

文章编号 1672-6634(2023)04-0082-11

DOI 10.19728/j.issn1672-6634.2023020013

含三嗪结构的联苯类化合物的设计合成、PD-1/PD-L1抑制活性筛选以及分子对接研究

黄 坤,马俊杰

(华侨大学 医学院,福建 泉州 362000)

摘 要 基于联苯类 PD-1/PD-L1 小分子抑制剂的作用模型,运用生物电子等排原理,设计并合成得到了 24 个含三嗪结构的联苯类小分子化合物,其结构经 HRMS 和 $^1\text{H-NMR}$ 确证。采用均相时间分辨荧光法(HTRF),对目标化合物进行了体外 PD-1/PD-L1 抑制活性筛选,结果表明,化合物 6a、6b、6d、6k 和 6m 在 $1\ \mu\text{mol/L}$ 浓度下表现出较好的抑制活性,抑制率均大于 50%,其中,化合物 6a 抑制活性最强,抑制率为 63.83%,同时,根据抑制活性结果初步分析了构效关系。最后,为了指导下一步的结构优化工作,对 6a 开展了分子对接工作,阐明了 6a 与 PD-L1 蛋白的作用方式。

关键词 肿瘤免疫;PD-1/PD-L1;设计;活性筛选;分子对接

中图分类号 R979.1

文献标识码 A

开放科学(资源服务)标识码(OSID)



Design, Synthesis, PD-1/PD-L1 Inhibitory Activity Screening and Molecular Docking Study of Biphenyl Compounds Bearing Triazine Structure

HUANG Kun, MA Junjie

(School of Medicine, Huaqiao University, Quanzhou 362000, China)

Abstract Based on the structure of biphenyl PD-1/PD-L1 small molecule inhibitors, 24 biphenyl small molecule compounds bearing triazine structure were designed and synthesized based on the bioisostere principle, and their structures were confirmed by HRMS and $^1\text{H-NMR}$. Using homogeneous time-resolved fluorescence(HTRF) method, the inhibitory activities of target compounds against PD-/PD-L1 interaction *in vitro* were screened, and the results showed that compounds 6a, 6b, 6d, 6k and 6m exhibited good inhibitory activities with inhibition rates greater than 50%, among them, compound 6a displayed the strongest inhibitory activity with the inhibition rate of 63.83%. To guide the further structural optimization, molecular docking of 6a was carried out to clarify the binding interaction with PD-L1 protein.

Key words tumor immunity; PD-1/PD-L1; design; activity screening; molecular docking

收稿日期:2023-02-22

基金项目:国家自然科学基金项目(81602970);福建省自然科学基金面上项目(2021J01309)资助

通讯作者:马俊杰,男,彝族,博士,副教授,研究方向:靶向药物设计, E-mail: majunjie3612@hqu.edu.cn.

1 引言

从免疫的角度分析,肿瘤的失控生长和过度增殖是由于肿瘤细胞可以通过多种机制逃避机体免疫系统的查杀而引起的^[1]。近年来,针对免疫检查点共抑制信号通路设计开发抑制剂,特异性激活自身 T 细胞的免疫应答,在肿瘤免疫治疗领域已经取得了重大突破^[2-4]。其中,PD-1/PD-L1 作为免疫检查点共抑制信号通路中的重要靶点,对重新激活肿瘤免疫系统扮演着至关重要的作用。设计开发 PD-1/PD-L1 抑制剂,抑制 PD-1 与 PD-L1 结合,抑制免疫逃逸,也已成为肿瘤免疫治疗领域的研究热点^[5, 6]。目前,PD-1/PD-L1 抑制剂,主要分为两类,一类为抗体药物^[7],如 Opdivo、Keytruda 和 Tecentriq 等。另一类为小分子抑制剂^[8],此类药物的研究要晚于抗体药物,大部分处于临床前/临床研究阶段,典型且活性显著的是百时美施贵宝(BMS)公司公开的一系列联苯类小分子 PD-1/PD-L1 抑制剂^[9-11],见图 1。研究表明,此类化合物能够特异性的诱导 PD-L1 蛋白二聚化,进而阻断 PD-1 与 PD-L1 结合^[12]。通过分析此类抑制剂与 PD-L1 蛋白的作用模型发现^[13-15],分子中 2-甲基联苯结构(图 1,紫色部分)是此类抑制剂的核心药效团,该结构可以伸入到 PD-L1 蛋白疏水口袋中,分别与两条 PD-L1 蛋白产生重要的疏水作用,如 T 型的 π - π 作用, π -烷基作用等。分子中部的芳基或杂芳基(图 1,绿色部分)可与一条 PD-L1 蛋白链上的 Tyr56 形成平行的 π - π 堆积作用。同时,还可以在芳环上引入不同的取代基,提供额外的 π - π 作用和氢键作用,从而增强抑制活性,如比较典型的为间氰基苄基等;分子末端为亲水性柔性链(图 1,蓝色部分),伸向了二聚化 PD-L1 蛋白的溶剂区,位于结合口袋的开口处,对取代基的大小没有过多限制,允许有较大的变化,链上广泛分布着的氢键供体和受体基团,一方面与 PD-L1 蛋白形成丰富的氢键结合作用,另一方面,调节化合物的亲水性。

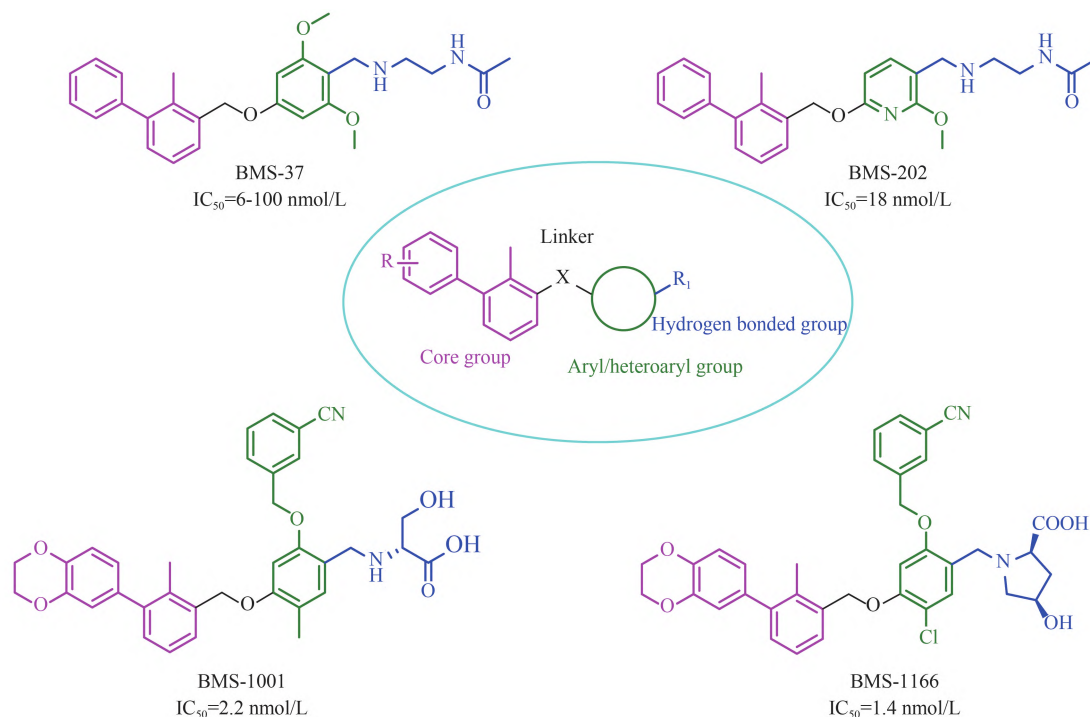


图 1 联苯类小分子抑制剂及其药效团模型

在本文中,参考以上的构效关系,为了保证与 PD-L1 蛋白疏水口袋形成重要的疏水作用,作者保留了结构中 2-甲基联苯核心结构。其次,采用生物电子等排原理,将结构中部的芳基替换为 1,3,5-三嗪基团。然后,为了进一步增强化合物的抑制活性,在三嗪结构上引入氰基苄基,并考察不同位置取代的氰基对抑制活性的影响。最后,在分子末端引入不同的小分子胺基团,一方面改善化合物的亲水性,另一方面与 PD-L1 蛋白形成多种氢键作用,增强与靶蛋白的结合力。基于以上思想,作者设计了一系列含三嗪结构的联苯类小分子化合物,见图 2。

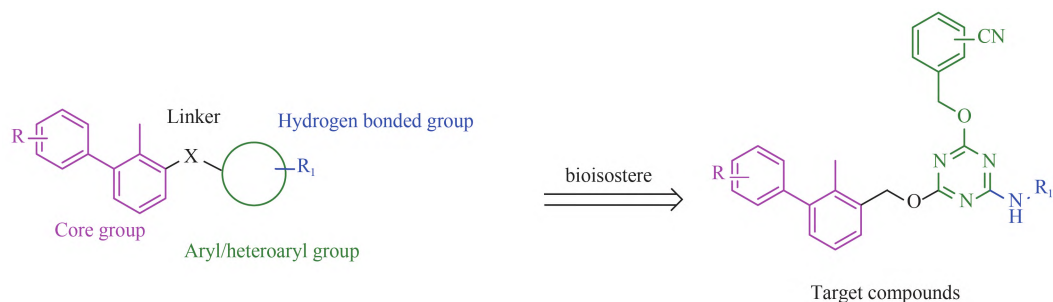
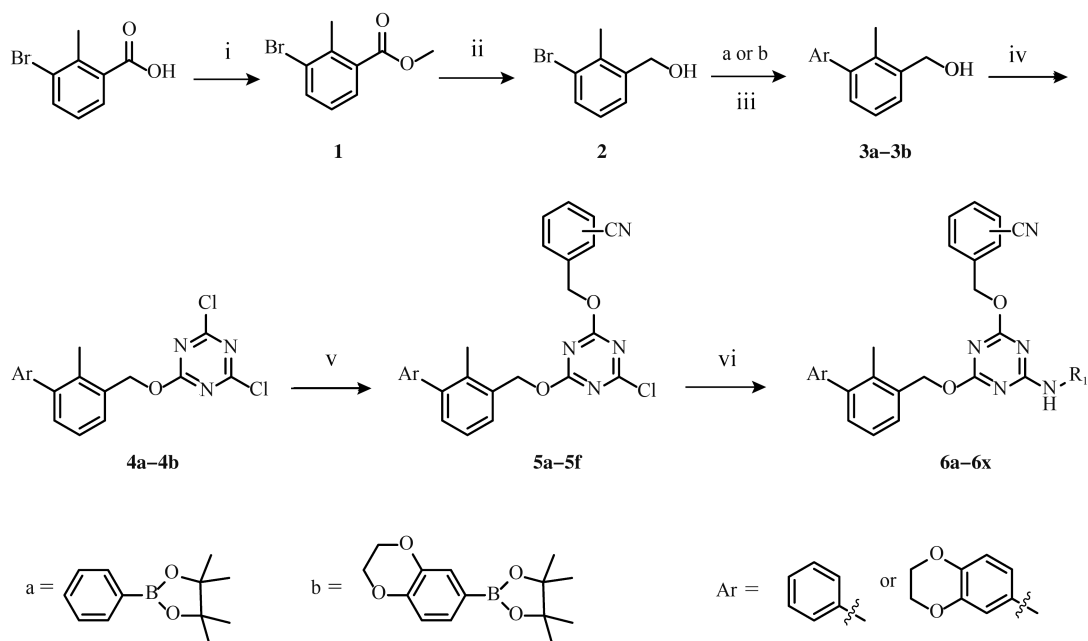


图2 目标化合物的设计

2 结果与讨论

2.1 化学合成

目标化合物的合成如方案1所示,以市售的3-溴-2-甲基苯甲酸为原料,在硫酸催化下,与甲醇进行甲酯化得到中间1。中间体1经四氢铝锂还原后得到中间体2。中间体2再分别与取代的苯硼酸酯(a或b)发生C-C偶联反应得到中间体3a和3b。接着,3a和3b分别与三聚氯氰发生亲核取代反应得到中间体4a和4b。然后,4a和4b分别与不同位置取代的氰基苄醇经亲核取代反应得到中间体5a-5f。最后,5a-5f再分别与不同的小分子胺经亲核取代反应制得目标化合物6a~6x。目标化合物的结构经 $^1\text{H-NMR}$ 和HRMS确证,具体数据见后文实验部分。



方案1 目标化合物的合成路线。试剂和条件:(i) H_2SO_4 , MeOH , $65\text{ }^\circ\text{C}$, 24 h;(ii) LiAlH_4 , THF , $0\text{ }^\circ\text{C}$, 2 h;(iii) N_2 , a or b, Cs_2CO_3 , $\text{PdCl}_2(\text{dppf})$, Dioxane , $80\text{ }^\circ\text{C}$, 12 h;(iv) DCM , DIPEA , 2,4,6-Trichloro-1,3,5-triazine, $-10\text{ }^\circ\text{C}$, 2 h;(v) Cyanobenzyl alcohol, NaH , THF , $-10\text{ }^\circ\text{C}$, 10 h;(vi) amine, DMF , rt , 1 h.

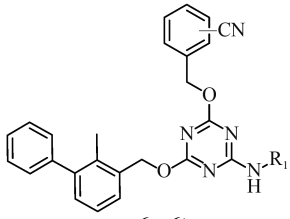
2.2 PD-1/PD-L1 体外抑制活性评价和分析

采用均相时间分辨荧光法(HTRF),以BMS-37为阳性对照药,评价了目标化合物在 $1\text{ }\mu\text{mol/L}$ 浓度下对PD-1/PD-L1信号通路的体外抑制活性。实验结果见表1。

如表1所示,与阳性对照药BMS-37相比,部分化合物在 $1\text{ }\mu\text{mol/L}$ 的浓度下均表现出一定的抑制活性,化合物6a、6b、6d、6k和6m表现出较好的抑制活性,抑制率均大于50%,其中化合物6a抑制活性最强,抑制率为63.83%。进一步分析发现,3位氰基(-CN)取代的目标化合物(6a~6g)的抑制活性要普遍强于4位氰基(6h~6n)或2位氰基取代的化合物(6o~6t),抑制活性顺序为3-位氰基>4-位氰基>2-位氰基。

通过分析 R₁ 上取代基对活性的影响发现, R₁ 上取代基的改变并没有表现出明显的构效关系。

表 1 目标化合物 6a-6t 的体外 PD-1/PD-L1 抑制活性



6a-6t

化合物	R ₁	-CN	抑制率(%) (1 μmol/L)	化合物	R ₁	-CN	抑制率(%) (1 μmol/L)
6a		3-CN	63.83 ± 1.99	6k		4-CN	51.05 ± 3.29
6b		3-CN	61.40 ± 13.97	6l		4-CN	32.62 ± 4.24
6c		3-CN	48.30 ± 5.02	6m		4-CN	58.06 ± 2.65
6d		3-CN	55.65 ± 7.06	6n		4-CN	ND
6e		3-CN	47.50 ± 10.78	6o		2-CN	<10
6f		3-CN	39.64 ± 2.03	6p		2-CN	<10
6g		3-CN	43.60 ± 5.87	6q		2-CN	<10
6h		4-CN	32.85 ± 0.72	6r		2-CN	<10
6i		4-CN	ND	6s		2-CN	20.81 ± 0.51
6j		4-CN	42.58 ± 2.44	6t		2-CN	<10
BMS-37			96.18 ± 0.26				

注: BMS-37: positive control drug; ND: not determined.

基于表 1 中化合物活性的分析,我们初步确定了 3-位氰基取代的苄醇为最适基团后,作者在保留 3-位氰基苄基的基础上,在联苯结构的苯基末端并合了乙二醇基,设计合成得到了化合物 6u~6x,并测试了化合物在 1 μmol/L 浓度下对 PD-1/PD-L1 体外抑制活性,结果如表 2 所示。虽然 6u~6x 还保持有一定的 PD-1/PD-L1 抑制活性,但与化合物 6a~6d 相比,抑制活性均发生了一定程度的下降,说明乙二醇基并不适于引入到此系列的结构中。

表 2 目标化合物6u-6x 的体外 PD-1/PD-L1 抑制活性

6u-6x

化合物	R ₁	抑制率(%) (1 μmol/L)	化合物	R ₁	抑制率(%) (1 μmol/L)
6u		43.28 ± 1.96	6w		44.39 ± 2.55
6v		30.80 ± 0.59	6x		23.96 ± 2.40
BMS-37		96.18 ± 0.26			

注: BMS-37; positive control drug.

2.3 分子对接

为了阐明化合物与 PD-L1 蛋白的作用方式,指导下一步的结构优化设计工作,作者采用计算机辅助药物设计软件 AutoDock 4.2.6 和 Pymol 2.3.0 开展了优选化合物6a 与 PD-L1 蛋白的分子对接工作,结果如图3 所示,化合物6a 位于二聚化 PD-L1 蛋白的深疏水型孔道中,与BMS-37 均作用于相同的结合位点。进一步分析发现,6a 结构中的末端苯基可与 PD-L1 蛋白的一条链上的 Tyr56 形成 T 型的 $\pi-\pi$ 疏水作用,间氰基苄基和三嗪基分别与 Tyr123 和另一条链上的 Tyr56 形成 $\pi-\pi$ 堆叠作用,并且,结构中的氰基可与 Arg125 形成氢键相互作用。值得说的是,分子结构中另一端的小分子胺基团并没有与 PD-L1 蛋白产生预想的多种氢键结合作用,而此部分氢键结合作用的丢失很有可能是该化合物没有表现出强效抑制活性的重要原因,同时也间接的解释了 R₁ 基团的变化没有表现出明显构效关系的原因,因此,对此部分进行进一步的结构优化,增加氢键结合作用,将是我们下一步研究工作的方向之一。

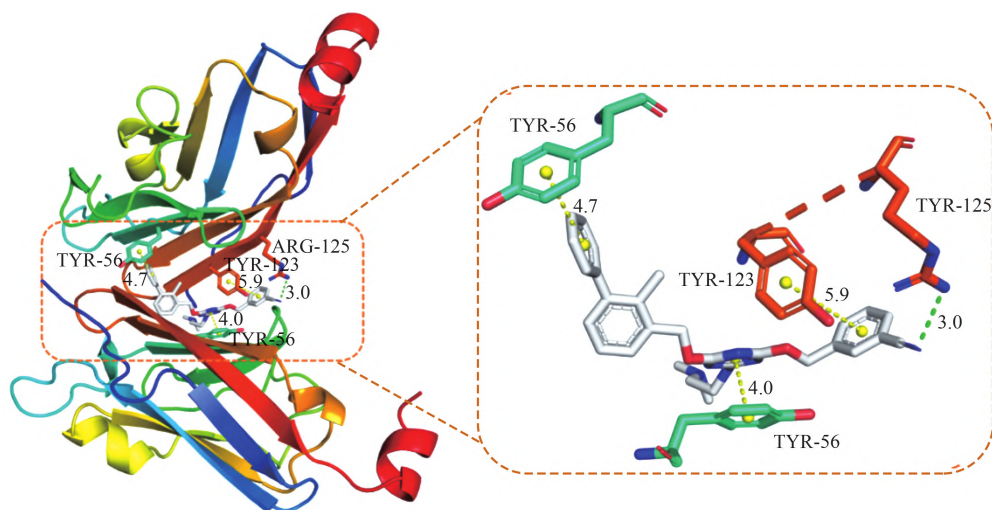


图 3 化合物6a 与 PD-L1(PDB ID: 5N2D)的分子对接结果(grey:6a)

3 结论

本文参考联苯类 PD-1/PD-L1 小分子抑制剂作用模型,采用生物电子等排原理,设计合成得到了 24 个

含三嗪结构的联苯类小分子化合物,并对其进行了体外 PD-1/PD-L1 抑制活性筛选工作。结果发现化合物 6a 抑制活性最强,抑制率为 63.83%,值得进一步研究。同时,通过构效关系分析发现,3-氰基取代苄醇基对抑制活性的贡献要大于 4 位氰基或 2 位氰基,在联苯结构的苯基末端引入乙二醇基并不适宜于此系列结构,会导致活性的降低。最后,对 6a 开展了分子对接研究,阐明了 6a 与 PD-L1 蛋白的作用方式,为下一步的结构优化设计指明了方向。本研究对进一步设计含三嗪结构的强效 PD-1/PD-L1 小分子抑制剂具有一定的指导意义和参考价值。

4 实验部分

4.1 化学合成

实验中所用的试剂及溶剂均为市售的分析纯,核磁共振氢谱采用 Bruker ARX-500(Bruker Bioscience, Billerica, MA, USA)核磁共振仪测定;高分辨质谱采用 Agilent Accurate-Mass Q-TOF 6530 测定;柱色谱硅胶(200~300 目)为青岛海洋化工厂生产;除有特别注明外,所有试剂和溶剂均直接使用。

4.1.1 3-溴-2-甲基苯甲酸甲酯(1)的合成。将 3-溴-2-甲基苯甲酸(10 g, 46.5 mmol)加入至 100 mL 无水甲醇中,室温下搅拌,加入 2 mL 浓硫酸,回流反应 24 h。TLC 检测反应完毕后,冷却至室温,旋干溶剂,加水搅拌,析出固体。抽滤得淡黄色固体 10.5 g,收率 98%。¹H-NMR(500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.71(t, *J* = 8 Hz, 2H), 7.10(d, *J* = 8 Hz, 1H), 3.90(s, 3H), 2.63(s, 3H)。

4.1.2 3-溴-2-甲基苄醇(2)的合成。将 1(10 g, 43.65 mmol)加入至 50 mL 无水四氢呋喃中,搅拌降温至 0 °C,分批缓慢加入四氢铝锂(1.27 g, 33.58 mmol),加毕,0 °C 反应 2 h。TLC 检测反应完毕后,将反应液滴加到冰水中,用稀盐酸调节 pH 至弱酸性,乙酸乙酯(150 mL×3)萃取,无水 Na₂SO₄ 干燥有机层后,浓缩得棕色油状物 8.6 g,收率 98%。¹H-NMR(500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.48(d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.38(d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.11(t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 5.25(td, *J* = 5.4, 1.0 Hz, 1H), 4.52(d, *J* = 5.4 Hz, 2H), 2.30(s, 3H)。

4.1.3 3-芳基-2-甲基苄基甲醇(3a~3b)的合成。氮气保护下,将 2(5.1 g, 25.3 mmol)加入至 40 mL 1,4-二氧六环中,室温下搅拌,加入 a 或 b(23 mmol)和 Cs₂CO₃(22.5 g, 69 mmol),通氮气 30 min 后,加入 PdCl₂(dppf)(0.9 g, 1.1 mmol),80 °C 反应 12 h。TLC 检测反应完毕后,静置冷却至室温,硅藻土抽滤,滤液浓缩后,加水搅拌,二氯甲烷(150 mL×3)萃取,无 Na₂SO₄ 干燥有机层后,浓缩得黑色固体粗品,采用石油醚/乙酸乙酯体系进行柱色谱分离得白色固体或淡黄色油状物 3a~3b。(3-[1,1'-联苯]-2-甲基苄基)甲醇(3a),白色固体 4.1 g,收率 78%。(3-(2,3-二氢苯并[b][1,4]二噁英-6-基)-2-甲基苄基)甲醇(3b),淡黄色油状物 4.8 g,收率 73%。

4.1.4 2,4-二氯-6-取代基-1,3,5-三嗪(4a~4b)的制备。室温搅拌下,将三聚氯氰(1.8 g, 10 mmol)和 DIPEA(1.8 mL, 10 mmol)加入到 10 mL 二氯甲烷中,降温至-10 °C,滴加 3a 或 3b(5 mmol)的 10 mL 二氯甲烷溶液,滴毕,-10 °C 反应 2 h。TLC 检测反应完毕后,旋干溶剂得黄色固体,粗品采用石油醚/乙酸乙酯体系进行柱色谱分离得黄色固体 4a~4b。2,4-二氯-6-((2-甲基-[1,1'-联苯]-3-基)甲氧基)-1,3,5-三嗪(4a),黄色固体 1.5 g,收率 87%。2,4-二氯-6-((3-(2,3-二氢苯并[b][1,4]二噁英-6-基)-2-甲基苄基)氧基)-1,3,5-三嗪(4b),黄色固体 1.7 g,收率 86%。

4.1.5 (((4-氯-6-取代基)-1,3,5-三嗪-2-基)氧基)甲基)苄醇(5a~5f)的制备。将不同位置取代的氰基苄醇(0.46 g, 3.4 mmol)加入至 10 mL 无水四氢呋喃中,搅拌降温至 0 °C,加入氢化钠(0.16 g, 3.7 mmol),搅拌 10 min 配成溶液 A。另取干燥的四氢呋喃 10 mL 加入到 100 mL 反应瓶中,加入 4a 或 4b(2.9 mmol),搅拌降温至-10 °C。缓慢滴加溶液 A,滴毕,-10 °C 反应 10 h。TLC 检测反应完毕后,加水,二氯甲烷(150 mL×3)萃取。无水 Na₂SO₄ 干燥有机层后,浓缩得白色固体 5a~5f。3-(((4-氯-6-((2-甲基-[1,1'-联苯]-3-基)甲氧基)-1,3,5-三嗪-2-基)氧基)甲基)苄醇(5a),黄色固体 1.1 g,收率 86%。4-(((4-氯-6-((2-甲基-[1,1'-联苯]-3-基)甲氧基)-1,3,5-三嗪-2-基)氧基)甲基)苄醇(5b),黄色固体 1.2 g,收率 89%。2-(((4-氯-6-((2-甲基-[1,1'-联苯]-3-基)甲氧基)-1,3,5-三嗪-2-基)氧基)甲基)苄醇(5c),黄色固体 1.1 g,收率 85%。

3-(((4-氯-6-((3-(2,3-二氢苯并[*b*][1,4]二噁英-6-基)-2-甲基苄基)氧基)-1,3,5-三嗪-2-基)氧基)甲基)苄腈(5d),白色固体 1.2 g,收率 85%。4-(((4-氯-6-((3-(2,3-二氢苯并[*b*][1,4]二噁英-6-基)-2-甲基苄基)氧基)-1,3,5-三嗪-2-基)氧基)甲基)苄腈(5e),白色固体 1.3 g,收率 88%。2-(((4-氯-6-((3-(2,3-二氢苯并[*b*][1,4]二噁英-6-基)-2-甲基苄基)氧基)-1,3,5-三嗪-2-基)氧基)甲基)苄腈(5f),白色固体 1.1 g,收率 83%。

4.1.6 目标化合物(6a~6x)的合成。温搅拌下,分别将5a-5f(0.23 mmol)和小分子胺(0.56 mmol)加入至 2 mL DMF 中,室温反应 1 h。反应完毕后,加入 10 mL 水搅拌,析出固体,抽滤得白色固体,粗品采用二氯甲烷/甲醇体系进行柱色谱分离得白色固体6a~6x。

3-(((4-((2-(二甲基氨基)乙基)氨基)-6-((2-甲基-[1,1'-联苯]-3-基)甲氧基)-1,3,5-三嗪-2-基)氧基)甲基)苄腈(6a),白色固体,收率 43%;¹H NMR(500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.98~7.93(m, 1H), 7.91(s, 1H), 7.82(d, *J*=7.8 Hz, 1H), 7.78(d, *J*=7.8, 1H), 7.61(t, *J*=7.8 Hz, 1H), 7.48~7.43(m, 2H), 7.42~7.36(m, 2H), 7.32~7.29(m, 2H), 7.28~7.24(m, 1H), 7.20(d, *J*=6.8 Hz, 1H), 5.43(d, *J*=3.5 Hz, 2H), 5.39(d, *J*=4.5 Hz, 2H), 3.50~3.42(m, 2H), 2.67~2.59(m, 2H), 2.34(s, 6H), 2.18(d, *J*=2.3 Hz, 3H). HRMS(ESI) for C₂₉H₃₀N₆O₂[M+H]⁺. Calcd:494.243 0, found:495.251 3。

3-(((4-((2-(二乙氨基)乙基)氨基)-6-((2-甲基-[1,1'-联苯]-3-基)甲氧基)-1,3,5-三嗪-2-基)氧基)甲基)苄腈(6b),白色固体,收率 44%;HRMS(ESI) for C₃₁H₃₄N₆O₂[M+H]⁺. Calcd:522.274 3, found:523.282 5。

3-(((4-((3-(二甲基氨基)丙基)氨基)-6-((2-甲基-[1,1'-联苯]-3-基)甲氧基)-1,3,5-三嗪-2-基)氧基)甲基)苄腈(6c),白色固体,收率 49%;¹H NMR(500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.07~8.02(m, 1H), 7.91(s, 1H), 7.82(d, *J*=7.8 Hz, 1H), 7.78(d, *J*=7.8 Hz, 1H), 7.61(t, *J*=7.8 Hz, 1H), 7.47~7.43(m, 2H), 7.41~7.35(m, 2H), 7.32~7.29(m, 2H), 7.28~7.24(m, 1H), 7.19(d, *J*=7.5 Hz, 1H), 5.42(d, *J*=7.4 Hz, 2H), 5.38(d, *J*=6.4 Hz, 2H), 3.35~3.23(m, 2H), 2.40~2.31(m, 2H), 2.20(s, 6H), 2.18(d, *J*=2.4 Hz, 3H), 1.72~1.61(m, 2H). HRMS(ESI) for C₃₀H₃₂N₆O₂[M+H]⁺. Calcd:508.258 6, found:509.267 1。

3-(((4-((3-(二乙氨基)丙基)氨基)-6-((2-甲基-[1,1'-联苯]-3-基)甲氧基)-1,3,5-三嗪-2-基)氧基)甲基)苄腈(6d),白色固体,收率 44%;¹H NMR(500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.14~8.07(m, 1H), 7.91(s, 1H), 7.82(d, *J*=7.8 Hz, 1H), 7.78(d, *J*=7.9 Hz, 1H), 7.63~7.58(m, 1H), 7.47~7.44(m, 2H), 7.42~7.36(m, 2H), 7.32~7.28(m, 2H), 7.28~7.25(m, 1H), 7.20(d, *J*=7.6 Hz, 1H), 5.43(d, *J*=4.1 Hz, 2H), 5.38(d, *J*=7.0 Hz, 2H), 3.36~3.24(m, 4H), 2.94~2.64(m, 4H), 2.18(d, *J*=2.3 Hz, 3H), 1.86~1.68(m, 2H), 1.18~0.93(m, 6H). HRMS(ESI) for C₃₂H₃₆N₆O₂[M+H]⁺. Calcd:536.290 0, found:537.299 3。

叔丁基(2-((4-((3-氰基苄基)氧基)-6-((2-甲基-[1,1'-联苯]-3-基)甲氧基)-1,3,5-三嗪-2-基)氨基)乙基)氨基甲酸酯(6e),白色固体,收率 46%;¹H NMR(500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.00~7.95(m, 1H), 7.91(d, *J*=12.0 Hz, 1H), 7.82(d, *J*=7.8 Hz, 1H), 7.78(d, *J*=9.2 Hz, 1H), 7.61(t, *J*=7.8 Hz, 1H), 7.48~7.43(m, 2H), 7.42~7.35(m, 2H), 7.33~7.29(m, 2H), 7.28~7.24(m, 1H), 7.20(d, *J*=7.7 Hz, 1H), 6.88(t, *J*=5.9 Hz, 1H), 5.44(d, *J*=3.7 Hz, 2H), 5.38(d, *J*=4.8 Hz, 2H), 3.33~3.27(m, 2H), 3.14~3.02(m, 2H), 2.19(d, *J*=2.3 Hz, 3H), 1.36(d, *J*=4.9 Hz, 9H). HRMS(ESI) for C₃₂H₃₄N₆O₄[M+H]⁺. Calcd:566.264 2, found:567.272 6。

N-(2-((4-((3-氰基苄基)氧基)-6-((2-甲基-[1,1'-联苯]-3-基)甲氧基)-1,3,5-三嗪-2-基)氨基)乙基)乙酰胺(6f),白色固体,收率 47%;¹H NMR(500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.02~7.98(m, 1H), 7.94(t, *J*=6.0 Hz, 1H), 7.92(d, *J*=8.9 Hz, 1H), 7.82(d, *J*=7.8 Hz, 1H), 7.79(t, *J*=6.8 Hz, 1H), 7.61(t, *J*=7.8 Hz, 1H), 7.48~7.44(m, 2H), 7.43~7.36(m, 2H), 7.32~7.30(m, 2H), 7.27(t, *J*=7.7

Hz, 1H), 7.20(d, $J=7.5$ Hz, 1H), 5.43(d, $J=6.4$ Hz, 2H), 5.38(d, $J=6.2$ Hz, 2H), 3.33~3.27(m, 2H), 3.23~3.12(m, 2H), 2.19(d, $J=7.4$ Hz, 3H), 1.79(d, $J=5.7$ Hz, 3H). HRMS(ESI) for $C_{29}H_{28}N_6O_3[M+H]^+$. Calcd: 508.222 3, found: 509.230 4.

3-(((4-((2-羟乙基)氨基)-6-((2-甲基-[1,1'-联苯]-3-基)甲氧基)-1,3,5-三嗪-2-基)氧基)甲基)苄腈(6g), 白色固体, 收率: 43%; 1H NMR(500 MHz, DMSO- d_6) δ 7.95~7.92(m, 1H), 7.91(s, 1H), 7.82(d, $J=7.7$ Hz, 1H), 7.79(d, $J=7.9$ Hz, 1H), 7.61(t, $J=7.7$ Hz, 1H), 7.48~7.44(m, 2H), 7.42~7.37(m, 2H), 7.32~7.30(m, 2H), 7.27(t, $J=7.6$ Hz, 1H), 7.20(d, $J=7.5$ Hz, 1H), 5.41(d, $J=8.4$ Hz, 2H), 5.38(d, $J=8.3$ Hz, 2H), 4.75~4.68(m, 1H), 3.54~3.45(m, 2H), 3.38~3.35(m, 2H), 2.18(d, $J=6.2$ Hz, 3H); HRMS(ESI) for $C_{27}H_{25}N_5O_3[M+H]^+$. Calcd: 467.195 7, found: 468.204 1.

4-(((4-((2-(二甲基氨基)乙基)氨基)-6-((2-甲基-[1,1'-联苯]-3-基)甲氧基)-1,3,5-三嗪-2-基)氧基)甲基)苄腈(6h), 白色固体, 收率 44%; 1H NMR(500 MHz, DMSO- d_6) δ 7.92~7.87(m, 1H), 7.86(s, 1H), 7.85(s, 1H), 7.60(dd, $J=8.1, 3.5$ Hz, 2H), 7.48~7.43(m, 2H), 7.42~7.36(m, 2H), 7.33~7.28(m, 2H), 7.27(t, $J=7.6$ Hz, 1H), 7.20(d, $J=7.5$ Hz, 1H), 5.49~5.35(m, 4H), 3.42~3.35(m, 2H), 2.40~2.29(m, 2H), 2.18(d, $J=2.4$ Hz, 3H), 2.14(s, 3H), 2.12(s, 3H); HRMS(ESI) for $C_{29}H_{30}N_6O_2[M+H]^+$. Calcd: 494.243 0, found: 495.250 8.

4-(((4-((2-(二乙氨基)乙基)氨基)-6-((2-甲基-[1,1'-联苯]-3-基)甲氧基)-1,3,5-三嗪-2-基)氧基)甲基)苄腈(6i), 白色固体, 收率 44%; 1H NMR(500 MHz, DMSO- d_6) δ 7.89~7.81(m, 3H), 7.60(t, $J=8.2$ Hz, 2H), 7.48~7.42(m, 2H), 7.38(q, $J=7.1$ Hz, 2H), 7.33~7.28(m, 2H), 7.26(t, $J=7.4$ Hz, 1H), 7.19(d, $J=7.4$ Hz, 1H), 5.49~5.35(m, 4H), 3.35~3.26(m, 2H), 2.51~2.39(m, 6H), 2.17(s, 3H), 0.96~0.88(m, 6H); HRMS(ESI) for $C_{31}H_{34}N_6O_2[M+H]^+$. Calcd: 522.274 3, found: 523.282 7.

4-(((4-((3-(二甲基氨基)丙基)氨基)-6-((2-甲基-[1,1'-联苯]-3-基)甲氧基)-1,3,5-三嗪-2-基)氧基)甲基)苄腈(6j), 白色固体, 收率 41%; 1H NMR(500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.07~7.99(m, 1H), 7.85(d, $J=8.0$ Hz, 2H), 7.60(d, $J=8.0$ Hz, 2H), 7.48~7.42(m, 2H), 7.42~7.35(m, 2H), 7.30(d, $J=7.4$ Hz, 2H), 7.26(td, $J=7.4, 2.3$ Hz, 1H), 7.19(d, $J=7.4$ Hz, 1H), 5.47~5.36(m, 4H), 3.33~3.23(m, 2H), 2.26~2.19(m, 2H), 2.18(d, $J=5.1$ Hz, 4H), 2.11(s, 6H), 1.67~1.53(m, 2H); HRMS(ESI) for $C_{30}H_{32}N_6O_2[M+H]^+$. Calcd: 508.258 7, found: 509.267 0.

4-(((4-((3-(二乙氨基)丙基)氨基)-6-((2-甲基-[1,1'-联苯]-3-基)甲氧基)-1,3,5-三嗪-2-基)氧基)甲基)苄腈(6k), 白色固体, 收率 43%; 1H NMR(500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.10~8.01(m, 1H), 7.85(d, $J=8.1$ Hz, 2H), 7.60(d, $J=8.1$ Hz, 2H), 7.49~7.43(m, 2H), 7.41~7.36(m, 2H), 7.30(d, $J=7.4$ Hz, 2H), 7.26(t, $J=7.6$ Hz, 1H), 7.20(d, $J=7.4$ Hz, 1H), 5.49~5.35(m, 4H), 3.32~3.23(m, 2H), 2.50~2.33(m, 6H), 2.18(d, $J=6.4$ Hz, 3H), 1.67~1.52(m, 2H), 1.00~0.86(m, 6H); HRMS(ESI) for $C_{32}H_{36}N_6O_2[M+H]^+$. Calcd: 536.290 0, found: 537.299 2.

叔丁基(2-(((4-((4-氰基苄基)氧基)-6-((2-甲基-[1,1'-联苯]-3-基)甲氧基)-1,3,5-三嗪-2-基)氨基)乙基)氨基)甲酸酯(6l), 白色固体, 收率 44%; 1H NMR(500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.01~7.93(m, 1H), 7.86(d, $J=8.2$ Hz, 2H), 7.61(dd, $J=14.1, 7.9$ Hz, 2H), 7.49~7.43(m, 2H), 7.40(dt, $J=14.9, 7.8$ Hz, 2H), 7.33~7.29(m, 2H), 7.27(t, $J=7.6$ Hz, 1H), 7.20(d, $J=7.4$ Hz, 1H), 6.91~6.84(m, 1H), 5.45(d, $J=16.2$ Hz, 2H), 5.40(d, $J=24.4$ Hz, 2H), 3.34~3.26(m, 2H), 3.13~3.01(m, 2H), 2.18(d, $J=10.4$ Hz, 3H), 1.36(d, $J=5.7$ Hz, 9H); HRMS(ESI) for $C_{32}H_{34}N_6O_4[M+H]^+$. Calcd: 566.264 2, found: 567.272 3.

N-(2-(((4-((4-氰基苄基)氧基)-6-((2-甲基-[1,1'-联苯]-3-基)甲氧基)-1,3,5-三嗪-2-基)氨基)乙基)乙酰胺(6m), 白色固体, 收率 50%; 1H NMR(500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.03~7.96(m, 1H), 7.94(t, $J=$

5.8 Hz, 1H), 7.86(d, $J=8.0$ Hz, 2H), 7.65~7.58(m, 2H), 7.48~7.43(m, 2H), 7.42~7.36(m, 2H), 7.33~7.29(m, 2H), 7.27(t, $J=7.6$ Hz, 1H), 7.20(d, $J=7.6$ Hz, 1H), 5.51~5.34(m, 4H), 3.34~3.28(m, 2H), 3.24~3.12(m, 2H), 2.18(d, $J=7.7$ Hz, 3H), 1.79(d, $J=5.9$ Hz, 3H); HRMS(ESI) for $C_{29}H_{28}N_6O_3[M+H]^+$. Calcd: 508.222 3, found: 509.230 4.

2-(((4-((2-羟乙基)氨基)-6-(((2-甲基-[1,1'-联苯基]-3-基)甲氧基)-1,3,5-三嗪-2-基)氧基)甲基)苄腈(6n), 白色固体, 收率 43%; 1H NMR(500 MHz, DMSO- d_6) δ 7.97~7.89(m, 1H), 7.85(d, $J=8.1$ Hz, 2H), 7.65~7.57(m, 2H), 7.48~7.42(m, 2H), 7.42~7.35(m, 2H), 7.31(d, $J=7.9$ Hz, 2H), 7.27(t, $J=7.6$ Hz, 1H), 7.20(d, $J=7.6$ Hz, 1H), 5.44(d, $J=9.7$ Hz, 2H), 5.40(d, $J=16.6$ Hz, 2H), 4.71(q, $J=5.7$ Hz, 1H), 3.56~3.42(m, 2H), 3.39~3.33(m, 4H), 2.18(d, $J=6.9$ Hz, 3H); HRMS(ESI) for $C_{27}H_{25}N_5O_3[M+H]^+$. Calcd: 467.195 7, found: 468.203 2.

2-(((4-((2-(二甲基氨基)乙基)氨基)-6-(((2-甲基-[1,1'-联苯]-3-基)甲氧基)-1,3,5-三嗪-2-基)氧基)甲基)苄腈(6o), 白色固体, 收率 45%; 1H NMR(500 MHz, DMSO- d_6) δ 7.93~7.89(m, 1H), 7.75(t, $J=7.6$ Hz, 1H), 7.72~7.65(m, 1H), 7.60~7.54(m, 1H), 7.48~7.43(m, 2H), 7.43~7.35(m, 2H), 7.31(d, $J=7.3$ Hz, 2H), 7.27(t, $J=7.6$ Hz, 1H), 7.20(d, $J=7.4$ Hz, 1H), 5.51(d, $J=22.2$ Hz, 2H), 5.42(d, $J=21.8$ Hz, 2H), 3.45~3.36(m, 2H), 2.43~2.33(m, 2H), 2.18(d, $J=2.6$ Hz, 3H), 2.16(d, $J=5.2$ Hz, 6H); HRMS(ESI) for $C_{29}H_{30}N_6O_2[M+H]^+$. Calcd: 494.243 0, found: 495.250 9.

2-(((4-((2-(二乙氨基)乙基)氨基)-6-(((2-甲基-[1,1'-联苯]-3-基)甲氧基)-1,3,5-三嗪-2-基)氧基)甲基)苄腈(6p), 白色固体, 收率 45%; 1H NMR(500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.06(t, $J=5.3$ Hz, 1H), 7.91(d, $J=7.7$ Hz, 1H), 7.75(td, $J=7.5, 3.3$ Hz, 1H), 7.69(dd, $J=11.6, 7.8$ Hz, 1H), 7.57(td, $J=7.4, 2.8$ Hz, 1H), 7.48~7.43(m, 2H), 7.42~7.36(m, 2H), 7.31(d, $J=7.1$ Hz, 2H), 7.27(t, $J=7.7$ Hz, 1H), 7.20(d, $J=7.4$ Hz, 1H), 5.51(d, $J=20.1$ Hz, 2H), 5.41(d, $J=20.6$ Hz, 2H), 3.33~3.25(m, 2H), 2.23(t, $J=6.6$ Hz, 4H), 2.20~2.16(m, 3H), 2.10(s, 6H), 1.67~1.55(m, 2H); HRMS(ESI) for $C_{31}H_{34}N_6O_2[M+H]^+$. Calcd: 522.274 3, found: 523.282 1.

2-(((4-((3-(二甲基氨基)丙基)氨基)-6-(((2-甲基-[1,1'-联苯]-3-基)甲氧基)-1,3,5-三嗪-2-基)氧基)甲基)苄腈(6q), 白色固体, 收率 85%; 1H NMR(500 MHz, DMSO- d_6) δ 7.94~7.86(m, 2H), 7.78~7.72(m, 1H), 7.68(dd, $J=16.1, 7.6$ Hz, 1H), 7.57(t, $J=7.5$ Hz, 1H), 7.48~7.43(m, 2H), 7.41~7.35(m, 2H), 7.31(d, $J=7.1$ Hz, 2H), 7.27(t, $J=7.6$ Hz, 1H), 7.20(d, $J=7.4$ Hz, 1H), 5.51(d, $J=25.9$ Hz, 2H), 5.42(d, $J=22.4$ Hz, 2H), 2.57~2.49(m, 6H), 2.18(s, 3H), 1.03~0.83(m, 6H); HRMS(ESI) for $C_{30}H_{32}N_6O_2[M+H]^+$. Calcd: 508.258 7, found: 509.266 5.

2-(((4-((3-(二乙氨基)丙基)氨基)-6-(((2-甲基-[1,1'-联苯]-3-基)甲氧基)-1,3,5-三嗪-2-基)氧基)甲基)苄腈(6r), 白色固体, 收率 44%; 1H NMR(500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.09(t, $J=5.7$ Hz, 1H), 7.91(d, $J=7.7$ Hz, 1H), 7.74(t, $J=7.5$ Hz, 1H), 7.68(t, $J=8.5$ Hz, 1H), 7.57(t, $J=7.5$ Hz, 1H), 7.48~7.42(m, 2H), 7.42~7.35(m, 2H), 7.31(d, $J=7.2$ Hz, 2H), 7.27(t, $J=7.6$ Hz, 1H), 7.20(d, $J=7.5$ Hz, 1H), 5.51(d, $J=20.9$ Hz, 2H), 5.41(d, $J=21.2$ Hz, 2H), 3.33~3.26(m, 2H), 2.50~2.36(m, 6H), 2.19(d, $J=6.6$ Hz, 3H), 1.70~1.54(m, 2H), 0.93(t, $J=7.0$ Hz, 6H); HRMS(ESI) for $C_{32}H_{36}N_6O_2[M+H]^+$. Calcd: 536.290 0, found: 537.297 2.

叔丁基(2-(((4-((2-氰基苄基)氧基)-6-(((2-甲基-[1,1'-联苯基]-3-基)甲氧基)-1,3,5-三嗪-2-基)氨基)乙基)氨基甲酸酯(6s), 白色固体, 收率 43%; 1H NMR(500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.00(t, $J=5.7$ Hz, 1H), 7.91(d, $J=7.7$ Hz, 1H), 7.77~7.73(m, 1H), 7.70(t, $J=7.2$ Hz, 1H), 7.57(t, $J=7.5$ Hz, 1H), 7.49~7.43(m, 2H), 7.43~7.35(m, 2H), 7.31(d, $J=7.2$ Hz, 2H), 7.27(t, $J=7.6$ Hz, 1H), 7.20(d, $J=7.5$ Hz, 1H), 6.92~6.82(m, 1H), 5.51(d, $J=22.5$ Hz, 2H), 5.42(d, $J=30.0$ Hz, 2H), 3.34~3.27(m, 2H), 3.14~3.04(m, 2H), 2.19(d, $J=10.3$ Hz, 3H), 1.36(s, 9H); HRMS(ESI) for

$C_{32}H_{34}N_6O_4[M+H]^+$. Calcd: 566.264 2, found: 567.272 1.

N-(2-((4-((2-氰基苄基)氧基)-6-((2-甲基-[1,1'-联苯基]-3-基)甲氧基)-1,3,5-三嗪-2-基)氨基)乙基)乙酰胺(6t), 白色固体, 收率 44%; 1H NMR(500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.03(t, $J=5.8$ Hz, 1H), 7.97~7.93(m, 1H), 7.91(d, $J=7.7$ Hz, 1H), 7.77~7.73(m, 1H), 7.73~7.68(m, 1H), 7.58(t, $J=7.5$ Hz, 1H), 7.47~7.43(m, 2H), 7.42~7.35(m, 2H), 7.31(d, $J=7.0$ Hz, 2H), 7.27(t, $J=7.6$ Hz, 1H), 7.20(d, $J=7.6$ Hz, 1H), 5.51(d, $J=19.9$ Hz, 2H), 5.42(d, $J=25.3$ Hz, 2H), 3.39~3.34(m, 2H), 3.24~3.14(m, 2H), 2.19(d, $J=7.8$ Hz, 3H), 1.79(d, $J=2.8$ Hz, 3H); HRMS(ESI) for $C_{29}H_{28}N_6O_3[M+H]^+$. Calcd: 508.222 3, found: 509.230 1.

3-(((4-((3-(2,3-二氢苯并[b][1,4]二噁英-6-基)-2-甲基苄基)氧基)-6-((2-(二甲基氨基)乙基)氨基)-1,3,5-三嗪-2-基)氧)甲基)苄腈(6u), 白色固体, 收率 41%; 1H NMR(500 MHz, DMSO- d_6) δ 7.93~7.85(m, 2H), 7.82(d, $J=7.6$ Hz, 1H), 7.79~7.74(m, 1H), 7.61(t, $J=7.8$ Hz, 1H), 7.36(t, $J=7.6$ Hz, 1H), 7.23(t, $J=7.4$ Hz, 1H), 7.16(d, $J=7.6$ Hz, 1H), 6.92(d, $J=8.2$ Hz, 1H), 6.77(s, 1H), 6.74(d, $J=8.2$ Hz, 1H), 5.41(d, $J=2.0$ Hz, 2H), 5.37(d, $J=3.1$ Hz, 2H), 4.28(s, 4H), 3.41~3.35(m, 2H), 2.40~2.31(m, 2H), 2.19(d, $J=2.7$ Hz, 3H), 2.14(d, $J=2.6$ Hz, 6H); HRMS(ESI) for $C_{31}H_{32}N_6O_4[M+H]^+$. Calcd: 552.248 5, found: 553.256 6.

3-(((4-((2-(二乙基氨基)乙基)氨基)-6-((3-(2,3-二氢苯并[b][1,4]二噁英-6-基)-2-甲基苄基)氧)-1,3,5-三嗪-2-基)氧)甲基)苄腈(6v), 白色固体, 收率 43%; 1H NMR(500 MHz, DMSO- d_6) δ 7.89(d, $J=9.3$ Hz, 1H), 7.87~7.84(m, 1H), 7.82(d, $J=7.8$ Hz, 1H), 7.77(t, $J=8.6$ Hz, 1H), 7.61(t, $J=7.8$ Hz, 1H), 7.35(t, $J=7.8$ Hz, 1H), 7.23(t, $J=7.5$ Hz, 1H), 7.16(d, $J=7.5$ Hz, 1H), 6.92(d, $J=8.2$ Hz, 1H), 6.77(s, 1H), 6.74(d, $J=9.8$ Hz, 1H), 5.41(d, $J=4.3$ Hz, 2H), 5.37(d, $J=2.4$ Hz, 2H), 4.28(s, 4H), 3.34~3.26(m, 2H), 2.51~2.42(m, 6H), 2.18(s, 3H), 0.93(t, $J=7.1$ Hz, 6H); HRMS(ESI) for $C_{33}H_{36}N_6O_4[M+H]^+$. Calcd: 580.279 8, found: 581.288 3.

3-(((4-((3-(2,3-二氢苯并[b][1,4]二噁英-6-基)-2-甲基苄基)氧基)-6-((3-(二甲基氨基)丙基)氨基)-1,3,5-三嗪-2-基)氧)甲基)苄腈(6w), 白色固体, 收率 40%; 1H NMR(500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.04~7.97(m, 1H), 7.90(s, 1H), 7.81(d, $J=7.0$ Hz, 1H), 7.77(d, $J=7.8$ Hz, 1H), 7.60(t, $J=7.7$ Hz, 1H), 7.39~7.33(m, 1H), 7.22(t, $J=7.6$ Hz, 1H), 7.15(d, $J=7.5$ Hz, 1H), 6.91(d, $J=8.2$ Hz, 1H), 6.76(s, 1H), 6.73(d, $J=8.2$ Hz, 1H), 5.40(s, 2H), 5.36(d, $J=3.4$ Hz, 2H), 4.28(s, 4H), 3.34~3.24(m, 2H), 2.28~2.22(m, 2H), 2.18(d, $J=5.1$ Hz, 3H), 2.13(d, $J=2.1$ Hz, 6H), 1.67~1.54(m, 2H); HRMS(ESI) for $C_{32}H_{34}N_6O_4[M+H]^+$. Calcd: 566.264 2, found: 567.272 8.

3-(((4-((3-(二乙基氨基)丙基)氨基)-6-((3-(2,3-二氢苯并[b][1,4]二噁英-6-基)-2-甲基苄基)氧)-1,3,5-三嗪-2-基)氧)甲基)苄腈(6x), 白色固体, 收率 45%; 1H NMR(500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.05(q, $J=5.5$ Hz, 1H), 7.90(s, 1H), 7.82(d, $J=7.7$ Hz, 1H), 7.77(d, $J=7.7$ Hz, 1H), 7.60(t, $J=7.8$ Hz, 1H), 7.36(d, $J=7.5$ Hz, 1H), 7.23(t, $J=7.4$ Hz, 1H), 7.16(d, $J=7.3$ Hz, 1H), 6.92(d, $J=8.2$ Hz, 1H), 6.77(s, 1H), 6.74(d, $J=8.2$ Hz, 1H), 5.40(s, 2H), 5.36(s, 2H), 4.28(s, 4H), 3.32~3.26(m, 2H), 2.48~2.35(m, 6H), 2.19(d, $J=6.4$ Hz, 3H), 1.66~1.53(m, 2H), 0.98~0.87(m, 6H); HRMS(ESI) for $C_{34}H_{38}N_6O_4[M+H]^+$. Calcd: 594.295 5, found: 595.304 1.

4.2 PD-1/PD-L1 体外抑制活性评价实验

HTRF 试剂盒购于 PerkinElmer 公司(CAT# 64PD1PEG), 具体操作如下, 将目标化合物和阳性对照药用 DMSO 配成 8 mmol/L 的母液, 再用 Diluent Buffer 稀释为 10 μ mol/L 的待测液。取 2 μ L 待测液加到 384 孔白色酶标板中, 再分别取 4 μ L 稀释后的 Tag1-PD-L1、Tag2-PD1 加入到上述 384 孔板中, 混匀后孵育 15 min, 最后取 10 μ L 预混的 Anti-Tag1-Eu3⁺ 和 Anti-Tag2-XL665 工作液分别加入到上述 384 孔板中, 混匀避光孵育 2 h。用 Tecan Spark 多功能酶标仪分别于 320 nm 刺激, 665 nm、620 nm 发射, 测定每个孔的发射信号值, 根据以下计算公式, 计算发射信号比率和抑制率。Emission Ratio(ER) = 665 nm Emission

signal/ 620 nm Emission signal。抑制率 $\rho_{\text{抑制率}} = (ER_{\text{positive}} - ER_{\text{sample}}) / (ER_{\text{positive}} - ER_{\text{negative}}) \times 100\%$ 。

4.3 分子对接实验

(1) 分子和蛋白准备:PD-L1 蛋白(PDB:5N2D)从 PDB 数据下载(<http://www.rcsb.org>)得到,利用 Pymol 软件删除水分子和多余的蛋白链,将配体分子和受体分子分开,并分别保存为 pdb 文件。小分子配体 6a 结构先通过 Chemdraw 软件画出 2D 结构,再运用 Chem3D 工具进行能量最小化后导出为相应的 3D 结构文件。(2) 受体准备:打开 AutoDockTools,读取受体蛋白,分别进行除水、加氢、计算电荷和添加原子类型,最后保存为 pdbqt 文件。(3) 配体准备:将 pdb 格式的小分配体导入到 AutoDock 软件中,并设置为配体,设置可旋转键的最大数目并保存为 pdbqt 文件。(4) 定义受体蛋白的结合位点(Grid):在 AutoDockTools 的 ADT 菜单栏中打开受体分子和配体分子,打开 Grid Options 对话框,调整 X,Y,Z 及格子中心坐标,使配体分子落在所选区域。(5) AutoDockVina 参数文件配置:创建一个配置文件 6a.conf.txt,将受体和配体的对接详细参数(Grid)写入文件中。(6) 对接:使用 AutoDockVina 程序,运行 6a.conf.txt,得到对应的 10 个最佳对接结果,保存为 6a-out.pdbqt。(7) 结果分析:在 Pymol 软件中打开 6a-out.pdbqt,选取最优的结合模型,导入与之对应的受体蛋白 5N2D.pdb 和阳性配体分子 BMS-37.pdb,分析配体与受体的相互作用。

参 考 文 献

- [1] JOYCE J A, FEARON D T. T cell exclusion, immune privilege and the tumor microenvironment [J]. Science, 2015, 348(6230): 74-80.
- [2] YANG Y. Cancer immunotherapy: harnessing the immune system to battle cancer [J]. The Journal of Clinical Investigation, 2015, 125(9): 3335-3337.
- [3] ROSENBERG S A. Entering the mainstream of cancer treatment [J]. Nature Reviews Clinical Oncology, 2014, 11(11): 630-632.
- [4] DARVIN P, TOOR S M, SASIDHARAN NAIR V, et al. Immune checkpoint inhibitors: recent progress and potential biomarkers [J]. Experimental & Molecular Medicine, 2018, 50(12): 1-11.
- [5] CHENG B, YUAN W E, SU J, et al. Recent advances in small molecule based cancer immunotherapy [J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2018, 157: 582-598.
- [6] SUNSHINE J, TAUBE J M. PD-1/PD-L1 inhibitors [J]. Current Opinion in Pharmacology, 2015, 23: 32-38.
- [7] OHAEGBULAM K C, ASSAL A, LAZAR-MOLNAR E, et al. Human cancer immunotherapy with antibodies to the PD-1 and PD-L1 pathway [J]. Trends in Molecular Medicine, 2015, 21(1): 24-33.
- [8] VAN DER ZANDEN S Y, LUIMSTRA J J, NEEFJES J, et al. Opportunities for Small Molecules in Cancer Immunotherapy [J]. Trends in Immunology, 2020, 41(6): 493-511.
- [9] CHEN T, LI Q, LIU Z, et al. Peptide-based and small synthetic molecule inhibitors on PD-1/PD-L1 pathway: A new choice for immunotherapy? [J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2019, 161:378-398.
- [10] ZARGANES-TZITZIKAS T, KONSTANTINIDOU M, GAO Y, et al. Inhibitors of programmed cell death 1(PD-1): a patent review (2010-2015) [J]. Expert Opinion on Therapeutic Patents, 2016, 26(9): 973-977.
- [11] CHEN R F, YUAN D D, MA J J. Advances of biphenyl small-molecule inhibitors targeting PD-1/PD-L1 interaction in cancer immunotherapy [J]. Future Medicinal Chemistry, 2021, 14(2): 97-113.
- [12] GUZIK K, ZAK K M, GRUDNIK P, et al. 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 [J]. Journal of Medicinal Chemistry, 2017, 60(13): 5857-5867.
- [13] WANG T, WU X, GUO C, et al. Development of Inhibitors of the Programmed Cell Death-1/Programmed Cell Death-Ligand 1 Signaling Pathway [J]. Journal of Medicinal Chemistry, 2019, 62(4): 1715-1730.
- [14] SKALNIAK L, ZAK K M, GUZIK K, et al. Small-molecule inhibitors of PD-1/PD-L1 immune checkpoint alleviate the PD-L1-induced exhaustion of T-cells [J]. 2017, 8(42): 72167-72181.
- [15] Wang Y, Huang K, Gao Y L, et al. Discovery of quinazoline derivatives as novel small-molecule inhibitors targeting the programmed cell death-1/programmed cell death-ligand 1(PD-1/PD-L1) interaction. [J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2022, 229:113998.

(责任编辑:刘庆松)