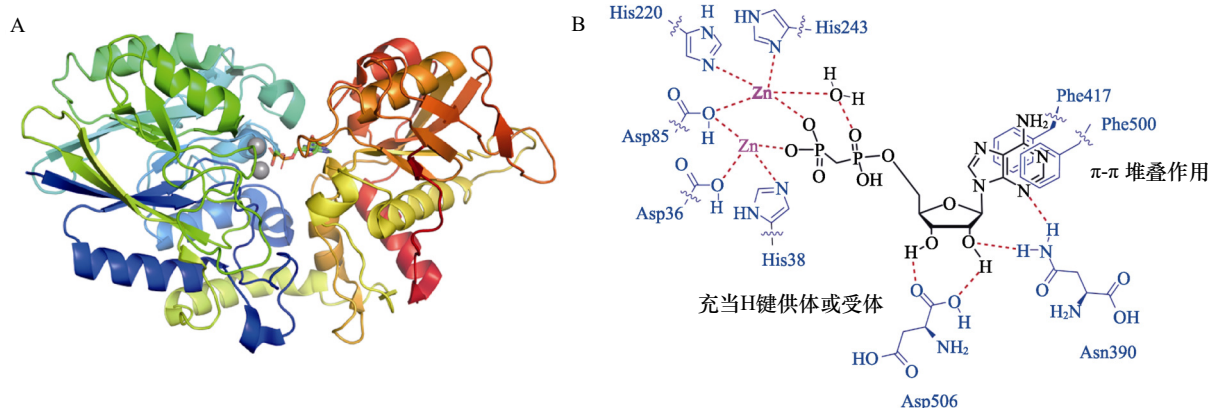


图 4 APCP 与人 CD73 蛋白共晶结构 (闭合构象)(PDB: 4H2I)(A) 与活性位点中 APCP 的结合模式及关键相互作用 (B)

Fig. 4 Crystal structure of hCD73 (closed conformation) in complex with APCP(PDB: 4H2I)(A) and schematic of binding model and key interactions between APCP and the active site of human CD73(B)

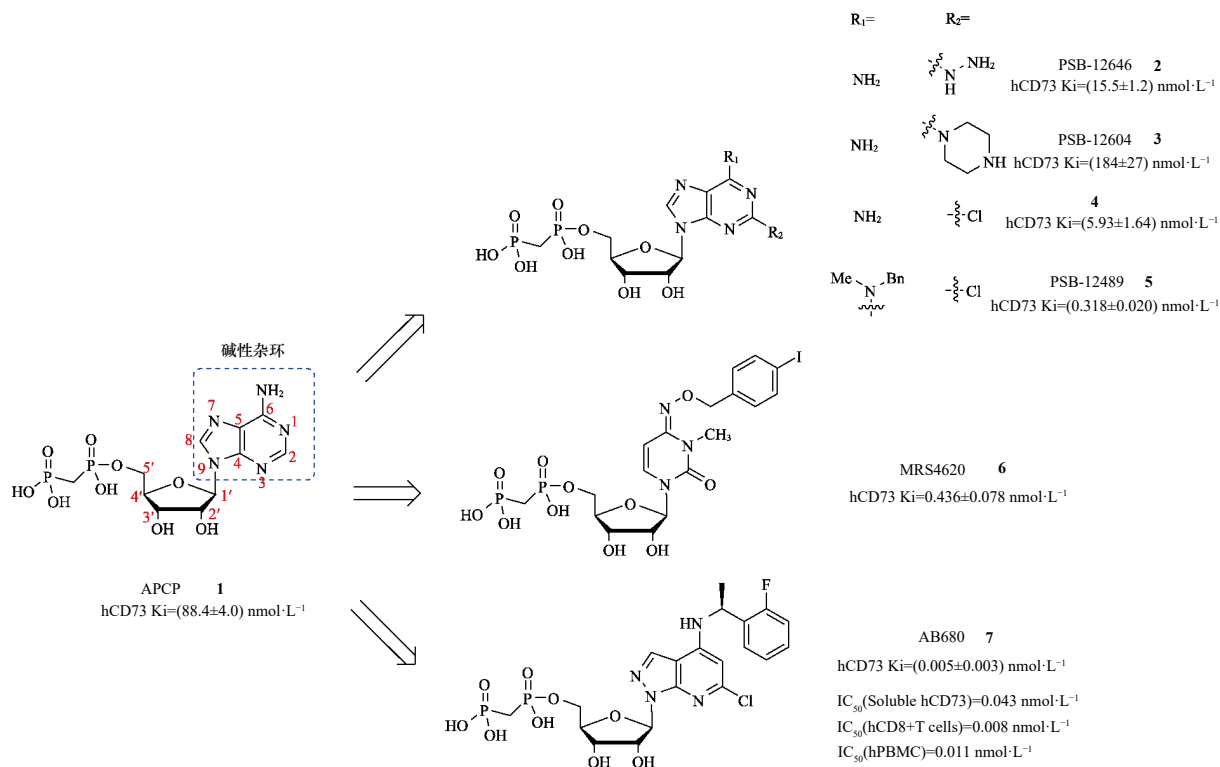


图5 核苷类 CD73 小分子抑制剂碱性杂环部分的修饰

Fig. 5 Modification of basic heterocycle of nucleoside CD73 small molecule inhibitors

215^[71], NCT05676931^[72], NCT05329766^[73], NCT04381832^[74]。

在磷酸基团部分的改造中(图6), Sharif 等^[75]成功将末端二磷酸基团用单磷酸基团替换(8), 化合物活性能保持在同一水平, 而单磷酸基团化合物的生物利用度会有所提高。ORIC Pharmaceuticals 公司重点研究了磷酸基团和核糖之间的连接部分^[76], 发现砷基取代连接处的氧可以保持抑制活性, 专利中也有类似结构公开(9)^[77]。进一步的 SAR 研究发现了 OP-5244(10), 其在 CD73 高表达的小鼠乳腺癌 EMT6 细胞系、人非小细胞肺癌 H1568 细胞系中, 均表现出比 AB680 更高的活性。通过对 OP-5244 与 CD73 的共晶结构(PDB: 7JV8)的研究发现^[76], 与 APCP 相比, 其在保持大部分原有相互作用的基础上, 甲氧基亚甲基中的氧与 R354 形成氢键, 而羟甲基中的氧与 R395 形成氢键, 额外的氢键相互作用可能是其细胞活性优异的原因。此外, 相关专利中还披露了化合物 11^[78] 和 12^[79] 的结构, 证明磷酸部分具有较大的改造空间, 在保持磷酸基团与活性位点双锌离子中心的作用下, 可被 O- α 位的双羧基或单酯基单磷酸部分所替代, 见图7。

在核糖部分的改造中(图7), Bhattarai 等^[63-65]发现将羟基替换为氢、甲氧基或氨基等基团会使活性丧失, 仅有 2'-去氧和 2'-去氧-2'-氟的修饰保留了抑制活性, 12 即采用了后者, 这提示该位置作为氢键供体和受体的重要性。最新研究表明^[80], 3'-乙炔基取代的化合物 13[hCD73 IC₅₀=(0.17±0.02)nmol·L⁻¹] 具有优异的 PK/PD 性质, 在小鼠肿瘤模型中, 13 不论是作为单一药物给药, 还是与化疗药物或检查点抑制剂联合给药都有良好的抗肿瘤效果。此外, 将戊糖环替换为环戊烷环并不会导致活性的丧失(11)^[78]。

上述关于核苷类化合物的结构改造不仅完善了此类 CD73 抑制剂的 SAR, 也为后续核苷类小分子抑制剂的发现提供了理论基础。现有核苷类 CD73 抑制剂的共同特点是至少存在一个酸性官能团, 如磷酸基和羧基。在生理 pH 值下, 这些酸性化合物在体内发生电离, 限制了它们穿过肠膜的能力, 这也是该类化合物的缺陷之一^[81]。

4.2.3 非核苷类小分子抑制剂

4.2.3.1 黄酮类 Knapp 等^[22]首先通过 X 射线晶体衍射法取得了类黄酮糖苷结构的天然产物黄芩苷(14)与 CD73 的共晶结构, 它是一种活性较弱

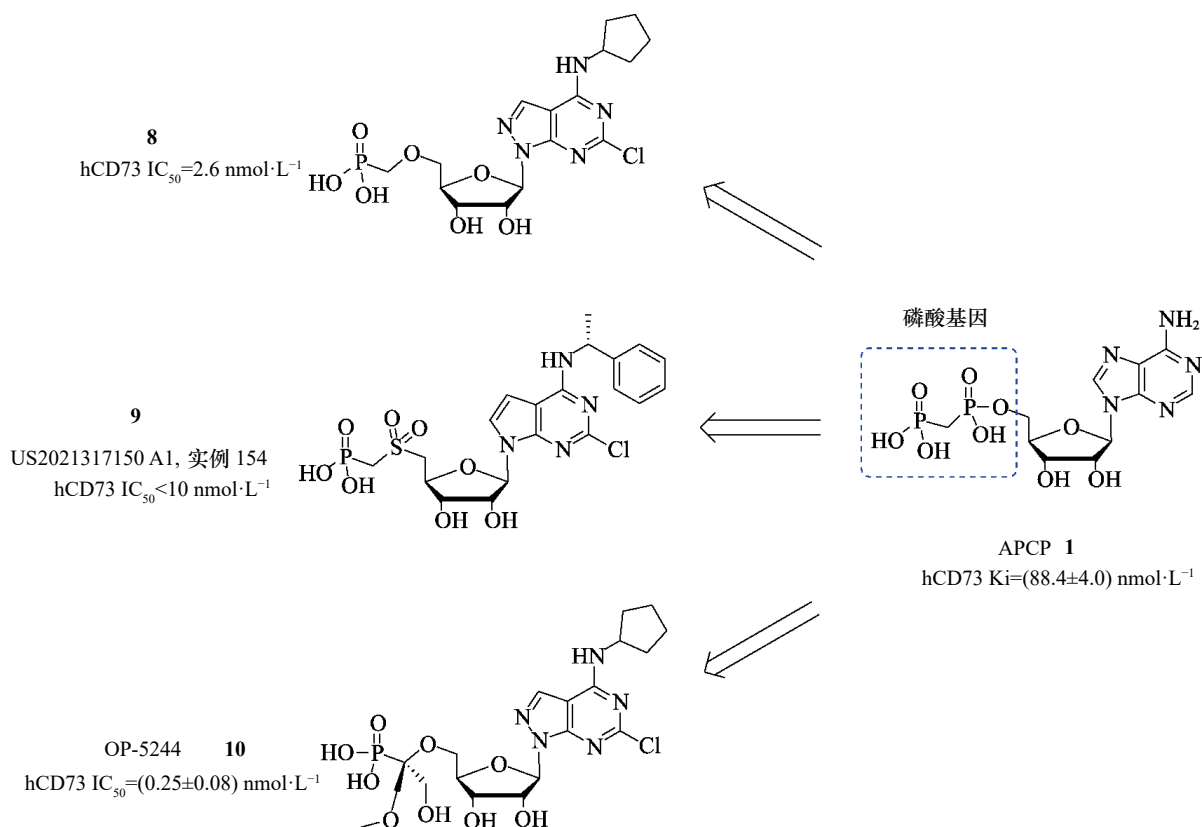


图6 核苷类 CD73 小分子抑制剂磷酸基团部分的修饰

Fig. 6 Modification of phosphate group of nucleoside CD73 small molecule inhibitors

的抑制剂。黄芩苷的苯并吡喃酮平面位于在 F417 和 F500 的侧链之间，葡萄糖醛酸部分与 D506、R354 和 R395 的侧链相互作用，黄芩苷与

CD73 的共晶结构推动了非核苷类小分子抑制剂的研究，见图 8。

4.2.3.2 蒽醌磺酸盐类 PSB-071(15) 早期被认为

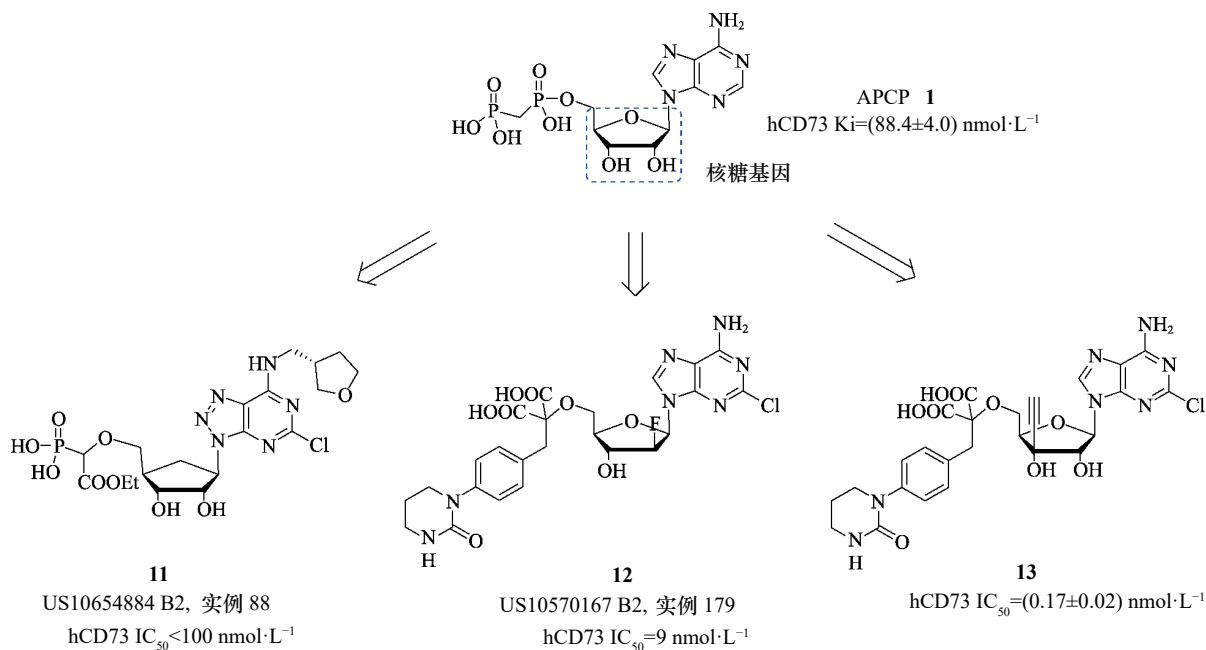


图7 核苷类 CD73 小分子抑制剂核糖基团部分的修饰

Fig. 7 Modification of ribose group of nucleoside CD73 small molecule inhibitors

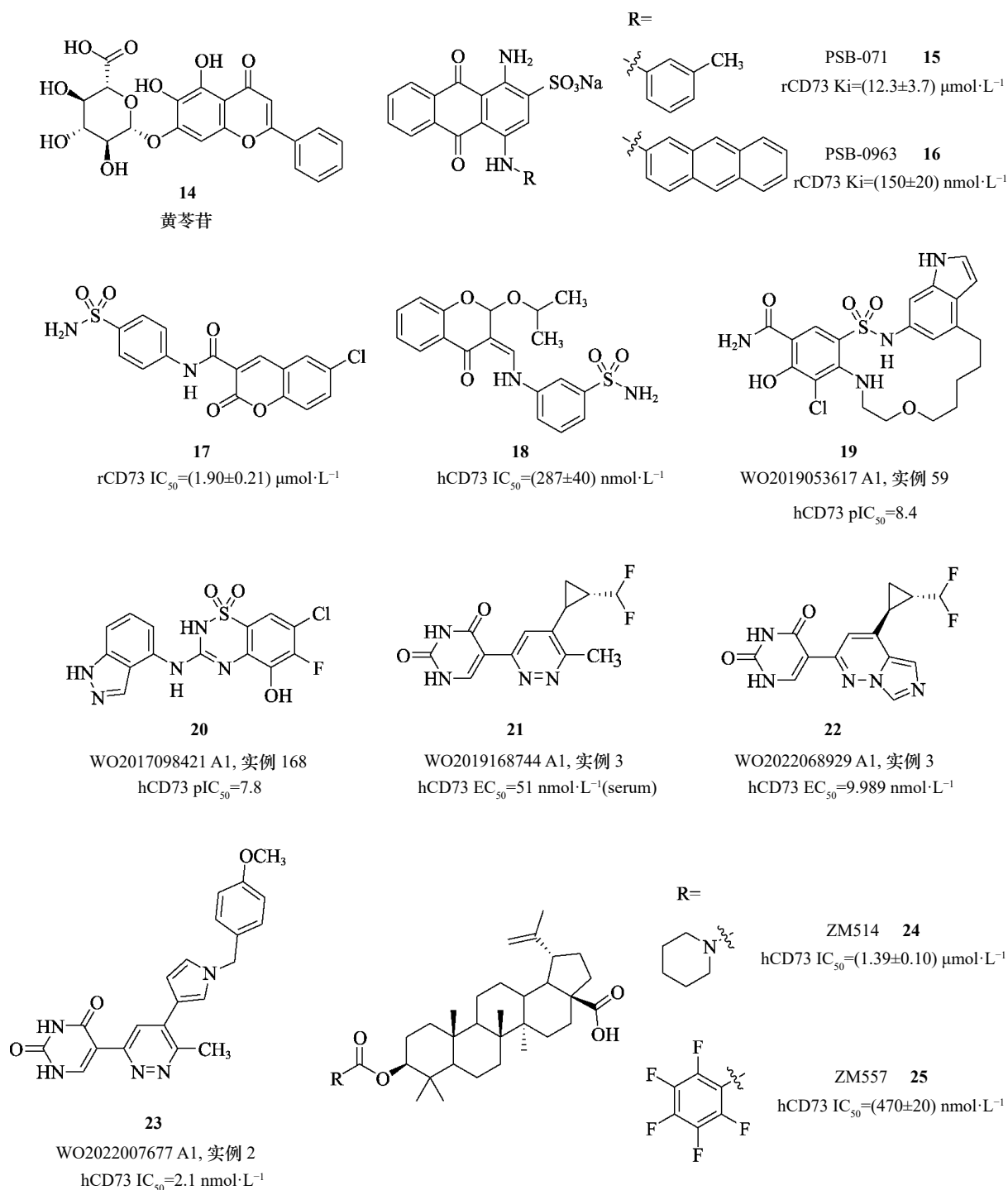


图8 非核苷类 CD73 小分子抑制剂

Fig. 8 Non-nucleotide-like CD73 small molecule inhibitors

是一种外核苷三磷酸二磷酸水解酶 2(NTPDase 2) 抑制剂^[82], 经结构修饰发现 β -萘基取代的衍生物 (PSB-0963, 16)^[83] 可使大鼠 CD73(rCD73) 抑制活性由 $12.3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 提升至 $150 \text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。在此类结构中, 磺酸盐结构至关重要, 而 β -萘基可能占据了 CD73 中的疏水口袋, 从而提升其抑制活性, 见图 8。

4.2.3.3 磺酰胺类 Ripphausen 等^[84] 运用基于结构的虚拟筛选方法, 首先发现了磺酰胺类弱 CD73 抑制剂 17[rCD73 $\text{IC}_{50} = (1.90 \pm 0.21) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$], 由于其结构中在生理 pH 值下不带电, 较核苷类 CD73 抑制剂有成药性优势。2016 年, Al-rashida 等^[85] 报道了一类 2-烷氧基-3-(磺酰基芳基氨基甲基)-4-色满酮结构的 CD73 抑制剂, 活性最优的化

合物 **18** [$\text{hCD73 IC}_{50}=(287\pm40)\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$] 中的间位的氨磺酰基 ($m\text{-SO}_2\text{NH}_2$) 被证明优于对位取代, 是活性提高的关键基团。此外, 还有专利公开了活性较好的羟基苯甲酰胺 (**19**)^[86] 和苯并噻嗪 (**20**)^[87] 的结构, 见图 8。

4.2.3.4 嘧啶-2,4-二酮类 礼来公司首次通过专利公开了一系列 5-[5-(2-环烷基)-6-噻嗪-3-基]-1*H*-嘧啶-2,4-二酮结构的 CD73 抑制剂^[88], 化合物 **21** 在人类血清中有较强活性 ($\text{hCD73 EC}_{50}=51\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 在体外能解除腺苷介导的 T 细胞增殖抑制, 并诱导 IFN- γ 和 TNF- α 产生。**21** 的 IC_{50} 值取决于最终测定条件下 AMP 的浓度, 在 AMP 浓度 $\geq 5.6\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时抑制活性提高, 而 TME 中 AMP 的积累可能会使该化合物的活性得到放大^[75]。在此基础上, 武汉人福药业通过并环策略开发出化合物 **22**^[89], 而贝达药业通过对噻嗪 5 位环烷基的结构改造发现了化合物 **23**, 其中对甲氧基苄基的邻位与间位取代活性差别很大, 可能与该分子的空间取向有关^[90], 见图 8。

4.2.3.5 五环三萜类 从天然产物中寻找并发现 CD73 小分子抑制剂也是非常有效的途径。Zhang 等^[91] 运用结构搜索策略 (Hit-based substructure search strategy, HBSS) 以白桦酸为先导物, 经过结构优化发现了五环三萜类化合物 ZM514 [**24**, $\text{hCD73 IC}_{50}=(1.39\pm0.10)\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$], 在发现氟取代可能对活性提高有益后, 进一步运用氟扫描策略 (Fluorine scanning strategy) 发现了活性约提高 3 倍的 ZM557 [**25**, $\text{hCD73 IC}_{50}=(470\pm20)\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$], 其表现出相对良好的免疫调节效果^[92], 见图 8。

4.2.3.6 苯并三氮唑类 Beatty 等^[93] 利用高表达人源 CD73 的中国仓鼠卵巢细胞 (CHO 细胞) 中筛选了二十万余种化合物的文库, 得到 9 种活性弱但结构新颖的 CD73 抑制剂。作者以 [1,2,4] 三唑并 [4,3-*a*] 吡啶母核化合物 **26** 为先导, 通过 SAR 研究发现了活性提高的苯并三氮唑类结构 (**27**), 令人惊喜的是, 在 4 位和 1' 位的关键修饰对活性提高有较大贡献 [**28**, $\text{hCD73 IC}_{50}=(18.9\pm3.8)\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$]。通过 **28** 与 CD73 的复合物晶体结构 (PDB: 6XUE) 发现: ①苯并三氮唑母核处于 F417 和 F500 之间并与二者形成 $\pi\text{-}\pi$ 堆叠相互作用, 2 位 N 与 N390 形成氢键; ②吡唑部分位于双锌离子催化中心, 分别与 R354 和 R395 形成阳离子- π 相互作用, 吡唑 NH 和 D506 之间形成氢键; ③吡唑

的 2 位 N 和苯并三唑的 3 位 N 与氢键网络中的水分子形成氢键; ④1' 位苄基取代与 N 端结构域 184~186 位氨基酸残基形成关键的疏水相互作用, 4 位卤素原子可伸入蛋白的“C2 口袋”而提高亲和力, 见图 9。

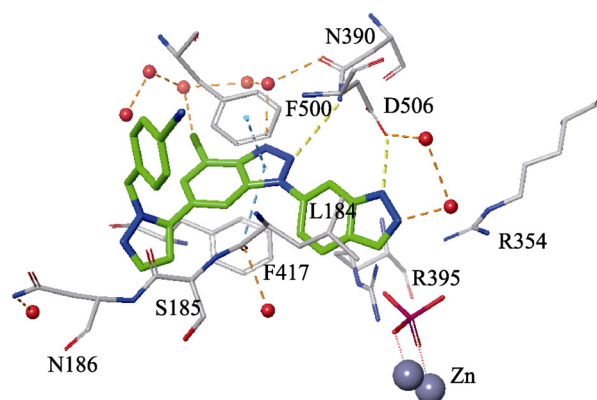


图 9 **28** 与 CD73 的复合物晶体结构中的关键相互作用 (PDB: 6XUE)
化合物 **28**(绿色); CD73 蛋白氨基酸残基(银色); 水分子(红色)。
Fig. 9 Key interactions in the crystal structure of the complex of **28** and human CD73 (PDB: 6XUE)
Compound **28**(green); amino acid residue of CD73(silver); water(red).

然而, **28** 会产生 CYP 抑制且肝细胞稳定性较差, 使用苯并咪唑酮替换吡唑后活性微降 [**29**, $\text{hCD73 IC}_{50}=(56.0\pm14.3)\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$], 但化合物体外 PK 性质更优, 半衰期提升近 20 倍且 CYP 抑制得到显著改善, 尤其是针对 CYP1A2, 其 IC_{50} 变化 >700 倍, 见图 10, 活性与成药性的平衡是化合物进一步开发应考虑的关键。

4.2.3.7 其他 2018 年, Miliutina 等^[94] 开发了一类通过 3-氯苯并- γ -吡喃酮合成吡唑并 [3,4-*b*] 吡啶、吡咯并 [2,3-*b*] 吡啶和吡啶并 [2,3-*d*] 嘧啶的新型多米诺反应, 高效简洁地得到了具有良好 CD73 抑制活性的 **30** [$\text{hCD73 IC}_{50}=(320\pm50)\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$]。2020 年, Ashraf 等^[95] 高效地合成一类全新结构的螺氧吡啶-吡唑并 [3,4-*b*] 吡啶衍生物, 其中 **31** [$\text{hCD73 IC}_{50}=(150\pm20)\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$] 可以非竞争性抑制 CD73, 其结构中不含酸性基团, 避免了核苷类化合物口服生物利用度不高的固有缺陷, 见图 11。

5 总结与展望

肿瘤能够通过免疫抑制途径促进其增殖和转移, 这种机制阻止免疫系统消除恶性肿瘤细胞, 并使疾病从早期发展到致命状态^[96]。针对“免疫逃逸”机制的肿瘤免疫疗法自从被发现以来, 人

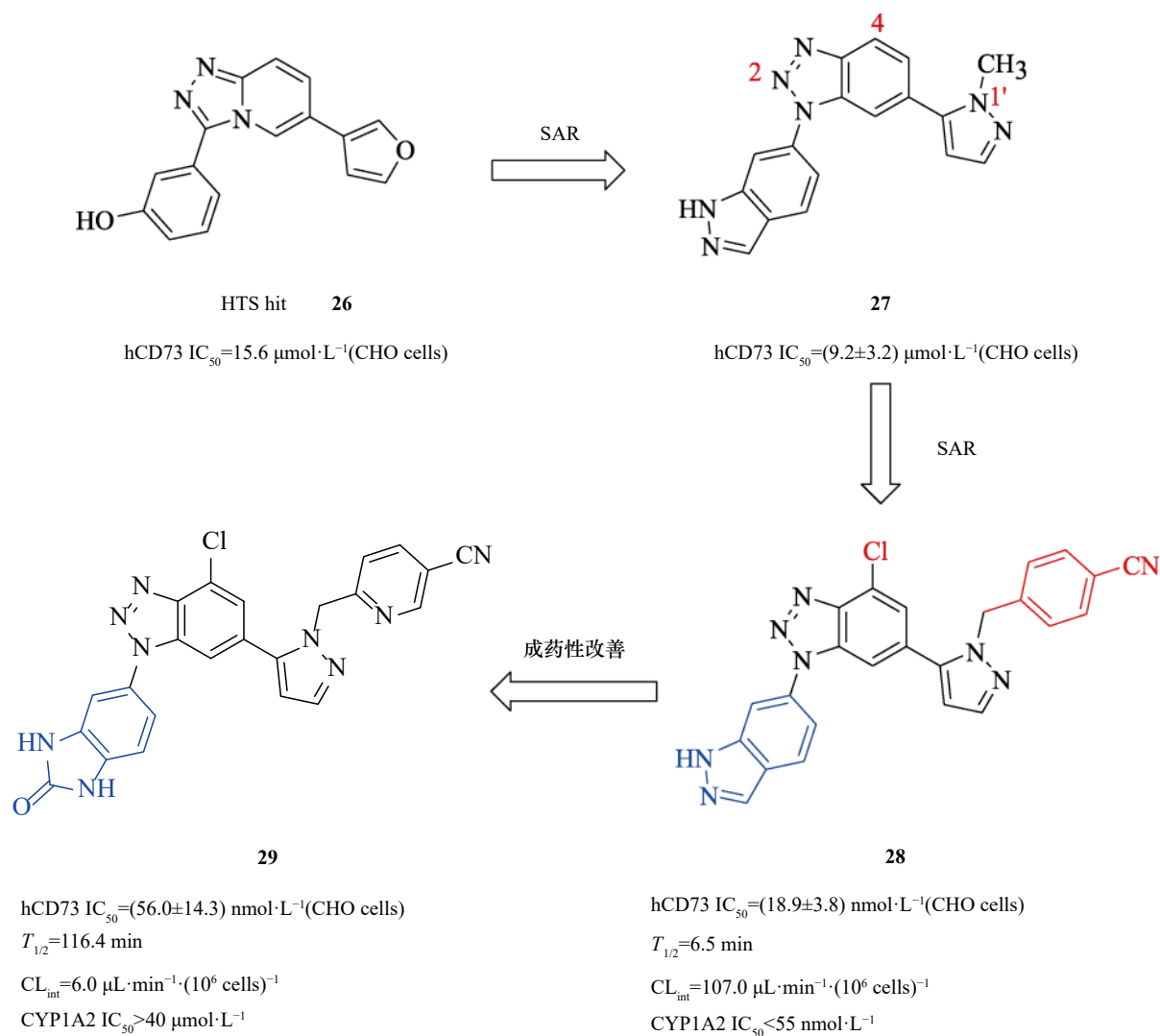


图 10 苯并三氮唑类 CD73 小分子抑制剂的发现过程

Fig. 10 Discovery process of benzotriazole CD73 small molecule inhibitor

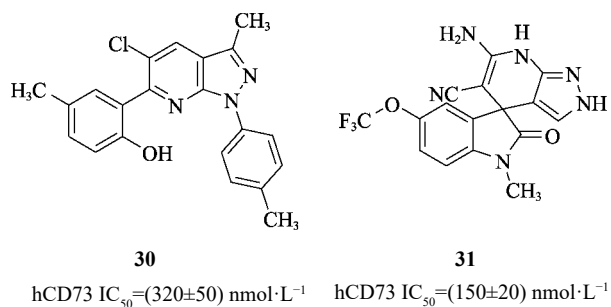


图 11 其他非核苷类 CD73 小分子抑制剂

Fig. 11 Other non-nucleotide-like CD73 small molecule inhibitors

类对癌症治疗有了较大的突破, 免疫检查点抑制剂 (PD-1/PD-L1, CTLA-4 等) 对多种肿瘤体现出优异的治疗效果, 针对免疫检查点的大分子和小分子药物也成为研究热点, 然而还存在适应证种类有限, 部分患者免疫抵抗等有待解决的问题。

CD73 介导的腺苷信号通路作为 TME 的重要“免疫开关”之一, 与肿瘤的发生、转移和不良预后密切相关, 大量临床前研究也证明了 CD73 促进肿瘤免疫逃逸的能力。但是, 也有研究表明 CD73 表达与一些癌症 (如乳腺癌和卵巢癌) 中的生存时间和预后相关^[97-98], 这表明 CD73 在不同癌症进展中的可能发挥着不同的作用。因此, 使用 CD73 靶向治疗前可能需要先评估不同肿瘤细胞上 CD73 的表达水平以及不同种类癌症的预后情况。

到目前为止, 靶向 CD39-CD73- A_2AR 信号通路的药物研发策略已应用于临床, 并取得了较好的肿瘤治疗效果, 研究证明 CD73 抗体与 PD-1/PD-L1 抗体或 A_2AR 拮抗剂联用能额外增强抑瘤效果, 延缓疾病进展, 且对多种不同类型的适应

证均有效。鉴于此,小分子 CD73 抑制剂的研究也正在兴起,核苷类 CD73 小分子抑制剂中领先的 AB680 已启动临床 II 期试验,但由于核苷类分子的结构,其天然存在透膜性差和难以口服给药等问题,使得非核苷类分子备受关注,临床研究中已经发现 CB-708/ATG-037 具有可以克服 CD73 抗体药物在治疗中产生“钩状效应”的优势。

sCD73(氨基酸残基 27-549)作为一种 CD73 的截短形式,通过内源性磷脂酶水解 GPI 锚或通过蛋白水解切割产生并释放^[21]。sCD73 保留了 AMP 亲和力和催化活性,可形成囊泡迁移以抑制抗肿瘤免疫反应,具有更远的作用距离,更长的半衰期和更好的酶活性^[99]。在患有肿瘤的小鼠和人类中,观察到 sCD73 的血清水平升高^[100],此外在接受 nivolumab 治疗的转移性黑色素瘤患者中,血清样本中较高的 sCD73 酶活性预示着较差的无进展生存期^[101]。因此,sCD73 作为血清学预后的生物标志物具有潜在价值,仍有待进一步验证。因此,在 CD73 抑制剂开发中应对这种游离型的 sCD73 格外加以关注。

此外,由于 CD73 在各种组织中的多种细胞类型上普遍表达,并且承担着一些保护性生理功能,需要在靶向治疗中考虑可能的不良反应,此前有研究发现,CD73 编码基因 NT5E 的错义突变会导致 CD73 功能缺失,从而引发动脉钙化^[102]。此外,在 CD73 单抗 BMS-986179 的临床研究中有患者出现了心脏不良事件^[1],临床试验中对于靶向 CD73 的安全性验证仍有待全面评估。一种避免 CD73 抑制剂风险的可能策略是使用各种药物递送系统仅在肿瘤部位特异性靶向 CD73,这有待药剂学家们的进一步探索。

在未来的研究中,CD73 能否作为一些癌症的预后生物标志物,以及 CD73 阻断和联合治疗的作用机制仍然有待阐明。随着 CD73 抑制剂的不断研发以及临床研究的逐步深入,将在肿瘤的临床治疗方面产生积极而深远的影响。

REFERENCES

- [1] ROH M, WAINWRIGHT D A, WU J D, et al. Targeting CD73 to augment cancer immunotherapy[J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2020(53): 66-76.
- [2] VIGANO S, ALATZOGLOU D, IRVING M, et al. Targeting adenosine in cancer immunotherapy to enhance T-cell function[J]. *Front Immunol*, 2019(10): 925.

- [3] ANTONIOLI L, YEGUTKIN G G, PACHER P, et al. Anti-CD73 in cancer immunotherapy: Awakening new opportunities[J]. *Trends Cancer*, 2016, 2(2): 95-109.
- [4] CHEN S Q, WAINWRIGHT D A, WU J D, et al. CD73: An emerging checkpoint for cancer immunotherapy[J]. *Immunotherapy*, 2019, 11(11): 983-997.
- [5] GHALAMFARSA G, KAZEMI M H, RAOOFI MOHSENI S, et al. CD73 as a potential opportunity for cancer immunotherapy[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2019, 23(2): 127-142.
- [6] MINOR M, ALCEDO K P, BATTAGLIA R A, et al. Cell type- and tissue-specific functions of ecto-5'-nucleotidase(CD73)[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2019, 317(6): C1079-C1092.
- [7] VIRGILIO F D, ADINOLFI E. Extracellular purines, purinergic receptors and tumor growth[J]. *Oncogene*, 2017, 36(3): 293-303.
- [8] ALLARD D, ALLARD B, STAGG J. On the mechanism of anti-CD39 immune checkpoint therapy[J]. *J Immunother Cancer*, 2020, 8(1): e000186.
- [9] VIJAYAN D, YOUNG A, TENG M W L, et al. Targeting immunosuppressive adenosine in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2017, 17(12): 765.
- [10] BOISON D, YEGUTKIN G G. Adenosine metabolism: Emerging concepts for cancer therapy[J]. *Cancer Cell*, 2019, 36(6): 582-596.
- [11] FREDHOLM B B, IJZERMAN A P, JACOBSON K A, et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors: An update[J]. *Pharmacol Rev*, 2011, 63(1): 1-34.
- [12] HARVEY J B, PHAN L H, VILLARREAL O E, et al. CD73's potential as an immunotherapy target in gastrointestinal cancers[J]. *Front Immunol*, 2020(11): 508.
- [13] ALLARD B, BEAVIS P A, DARCY P K, et al. Immunosuppressive activities of adenosine in cancer[J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2016(29): 7-16.
- [14] DA M H, CHEN L X, ENK A, et al. The multifaceted actions of CD73 during development and suppressive actions of regulatory T cells[J]. *Front Immunol*, 2022(13): 914799.
- [15] SHETH S, BRITO R, MUKHERJEA D, et al. Adenosine receptors: Expression, function and regulation[J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(2): 2024-2052.
- [16] MISUMI Y, OGATA S, OHKUBO K, et al. Primary structure of human placental 5'-nucleotidase and identification of the glycolipid anchor in the mature form[J]. *Eur J Biochem*, 1990, 191(3): 563-569.
- [17] YEGUTKIN G G. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1783(5): 673-694.
- [18] MARTÍNEZ-MARTÍNEZ A, MUÑOZ-DELGADO E, CAMPOY F J, et al. The ecto-5'-nucleotidase subunits in dimers are not linked by disulfide bridges but by non-covalent bonds[J]. *Biochim Biophys Acta BBA Protein Struct Mol Enzymol*, 2000, 1478(2): 300-308.
- [19] OGATA S, HAYASHI Y, MISUMI Y, et al. Membrane-anchoring domain of rat liver 5'-nucleotidase: Identification of

- the COOH-terminal serine-523 covalently attached with a glycolipid[J]. *Biochemistry*, 1990, 29(34): 7923-7927.
- [20] NEDELJKOVIC N. Complex regulation of ecto-5'-nucleotidase/CD73 and A_{2A}R-mediated adenosine signaling at neurovascular unit: A link between acute and chronic neuroinflammation[J]. *Pharmacol Res*, 2019(144): 99-115.
 - [21] HEUTS D P, WEISSENBORN M J, OLKHOV R V, et al. Crystal structure of a soluble form of human CD73 with ecto-5'-nucleotidase activity[J]. *ChemBioChem*, 2012, 13(16): 2384-2391.
 - [22] KNAPP K, ZEBISCH M, PIPPEL J, et al. Crystal structure of the human ecto-5'-nucleotidase(CD73): Insights into the regulation of purinergic signaling[J]. *Structure*, 2012, 20(12): 2161-2173.
 - [23] GARAVAGLIA S, BRUZZONE S, CASSANI C, et al. The high-resolution crystal structure of periplasmic *Haemophilus influenzae* NAD nucleotidase reveals a novel enzymatic function of human CD73 related to NAD metabolism[J]. *Biochem J*, 2012, 441(1): 131-141.
 - [24] SCALETTI E, HUSCHMANN F U, MUELLER U, et al. Substrate binding modes of purine and pyrimidine nucleotides to human ecto-5'-nucleotidase(CD73) and inhibition by their bisphosphonic acid derivatives[J]. *Purinergic Signal*, 2021, 17(4): 693-704.
 - [25] LYU S F, ZHAO Y S, ZENG X, et al. Identification of phelligradin-based compounds as novel human CD73 inhibitors[J]. *J Chem Inf Model*, 2021, 61(3): 1275-1286.
 - [26] SOLEIMANI A, TAGHIZADEH E, SHAHSAVARI S, et al. CD73; a key ectonucleotidase in the development of breast cancer: Recent advances and perspectives[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(9): 14622-14632.
 - [27] ZIMMERMANN H. 5'-Nucleotidase: Molecular structure and functional aspects[J]. *Biochem J*, 1992, 285(Pt 2): 345-365.
 - [28] ANTONIOLI L, PACHER P, VIZI E S, et al. CD39 and CD73 in immunity and inflammation[J]. *Trends Mol Med*, 2013, 19(6): 355-367.
 - [29] SYNNESTVEDT K, FURUTA G T, COMERFORD K M, et al. Ecto-5'-nucleotidase(CD73) regulation by hypoxia-inducible factor-1 mediates permeability changes in intestinal epithelia[J]. *J Clin Invest*, 2002, 110(7): 993-1002.
 - [30] CHAMBERS A M, MATOSEVIC S. Immunometabolic dysfunction of natural killer cells mediated by the hypoxia-CD73 axis in solid tumors[J]. *Front Mol Biosci*, 2019(6): 60.
 - [31] LEE J W, KO J, JU C, et al. Hypoxia signaling in human diseases and therapeutic targets[J]. *Exp Mol Med*, 2019, 51(6): 1-13.
 - [32] RESTA R, THOMPSON L F. T cell signalling through CD73[J]. *Cell Signal*, 1997, 9(2): 131-139.
 - [33] AIRAS L, NIEMELÄ J, JALKANEN S. CD73 engagement promotes lymphocyte binding to endothelial cells via a lymphocyte function-associated antigen-1-dependent mechanism[J]. *J Immunol*, 2000, 165(10): 5411-5417.
 - [34] MIKHAILOV A, SOKOLOVSKAYA A, YEGUTKIN G G, et al. CD73 participates in cellular multiresistance program and protects against TRAIL-induced apoptosis[J]. *J Immunol*, 2008, 181(1): 464-475.
 - [35] AIRAS L, NIEMELÄ J, SALMI M, et al. Differential regulation and function of CD73, a glycosylphosphatidylinositol-linked 70-kD adhesion molecule, on lymphocytes and endothelial cells[J]. *J Cell Biol*, 1997, 136(2): 421-431.
 - [36] TERP M G, OLESEN K A, ARNSPANG E C, et al. Anti-human CD73 monoclonal antibody inhibits metastasis formation in human breast cancer by inducing clustering and internalization of CD73 expressed on the surface of cancer cells[J]. *J Immunol*, 2013, 191(8): 4165-4173.
 - [37] KULESSKAYA N, VÖIKAR V, PELTOLA M, et al. CD73 is a major regulator of adenosinergic signalling in mouse brain[J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): e66896.
 - [38] BLUNDON J A, ROY N C, TEUBNER B J W, et al. Restoring auditory cortex plasticity in adult mice by restricting thalamic adenosine signaling[J]. *Science*, 2017, 356(6345): 1352-1356.
 - [39] MUZZI M, BLASI F, MASI A, et al. Neurological basis of AMP-dependent thermoregulation and its relevance to central and peripheral hyperthermia[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2013, 33(2): 183-190.
 - [40] ZIELINSKI M R, PING T S, CLINTON J M, et al. 5'-Ectonucleotidase-knockout mice lack non-REM sleep responses to sleep deprivation[J]. *Eur J Neurosci*, 2012, 35(11): 1789-1798.
 - [41] YANG K Y, WU Z J, ZHANG H, et al. Glioma targeted therapy: Insight into future of molecular approaches[J]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1): 39.
 - [42] SADEJ R, SKLADANOWSKI A C. Dual, enzymatic and non-enzymatic, function of ecto-5'-nucleotidase(eN, CD73) in migration and invasion of A375 melanoma cells[J]. *Acta Biochim Pol*, 2012, 59(4): 647-652.
 - [43] XIONG L, WEN Y, MIAO X Y, et al. NT5E and FcGBP as key regulators of TGF-1-induced epithelial-mesenchymal transition(EMT) are associated with tumor progression and survival of patients with gallbladder cancer[J]. *Cell Tissue Res*, 2014, 355(2): 365-374.
 - [44] GAO Z W, WANG H P, LIN F, et al. CD73 promotes proliferation and migration of human cervical cancer cells independent of its enzyme activity[J]. *BMC Cancer*, 2017, 17(1): 135.
 - [45] ANTONIOLI L, BLANDIZZI C, PACHER P, et al. Immunity, inflammation and cancer: A leading role for adenosine[J]. *Nat Rev Cancer*, 2013, 13(12): 842-857.
 - [46] SOLEIMANI A, BAHREYNI A, ROSHAN M K, et al. Therapeutic potency of pharmacological adenosine receptors agonist/antagonist on cancer cell apoptosis in tumor microenvironment, current status, and perspectives[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(3): 2329-2336.
 - [47] BEAVIS P A, STAGG J, DARCY P K, et al. CD73: A potent suppressor of antitumor immune responses[J]. *Trends Immunol*, 2012, 33(5): 231-237.
 - [48] BUISSERET L, POMMEY S, ALLARD B, et al. Clinical significance of CD73 in triple-negative breast cancer: Multiplex analysis of a phase III clinical trial[J]. *Ann Oncol*, 2018, 29(4): 1056-1062.

- [49] SERRA S, HORENSTEIN A L, VAISITTI T, et al. CD73-generated extracellular adenosine in chronic lymphocytic leukemia creates local conditions counteracting drug-induced cell death[J]. *Blood*, 2011, 118(23): 6141-6152.
- [50] ALLARD B, LONGHI M S, ROBSON S C, et al. The ectonucleotidases CD39 and CD73: Novel checkpoint inhibitor targets[J]. *Immunol Rev*, 2017, 276(1): 121-144.
- [51] ROMIO M, REINBECK B, BONGARDT S, et al. Extracellular purine metabolism and signaling of CD73-derived adenosine in murine Treg and T_H17 cells[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2011, 301(2): C530-C539.
- [52] STAGG J, DIVISEKERA U, DURET H, et al. CD73-deficient mice have increased antitumor immunity and are resistant to experimental metastasis[J]. *Cancer Res*, 2011, 71(8): 2892-2900.
- [53] MANDAPATHIL M, HILLDORFER B, SZCZEPANSKI M J, et al. Generation and accumulation of immunosuppressive adenosine by human CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ regulatory T cells[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(10): 7176-7186.
- [54] ZANIN R F, BRAGANHOL E, BERGAMIN L S, et al. Differential macrophage activation alters the expression profile of NTPDase and ecto-5'-nucleotidase[J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): e31205.
- [55] COSTALES M G, ALAM M S, CAVANAUGH C, et al. Extracellular adenosine produced by ecto-5'-nucleotidase(CD73) regulates macrophage pro-inflammatory responses, nitric oxide production, and favors *Salmonella* persistence[J]. *Nitric Oxide*, 2018(72): 7-15.
- [56] ALLARD D, CHROBAK P, ALLARD B, et al. Targeting the CD73-adenosine axis in immuno-oncology[J]. *Immunol Lett*, 2019(205): 31-39.
- [57] NOCENTINI A, CAPASSO C, SUPURAN C T. Small-molecule CD73 inhibitors for the immunotherapy of cancer: A patent and literature review(2017-present)[J]. *Expert Opin Ther Pat*, 2021, 31(10): 867-876.
- [58] BURGER R M, LOWENSTEIN J M. Preparation and properties of 5'-nucleotidase from smooth muscle of small intestine[J]. *J Biol Chem*, 1970, 245(23): 6274-6280.
- [59] IVAN PERROT, HENRI-ALEXANDRE MICHAUD, MARC GIRAUDON-PAOLI, et al. Blocking antibodies targeting the CD39/CD73 immunosuppressive pathway unleash immune responses in combination cancer therapies[J]. *Cell Reports*, 2019, 27(8): 2411-2425.
- [60] NAITO Y, LOWENSTEIN J M. 5'-Nucleotidase from rat heart membranes. Inhibition by adenine nucleotides and related compounds[J]. *Biochem J*, 1985, 226(3): 645-651.
- [61] TAKEDA T A, MIYAZAKI S, KOBAYASHI M, et al. Zinc deficiency causes delayed ATP clearance and adenosine generation in rats and cell culture models[J]. *Commun Biol*, 2018(1): 113.
- [62] BHATTARAI S, PIPPEL J, SCALETTI E, et al. 2-substituted α , β -methylene-ADP derivatives: Potent competitive ecto-5'-nucleotidase(CD73) inhibitors with variable binding modes[J]. *J Med Chem*, 2020, 63(6): 2941-2957.
- [63] GILEAD SCIENCES. Study With Immunotherapy Combinations in Participants With Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer[EB/OL]. US National Library of Medicine. ClinicalTrials.gov. (2023-01-09) [2023-03-10]. <https://ClinicalTrials.gov/study/NCT05676931>.
- [64] BHATTARAI S, PIPPEL J, MEYER A, et al. X-ray co-crystal structure guides the way to subnanomolar competitive ecto-5'-nucleotidase(CD73) inhibitors for cancer immunotherapy[J]. *Adv Ther*, 2019, 2(10): 1900075.
- [65] JUNKER A, RENN C, DOBELMANN C, et al. Structure-activity relationship of purine and pyrimidine nucleotides as ecto-5'-nucleotidase(CD73) inhibitors[J]. *J Med Chem*, 2019, 62(7): 3677-3695.
- [66] SCORTICHINI M, IDRIS R M, MOSCHÜTZ S, et al. Structure-activity relationship of 3-methylcytidine-5'- α , β -methylenediphosphates as CD73 inhibitors[J]. *J Med Chem*, 2022, 65(3): 2409-2433.
- [67] LAWSON K V, KALISIAK J, LINDSEY E A, et al. Discovery of AB680: A potent and selective inhibitor of CD73[J]. *J Med Chem*, 2020, 63(20): 11448-11468.
- [68] LAWSON K V, JIN L X, JEFFREY J L, et al. Discovery and characterization of AB680, a potent and selective small-molecule CD73 inhibitor for cancer immunotherapy[J]. *Cancer Res*, 2018, 78(13): 1756.
- [69] ARCUS BIOSCIENCES, INC. A study to investigate the safety of AB680 in healthy volunteers[EB/OL]. US National Library of Medicine. ClinicalTrials.gov. (2018-09-19) [2023-03-10]. <https://ClinicalTrials.gov/study/NCT03677973>.
- [70] ARCUS BIOSCIENCES, INC. A Study to Investigate the Pharmacokinetic Profile of Oral AB680 in Healthy Volunteers[EB/OL]. US National Library of Medicine. ClinicalTrials.gov. (2020-10-05) [2023-03-10]. <https://ClinicalTrials.gov/study/NCT04575311>.
- [71] JONSSON COMPREHENSIVE CANCER CENTER. Zimberelimab and Quemliclustat in Combination With Chemotherapy for the Treatment of Patients With Borderline Resectable and Locally Advanced Pancreatic Adenocarcinoma[EB/OL]. US National Library of Medicine. ClinicalTrials.gov. (2023-01-18) [2023-03-10]. <https://ClinicalTrials.gov/study/NCT05688215>.
- [72] GILEAD SCIENCES. Study With Immunotherapy Combinations in Participants With Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer[EB/OL]. US National Library of Medicine. ClinicalTrials.gov. (2023-01-15) [2023-03-10] <https://ClinicalTrials.gov/study/NCT05676931>.
- [73] ARCUS BIOSCIENCES, INC. A Safety and Efficacy Study of Treatment Combinations With and Without Chemotherapy in Adult Participants With Advanced Upper Gastrointestinal Tract Malignancies[EB/OL]. US National Library of Medicine. ClinicalTrials.gov. (2022-04-15) [2023-03-10]. <https://ClinicalTrials.gov/study/NCT05329766>.
- [74] ARCUS BIOSCIENCES, INC. Adenosine Receptor Antagonist Combination Therapy for Metastatic Castrate Resistant Prostate Cancer[EB/OL]. US National Library of Medicine. ClinicalTrials.gov. (2020-05-11) [2023-03-10]. <https://ClinicalTrials.gov/study/NCT0438183>.
- [75] SHARIF E U, KALISIAK J, LAWSON K V, et al. Discovery of potent and selective methylenephosphonic acid CD73

- inhibitors[J]. *J Med Chem*, 2021, 64(1): 845-860.
- [76] DU X H, MOORE J, BLANK B R, et al. Orally bioavailable small-molecule CD73 inhibitor(OP-5244) reverses immunosuppression through blockade of adenosine production[J]. *J Med Chem*, 2020, 63(18): 10433-10459.
- [77] WANG B, YANG H B, BEDKE K, et al. Cd73 inhibitors and uses thereof: US20200115404[P]. 2020-04-16.
- [78] CACATIAN S, CLAREMON D A, JIA L, et al. Preparation of purine derivatives as CD73 inhibitors for the treatment of cancer: WO2015164573A1[P]. 2015-10-29.
- [79] BILLEDEAU R J, LI J, CHEN L. Preparation of heterocyclic nucleosides as antitumor agents and ectonucleotidase inhibitors: WO2018119284A1[P]. 2018-06-28.
- [80] LI J, CHEN L J, BILLEDEAU R J, et al. Discovery of a series of potent, selective, and orally bioavailable nucleoside inhibitors of CD73 that demonstrates *in vivo* antitumor activity[J]. *J Med Chem*, 2023, 66(1): 345-370.
- [81] JEFFREY J L, LAWSON K V, POWERS J P. Targeting metabolism of extracellular nucleotides via inhibition of ectonucleotidases CD73 and CD39[J]. *J Med Chem*, 2020, 63(22): 13444-13465.
- [82] ZEBISCH M, BAQI Y, SCHÄFER P, et al. Crystal structure of NTPDase2 in complex with the sulfoanthraquinone inhibitor PSB-071[J]. *J Struct Biol*, 2014, 185(3): 336-341.
- [83] BAQI Y, LEE S Y, IQBAL J, et al. Development of potent and selective inhibitors of ecto-5'-nucleotidase based on an anthraquinone scaffold[J]. *J Med Chem*, 2010, 53(5): 2076-2086.
- [84] RIPPHAUSEN P, FREUNDLIEB M, BRUNSCHWEIGER A, et al. Virtual screening identifies novel sulfonamide inhibitors of ecto-5'-nucleotidase[J]. *J Med Chem*, 2012, 55(14): 6576-6581.
- [85] AL-RASHIDA M, BATOOL G, SATTAR A, et al. 2-Alkoxy-3-(sulfonylarylamino)methylene)-chroman-4-ones as potent and selective inhibitors of ectonucleotidases[J]. *Eur J Med Chem*, 2016(115): 484-494.
- [86] DUFFY K J, PARRISH C A, ATOR L E, et al. Preparation of macrocycles containing salicylamide and arylsulfonamide fragments as CD73 inhibitors useful in mono- and combination therapy of cancer and other diseases: WO2019053617A1[P]. 2019-03-21.
- [87] ADAMS J L, ATOR L E, DUFFY K J, et al. Preparation of benzothiadiazine compounds as CD73 inhibitors for treating cancer and other diseases assocd. with CD73 inhibition: WO2017098421A1[P]. 2017-06-15.
- [88] DALLY R D, GARCIA PAREDES M C, HEINZ L J, II, et al. Preparation of 5-(5-cycloalkylpyridazin-3-yl)-1H-pyrimidine-2, 4-dione compounds as CD73 inhibitors useful in treating cancer: WO2019168744A1[P]. 2019-09-06.
- [89] ZHANG X, CHANG S, LI X, et al. Preparation of pyrimidinedione derivatives which inhibit the activity of CD73: WO2022068929A1[P]. 2022-04-07.
- [90] LIU J, WU H P, ZHUANG L H, et al. CD73 inhibitors and therapeutic uses thereof: US11332492[P]. 2022-05-17.
- [91] ZHANG Y M, YE S, WANG Y, et al. Discovery and optimization of betulinic acid derivatives as novel potent CD73 inhibitors[J]. *Bioorg Med Chem*, 2022(59): 116672.
- [92] ZHANG Y M, YANG K L, YE S, et al. Application of a fluorine strategy in the lead optimization of betulinic acid to the discovery of potent CD73 inhibitors[J]. *Steroids*, 2022(188): 109112.
- [93] BEATTY J W, LINDSEY E A, THOMAS-TRAN R, et al. Discovery of potent and selective non-nucleotide small molecule inhibitors of CD73[J]. *J Med Chem*, 2020, 63(8): 3935-3955.
- [94] MILIUTINA M, JANKE J, HASSAN S, et al. A domino reaction of 3-chlorochromones with aminoheterocycles. Synthesis of pyrazolopyridines and benzofuopyridines and their optical and ecto-5'-nucleotidase inhibitory effects[J]. *Org Biomol Chem*, 2018, 16(5): 717-732.
- [95] ASHRAF A, SHAFIQ Z, KHAN JADOON M S, et al. Synthesis, characterization, and *In silico* studies of novel spirooxindole derivatives as ecto-5'-nucleotidase inhibitors[J]. *ACS Med Chem Lett*, 2020, 11(12): 2397-2405.
- [96] WANG L G, WEN Y M, ZHOU L. Progress in medications for triple negative breast cancer[J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学)*, 2022, 39(11): 1509-1516.
- [97] BOWSER J L, BLACKBURN M R, SHIPLEY G L, et al. Loss of CD73-mediated actin polymerization promotes endometrial tumor progression[J]. *J Clin Invest*, 2016, 126(1): 220-238.
- [98] SUPERNAT A, MARKIEWICZ A, WELNICKA-JASKIEWICZ M, et al. CD73 expression as a potential marker of good prognosis in breast carcinoma[J]. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2012, 20(2): 103-107.
- [99] SCHNEIDER E, RISSIEK A, WINZER R, et al. Generation and function of non-cell-bound CD73 in inflammation[J]. *Front Immunol*, 2019(10): 1729.
- [100] HUANG Q, DURHAM N M, SULT E, et al. Levels and enzyme activity of CD73 in primary samples from cancer patients[C]//Proceedings of the 106th annual meeting of the American Association for Cancer Research, 2015, 75(15): 1538.
- [101] MORELLO S, CAPONE M, SORRENTINO C, et al. Soluble CD73 as biomarker in patients with metastatic melanoma patients treated with nivolumab[J]. *J Transl Med*, 2017, 15(1): 244.
- [102] LI Q L, PRICE T P, SUNDBERG J P, et al. Juxta-articular joint-capsule mineralization in CD73 deficient mice: Similarities to patients with NT5E mutations[J]. *Cell Cycle*, 2014, 13(16): 2609-2615.

收稿日期: 2023-03-10
(本文责编: 陈怡心)