

萘环类PD-1/PD-L1抑制剂的设计、合成及生物活性评价

赵磊¹, 余龙波², 欧阳宜强¹, 郭文洁², 徐强², 高健^{2*}, 赖宜生^{1*}

¹中国药科大学, 新药研究中心, 天然药物活性组分与药效国家重点实验室, 江苏省代谢性疾病药物重点实验室, 江苏 南京

²南京大学, 生命科学学院, 医药生物技术国家重点实验室, 江苏 南京
Email: *gaojian1328127@163.com, *yslai@cpu.edu.cn

收稿日期: 2021年4月30日; 录用日期: 2021年5月24日; 发布日期: 2021年5月31日

摘要

以BMS-1018为先导化合物, 通过替换联苯片段为萘环以及生物电子等排原理, 结合分子对接技术, 设计并合成了两个系列共18个新型萘环类PD-1/PD-L1小分子抑制剂, 结构经¹H-NMR和ESI-MS谱确证。采用均相时间分辨荧光法评价目标化合物对PD-1/PD-L1结合的抑制活性。结果表明, 所有目标化合物对PD-1/PD-L1均显示不同程度的抑制活性。其中6个化合物A-8、A-9和B-5、B-6、B-8、B-9的活性较为突出, 值得进一步研究。

关键词

肿瘤免疫治疗, 免疫检查点, PD-1/PD-L1抑制剂, 生物活性

Design, Synthesis and Biological Evaluation of Naphthalene Ring PD-1/PD-L1 Inhibitors

Lei Zhao¹, Longbo Yu², Yiqiang Ouyang¹, Wenjie Guo², Qiang Xu², Jian Gao^{2*}, Yisheng Lai^{1*}

¹China Pharmaceutical University, Jiangsu Key Laboratory of Drug Discovery for Metabolic Diseases, State Key Laboratory of National Medicines, Center of Drug Discovery, Nanjing Jiangsu

²Nanjing University, School of Life Sciences, State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, Nanjing Jiangsu
Email: *gaojian1328127@163.com, *yslai@cpu.edu.cn

*通讯作者。

文章引用: 赵磊, 余龙波, 欧阳宜强, 郭文洁, 徐强, 高健, 赖宜生. 萘环类 PD-1/PD-L1 抑制剂的设计、合成及生物活性评价[J]. 药物化学, 2021, 9(2): 94-103. DOI: 10.12677/hjmce.2021.92012

Received: Apr. 30th, 2021; accepted: May 24th, 2021; published: May 31st, 2021

Abstract

Using BMS-1018 as the lead compound, two series of novel naphthalene-based PD-1/PD-L1 small molecule inhibitors were designed and synthesized by replacing the biphenyl moiety with a naphthalene ring and applying the principle of bioisosterism combined with molecular docking technology. The structures of the target compounds were confirmed by ¹H-NMR and ESI-MS. The inhibitory activity of the compounds against the PD-1/PD-L1 interaction was evaluated by homogeneous time-resolved fluorescence. The results showed that all the target compounds displayed different degrees of inhibitory activity. Among them, six compounds A-8, A-9 and B-5, B-6, B-8, B-9 have outstanding activities, which are worthy of further study.

Keywords

Tumor Immunotherapy, Immune Checkpoint, PD-1/PD-L1 Inhibitor, Biological Activity

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

免疫检查点是指通过平衡共刺激和共抑制信号来控制 T 细胞免疫应答强度的信号通路[1]。在正常生理状态下,免疫检查点在维持自身耐受和避免自身免疫中发挥重要作用,但在肿瘤患者中,免疫检查点相关蛋白的表达失调,会导致肿瘤免疫逃逸[2]。自 2014 年以来,美国 FDA 已批准 6 种 PD-1/PD-L1 单克隆抗体用于癌症治疗[3],这些单抗具有很好的临床疗效,显著改善了部分此前无法治疗的恶性肿瘤患者的预后。但是高成本、低应答率、免疫原性等问题仍然限制了该类单抗的临床应用[4]。因此,PD-1/PD-L1 小分子抑制剂的研发引起了越来越多学术机构和制药公司的关注[5]。2015 年,百时美施贵宝(BMS)公司首次披露了一系列具有间-(苯氧甲基)联苯骨架的 PD-1/PD-L1 小分子抑制剂(图 1)[6][7]。随后,Holak 课题组发现,BMS-202 及其类似物可诱导 PD-L1 蛋白同源二聚体的形成,从而阻止 PD-L1 与其受体 PD-1 的结合,并最终阻断下游信号传导[8][9][10]。受到这一独特作用机制的启发,一系列新型 PD-1/PD-L1 小分子抑制剂先后被研发,并有望与单抗联用实现协同抗癌作用[11]。

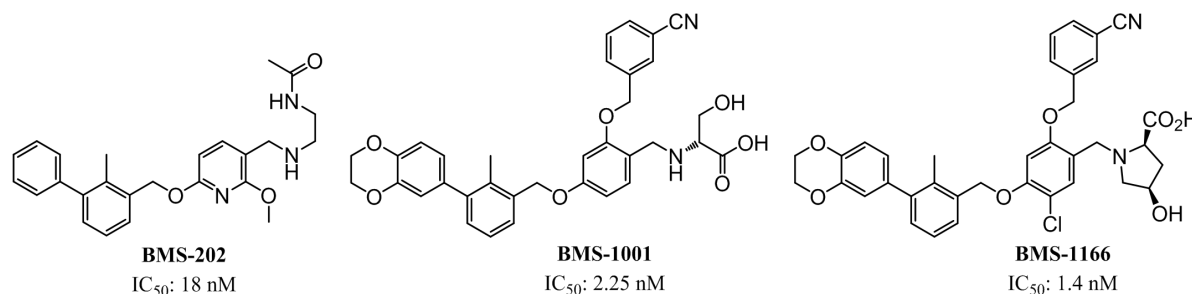


Figure 1. The representative small-molecule PD-1/PD-L1 inhibitors developed by BMS

图 1. BMS 研发的代表性 PD-1/PD-L1 小分子抑制剂的结构

2. 目标化合物的设计与合成

2.1. 目标化合物的设计

在 BMS 公司公开 PD-1/PD-L1 小分子抑制剂结构后, Holak 等[8] [9]揭示了其中的 BMS-202、BMS-1001、BMS-1166 与靶蛋白结合的晶体结构, 发现其联苯片段能够与 PD-L1 二聚体构成的疏水通道形成关键的作用。具体来讲, 联苯中的 a 环能够与 A 亚基的 Met115 形成关键的 π -烷基堆积作用, 因此增强联苯结构的电子云密度可能有利于提高活性。据此, 本文作者尝试将联苯结构替换成萘环, 拟在保留联苯结构 a 环的同时, 通过共轭作用提高电子云密度, 从而增强其与疏水空腔 A Met115 的 π -烷基作用。再者, 萘环与联苯结构的体积相当, 有望能够更好地占据疏水空腔。此外, 我们还对伸向溶剂区的亲水片段 R 基团进行优化, 以考察其对活性的影响, 从而设计了 A 系列和 B 系列目标化合物(图 2)。

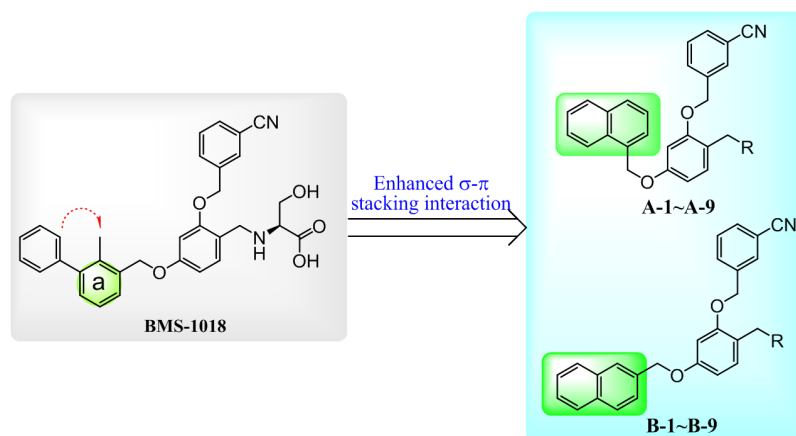
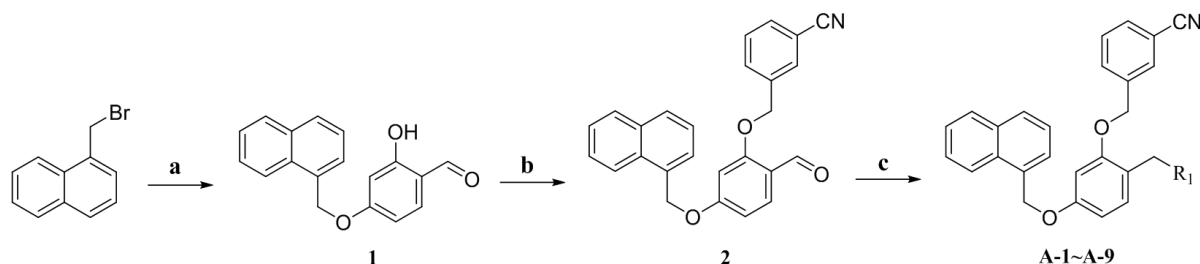


Figure 2. The design strategy of the target compounds A and B
图 2. A 和 B 系列目标化合物的设计策略

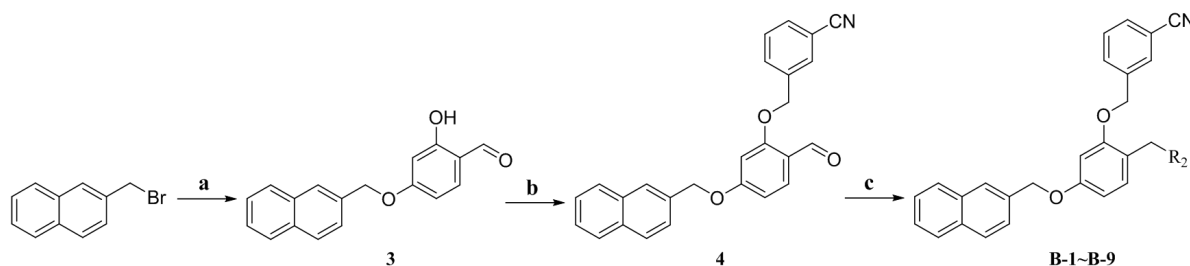
A 系列目标化合物的合成: 以 1-溴甲基萘为原料, 与 2,4-二羟基苯甲醛经 Williamson 醚化反应生成中间体 **1**, **1** 与间氰基苄溴反应生成中间体 **2**, **2** 分别与各种氨基醇或氨基酸经还原胺化反应制得目标化合物 A-1~A-9 (图 3)。



试剂和条件: (a) CH_3CN , NaHCO_3 , 90°C , 6 h; (b) 3-(bromomethyl)benzonitrile, DMF, K_2CO_3 , rt, 12 h; (c) DMF, AcOH, NaBH_3CN , rt, 24 h.

Figure 3. Synthetic route for the target compounds A-1~A-9
图 3. 目标化合物 A-1~A-9 的合成路线

B 系列目标化合物的合成: 以 2-溴甲基萘为原料, 与 2,4-二羟基苯甲醛经 Williamson 醚化反应生成中间体 **3**, **3** 与间氰基苄溴反应生成中间体 **4**, **4** 分别与各种氨基醇或氨基酸经还原胺化反应制得目标化合物 B-1~B-9 (图 4)。



试剂和条件: (a) CH_3CN , NaHCO_3 , 90°C , 6 h; (b) 3-(bromomethyl)benzonitrile, DMF, K_2CO_3 , rt, 12 h; (c) DMF, AcOH, NaBH_3CN , rt, 24 h.

Figure 4. Synthetic route for the target compounds B-1~B-9

图 4. 目标化合物 B-1~B-9 的合成路线

2.2. 目标化合物的合成

化合物熔点采用 RY-1 型熔点仪测定, 温度计未经校正; $^1\text{H-NMR}$ 使用 ACF-300 MHz 核磁共振仪测定, TMS 为内标; ESI-MS 使用 Agilent 1100 Series LC/MSD Trap (SL) 质谱仪测定。所有试剂未经特别说明均为市售化学纯或分析纯产品。

2.2.1. 目标化合物 A-1~A-9 的合成

分别将 1-溴甲基萘(2.0 g, 9.1 mmol)、2,4-二羟基苯甲醛(1.5 g, 10.8 mmol)和碳酸氢钠(1.2 g, 14.3 mmol)加入乙腈(30 mL)中, 90°C 回流反应 12 h。加入水(100 mL), 乙酸乙酯萃取(50 mL \times 3), 有机相用无水硫酸镁干燥, 抽滤, 滤液浓缩, 柱层析分离(石油醚/乙酸乙酯, 体积比 15:1)得白色固体 **1** (1.5 g, 收率 59.6%)。 $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 11.07 (s, 1H), 10.02 (s, 1H), 8.00-7.96 (m, 2H), 7.95 (s, 1H), 7.93 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H), 7.65 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 7.58 (dd, $J = 8.4, 1.8$ Hz, 1H), 7.55-7.52 (m, 2H), 6.70 (dd, $J = 8.7, 2.4$ Hz, 1H), 6.62 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 5.35 (s, 2H)。

分别将 **1** (1.5 g, 5.4 mmol)、碳酸钾(1.1 g, 8.1 mmol)和 3-氰基苄基溴(1.4 g, 7.1 mmol)加入 DMF(30 mL)中, 室温反应 6 h。加入水(150 mL), 乙酸乙酯萃取(50 mL \times 3), 有机相用无水硫酸镁干燥, 抽滤, 滤液浓缩, 柱层析分离(石油醚/乙酸乙酯, 体积比 8:1)得白色固体 **2** (1.8 g, 收率 84.9%)。 $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{Chloroform-}d$) δ 10.38 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H), 7.92 (d, $J = 9.5$ Hz, 2H), 7.90-7.82 (m, 3H), 7.68 (dd, $J = 16.1, 5.9$ Hz, 2H), 7.64-7.59 (m, 1H), 7.58-7.51 (m, 2H), 7.48 (dd, $J = 14.3, 7.1$ Hz, 2H), 6.83-6.68 (m, 1H), 6.59 (d, $J = 4.7$ Hz, 1H), 5.29 (s, 2H), 5.16 (s, 2H)。

3-((((1,3-二羟基-2-甲基丙烷-2-基)氨基)甲基)-5-(萘-1-基甲氧基)苯氧基)甲基)苯甲腈(**A-1**)的制备: 将 **2** (0.2 g, 0.5 mmol)溶于 DMF(25 mL)中, 随后依次加入 2-氨基-2-甲基-1,3-丙二醇(0.1 g, 1.0 mmol)、冰醋酸(0.06 g, 1.0 mmol)和氰基硼氢化钠(0.1 g, 1.6 mmol), 室温反应 24 h。加入水(50 mL), 乙酸乙酯萃取(20 mL \times 3), 有机相用无水硫酸镁干燥, 抽滤, 滤液浓缩, 柱层析分离(二氯甲烷/甲醇, 体积比 20:1), 得 0.15 g 白色固体 **A-1**, 收率 61.1%, mp $183^\circ\text{C}\sim 185^\circ\text{C}$ 。ESI-MS m/z : 481.2 $[\text{M-H}]^-$ 。 $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8.10-8.06 (m, 1H), 8.03 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 8.00 (dd, $J = 7.7, 1.9$ Hz, 1H), 7.95 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.91-7.87 (m, 1H), 7.83 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.68 (dd, $J = 7.0, 1.2$ Hz, 1H), 7.62-7.57 (m, 3H), 7.52 (dd, $J = 8.2, 7.0$ Hz, 1H), 7.44 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 6.88 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 6.81 (dd, $J = 8.4, 2.3$ Hz, 1H), 5.60 (s, 2H), 5.40 (s, 2H), 5.22 (s, 2H), 4.12 (s, 2H), 3.55 (s, 2H), 3.54 (s, 2H), 1.12 (s, 3H)。采用类似的方法制备目标化合物 **A-2~A-9**。

3-((2-((咪唑-2-基甲基)氨基)甲基)-5-(萘-1-基甲氧基)苯氧基)甲基)苯甲腈(**A-2**), 白色固体, 收率 62.2%, mp $172^\circ\text{C}\sim 174^\circ\text{C}$ 。ESI-MS m/z : 473.2 $[\text{M-H}]^-$ 。 $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{Chloroform-}d$) δ 7.92 (td, $J = 6.2, 3.0$ Hz, 2H), 7.87 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.72 (dd, $J = 8.9, 1.7$ Hz, 2H), 7.62 (dt, $J = 7.7, 1.4$ Hz, 1H), 7.54 (dd, $J = 6.4, 3.3$ Hz, 2H), 7.51 (d, $J = 1.1$ Hz, 1H), 7.50-7.48 (m, 2H), 7.47 (s, 1H), 7.33 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H), 6.68 (dd, J

= 8.4, 2.3 Hz, 1H), 6.59 (d, $J = 3.4$ Hz, 1H), 6.55 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 6.30 (dd, $J = 3.3, 1.9$ Hz, 1H), 5.34 (s, 2H), 5.10 (s, 2H), 3.97 (s, 2H), 3.94 (s, 2H)。

3-((2-((1,3-二羟基丙烷-2-基)氨基)甲基)-5-(萘-1-基甲氧基)苯氧基)甲基)苯甲腈(**A-3**), 白色固体, 收率 42.0%, mp 175°C~177°C。ESI-MS m/z : 467.2 [M-H]⁻。¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.99 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.86 (dt, $J = 15.1, 7.4$ Hz, 2H), 7.73 (d, $J = 5.6$ Hz, 1H), 7.60 (d, $J = 6.5$ Hz, 1H), 7.53 (dq, $J = 7.7, 4.1$ Hz, 4H), 7.43 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H), 7.33 (s, 1H), 6.68 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 6.57 (d, $J = 5.7$ Hz, 1H), 5.41 (s, 2H), 5.08 (s, 2H), 4.07 (s, 2H), 3.74 (d, $J = 7.1$ Hz, 4H), 3.00-2.94 (m, 1H), 2.90 (d, $J = 7.4$ Hz, 2H)。

N-(2-((2-((3-氰基苯)氧基)-4-(萘-1-甲氧基)苄基)氨基)乙基)乙酰胺(**A-4**), 白色固体, 收率 41.0%, mp 165°C~167°C。ESI-MS m/z : 478.2 [M-H]⁻。¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.06-7.96 (m, 1H), 7.92-7.87 (m, 1H), 7.85 (s, 1H), 7.73 (d, $J = 6.7$ Hz, 1H), 7.66 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.56 (t, $J = 5.6$ Hz, 2H), 7.53 (s, 1H), 7.51-7.44 (m, 2H), 7.34 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.10 (s, 1H), 6.71 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 6.60 (d, $J = 14.7$ Hz, 1H), 5.44 (s, 2H), 5.15 (s, 2H), 4.11 (s, 2H), 3.44 (t, $J = 10.4$ Hz, 2H), 3.12 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 1.93 (s, 3H)。

N-(2-((3-氰基苯)氧基)-4-(萘-1-基甲氧基)苄基)-*N*-甲基甘氨酸(**A-5**), 白色固体, 收率 56.2%, mp 171°C~173°C。ESI-MS m/z : 465.2 [M-H]⁻。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.09-8.05 (m, 1H), 7.98-7.93 (m, 2H), 7.91 (d, $J = 5.1$ Hz, 2H), 7.79 (t, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.65 (d, $J = 7.1$ Hz, 1H), 7.57 (dd, $J = 8.1, 4.3$ Hz, 3H), 7.51 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 6.78 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 6.70 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 5.51 (s, 2H), 5.19 (s, 2H), 3.56 (s, 2H), 3.55 (s, 2H), 2.14 (s, 3H)。

(*S*)-1-(2-((3-氰基苯甲酰基)氧基)-4-(萘-1-基甲氧基)苄基)哌啶-2-羧酸(**A-6**), 白色固体, 收率 46.6%, mp 172°C~174°C。ESI-MS m/z : 505.2 [M-H]⁻。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.08 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 8.01-7.92 (m, 3H), 7.82 (dd, $J = 12.0, 7.7$ Hz, 2H), 7.67 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H), 7.59 (q, $J = 7.5, 6.5$ Hz, 3H), 7.52 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.36 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 6.83 (s, 1H), 6.79 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 5.54 (s, 2H), 5.22 (s, 2H), 4.04-3.97 (m, 2H), 3.86 (s, 1H), 3.19 (dd, $J = 8.1, 4.1$ Hz, 1H), 3.00 (dd, $J = 11.5, 5.9$ Hz, 1H), 1.86 (t, $J = 9.3$ Hz, 1H), 1.73 (q, $J = 10.7, 9.3$ Hz, 1H), 1.53 (m, 3H), 1.37 (q, $J = 7.5, 7.1$ Hz, 1H)。

(2-((3-氰基苯甲酰基)氧基)-4-(萘-1-基甲氧基)苄基)-*L*-丝氨酸(**A-7**), 白色固体, 收率 44.8%, mp 167°C~169°C。ESI-MS m/z : 481.2 [M-H]⁻。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.07 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 8.00 (s, 2H), 7.94 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.89 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.80 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.66 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H), 7.63-7.53 (m, 4H), 7.52 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.42 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 6.86 (s, 1H), 6.79 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 5.55 (s, 2H), 5.24 (s, 2H), 4.17 (d, $J = 11.7$ Hz, 2H), 3.84 (s, 2H), 3.43 (s, 1H)。

2-((2-((3-氰基苯甲酰基)氧基)-4-(萘-1-基甲氧基)苄基)氨基)-3-羟基丁酸(**A-8**), 白色固体, 收率 41.5%, mp 161°C~163°C。ESI-MS m/z : 495.2 [M-H]⁻。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.08-8.05 (m, 1H), 7.98 (d, $J = 9.3$ Hz, 2H), 7.94 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.88 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.80 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.66 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H), 7.61-7.56 (m, 3H), 7.53-7.49 (m, 1H), 7.32 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 6.81 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 6.74 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 5.53 (s, 2H), 5.22 (s, 2H), 3.91 (d, $J = 6.3$ Hz, 2H), 3.84 (d, $J = 4.5$ Hz, 1H), 3.81 (d, $J = 6.1$ Hz, 1H), 1.11 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H)。

(2-((3-氰基苯甲酰基)氧基)-4-(萘-1-基甲氧基)苄基)-*L*-脯氨酸(**A-9**), 白色固体, 收率 43.9%, mp 174°C~176°C。ESI-MS m/z : 491.2 [M-H]⁻。¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.02-7.98 (m, 1H), 7.94-7.88 (m, 2H), 7.72 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.68 (s, 1H), 7.60 (s, 1H), 7.55 (dd, $J = 4.0, 2.4$ Hz, 2H), 7.51-7.45 (m, 2H), 7.39 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.28 (s, 1H), 6.70 (dd, $J = 8.3, 2.3$ Hz, 1H), 6.57 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 5.43 (s, 2H), 5.14 (s, 2H), 4.28 (s, 2H), 3.91 (d, $J = 4.1$ Hz, 1H), 3.58 (q, $J = 3.8, 3.3$ Hz, 1H), 2.94 (d, $J = 9.5$ Hz, 1H), 2.38-2.27 (m, 2H), 1.97 (dd, $J = 10.1, 5.9$ Hz, 2H)。

2.2.2. 目标化合物 B-1~B-9 的合成

分别将 2-溴甲基萘(2.0 g, 9.1 mmol)、2,4-二羟基苯甲醛(1.5 g, 10.8 mmol)和碳酸氢钠(1.2 g, 14.3 mmol)加入乙腈(30 mL)中, 90°C回流反应 12 h。加入水(100 mL), 乙酸乙酯萃取(50 mL × 3), 有机相用无水硫酸镁干燥, 抽滤, 滤液浓缩, 柱层析分离(石油醚/乙酸乙酯, 体积比 15:1)得白色固体 **3** (1.4 g, 收率 55.6%)。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.97 (s, 1H), 9.92 (s, 1H), 7.95-7.92 (m, 2H), 7.90 (s, 1H), 7.87 (s, 1H), 7.62 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H), 7.55 (dd, *J* = 7.5, 1.7 Hz, 1H), 7.45 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 6.65 (dd, *J* = 7.7, 2.1 Hz, 1H), 6.53 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H), 5.35 (s, 2H)。

分别将 **3** (1.5 g, 5.4 mmol)、碳酸钾(1.1 g, 8.1 mmol)和 3-氰基苄基溴(1.4 g, 7.1 mmol)加入 DMF (30 mL)中, 室温反应 6 h。加入水(150 mL), 乙酸乙酯萃取(50 mL × 3), 有机相用无水硫酸镁干燥, 抽滤, 滤液浓缩, 柱层析分离(石油醚/乙酸乙酯, 体积比 8:1)得白色固体 **4** (1.7 g, 收率 80.2%)。¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 10.39 (s, 1H), 7.93 (s, 1H), 7.90 (d, *J* = 2.2 Hz, 2H), 7.88 (s, 2H), 7.71 (s, 1H), 7.65 (d, *J* = 5.7 Hz, 1H), 7.62 (s, 1H), 7.56 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 7.53 (dd, *J* = 3.8, 2.1 Hz, 2H), 7.51 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 6.76 (dd, *J* = 8.8, 2.2 Hz, 1H), 6.59 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 5.31 (s, 2H), 5.17 (s, 2H)。

3-((2-((1,3-二羟基-2-甲基丙烷-2-基)氨基)甲基)-5-(萘-2-基甲氧基)苯氧基)甲基)苯甲腈(**B-1**)的制备: 将 **4** (0.2 g, 0.5 mmol)溶于 DMF(25 mL)中, 随后依次加入 2-氨基-2-甲基-1,3-丙二醇(0.1 g, 1.0 mmol)、冰醋酸(0.06 g, 1.0 mmol)和氰基硼氢化钠(0.1 g, 1.6 mmol), 室温反应 24 h, 加入水(50 mL), 乙酸乙酯萃取(30 mL × 3), 有机相用无水硫酸镁干燥, 抽滤, 滤液浓缩, 柱层析分离(二氯甲烷/甲醇, 体积比 20:1), 得 0.15 g 白色固体 **B-1**, 收率 40.7%, mp 182°C~184°C。ESI-MS *m/z*: 481.2 [M-H]⁻。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.24 (s, 1H), 8.02 (s, 1H), 7.98 (s, 1H), 7.97-7.93 (m, 2H), 7.92 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H), 7.88 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.82 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.63-7.57 (m, 2H), 7.56 (q, *J* = 1.8 Hz, 1H), 7.54-7.53 (m, 1H), 7.38 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.86 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 6.74 (dd, *J* = 8.4, 2.4 Hz, 1H), 5.37 (s, 2H), 5.34 (s, 2H), 5.22 (s, 2H), 4.10 (s, 2H), 3.52 (s, 4H), 1.10 (s, 3H)。用类似的方法制备目标化合物 **B-2~B-9**。

3-((2-((1,3-二羟基丙烷-2-基)氨基)甲基)-5-(萘-2-基甲氧基)苯氧基)甲基)苯甲腈(**B-2**), 白色固体, 收率 56.0%, mp 163°C~165°C。ESI-MS *m/z*: 467.2 [M-H]⁻。¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.86 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 7.84 (s, 1H), 7.82 (t, *J* = 2.8 Hz, 2H), 7.75 (s, 1H), 7.63 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.56-7.53 (m, 1H), 7.49 (dd, *J* = 6.4, 2.9 Hz, 3H), 7.47-7.40 (m, 2H), 7.28 (s, 1H), 6.62 (dd, *J* = 8.3, 2.2 Hz, 1H), 6.56 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 5.14 (s, 2H), 5.11 (s, 2H), 4.08 (s, 2H), 3.74 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H), 3.69-3.58 (m, 2H), 2.96-2.90 (m, 1H)。

N-2-((2-((3-氰基苯甲酰基)氧基)-4-(萘-2-基甲氧基)苄基)氨基)乙基)乙酰胺(**B-3**), 白色固体, 收率 61.5%, mp 170°C~172°C。ESI-MS *m/z*: 478.2 [M-H]⁻。¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.87 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H), 7.85 (d, *J* = 4.3 Hz, 2H), 7.83 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H), 7.75 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 7.68-7.64 (m, 1H), 7.60-7.56 (m, 1H), 7.53-7.50 (m, 2H), 7.50 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 7.48-7.46 (m, 1H), 7.33 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.28 (s, 1H), 6.63 (dd, *J* = 8.4, 2.3 Hz, 1H), 6.57 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 5.16 (s, 4H), 4.07 (s, 2H), 3.49 (s, 1H), 3.45 (d, *J* = 4.9 Hz, 2H), 3.06 (t, *J* = 5.0 Hz, 2H), 1.93 (s, 3H)。

3-((2-((2-羟乙基)氨基)甲基)-5-(萘-2-基甲氧基)苯氧基)甲基)苯甲腈(**B-4**), 白色固体, 收率 49.3%, mp 167°C~169°C。ESI-MS *m/z*: 437.2 [M-H]⁻。¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.86 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H), 7.84 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 7.82 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 7.73 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 7.67-7.64 (m, 1H), 7.54 (s, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.50 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H), 7.48 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 7.46 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 7.32 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.28 (s, 1H), 6.62 (dd, *J* = 8.4, 2.3 Hz, 1H), 6.57 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 5.16 (s, 2H), 5.15 (s, 2H), 4.10 (s, 2H), 3.71 (t, *J* = 4.8 Hz, 2H), 2.96 (t, *J* = 4.9 Hz, 2H)。

N-2-((3-氰基苯)氧基)-4-(萘-2-基甲氧基)苄基)-*N*-甲基甘氨酸(**B-5**), 白色固体, 收率 50.6%, mp 182°C

~184°C。ESI-MS m/z : 465.2 [M-H]⁻。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.96 (d, J = 4.4 Hz, 2H), 7.93-7.90 (m, 3H), 7.79 (dd, J = 12.1, 7.5 Hz, 2H), 7.58 (d, J = 2.9 Hz, 1H), 7.55 (s, 1H), 7.53-7.50 (m, 2H), 7.26 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 6.77 (d, J = 6.4 Hz, 1H), 6.65 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 5.25 (s, 2H), 5.21 (s, 2H), 3.57 (s, 2H), 3.40 (s, 2H), 2.17 (s, 3H)。

(*S*)-1-(2-((3-氰基苯)氧基)-4-(萘-2-甲氧基)苄基)哌啶-2-羧酸(**B-6**)，白色固体，收率 46.6%，mp 161°C ~163°C。ESI-MS m/z : 505.2 [M-H]⁻。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.98 (s, 1H), 7.94 (q, J = 6.8, 5.9 Hz, 4H), 7.81 (dd, J = 12.9, 7.8 Hz, 2H), 7.59 (s, 1H), 7.56 (s, 1H), 7.56-7.52 (m, 2H), 7.33 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 6.79 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 6.70 (dd, J = 8.5, 2.3 Hz, 1H), 5.26 (s, 2H), 5.22 (s, 2H), 3.90 (s, 2H), 3.75 (s, 1H), 3.11 (dd, J = 8.3, 4.2 Hz, 1H), 2.99-2.93 (m, 1H), 2.39-2.31 (m, 1H), 1.80 (s, 1H), 1.73 (t, J = 8.1 Hz, 1H), 1.34 (s, 1H), 1.24 (d, J = 6.1 Hz, 1H), 1.16 (dt, J = 13.9, 6.9 Hz, 1H)。

(2-((3-氰基苯甲酰基)氧基)-4-(萘-1-基甲氧基)苄基)-*L*-丝氨酸(**B-7**)，白色固体，收率 53.0%，mp 163°C ~165°C。ESI-MS m/z : 481.2 [M-H]⁻。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.01-7.95 (m, 3H), 7.91 (d, J = 8.4 Hz, 3H), 7.79 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 7.58 (s, 1H), 7.57-7.50 (m, 3H), 7.36 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 6.83 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 6.75-6.68 (m, 1H), 5.29 (s, 2H), 5.24 (s, 2H), 4.09 (s, 2H), 3.77 (d, J = 3.9 Hz, 2H), 3.70 (t, J = 6.1 Hz, 1H)。

(2*S*)-2-((2-((3-氰基苯甲酰基)氧基)-4-(萘-2-基甲氧基)苄基)氨基)-3-羟基丁酸(**B-8**)，白色固体，收率 58.1%，mp 173°C ~175°C。ESI-MS m/z : 495.2 [M-H]⁻。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.00 (s, 1H), 7.97 (s, 1H), 7.95 (d, J = 4.5 Hz, 1H), 7.93 (s, 2H), 7.88 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.80 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.61-7.57 (m, 2H), 7.54 (q, J = 3.5, 3.0 Hz, 3H), 7.35 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 6.82 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 6.71 (dd, J = 8.3, 2.3 Hz, 1H), 5.28 (s, 2H), 5.24 (s, 2H), 5.20 (s, 1H), 4.03 (d, J = 14.7 Hz, 2H), 3.91 (d, J = 6.2 Hz, 1H), 3.01 (d, J = 5.7 Hz, 1H), 1.15 (d, J = 6.2 Hz, 3H)。



(2-((3-氰基苯甲酰基)氧基)-4-(萘-1-基甲氧基)苄基)-*L*-脯氨酸(**B-9**)，白色固体，收率 47.9%，mp 165°C ~167°C。ESI-MS m/z : 491.2 [M-H]⁻。¹H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.87 (d, J = 3.1 Hz, 1H), 7.84 (q, J = 3.5, 2.9 Hz, 2H), 7.82 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.72-7.67 (m, 2H), 7.60-7.56 (m, 1H), 7.50 (dt, J = 6.1, 3.0 Hz, 3H), 7.48-7.46 (m, 1H), 7.32 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 6.62 (dd, J = 8.3, 2.3 Hz, 1H), 6.57 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 5.16 (s, 4H), 4.26 (d, J = 5.9 Hz, 2H), 3.92 (dd, J = 8.7, 5.3 Hz, 1H), 3.57 (dt, J = 11.2, 5.5 Hz, 1H), 2.97-2.92 (m, 1H), 2.35-2.26 (m, 2H), 1.98-1.90 (m, 2H)。

3. 生物活性评价

采用均相时间分辨荧光法[12]评价目标化合物对 PD-1/PD-L1 的抑制活性。PD-1/PD-L1 结合分析试剂盒(641CP01PEG)购自 Cisbio。将化合物用 DMSO 配置成所设置的浓度，加入稀释缓冲液，混合均匀后取 2 μL 加到 384 孔白色酶标板中。将 PD-1 和 PD-L1 用缓冲液稀释，分别取 4 μL 加到上述 384 孔板中，孵育 15 min。将 10 μL Anti-tag1-Eu 和 Anti-tag2-XL665 混合液加入检测缓冲溶液中，混合均匀后加入上述 384 孔板中，然后在室温条件下孵育 2 h。用 Infinite® M1000 多功能酶标仪检测 665 nm 和 620 nm 处荧光信号，根据荧光比值计算化合物对蛋白结合的抑制率。实验结果如表 1 所示。

Table 1. Inhibitory activity of the target compounds **A-1**~**A-9** and **B-1**~**B-9** against the PD-1/PD-L1 interaction

表 1. 目标化合物 **A-1**~**A-9** 和 **B-1**~**B-9** 对 PD-1/PD-L1 相互作用的抑制活性

Compd.	R	Inhibition (%) (at 10 μmol/L)	Compd.	R	Inhibition (%) (at 10 μmol/L)
A-1		33.51	B-1		39.32

Continued

A-2		25.22	B-2		37.23
A-3		34.27	B-3		24.25
A-4		27.86	B-4		39.74
A-5		28.13	B-5		40.75
A-6		38.52	B-6		46.65
A-7		37.32	B-7		34.41
A-8		41.52	B-8		47.53
A-9		42.32	B-9		46.36
BMS-1018		99.51			

BMS-1018: Positive control compound.

4. 结果与讨论

本文合成了 18 个未见文献报道的萘环类目标化合物, 结构均经 $^1\text{H-NMR}$ 和 ESI-MS 谱确证。从表 1 的活性数据可以看出, 所有的目标化合物在 $10\ \mu\text{mol/L}$ 浓度下对 PD-1/PD-L1 相互作用均显示出不同程度的抑制活性, 其中 6 个化合物(A-8、A-9 和 B-5、B-6、B-8、B-9)的活性相对突出。

从表 1 的数据可以获得以下构效关系规律: 1) 从整体来看, B 系列化合物的整体活性优于 A 系列(A-1 vs B-1、A-5 vs B-5 和 A-6 vs B-6); 2) 在 A 系列化合物中, 伸入溶剂区的末端取代基为氨基酸时(A-6、A-7、A-8 和 A-9)活性优于氨基醇类化合物(A-1 和 A-3); 3) 末端取代基含有较多极性基团如羟基(A-3)时活性优于含有非极性基团如咪唑环(A-2); 4) 相似地, B 系列化合物末端取代基为氨基酸时(B-5、B-6、B-8 和 B-9)活性也普遍优于氨基醇类化合物(B-1、B-2 和 B-4); 5) 在两个系列目标化合物中, 乙酰基乙二胺衍生物的活性均较弱(A-4 和 B-3), 但肌氨酸衍生物则显示 A-5 弱而 B-5 强, 此外, 苏氨酸和脯氨酸的衍生物均显示出最强的活性(A-8、A-9 和 B-8、B-9)。

为了进一步说明目标化合物的构效关系, 本文作者通过 Discovery Studio 4.0 中的 CDocker 模块, 选取了活性最强的 A-8 和 B-8 进行分子对接实验, 分析了小分子与 PD-L1 蛋白的结合模式。从图 5 可以看出, 化合物 A-8 和 B-8 均处于 PD-L1 蛋白二聚体构成的夹缝中。从图 5(A)可知, A-8 和 B-8 与靶蛋白的结合模式与 BMS-1018 相似。具体来说, 两者的萘环与 BMS-1018 的联苯片段朝向一致, 而且中心苯环的 3 位间氨基苯氧基的朝向也一致。此外, 两者的 a 环都能与 $^{\text{B}}\text{Met115}$ 形成 $\sigma\text{-}\pi$ 相互作用, 而中心苯环则与 $^{\text{B}}\text{Tyr56}$ 形成 $\pi\text{-}\pi$ 堆积作用。进一步地, A-8 的氨基氮原子可以与 $^{\text{A}}\text{Arg125}$ 形成氢键作用, 其末端

苏氨酸可以与^AAla18、^AAsp122、^ALys124 形成三个氢键。而 **B-8** 末端苏氨酸残基则可以与^AAla18、^APhe19、^AAsp122 和^BGln66 形成四个氢键相互作用，这可能是 **B** 系列化合物的活性普遍优于 **A** 系列的原因。上述构效关系信息为后续开展结构优化提供了理论指导。

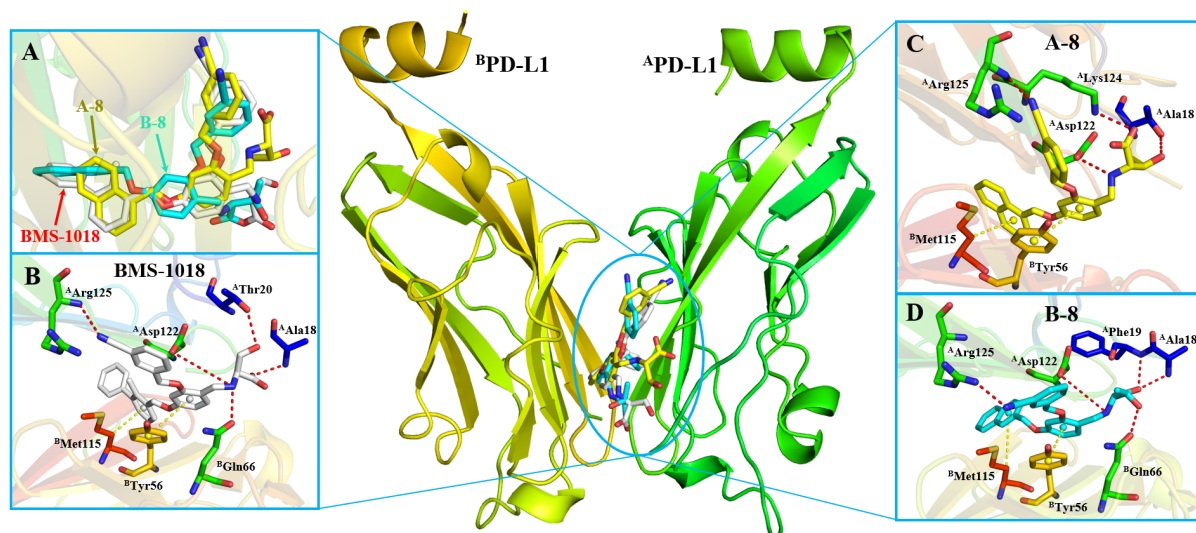


Figure 5. Proposed binding mode of BMS-1018, A-8 and B-8 (PDB ID: 5J89)

图 5. BMS-1018、A-8、B-8 与靶蛋白的结合模式

基金项目

国家自然科学基金项目(21977117)。

参考文献

- [1] Chen, L. and Flies, D.B. (2013) Molecular Mechanisms of T Cell Co-Stimulation and Co-Inhibition. *Nature Reviews Immunology*, **13**, 227-242. <https://doi.org/10.1038/nri3405>
- [2] Mohme, M., Riethdorf, S. and Pantel, K. (2017) Circulating and Disseminated Tumour Cells-Mechanisms of Immune Surveillance and Escape. *Nature Reviews Clinical Oncology*, **14**, 155-167. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.144>
- [3] Lin, X., Lu, X., Luo, G. and Xiang, H. (2020) Progress in PD-1/PD-L1 Pathway Inhibitors: From Biomacromolecules to Small Molecules. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **186**, 111876-111905. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111876>
- [4] Li, X., Shao, C., Shi, Y. and Han, W. (2018) Lessons Learned from the Blockade of Immune Checkpoints in Cancer Immunotherapy. *Journal of Hematology & Oncology*, **11**, 31-56. <https://doi.org/10.1186/s13045-018-0578-4>
- [5] van der Zanden, S.Y., Luimstra, J.J., Neefjes, J., Borst, J. and Ovaas, H. (2020) Opportunities for Small Molecules in Cancer Immunotherapy. *Trends in Immunology*, **41**, 493-511. <https://doi.org/10.1016/j.it.2020.04.004>
- [6] Chupak, L.S. and Zheng, X. (2015) Compounds Useful as Immunomodulators. WO2015034820 A1.
- [7] Chupak, L.S., Ding, M., Martin, S.W., Zheng, X., Hewawasam, P., Connolly, T.P., Xu, N., Yeung, K., Zhu, J. and Langley, D.R. (2015) Compounds Useful as Immunomodulators. WO2015160641 A1.
- [8] Skalniak, L., Zak, K.M., Guzik, K., Magiera, K., Musielak, B., Pachota, M., Szelazek, B., Kocik, J., Grudnik, P., Tomala, M., Krzanik, S., Pyrc, K., Dömling, A., Dubin, G. and Holak, T.A. (2017) Small-Molecule Inhibitors of PD-1/PD-L1 Immune Checkpoint Alleviate the PD-L1-Induced Exhaustion of T-Cells. *Oncotarget*, **8**, 72167-72181. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.20050>
- [9] Zak, K.M., Grudnik, P., Guzik, K., Zieba, B.J., Musielak, B., Dömling, A., Dubin, G. and Holak, T.A. (2016) Structural Basis for Small Molecule Targeting of the Programmed Death Ligand 1 (PD-L1). *Oncotarget*, **7**, 30323-30335. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8730>
- [10] Guzik, K., Zak, K.M., Grudnik, P., Magiera, K., Musielak, B., Törner, R., Skalniak, L., Dömling, A., Dubin, G. and

-
- Holak, T.A. (2017) Small-Molecule Inhibitors of the Programmed Cell Death-1/Programmed Death-Ligand 1 (PD-1/PD-L1) Interaction via Transiently Induced Protein States and Dimerization of PD-L1. *Journal of Medicinal Chemistry*, **60**, 5857-5867. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b00293>
- [11] Qin, M., Cao, Q., Wu, X., Liu, C., Zheng, S., Xie, H., Tian, Y., Xie, J., Zhao, Y., Hou, Y., Zhang, X., Xu, B., Zhang, H. and Wang, X. (2020) Discovery of the Programmed Cell Death-1/Programmed Cell Death-Ligand 1 Interaction Inhibitors Bearing an Indoline Scaffold. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **186**, 111856-111868. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111856>
- [12] Cheng, B., Ren, Y., Niu, X., Wang, W., Wang, S., Tu, Y., Liu, S., Wang, J., Yang, D., Liao, G. and Chen, J. (2020) Discovery of Novel Resorcinol Dibenzyl Ethers Targeting the Programmed Cell Death-1/Programmed Cell Death-Ligand 1 Interaction as Potential Anticancer Agents. *Journal of Medicinal Chemistry*, **63**, 8338-8358. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00574>