

PARP1 与 BRD4 双靶点抑制剂的发现与抗三阴性乳腺癌研究

刘妍妍, 孔宪秀, 李英鹏, 邓雁如*, 葛 军*

天津中医药大学 中药学院, 天津 301617

摘要: **目的** 发现一类骨架结构新颖的聚腺苷二磷酸核糖聚合酶 1 (PARP1) 与溴结构域蛋白 4 (BRD4) 双靶点抑制剂。**方法** 从 ChEMBL 数据库中收集已知的 BRD4 抑制剂作为筛选化合物库。采用药效团与分子对接串联筛选策略, 从化合物库中筛选能够和 PARP1 高效结合的化合物作为模板分子。对模板分子进行结构修饰, 合成得到衍生物。测试衍生物对 PARP1 与 BRD4 的酶抑制活性, 对乳腺癌细胞的增殖抑制能力。**结果** A (化合物 5I) 对 PARP1 与 BRD4 有中等水平的抑制能力, 对三阴性乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的增殖抑制能力强于阳性药 Olaparib, 与 JQ1 水平相当。除了较高的脂水分分配系数外, 5I 的理化性质大都分布在合理范围内, 可作为先导化合物用于深入研究。**结论** 得到一类菲啶酮骨架结构的 PARP1 与 BRD4 双靶点抑制剂, 证明通过计算机虚拟筛选发现 PARP1 与 BRD4 双靶点抑制剂是一种可行的策略。

关键词: 聚腺苷二磷酸核糖转移酶 1; 含溴结构域蛋白 4; 双靶点药物; 药效团; 分子对接; 乳腺癌

中图分类号: R914.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2025)08-1922-12

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2025.08.006

Discovery of PARP1 and BRD4 dual-target inhibitors and research on triple-negative breast cancer

LIU Yanyan, KONG Xianxiu, LI Yingpeng, DENG Yanru, GE Jun

College of Chinese Materia Medica, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

Abstract: Objective To discover a novel class of PARP1 and BRD4 dual-target inhibitors with novel scaffold structures. **Methods** Known BRD4 inhibitors were collected from the ChEMBL database to create a screening compound library. A combined strategy of pharmacophore modeling and molecular docking was employed to identify compounds from the library that could efficiently bind to PARP1, which were then used as template molecules for drug design. Structural modifications were made to the template molecules, resulting in the synthesis of derivatives. The inhibitory activity of these derivatives against PARP1 and BRD4 enzymes, as well as their ability to inhibit the proliferation of breast cancer cells was tested. **Results** A (compound 5I) exhibits moderate inhibitory activity against PARP1 and BRD4, with a stronger ability to inhibit the proliferation of triple-negative breast cancer cells MDA-MB-231 compared to the positive drug Olaparib, and at a level comparable to JQ1. Aside from a higher lipophilicity, the physicochemical properties of 5I are mostly within a reasonable range, making it a potential lead compound for further research. **Conclusion** A class of PARP1 and BRD4 dual-target inhibitors with a phenanthrene scaffold structure was obtained, demonstrating that computer-aided virtual screening is a feasible strategy for discovering dual-target inhibitors of PARP1 and BRD4.

Key words: PARP1; BRD4; dual-target drug; pharmacophore; molecule docking; breast cancer

2022 年全球乳腺癌新增病例 230 万, 死亡 66 万。预计到 2040 年, 乳腺癌年新增病例将增加到 300 万, 死亡人数增加到 100 万^[1-4]。乳腺癌存在多种不同的亚型和病理学特征, 导致了不同的治疗方案及预后。三阴性乳腺癌 (TNBC) 是雌激素受体

(ER)、孕激素受体 (PR) 和人表皮生长因子 (HER-2) 3 个治疗靶点均表达为阴性, 放疗和化疗仍然是其主要的治疗手段, 缺乏有效的靶向药物^[5]。

聚腺苷二磷酸核糖聚合酶 1 (PARP1) 抑制剂基于合成致死原理可以单独用于同源重组功能缺

收稿日期: 2025-03-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82374050); 天津市教委科研计划项目 (2021KJ126)

作者简介: 刘妍妍, 女, 硕士研究生, 研究方向为抗肿瘤双靶点药物设计。E-mail: liuyanyan0836@163.com

*通信作者: 邓雁如, 女, 教授, 研究方向为天然药物抗肿瘤作用。E-mail: dyanru@sina.com

葛 军, 男, 讲师, 研究方向为抗肿瘤药物设计。E-mail: gejun87@126.com

陷的癌症的靶向治疗,如乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌^[6]。尽管 PARP1 抑制剂已经在癌症的治疗上取得重要进展,但是该类抑制剂在三阴性乳腺癌的治疗上应用有限。三阴性乳腺癌是一种高度异质性癌症,在三阴性乳腺癌患者中,具有同源重组修复功能缺陷即“BRCAness”表型的患者比例为 66%~71%,并非所有的患者都对 PARP1 抑制剂敏感,仍然存在大量的患者无法受益于 PARP1 抑制剂的单药治疗^[7]。癌症作为一种多因素疾病,涉及到多个信号通路多个生理过程的失调,选择性的作用单一靶点往往疗效并不理想。针对 PARP1 抑制剂存在的上述问题,合理的药物联用策略发挥协同效应,可以解决上述问题^[8-9]。抑制溴结构域蛋白 4 (BRD4) 会下调同源重组相关基因的表达,诱导同源重组功能正常的三阴性乳腺癌发生同源重组功能缺陷,增强对 PARP1 抑制剂的敏感性,逆转其原发性耐药。此外,抑制 BRD4 还能够下调 TNBC 重要的驱动基因如 *WEE1*、*TOPBP1*、*Aurora Kinases*、*c-MYC* 的表达,促使 TNBC 细胞周期阻滞、增殖抑制、凋亡,以此发挥协同增效作用^[10-11]。

Chang 等^[12-13]首次报道了一类喹唑啉酮骨架结构的 PARP1/BRD4 双靶点抑制剂用于抗乳腺癌研究。Wang 等报道了一类苯并咪唑骨架结构的 PARP1/BRD4 双靶点抑制剂用于抗胰腺癌研究^[14-15]。虽然这些 PARP1/BRD4 双靶点抑制剂展现了出色的协同增效作用,然而此类双靶点抑制剂的药物化学研究仍不完善,骨架结构类型少,制约了相关研究。因此,本研究通过计算机虚拟筛选技术发现骨架结构新颖的 PARP1/BRD4 双靶点抑制剂,合成 16 个衍生物总结构效关系,测试其抗三阴性乳腺癌增殖的能力,为抗乳腺癌药物提供药理研究工具分子和药物开发先导化合物,具有重要的研究意义和应用前景。

1 仪器与试剂

400M AVIII 型核磁共振仪 (布鲁克科技有限公司); 6540 UHD Q-TOF HRMS 高分辨质谱仪 (安捷伦科技有限公司); Milli-Q 型超纯水系统 (Millipore 公司); 超净工作台 (Haier 公司); Varioskan LUX 多功能酶标仪 (上海赛默飞世尔科技有限公司); 台式通用离心机 (Eppendorf 公司); 荧光倒置显微镜 (Olympus 公司); HWC-52 型恒温水浴箱 (上海天平仪器厂); -80 °C 低温冰箱 (Haier 公司); -20 °C 低温冰箱 (Haier 公司); 4 °C 冰箱 (Haier 公司);

D180 二氧化碳培养箱 (深圳市瑞沃德科技有限公司); 摇床 (常州兆圣实验设备制造有限公司); 移液器 (Eppendorf 公司); JY10002 电子分析天平 (上海良平仪器仪表有限公司); OSB-2200 型水浴锅 (上海爱朗仪器有限公司); N-1300 型旋转蒸发仪 (上海爱朗仪器有限公司); MS-1 型磁力搅拌器 (杭州旌裴仪器科技有限公司); YQD-6 氮气瓶 (上海长城仪表厂); ZF-2C 型暗箱式自动紫外分析仪 (上海市安亭电子仪器厂); CA-1116A 型冷却水循环装置 (上海爱朗仪器有限公司); SHZ-D 循环水式多用真空泵 (上海力辰邦西仪器科技有限公司); MP-201 隔膜真空泵 (郑州长城科工贸有限公司); GF254 薄层色谱板 (烟台化工厂); 200~300 目柱色谱用硅胶 (青岛海洋化工厂)。药效团筛选和分子对接筛选采用软件 Discovery Studio 2016。分子对接的结合模式图用 Pymol 2.5 软件制作。

实验中所用的原料和试剂均为分析纯。6(5*H*)-菲啶酮 (上海麦克林生化科技股份有限公司); 3,4-二氟苯磺酰氯、3-溴苯磺酰氯、4-溴苯磺酰氯、5-溴-2-甲氧基苯磺酰氯 (上海阿拉丁生化科技股份有限公司); 2-三氟甲基苯磺酰氯、3-三氟甲基苯磺酰氯、4-三氟甲基苯磺酰氯、2-三氟甲氧基苯磺酰氯、3-三氟甲氧基苯磺酰氯、4-三氟甲氧基苯磺酰氯、3-氟苯磺酰氯、4-氟苯磺酰氯、3-甲氧基苯磺酰氯、2,4-二甲氧基苯磺酰氯、3,4-二氯苯磺酰氯、3,5-二氯苯磺酰氯、钨碳 (上海毕得医药科技股份有限公司); 氯化钠 (北京通广精细化工有限公司); 二氯甲烷、石油醚、甲醇、吡啶、四氢呋喃 (天津市康科德科技有限公司)。

人乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 购于国家生物医学实验细胞资源库; 二甲亚砜 (DMSO, 上海阿拉丁试剂有限公司); DMEM 培养基 (赛默飞世尔科技有限公司); 胎牛血清 (维森特生物技术有限公司); 青链霉素混合液、噻唑蓝 (MTT) (北京索莱宝科技有限公司)。

2 方法与结果

2.1 计算机虚拟筛选策略

常见的计算机虚拟筛选方法主要包括药效团虚拟筛选和分子对接 2 种策略^[16]。药效团虚拟筛选的优势在于其计算速度快,能够高效地筛选出潜在活性化合物。然而,由于其依赖于特定的药效团模型,筛选结果往往局限于具有相似骨架结构的化合物,导致化学多样性不足。与之相比,分子对接方

法通过模拟配体与靶标蛋白结合的具体相互作用，可以筛选出结构类型更加多样的化合物。然而，这种方法的计算复杂度较高，通常需要更长的时间完成筛选。如图 1 所示，为了充分发挥 2 种方法的优势，本课题组采用药效团匹配与分子对接相结合的串联策略。首先利用药效团筛选快速缩小候选化合物的范围，然后通过分子对接进一步优化筛选结果。这种组合方法不仅显著提高了筛选效率，还能够获得结构类型多样的化合物，为后续的药物开发提供了更丰富的化学空间。

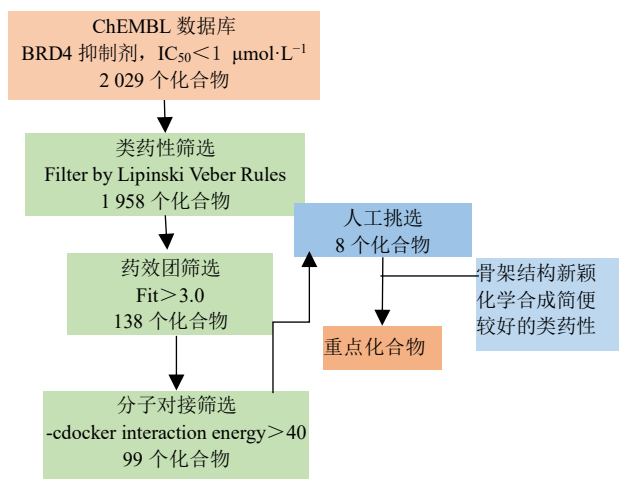


图 1 虚拟筛选策略

Fig. 1 virtual screening strategy

ChEMBL 数据库是欧洲生物信息研究所 (EBI) 开发的在线免费数据库，它通过从大量文献中收集各种靶点及化合物的生物活性数据，为药物化学工作者提供了一个非常便利的查询靶点和化合物的生物活性数据的平台。本研究从 ChEMBL 数据库中收集文献已报道的对 BRD4 有抑制活性的化合物 (BRD4 抑制活性 $IC_{50} < 1 \mu\text{mol/L}$) 用于筛选得到 PARP1/BRD4 双靶点抑制剂。首先，通过 Discovery Studio 软件的 Filter by Lipinski and Veber Rules 模块功能对化合物库进行筛选，去除不符合 Lipinski 规则和 Veber 规则的类药性差分子。接下来，通过药效团筛选功能对化合物库进行快速筛选，保留 Fit Value 值 ≥ 3 的化合物进行分子对接。化合物经过分子对接后，按照打分进行从高到低排序，保留前 99 个化合物 ($-cdocker \text{ interaction energy} > 40$)。最后，对这 99 个化合物进行人工挑选，在挑选时按照如下原则进行挑选：①合成方法容易，便于后续的衍生物的合成。②骨架结构是 PARP1/BRD4 双靶点抑制剂中没有报道的新颖结构。③骨架结构具有较好

的类药性。

2.2 筛选方法可靠性的验证

药效团的生成方法有几种，如基于配体生成的药效团，基于受体结构生成的药效团，基于配体 - 受体相互作用生成的药效团方法相比其他方法具有以下几个显著优势：一是这种方法能够更准确地反映配体与受体结合的关键特征，从而提高药效团模型的生物学相关性和预测能力。二是基于配体 - 受体相互作用生成的药效团不局限于已知配体的骨架结构。因此，该方法在筛选化学骨架新颖的化合物时具有更大的潜力，有助于发现具有创新性的先导化合物。三是配体 - 受体相互作用生成的药效团能够更有效地排除与靶标结合能力较弱的化合物，从而降低虚拟筛选中的假阳性率，提高筛选结果的准确性。因此，本课题采用基于配体 - 受体相互作用生成的药效团对化合物库进行药效团匹配筛选。

药效团匹配可靠性的验证。在 DUDE 网站生成并下载与已知活性的 PARP1 抑制剂理化性质接近的非活性分子来构建诱饵集分子，评判筛选方法从大量化合物中富集活性分子的能力。在生成药效团时，使用 Discovery Studio 软件内置的验证功能对可靠性进行验证。在计算机虚拟筛选中，敏感性 (sensitivity)、特异性 (specificity) 和受试者特征曲线 (ROC) 是评估筛选方法可靠性的重要参数。敏感性反映了虚拟筛选方法对活性化合物的检出能力。高敏感性意味着虚拟筛选方法能够尽可能多地捕获真实的活性化合物，减少漏检的可能性。在药物研发中，敏感性高的筛选方法有助于确保潜在的候选化合物不会被遗漏。如表 1 所示，药效团 5 拥有最高的敏感性 (0.985 20)。特异性是指虚拟筛选方法正确识别出真实无活性化合物 (即“负样本”) 的能力。特异性反映了虚拟筛选方法对无活性化合物的排除能力。高特异性意味着虚拟筛选方法能够有效减少假阳性，避免将无活性化合物误认为活性化合物。在药物研发中，特异性高的筛选方法有助于减少后续实验验证的工作量和成本。如表 1 所示，药效团 1 拥有最高的特异性 (0.756 86)。然而，需要指出的是，过高的敏感性和特异性也会带来一些问题。如果敏感性过高，可能会导致更多的假阳性，即无活性化合物被错误预测为活性化合物。如果特异性过高，可能会导致更多的假阴性，即活性化合物被错误预测为无活性化合物。ROC 曲线是通过绘

制敏感性与 1-特异性之间的关系曲线来评估虚拟筛选方法整体性能的工具,综合考虑了敏感性和特异性,能够全面评估筛选方法的可靠性。曲线下面积(AUC)是 ROC 曲线的一个重要量化参数,AUC 数值在 0.5~1.0,越接近 1.0 表明 ROC 曲线越接近坐标左上角,表示越高的敏感性和高特异性。如图 2 所示,考虑到药效团 5 拥有最高的 AUC 值

(0.835),本研究选用该药效团用于筛选工作。如图 3 所示,药效团 5 由如下的特征元素组成:1 个氢键受体,1 个氢键供体,1 个疏水中心,1 个芳香环中心,1 个正电中心和若干排除体积。

分子对接可靠性的验证。通过将蛋白-配体晶体复合物文件中的配体分子重新对接到蛋白中,对其结合模式和结合构象进行比较。Olaparib (AZD2281,

表 1 药效团活性验证

Table 1 Validation of pharmacophore activity								
药效团	活性化合物数	无活性化合物数	阳性	阴性	假阳性	假阴性	敏感性	特异性
1	473	29 280	380	22 161	7 119	98	0.803 38	0.756 86
2	473	29 280	269	17 915	11 365	204	0.568 71	0.611 85
3	473	29 280	424	18 792	10 488	49	0.896 41	0.641 80
4	473	29 280	416	11 853	17 427	57	0.879 49	0.404 82
5	473	29 280	466	15 998	13 282	7	0.985 20	0.546 38
6	473	29 280	427	17 198	12 082	46	0.902 75	0.587 36
7	473	29 280	305	13 220	16 060	168	0.644 82	0.451 50
8	473	29 280	386	10 693	18 587	87	0.816 07	0.365 20
9	473	29 280	417	9 647	19 633	56	0.881 61	0.329 47
10	473	29 280	406	10 463	18 817	67	0.858 35	0.357 34

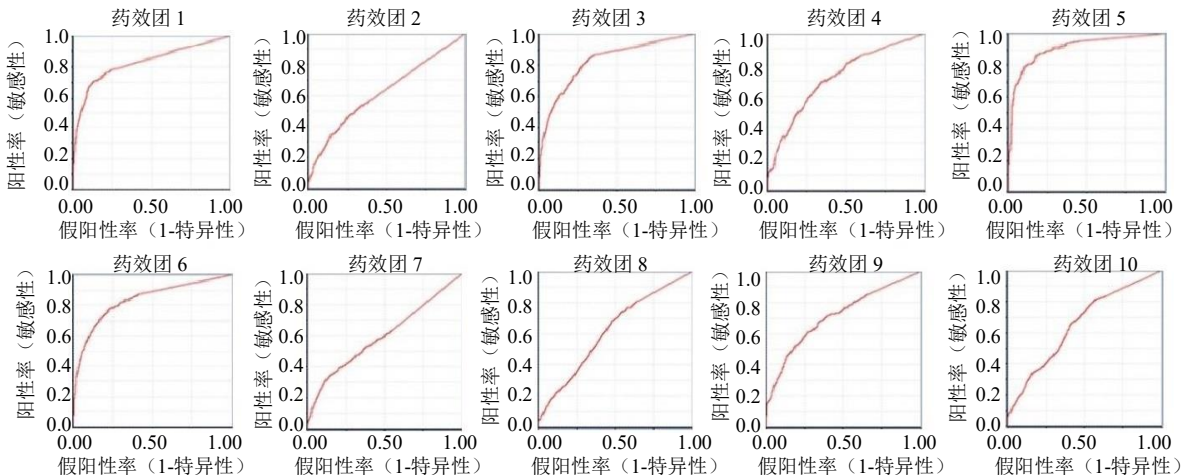


图 2 药效团 AUC 值

Fig. 2 AUC value of the pharmacophore

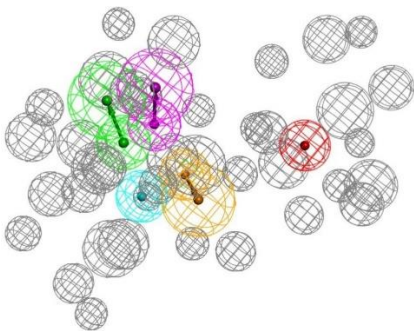
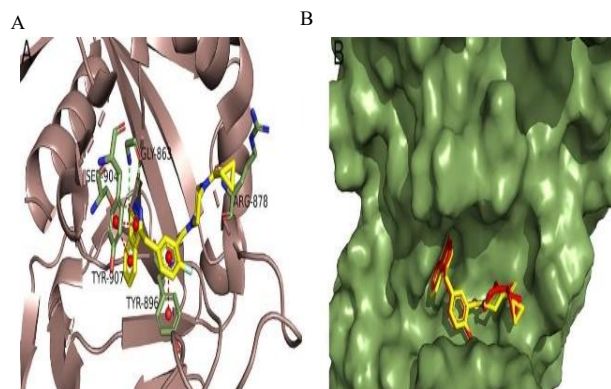


图 3 最优药效团的组成元素

Fig. 3 Constituent elements of the optimal pharmacophore

Ku-0059436)是一种选择性的 PARP1/2 抑制剂,如图 4 所示,分子对接显示 Olaparib 能够和 PARP1 的关键氨基酸残基发生相互作用,模拟构象与晶体复合物中的真实构象高度重合(PDB code: 5DS3)。

均方根偏差值(RMSD)是比较分子对接预测的配体构象与其在晶体复合物中真实构象的差异大小的量化参数,一般认为 RMSD 值小于 1.5 Å (1 Å=0.1 nm)即可表明 2 种构象的差异较小。如表 2 所示,通过 CDOCKER 方法预测的 PARP1 抑制剂 Olaparib (PDB code: 5DS3)的构象 Top Hit 1 拥有最高值的打分-cdocking interaction energy,其与



红色为 Olaparib 的真实构象, 黄色为 Olaparib 的 CDOCKER 预测构象。

red: real conformation of Olaparib; yellow: CDOCKER predicted conformation of Olaparib.

图 4 Olaparib 与 PARP1 分子对接 (A)、构象与真实构象的叠合比较 (B)

Fig. 4 Molecular docking simulation of Olaparib and PARP1(A), superimposition comparison of predicted conformation and the real conformation (B)

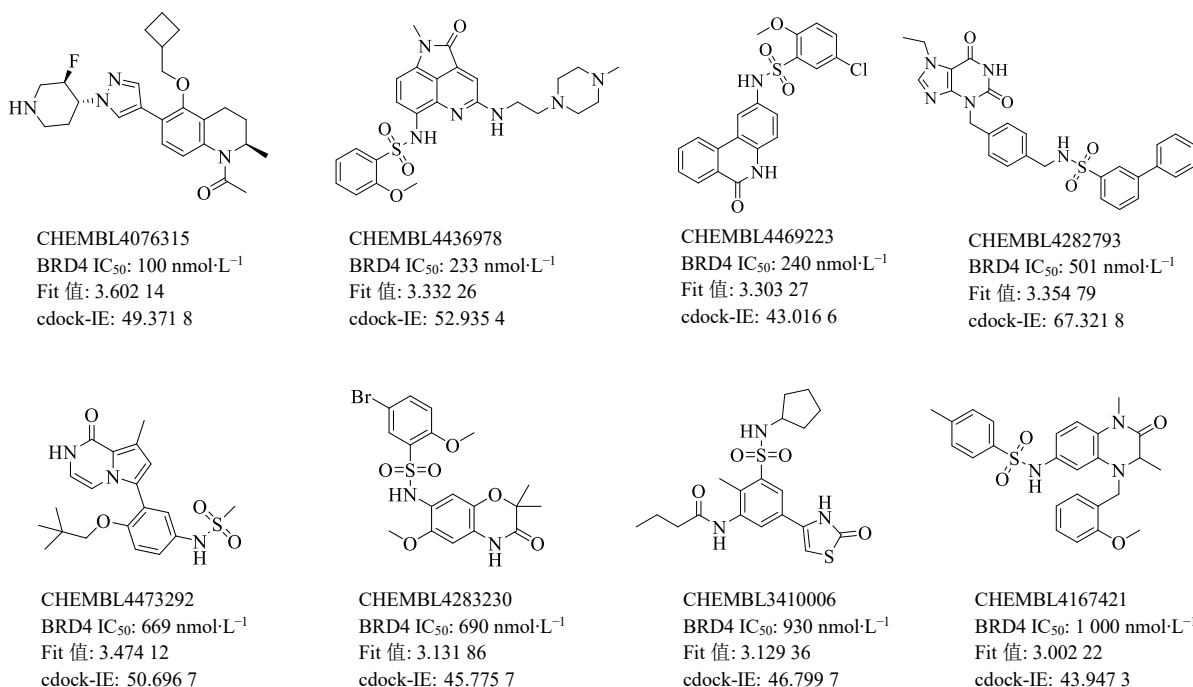


图 5 计算机虚拟筛选得到的 PARP1/BRD4 双靶点抑制剂

Fig. 5 PARP1/BRD4 dual-target inhibitors obtained by computer-aided virtual screening

结构的化合物。菲啶酮骨架结构因其多样的生物活性、优良的药动学特性、广泛的合成方法, 成为药物开发中的一种优势骨架结构^[17]。此外, ChEMBL4469223 对 BRD4 的抑制活性已被文献报道, 构效关系明确, 利于双靶点抑制剂的药物设计,

因此将其选为模板化合物用于 PARP1/BRD4 双靶点抑制剂的分子设计^[18]。

2.4 药物分子设计与合成

如图 6 所示, 对于 PARP1, 化合物 ChEMBL4469223 菲啶酮的酰胺结构可以和 PARP1 蛋白的 Gly-863、

表 2 分子对接的 RMSD 值

构象	-cdocker interaction energy	RMSD
Top Hit 1	62.874 6	0.474 8
Top Hit 2	62.430 2	0.714 9
Top Hit 3	62.324 6	0.620 5
Top Hit 4	62.342 4	0.801 5
Top Hit 5	62.206 1	0.818 1
Top Hit 6	55.499 3	1.564 0
Top Hit 7	55.767 0	1.350 6
Top Hit 8	55.618 2	1.593 7
Top Hit 9	56.167 4	2.459 4
Top Hit 10	55.048 3	1.662 5

真实构象的误差也最小 (RMSD 值为 0.436 7), 说明分子对接的打分函数- cdocker interaction energy 能够准确预测化合物与 PARP1 蛋白的结合构象。

2.3 筛选结果

如图 5 所示, 最终从筛选结果中得到 8 个骨架结构新颖的化合物作为 PARP1/BRD4 双靶点抑制剂。化合物 ChEMBL4469223 是一种含菲啶酮骨架

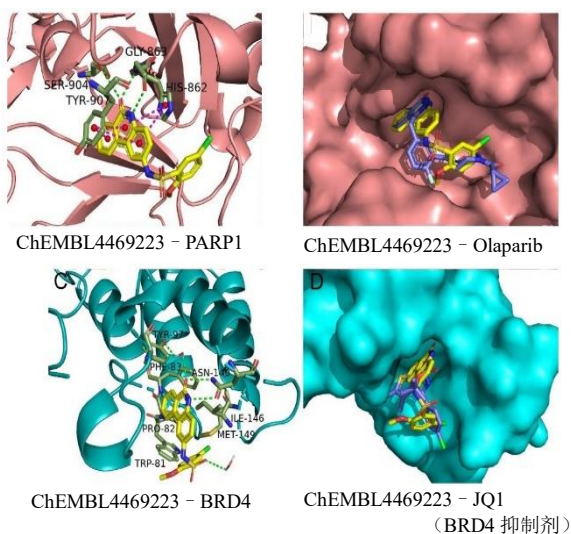


图 6 ChEMBL4469223 与靶点蛋白的结合模式

Fig. 6 Binding mode of ChEMBL4469223 to target protein

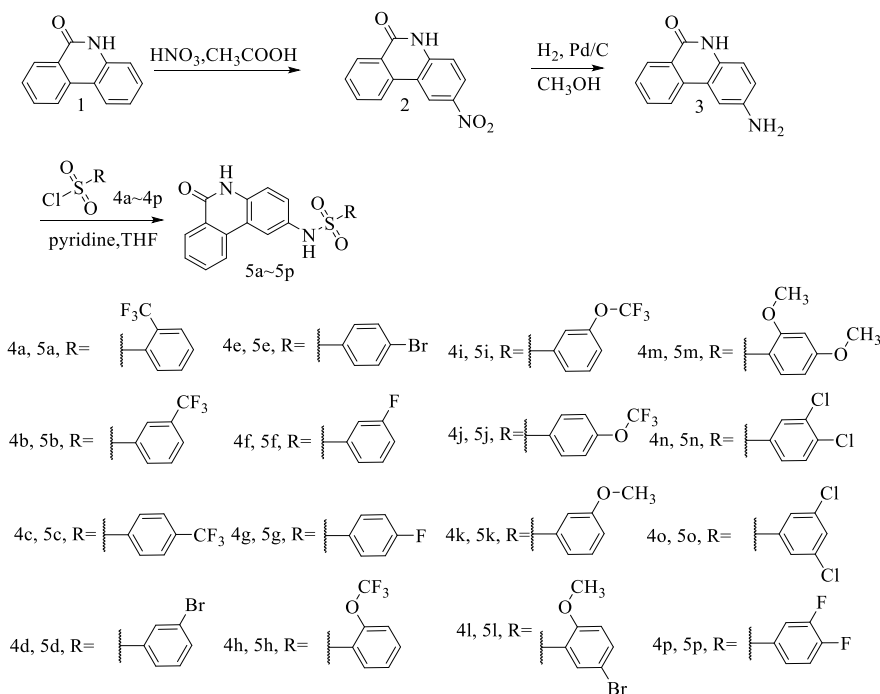


图 7 目标化合物的合成路线

Fig. 7 Synthesis route of target compounds

中间体 3。中间体 3 通过与商业途径购买得到的磺酰氯 4a~4p 发生磺酰化反应得到目标化合物 5a~5p。以下化合物均经过 $^1\text{H-NMR}$ 和 $^{13}\text{C-NMR}$ 验证, 关键特征峰的 NMR 数据与已报道文献一致, 能够确证其预期结构^[18]。

2-硝基-6(5H)菲啶酮(化合物 2)的制备 将 0.3 g (1.54 mmol) 6-(5H)-菲啶酮在冰水浴 0 °C 条件下,

Ser-904 发生氢键相互作用, 菲啶酮的苯环与 Tyr-907 和 Tyr-896 发生 $\pi-\pi$ 堆积作用。末端的磺酰胺片段则伸入到较大的疏水性空腔中与 Tyr-896 发生 $\pi-\pi$ 堆积作用, 但没有与 Arg-878 发生氢键作用。对于 BRD4, 化合物 ChEMBL4469223 的菲啶酮的酰胺结构与 Asn-140 发生氢键相互作用, 与 Tyr-97 发生水分子介导的氢键相互作用。磺胺片段则与保守的水分子发生氢键相互作用, 这对于增强化合物与靶点蛋白的结合是有利的^[18]。菲啶酮结构能够与 PARP1 和 BRD4 的关键氨基酸发生相互作用, 是一种优势骨架结构。综合化合物 ChEMBL4469223 与靶点蛋白结合模式以及文献报道的构效关系, 本项目拟在苯环上引入不同的取代基, 考察电性和取代位置对 PARP1 抑制活性和 BRD4 抑制活性的影响。

如图 7 所示, 菲啶酮通过硝化反应得到中间体 2。中间体 2 的硝基通过催化氢化还原为氨基得到

加入硝酸 (1.5 mL) 和乙酸 (1.5 mL) 溶液中, 反应体系置换为氮气环境, 搅拌 10 min, 90 °C 加热回流 4 h, 薄层色谱以二氯甲烷-甲醇 (100:1) 展开剂监测反应的完成。反应混合物中加入 15 mL 的水, 有白色固体析出, 抽滤, 用水淋洗滤饼, 烘干得 0.34 g 黄色固体, 收率为 91%。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 11.09 (s, 1H), 8.88 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H),

8.60 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 8.49~8.29 (m, 2H), 7.94 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 7.76 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.46 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H)。

2-氨基菲-6(5H)菲啶酮(化合物 3)的制备 将 0.34 g (1.42 mmol) 化合物 2 和 0.033 g (0.31 mmol) 钯碳溶于 20 mL 甲醇溶液中, 反应体系置换为氢气环境, 室温反应 8 h, 薄层色谱以二氯甲烷-甲醇(80:1)展开剂监测反应的完成。抽滤, 保留滤液, 减压浓缩, 得 0.26 g 棕色固体, 收率为 88%, mp 234~235 °C。¹H-NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 11.32 (s, 1H), 8.30 (dd, $J = 8.0, 1.5$ Hz, 1H), 8.22 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.86~7.78 (m, 1H), 7.66~7.53 (m, 1H), 7.47 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 7.10 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 6.82 (dd, $J = 8.6, 2.4$ Hz, 1H), 5.01 (s, 2H)。

目标化合物 5a~5p 的制备方法 将 0.2 g (0.95 mmol) 化合物 3 和 1.05 mmol 具有不同取代基的苯磺酰氯(4a~4p), 溶于吡啶(3 mL)和四氢呋喃(9 mL)溶液中, 65 °C 加热回流 4 h, 薄层色谱以二氯甲烷-甲醇(60:1)展开剂监测反应的完成。反应液中加水(30 mL), 用二氯甲烷(30 mL×2)萃取, 有机层用饱和氯化钠溶液洗涤, 减压浓缩得到粗品, 经硅胶柱色谱分离, 二氯甲烷-甲醇(80:1)梯度洗脱, 得到目标化合物 5a~5p。

N-(6-氧代-5,6-二氢菲-2-基)-2-(三氟甲基)苯磺酰胺(化合物 5a): 收率为 60%, mp>250 °C。¹H-NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 11.65 (s, 1H), 10.61 (s, 1H), 8.31 (d, $J = 6.5$ Hz, 1H), 8.16 (t, $J = 8.4$ Hz, 2H), 8.05~7.95 (m, 2H), 7.92~7.77 (m, 3H), 7.66 (t, $J = 7.1$ Hz, 1H), 7.31~7.15 (m, 2H); ¹³C-NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 160.91, 138.80, 134.27, 133.91, 133.86, 133.80, 133.52, 131.93, 131.40, 128.99 (d, $J = 6.3$ Hz), 128.84, 128.13, 126.92 (d, $J = 32.8$ Hz), 126.30, 123.92, 123.25 (d, $J = 274.1$ Hz), 122.46, 118.26, 117.53, 115.75。MS (ESI, positive) m/z : 419.067 1 [M+H]⁺。

N-(6-氧代-5,6-二氢菲-2-基)-3-(三氟甲基)苯磺酰胺(化合物 5b): 收率为 65%, mp 248~249 °C。¹H-NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 11.67 (s, 1H), 10.42 (s, 1H), 8.32 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 8.17 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 8.09~7.94 (m, 4H), 7.93~7.84 (m, 1H), 7.80 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.67 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.27 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 7.19 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H); ¹³C-NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 160.94, 140.88, 134.69, 133.82,

133.47, 131.78, 131.42, 131.30, 130.27 (d, $J = 31.8$ Hz), 130.08, 128.85, 128.12, 126.28, 124.74, 123.78 (d, $J = 3.9$ Hz), 123.77 (d, $J = 272.8$ Hz), 122.45, 118.30, 117.54, 116.88。MS (ESI, positive) m/z : 419.067 3 [M+H]⁺。

N-(6-氧代-5,6-二氢菲-2-基)-4-(三氟甲基)苯磺酰胺(化合物 5c): 收率为 63%, mp>250 °C。¹H-NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 11.67 (s, 1H), 10.49 (s, 1H), 8.32 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 8.18 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 8.03~7.92 (m, 5H), 7.87 (t, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.67 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.27 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 7.20 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H); ¹³C-NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 160.94, 143.73, 134.63, 133.86, 133.47, 132.99 (d, $J = 32.5$ Hz), 131.80, 128.84, 128.25, 128.11, 126.98 (d, $J = 3.9$ Hz), 126.30, 124.60, 123.83 (d, $J = 272.9$ Hz), 122.55, 118.33, 117.56, 116.73。MS (ESI, positive) m/z : 419.067 6 [M+H]⁺。

3-溴-*N*-(6-氧代-5,6-二氢菲-2-基)苯磺酰胺(化合物 5d): 收率为 68%, mp>250 °C。¹H-NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 11.67 (s, 1H), 10.36 (s, 1H), 8.32 (dd, $J = 8.0, 1.4$ Hz, 1H), 8.19 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.98 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 7.95~7.84 (m, 2H), 7.85~7.78 (m, 1H), 7.73 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.67 (t, $J = 7.1$ Hz, 1H), 7.50 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.27 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 7.19 (dd, $J = 8.7, 2.2$ Hz, 1H); ¹³C-NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 160.94, 141.74, 136.25, 134.55, 133.86, 133.52, 132.02, 131.95, 129.58, 128.85, 128.13, 126.32, 126.29, 124.47, 122.54, 122.52, 118.29, 117.53, 116.54。MS (ESI, positive) m/z : 428.991 3 [M+H]⁺。

4-溴-*N*-(6-氧代-5,6-二氢菲-2-基)苯磺酰胺(化合物 5e): 收率为 57%, mp>250 °C。¹H-NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 11.67 (s, 1H), 10.34 (s, 1H), 8.31 (d, $J = 6.5$ Hz, 1H), 8.19 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.97 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 7.93~7.84 (m, 1H), 7.79~7.73 (m, 2H), 7.71~7.61 (m, 3H), 7.26 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 7.18 (d, $J = 6.5$ Hz, 1H); ¹³C-NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 160.93, 139.03, 134.45, 133.88, 133.51, 132.83, 132.11, 129.25, 128.83, 128.12, 127.25, 126.28, 124.38, 122.56, 118.29, 117.51, 116.39。MS (ESI, positive) m/z : 428.991 2 [M+H]⁺。

3-氟-*N*-(6-氧代-5,6-二氢菲-2-基)苯磺酰胺(化合物 5f): 收率为 65%, mp>250 °C。¹H-NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 11.66 (s, 1H), 10.37 (s, 1H), 8.32

(dd, $J = 7.9, 1.3$ Hz, 1H), 8.19 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.99 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 7.92~7.84 (m, 1H), 7.67 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.63~7.55 (m, 3H), 7.53~7.43 (m, 1H), 7.27 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 7.20 (dd, $J = 8.3, 1.7$ Hz, 1H); ^{13}C -NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 162.10 (d, $J = 248.6$ Hz), 160.93, 141.84 (d, $J = 6.6$ Hz), 134.50, 133.87, 133.51, 132.16 (d, $J = 8.0$ Hz), 132.02, 128.82, 128.12, 126.29, 124.42, 123.57 (d, $J = 3.2$ Hz), 122.54, 120.60 (d, $J = 21.2$ Hz), 118.28, 117.50, 116.47, 114.21 (d, $J = 24.3$ Hz)。MS (ESI, positive) m/z : 369.070 2 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

4-氟-*N*-(6-氧代-5,6-二氢菲-2-基)苯磺酰胺 (化合物 **5g**): 收率为 62%, mp > 250 °C。 ^1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 11.65 (s, 1H), 10.27 (s, 1H), 8.32 (dd, $J = 8.0, 1.4$ Hz, 1H), 8.18 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.98 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 7.88 (t, $J = 6.9$ Hz, 1H), 7.82 (dd, $J = 8.9, 5.2$ Hz, 2H), 7.71~7.62 (m, 1H), 7.43~7.34 (m, 2H), 7.26 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 7.19 (dd, $J = 8.7, 2.2$ Hz, 1H); ^{13}C -NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 164.75 (d, $J = 251.6$ Hz), 160.93, 136.16 (d, $J = 3.1$ Hz), 134.40, 133.90, 133.50, 132.27, 130.29 (d, $J = 9.7$ Hz), 128.80, 128.12, 126.29, 124.38, 122.52, 118.27, 117.47, 116.90 (d, $J = 22.8$ Hz), 116.33。MS (ESI, positive) m/z : 369.070 5 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

(6-氧代-5,6-二氢菲-2-基)-2-(三氟甲氧基)苯磺酰胺 (化合物 **5h**): 收率为 58%, mp > 250 °C。 ^1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 11.64 (s, 1H), 10.51 (s, 1H), 8.31 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 8.15 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 8.04~7.96 (m, 2H), 7.88 (t, $J = 6.9$ Hz, 1H), 7.78~7.69 (m, 1H), 7.66 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.57~7.45 (m, 2H), 7.29~7.17 (m, 2H); ^{13}C -NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 160.91, 145.58, 135.90, 134.25, 133.89, 133.51, 131.91, 131.53, 128.79, 128.13, 127.99, 126.29, 123.88, 122.40, 121.47, 120.30 (d, $J = 259.3$ Hz), 118.19, 117.41, 115.64。MS (ESI, positive) m/z : 435.061 5 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

N-(6-氧代-5,6-二氢菲-2-基)-3-(三氟甲氧基)苯磺酰胺 (化合物 **5i**): 收率为 62%, mp 231~232 °C。 ^1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 11.67 (s, 1H), 10.41 (s, 1H), 8.32 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 8.16 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.96 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 7.87 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.78 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.73~7.59 (m, 4H), 7.27 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 7.19 (d, $J = 10.9$ Hz, 1H); ^{13}C -NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 160.94, 148.62 (d, $J = 1.9$

Hz), 141.67, 134.67, 133.83, 133.45, 132.27, 131.82, 128.84, 128.11, 126.41, 126.26, 126.17, 124.71, 122.45, 120.29 (d, $J = 257.8$ Hz), 119.54, 118.29, 117.50, 116.79。MS (ESI, positive) m/z : 435.062 7 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

N-(6-氧代-5,6-二氢菲-2-基)-4-(三氟甲氧基)苯磺酰胺 (化合物 **5j**): 收率为 59%, mp 163~164 °C。 ^1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 11.66 (s, 1H), 10.35 (s, 1H), 8.31 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 8.16 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.95 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 7.92~7.83 (m, 3H), 7.66 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.54 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.27 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 7.20 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H); ^{13}C -NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 160.94, 151.51, 138.73, 134.54, 133.87, 133.46, 132.04, 129.89, 128.82, 128.11, 126.29, 124.63, 122.49, 121.87, 120.25 (d, $J = 258.2$ Hz), 118.29, 117.51, 116.62。MS (ESI, positive) m/z : 435.062 7 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

3-甲氧基-*N*-(6-氧代-5,6-二氢菲-2-基)苯磺酰胺 (化合物 **5k**): 收率为 56%, mp > 250 °C。 ^1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 11.64 (s, 1H), 10.25 (s, 1H), 8.31 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 8.17 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.99 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 7.88 (t, $J = 6.9$ Hz, 1H), 7.70~7.62 (m, 1H), 7.44 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.33 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.29 (t, $J = 2.2$ Hz, 1H), 7.25 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 7.21 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 7.16 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 3.75 (s, 3H); ^{13}C -NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 160.91, 159.79, 141.03, 134.24, 133.90, 133.51, 132.50, 130.92, 128.79, 128.14, 126.28, 124.13, 122.45, 119.35, 119.17, 118.19, 117.42, 115.93, 112.20, 56.01。MS (ESI, positive) m/z : 381.090 2 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

A[5-溴-2-甲氧基-*N*-(6-氧代-5,6-二氢菲-2-基)苯磺酰胺 (化合物 **5l**)] : 收率为 60%, mp 104~105 °C。 ^1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 11.61 (s, 1H), 10.13 (s, 1H), 8.31 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 8.16 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.97 (s, 1H), 7.89 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.81 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 7.72 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.66 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.23 (s, 2H, H-3), 7.17 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 3.93 (s, 3H); ^{13}C -NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ : 160.89, 156.15, 137.98, 134.17, 133.90, 133.52, 132.47, 132.25, 128.76, 128.61, 128.16, 126.32, 123.83, 122.31, 118.09, 117.36, 115.90, 115.51, 111.45, 57.07。MS (ESI, positive) m/z : 459.001 1 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

2,4-二甲氧基-*N*-(6-氧代-5,6-二氢菲-2-基)苯磺

酰胺 (化合物 **5m**): 收率为 67%, mp 126~127 °C。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 11.57 (s, 1H), 9.82 (s, 1H), 8.30 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H), 8.14 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.97 (s, 1H), 7.92~7.84 (m, 1H), 7.72~7.61 (m, 2H), 7.26~7.16 (m, 2H), 6.63 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 6.53 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H), 3.92 (s, 3H), 3.75 (s, 3H); ¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 164.98, 160.84, 158.42, 134.01, 133.66, 133.49, 133.12, 132.50, 128.66, 128.15, 126.29, 123.24, 122.28, 118.87, 118.01, 117.17, 114.66, 105.46, 99.58, 56.70, 56.14。MS (ESI, positive) *m/z*: 411.100 8 [M+H]⁺。

3,4-二氯-*N*-(6-氧代-5,6-二氢菲-2-基)苯磺酰胺 (化合物 **5n**): 收率为 59%, mp 247~248 °C。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 11.67 (s, 1H), 10.41 (s, 1H), 8.32 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 8.22 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 8.00 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 7.95 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 7.88 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.82 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.71~7.63 (m, 2H), 7.28 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.20 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H); ¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 160.96, 140.08, 136.49, 134.71, 133.86, 133.50, 132.62, 132.18, 131.69, 128.94, 128.86, 128.11, 127.37, 126.30, 124.64, 122.61, 118.37, 117.60, 116.91。MS (ESI, positive) *m/z*: 419.001 6 [M+H]⁺。

3,5-二氯-*N*-(6-氧代-5,6-二氢菲-2-基)苯磺酰胺 (化合物 **5o**): 收率为 67%, mp > 250 °C。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 11.69 (s, 1H), 10.45 (s, 1H), 8.32 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 8.23 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 8.01 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 7.95~7.85 (m, 2H), 7.73 (d, *J* = 1.9 Hz, 2H), 7.68 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.30 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.21 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H); ¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 160.97, 142.88, 135.54, 134.82, 133.83, 133.51, 133.10, 131.47, 128.89, 128.12, 126.31, 125.78, 124.69, 122.60, 118.39, 117.63, 117.07。MS (ESI, positive) *m/z*: 419.001 6 [M+H]⁺。

3,4-二氟-*N*-(6-氧代-5,6-二氢菲-2-基)苯磺酰胺 (化合物 **5p**): 收率为 65%, mp > 250 °C。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 11.68 (s, 1H), 10.37 (s, 1H), 8.32 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 8.23 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.00 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 7.92~7.79 (m, 2H), 7.72~7.56 (m, 3H), 7.28 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.20 (d, *J* = 10.9 Hz, 1H); ¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 160.96, 152.56 (dd, *J* = 253.7, 12.4 Hz), 149.65 (dd, *J* = 251.7, 13.4 Hz), 136.93 (d, *J* = 8.5 Hz), 134.62, 133.88,

133.50, 131.83, 128.83, 128.10, 126.28, 125.22 (dd, *J* = 8.1, 3.8 Hz), 124.60, 122.65, 119.22 (d, *J* = 18.5 Hz), 118.34, 117.55, 117.06 (d, *J* = 19.7 Hz), 116.80。MS (ESI, positive) *m/z*: 387.061 0 [M+H]⁺。

2.5 生物活性评价

通过 ELISA 法在 96 孔板中评估测试化合物对 PARP1 酶活性的抑制作用。每个孔预先包被组蛋白 (20 μg/mL), 用 100 μL PBS 缓冲液, 并在 4 °C 下孵育过夜。随后向每个孔中加入 30 μL 反应缓冲液 (2 mmol/L MgCl₂ 和 50 mmol/L Tris, pH 8.0) 中的 NAD⁺ (100 μmol/L)、生物素化 NAD⁺ (25 μmol/L) 和 siDNA (200 nmol/L)。之后加入 5 μL 不同浓度的化合物或溶剂对照。通过加入 20 μL PARP (50 ng/孔) 并在 30 °C 下孵育 1 h 来启动反应。反应结束后, 加入 50 μL 链霉亲和素偶联的 HRP, 并在 30 °C 下继续进行 30 min 的测定。最后, 加入 100 μL 含有 H₂O₂ 和鲁米诺的 0.1 mol/L 柠檬酸盐缓冲液 (pH 5.4) 溶液, 并使用 SpectraMax M5 微孔板读数仪记录发光信号。PARP1 酶活性的抑制率 = (对照组测量值 - 处理组测量值) / 对照组测量值。按照上述方法, 首先测定了化合物对 PARP1 在 0.5 μmol/L 浓度下的抑制率。

采用 TR-FRET 技术测试化合物的 BRD4 抑制活性。使用重组 BRD4 (BD1+BD2) 及其相应的配体。测定中产生的 TR-FRET 信号与配体与溴结构域的结合成正比。所有反应的最终 DMSO 浓度为 1%。所有结合反应在室温下进行。每个 20 μL 的反应混合物中, 包含溴结构域、BET 配体和指定的抑制剂量。对于阴性对照, 5 μL 的测定缓冲液替代了 BET 配体。在与配体孵育 120 min 后, 使用 Tecan Infinite M1000 酶标仪捕获 TR-FRET 信号。IC₅₀ 值通过在 Prism GraphPad 软件中的标准化剂量-反应拟合进行确定。BRD4 活性的抑制率计算公式同上。按照上述方法, 首先测定了化合物对 BRD4 在 0.5 μmol/L 浓度下的抑制率。

MDA-MB-231 细胞在补充了 10% FBS 和 1% 青霉素/链霉素的 DMEM 培养基中维持, 并在 37 °C 的湿润环境中培养, 含有 5% CO₂。细胞活力通过 MTT 法进行评估。细胞以每孔 3 × 10³ 个细胞的密度接种于 96 孔板中, 并用不同浓度 (0.05、0.20、0.80、3.20、6.40、12.80 μmol/L) 的化合物处理 72 h。孵育后, 向每孔中添加 100 μL MTT 溶液 (0.5 mg/mL), 并进一步孵育 4 h。形成的福尔马赞晶体

溶解在 150 μL DMSO 中,使用微孔板读数仪在 570 nm 处测量吸光度。

如表 3 所示,测试了化合物在 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下对 PARP1 和 BRD4 的抑制率和对三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的增殖抑制能力。对于三氟甲基取代的化合物 5a~5c,对位取代的 5c 对 PARP1 的抑制能力最强。对于三氟甲氧基取代的化合物 5h~5j,邻位取代的 5h 对 PARP1 的抑制能力最强。5b, 5i, 5k 三者相比,5k 对 PARP1 的抑制率最高,说明

表 3 目标化合物的酶抑制活性和细胞增殖抑制活性

Table 3 Enzyme inhibitory activity and cell proliferation inhibitory activity of the target compounds

化合物	活性抑制率/%或 $\text{IC}_{50}(\bar{x} \pm s)/(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$		
	PARP1	BRD4	MDA-MB-231
Olaparib	0.002 $\pm$ 0.001	—	8.736 $\pm$ 0.195
JQ1	—	0.124 $\pm$ 0.042	1.599 $\pm$ 0.059
5a	39	14	16.60 $\pm$ 1.875
5b	26	5	25.27 $\pm$ 1.480
5c	56	4	31.22 $\pm$ 5.344
5d	26	6	10.94 $\pm$ 0.587
5e	26	3	7.878 $\pm$ 0.346
5f	45	6	7.720 $\pm$ 1.442
5g	25	16	18.94 $\pm$ 0.536
5h	54	4	21.13 $\pm$ 0.456
5i	26	13	19.99 $\pm$ 1.082
5j	17	34	18.67 $\pm$ 3.168
5k	36	6	11.49 $\pm$ 2.207
5l	2.949 $\pm$ 1.041	6.956 $\pm$ 2.258	1.587 $\pm$ 0.355
5m	47	11	5.124 $\pm$ 0.932
5n	10	5	4.178 $\pm$ 0.092
5o	26	3	13.42 $\pm$ 1.305
5p	10	5	10.07 $\pm$ 1.250

在苯环间位引入供电子基团有利于提高对 PARP1 的抑制能力。当取代基是卤素原子时,氟原子间位单取代的化合物 5f 拥有最强的 PARP1 抑制能力。当卤素原子是双取代时,间位对位双取代的化合物 5n、5p 的 PARP1 抑制能力要比间位间位双取代的化合物 5o 弱,说明取代基是卤素时,取代位置对 PARP1 抑制能力有影响。除了化合物 5j 和 5l 外,其余化合物对 BRD4 的抑制能力较弱,有待进一步结构优化。接下来,本研究测试了化合物在给药 72 h 后对 MDA-MB-231 细胞的增殖抑制能力。结果显示 BRD4 抑制剂 JQ1 比 PARP1 抑制剂 Olaparib 有更强的增殖抑制能力。化合物 5l、5m、5n 对 MDA-MB-231 细胞的增殖抑制能力强于阳性药 Olaparib,其中 5l 拥有最强的抑制活性,与阳性药 JQ1 水平相当。尽管化合物 5l 对 PARP1 和 BRD4 的抑制能力[PARP1, $\text{IC}_{50} = (2.949 \pm 1.041) \mu\text{mol/L}$; BRD4, $\text{IC}_{50} = (6.956 \pm 2.258) \mu\text{mol/L}$]弱于阳性药,但化合物 5l 较强的抗癌细胞增殖能力提示双靶点抑制剂的协同效应发挥了重要作用。

2.6 化合物 5l 对 MDA-MB-231 细胞迁移的抑制作用

增强的迁移能力使癌细胞能够通过血液或淋巴系统从原发灶转移至远端组织,进而形成转移性病灶。这是许多癌症进展的一个关键指标。本研究通过细胞划痕实验评估了化合物 5l、JQ1 和 Olaparib 对 MDA-MB-231 细胞迁移能力的影响(图 8)。将 MDA-MB-231 细胞以 5×10^5 个/孔的密度接种在 6 孔板中,让其在培养箱中孵育过夜。使用 10 μL 移

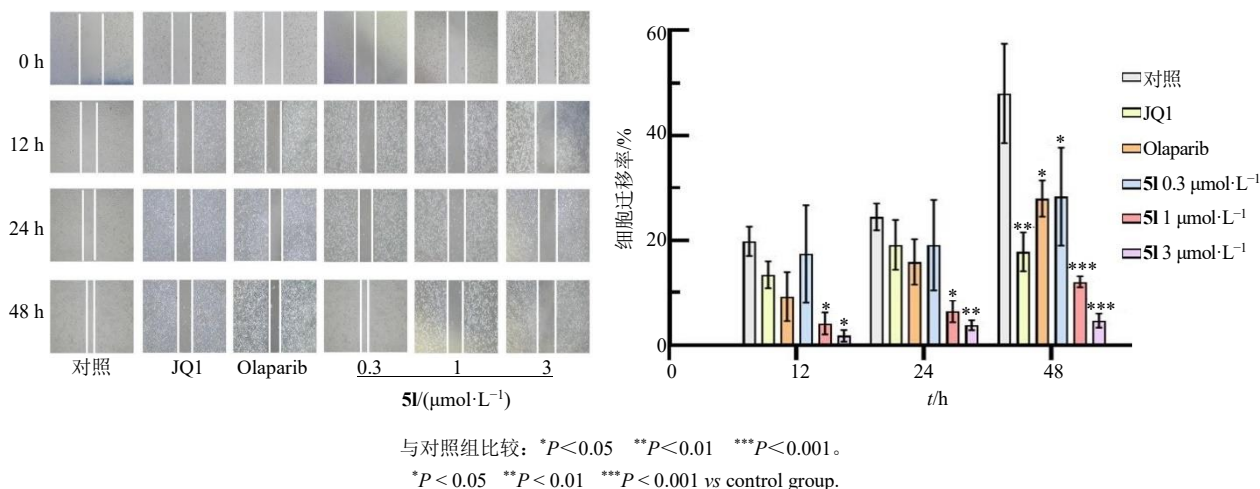


图 8 化合物 5l 对 MDA-MB-231 细胞迁移的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 8 Effect of compound 5l on the migration of MDA-MB-231 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

液器尖端在细胞单层中小心地产生划痕。划痕后，用 PBS 洗涤细胞，并用化合物 **5I**、JQ1 或 Olaparib 进行处理。在 0、12、24、48 h 拍摄图像，以监测分析细胞在指定时间间隔内的迁移情况。在 1 $\mu\text{mol/L}$ 的浓度下，化合物 **5I** 对 MDA-MB-231 细胞迁移抑制效果明显优于阳性药 JQ1 和 Olaparib。而当化合物 **5I** 的浓度达到 3 $\mu\text{mol/L}$ 时，其对 MDA-MB-231 细胞的迁移抑制作用进一步增强，这凸显了化合物 **5I** 迁移抑制作用的浓度相关性。

2.7 理化性质评价

通过 ADMETlab2.0 网站 (<https://admetmesh.scbdd.com/>) 预测了化合物 **5I** 的理化性质。如图 9 所示，化合物 **5I** 的大部分理化性质都在成药性合理范围内，只有脂溶性 ($\lg P=4.132$) 和水溶性 ($\lg S=-5.056$) 超出了合理界限，提示该化合物的脂水分分配系数过高，需要结构修饰进行优化。后续的结构优化，拟引入一些亲水性官能团或将苯环替换为吡啶环，降低化合物的脂水分分配系数。

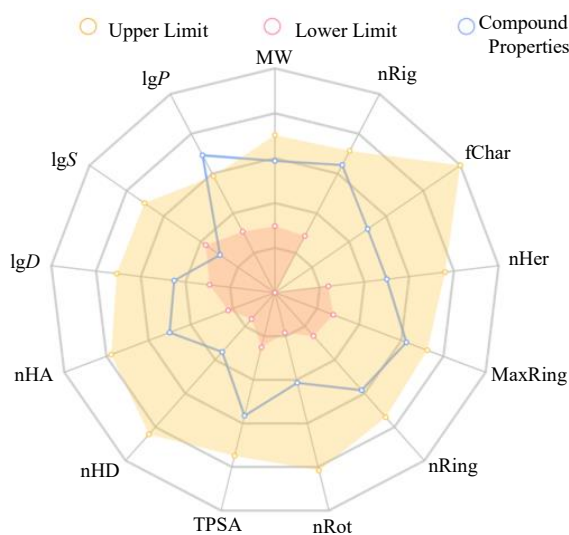


图 9 化合物 **5I** 的理化性质

Fig. 9 Physicochemical properties of compound **5I**

3 讨论

药效团融合策略是双靶点抑制剂常用的设计策略，该方法虽然能够高效的得到对 2 种靶点仍保持结合能力的新分子，但是多数情况下，由于 2 种靶点的结构差异较大，2 种靶点的抑制剂的药效团能够融合的化学空间较小，导致基于药效团融合策略设计得到的双靶点抑制剂往往具有较大的分子尺寸和分子重量，类药性差，限制了进一步应用的

价值。本课题采用计算机虚拟筛选策略从已报道的 BRD4 抑制剂中发现 8 种骨架结构新颖的 PARP1/BRD4 双靶点抑制剂。以含菲啶酮结构的化合物 ChEMBL4469223 为模板，合成了 16 个衍生物，其中化合物 **5I** 对 PARP1 和 BRD4 拥有中等强度的抑制能力，对三阴性乳腺癌细胞的增殖抑制能力与 JQ1 相当，并具有出色的抑制癌细胞迁移能力。**5I** 的理化性质如相对分子质量、氢键受体供体数量、极性表面积等都分布在合理范围内，只有脂水分分配系数偏高限制了其应用，未来的结构优化考虑适当的引入亲水性官能团提高水溶性。综上，本课题通过计算机虚拟筛选方法发现了一类菲啶酮骨架结构的 PARP1/BRD4 双靶点抑制剂，该方法具有快速可靠、节约研发成本、化合物类药性好等优点，为抗乳腺癌双靶点药物研发提供了一种有益的参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Arnold M, Morgan E, Rungay H, *et al.* Current and future burden of breast cancer: Global statistics for 2020 and 2040 [J]. *Breast*, 2022, 66: 15-23.
- [2] Bray F, Laversanne M, Sung H Y A, *et al.* Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2024, 74(3): 229-263.
- [3] Giaquinto A N, Sung H, Miller K D, *et al.* Breast cancer statistics, 2022 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2022, 72(6): 524-541.
- [4] Xia C F, Dong X S, Li H, *et al.* Cancer statistics in China and United States, 2022: Profiles, trends, and determinants [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2022, 135(5): 584-590.
- [5] Obidiro O, Battogtokh G, Akala E O. Triple negative breast cancer treatment options and limitations: Future outlook [J]. *Pharmaceutics*, 2023, 15(7): 1796.
- [6] Cheng B B, Ding Z B, Hong Y M, *et al.* Research progress in DNA damage response (DDR)-targeting modulators: From hits to clinical candidates [J]. *Eur J Med Chem*, 2025, 287: 117347.
- [7] Belli C, Duso B A, Ferraro E, *et al.* Homologous recombination deficiency in triple negative breast cancer [J]. *Breast*, 2019, 45: 15-21.
- [8] Patel M, Newsheem S, Maraboyina S, *et al.* The role of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors in the treatment of cancer and methods to overcome resistance: A review [J]. *Cell Biosci*, 2020, 10: 35.
- [9] Prasanna T, Wu F, Khanna K K, *et al.* Optimizing poly

- (ADP-ribose) polymerase inhibition through combined epigenetic and immunotherapy [J]. *Cancer Sci*, 2018, 109(11): 3383-3392.
- [10] Shu S K, Lin C Y, He H H, *et al.* Response and resistance to BET bromodomain inhibitors in triple-negative breast cancer [J]. *Nature*, 2016, 529(7586): 413-417.
- [11] Sahni J M, Gayle S S, Weber Bonk K L, *et al.* Bromodomain and extraterminal protein inhibition blocks growth of triple-negative breast cancers through the suppression of aurora kinases [J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(45): 23756-23768.
- [12] Chang X S, Sun D J, Shi D F, *et al.* Design, synthesis, and biological evaluation of quinazolin-4(3*H*)-one derivatives co-targeting poly(ADP-ribose) polymerase-1 and bromodomain containing protein 4 for breast cancer therapy [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11(1): 156-180.
- [13] Zhang J F, Yang C C, Tang P, *et al.* Discovery of 4-hydroxyquinazoline derivatives as small molecular BET/PARP1 inhibitors that induce defective homologous recombination and lead to synthetic lethality for triple-negative breast cancer therapy [J]. *J Med Chem*, 2022, 65(9): 6803-6825.
- [14] Wang S P, Li Y, Huang S H, *et al.* Discovery of potent and novel dual PARP/BRD4 inhibitors for efficient treatment of pancreatic cancer [J]. *J Med Chem*, 2021, 64(23): 17413-17435.
- [15] Huang S H, Cao R, Lin Q W, *et al.* Design, synthesis and mechanism studies of novel dual PARP1/BRD4 inhibitors against pancreatic cancer [J]. *Eur J Med Chem*, 2022, 230: 114116.
- [16] 梁琦, 何俊, 师健友, 等. 小分子核糖原合成酶激酶 3 β /程序性死亡配体 1 双靶点抑制剂的虚拟筛选 [J]. 华西药理学杂志, 2023, 38(4): 359-365.
- [17] 刘海龙, 田茂军, 田玲, 等. 过渡金属催化合成菲啶酮类衍生物研究进展 [J]. 广州化工, 2022, 50(16): 6-9.
- [18] Zhi Y L, Wang S, Huang W H, *et al.* Novel phenanthridin-6(5*H*)-one derivatives as potent and selective BET bromodomain inhibitors: Rational design, synthesis and biological evaluation [J]. *Eur J Med Chem*, 2019, 179: 502-514.

[责任编辑 高源]