

· 论著 ·

靶向 BRD4 的 ATTECs 设计、合成与降解活性研究

周洛竹, 盛春泉 (海军军医大学药理学系药物化学教研室, 上海 200433)

[摘要] 目的 基于自噬小体绑定化合物(ATTEC)策略, 设计并合成靶向 BRD4 的自噬降解剂, 验证其降解活性。方法 以化合物伊司平斯(ispinesib)为 LC3 配体, 通过不同长度的 linker 与化合物 JQ1 相连, 产物结构经 ^1H NMR、 ^{13}C NMR 与 ESI-MS 确证, 并使用蛋白印迹法(Western Blot)技术测试其在不同细胞系中诱导 BRD4 的降解活性。结果 获得 5 个首次报道的 BRD4-ATTEC 分子, 化合物 4 在不同细胞系中显示出一定的 BRD4 降解活性。结论 本研究发现了新型 BRD4 自噬降解剂, 拓展了靶向自噬降解的适用范围。

[关键词] 自噬小体绑定化合物; BRD4; LC3 蛋白; 伊司平斯

[文章编号] 2097-2024(2023)01-0018-08

[DOI] 10.12206/j.issn.2097-2024.202206050

Design, synthesis and degradation activity of BRD4-targeting ATTECs

ZHOU Luo-zhu, SHENG Chun-quan (Department of Medicinal Chemistry, School of Pharmacy, Naval Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective** To design and synthesize autophagic degraders targeting BRD4 based on autophagosome tethering compound (ATTEC) strategy and test their BRD4 degradation activity. **Methods** BRD4-targeting ATTECs were constructed by conjugating ispinesib that used as a LC3 ligand and JQ1 through a variety of alkane linkers. The final compounds were confirmed by ^1H NMR, ^{13}C NMR and ESI-MS, and their degradation activity in different cell lines were tested by Western Blot. **Results** Five BRD4-ATTEC molecules were successfully synthesized for the first time. Compound 4 showed moderate BRD4 degradation activity in different cell lines. **Conclusion** The novel BRD4 autophagic degraders were discovered, which expanded the applicability of targeted autophagic degradation via ATTEC.

[Key words] autophagosome-tethering compounds; BRD4; LC3; Ispinesib

蛋白降解靶向嵌合体 (proteolysis targeting chimera, PROTAC) 是近年来最受期待的蛋白降解技术^[1]。PROTAC 是一种异双功能分子, 一端与靶蛋白结合, 另一端结合 E3 连接酶形成靶蛋白-PROTAC-E3 三元复合物, E3 连接酶诱导靶蛋白泛素化, 随后被蛋白酶体识别并降解。PROTAC 相较传统药物具有诸多优势, 如使难成药靶点实现成药性、大幅增加可用靶点数量、克服耐药性、提高选择性和活性、降低毒副作用等。但是, PROTAC 依赖 E3 连接酶和蛋白酶体, 也存在一些固有缺陷, 如主要针对细胞质中可溶性蛋白进行降解, 不能降解蛋白聚集物和大的蛋白质, 对非蛋白物质的降解无能为力^[2]。

自噬-溶酶体途径(ALP)是广泛存在于真核细

胞中的蛋白降解系统, 它是指在自噬关键蛋白 LC3 参与下, 细胞内膜结构形成自噬小体并将底物包裹, 随后转运至溶酶体实现底物降解的过程^[3]。该机制涉及的底物范围十分广泛, 包括蛋白质聚集、衰老或受损的细胞器、入侵的病原微生物等。ALP 与泛素-蛋白酶体途径互为补充, 在细胞中发挥重要的生理功能^[4-5]。

2019 年, 复旦大学鲁伯垠团队基于自噬-溶酶体途径首次提出自噬小体绑定化合物(ATTEC)概念。ATTEC 是一种双功能分子, 同时结合 LC3 与靶蛋白, 将靶蛋白包裹进自噬小体, 并在溶酶体中实现降解。基于这一思想, 研究人员将小分子库固定在芯片上, 筛选以“分子胶”方式将突变型亨廷顿蛋白(mHTT)和 LC3 蛋白“黏合”的分子, 成功获得 4 个小分子化合物(10O5、ispinesib、AN1-2, 图 1)。这些化合物能有效降解 mHTT 蛋白, 并减弱亨廷顿病相关表型^[6]。ATTEC 分子通过直接连接自噬蛋白 LC3, 绕过泛素化过程, 是一种利用自噬降解靶标最为直接的策略, 对于降解不同类型的靶标具有

[基金项目] 国家自然科学基金(82030105)

[作者简介] 周洛竹, 硕士研究生, Email: 532845727@qq.com

[通信作者] 盛春泉, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 抗真菌和抗肿瘤药物研究, Tel: (021) 81871238, Email: shengcq@smmu.edu.cn

很大的潜力。但是, ATTEC 技术尚处于概念验证阶段, 急需拓展靶标应用范围, 推动技术的不断成熟。

BRD4 是 BET 溴结构域蛋白家族中最重要的成员之一, 在人体中广泛分布, 对细胞正常生长及细胞周期的调控具有重要意义, 与肿瘤发生密切相关, 是肿瘤治疗的热门靶点^[7], 基于 PROTAC 的 BRD4 降解剂相继报道^[8-9]。BRD4 已成为靶向蛋白降解研究的经典体系, 为了验证 ATTEC 降解策略的普适性和可行性, 我们以 BRD4 靶点为研究对象, 开展 BRD4-ATTEC 分子设计、合成和蛋白降解活性评价研究。

1 目标化合物的设计

BRD4-ATTEC 分子由三部分组成: BRD4 抑制剂、连接子 Linker 和 LC3 配体。我们选择经典 BRD4 抑制剂 JQ1 作为靶蛋白配体, JQ1 与 BRD4

共晶结构如图 2A 所示。JQ1 的酯基部分暴露于溶剂中, 适合作为 Linker 连接位点, 不影响 BRD4 蛋白结合活性^[10]; Ispinesib 作为 LC3 配体, 由于鲁伯坝团队在进行高通量筛选时, 化合物 ispinosib 的氨基端连接于分子芯片, 故选择氨基端作为 Linker 连接另一位点, 不会影响其与 LC3 蛋白的结合; 随后, 使用不同长度的烷烃链将两个配体相连设计得到相应目标化合物(图 2B、C)。目标化合物通过同时结合 BRD4 与 LC3 蛋白, 将 BRD4 靶向至自噬小体中, 从而被溶酶体吞噬完成降解。

2 材料与方法

2.1 试剂和仪器

化学原料均为市售分析纯; 兔抗 BRD4 抗体 (Abcam, ab128874); 兔抗 GAPDH 抗体 (Abcam, ab181602); 山羊抗兔 IgG H&L (Alexa Fluor® 680) (Abcam, ab175773); Bruker AVANCE600 (Bruker

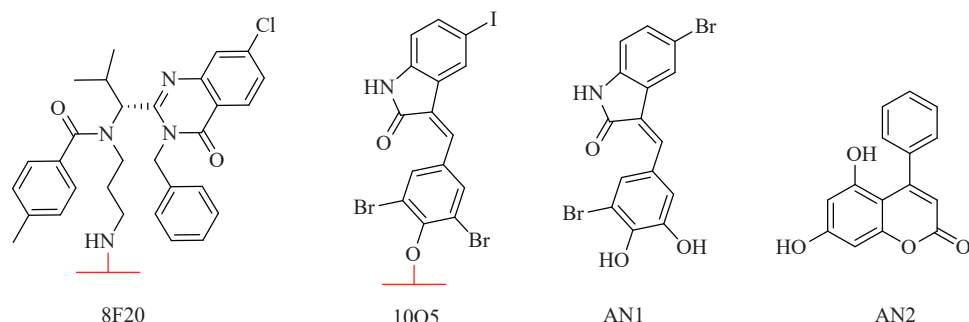


图 1 ATTEC 分子化学结构

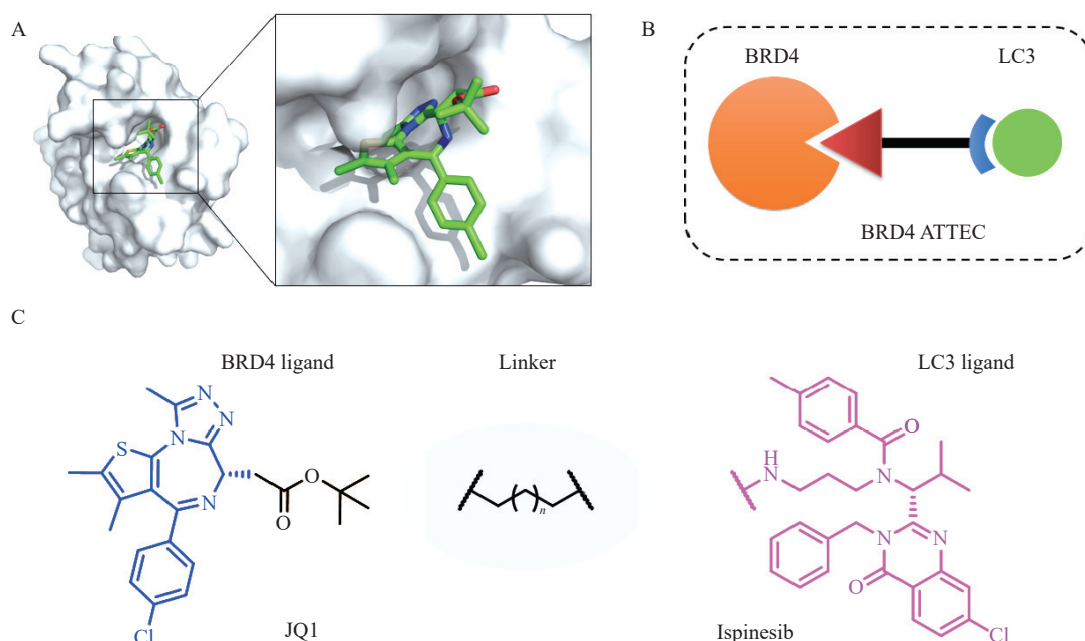


图 2 BRD4 自噬降解设计

A. BRD4 蛋白与 JQ1 共晶结构(PDB: 3MXF); B. BRD4-ATTEC 自噬降解剂原理; C. BRD4-ATTEC 化合物设计

Company, Germany)核磁共振仪, TMS 作为内标, 化学位移与偶合常数分别用 ppm 和 Hz 表示; Agilent 6538 UHD Accurate-Mass Q-TOF LC/MS 高分辨质谱(HRMS)仪; 上海申光 WRR 目视熔点仪; Bioteck Synergy2 多功能酶标仪; Biorad ChemiDoc 成像仪。

2.2 目标产物合成

化合物 4 的合成路线见图 3。

(*S*)-5-(2-(4-(4-氯苯基)-2, 3, 9-三甲基-6*H*-噻吩并 [3, 2-*f*] [1, 2, 4] 三唑并 [4, 3-*a*] [1, 4] 二氮杂卓-6-基)乙酰氨基)戊酸甲酯(2)的制备:

将 JQ1-1 (100 mg, 0.25 mmol) 溶解于二氯甲烷 (DCM, 10 ml) 中, 加入 5-氨基戊酸甲酯(1) (39 mg, 0.30 mmol)、EDCI (73 mg, 0.38 mmol) 和 HOBT (51 mg, 0.38 mmol), 室温下反应 8 h。反应完后, 加水 (200 ml) 稀释, 并用 DCM (50 ml×3) 萃取, 收集有机层, 使用无水硫酸钠干燥, 蒸干溶剂, 硅胶柱色谱分离 (DCM : MeOH = 98 : 2), 得淡黄色油状液体(2) 91 mg, 产率 71%; ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 8.20 (t, *J*=5.7 Hz, 1 H), 7.48 (d, *J*=8.8 Hz, 2 H), 7.42 (d, *J*=8.6 Hz, 2 H), 4.50 (dd, *J*=8.4, 5.7 Hz, 1 H), 3.57 (s, 3 H), 3.28–3.22 (m, 1 H), 3.19–3.12 (m, 2 H), 3.10–3.03 (m, 1 H), 2.59 (s, 3 H), 2.41 (d, *J*=0.6 Hz, 3 H), 2.33 (t, *J*=7.4 Hz, 2 H), 1.62 (s, 3 H), 1.59–1.53 (m, 2 H), 1.48–1.42 (m, 2 H)。

N-((*R*)-1-(3-苄基-7-氯-4-氧代-3, 4-二氢喹啉-2-基)-2-甲基丙基)-*N*-(3-(5-(2-((*S*)-4-(4-氯苯基)-2, 3, 9-三甲基-6*H*-噻吩并 [3, 2-*f*] [1, 2, 4] 三唑

并 [4, 3-*a*] [1, 4] 二氮杂卓-6-基)乙酰胺基)戊酰胺基丙基)-4-甲基苯甲酰胺(4)的制备:

将化合物 2 (91 mg, 0.18 mmol) 溶于 THF-MeOH-H₂O (3 : 2 : 1) 混合溶剂 (6 ml), 加入 LiOH (17 mg, 0.72 mmol), 室温反应 5 h 后蒸干溶剂, 使用 1 mol/L 稀盐酸调 pH 至 6, 过滤, 收集固体并干燥, 得白色固体 49 mg (0.10 mmol); 将所得白色固体 (49 mg, 0.10 mmol) 溶于 DCM (15 ml), 加入 EDCI (29 mg, 0.15 mmol)、HOBT (20 mg, 0.15 mmol) 和 ispinesib (0.10 mmol, 52 mg), 室温反应 8 h 后, 加水 (300 ml) 稀释, 用 DCM (100 ml×3) 萃取, 收集有机层, 使用无水硫酸钠干燥, 蒸干溶剂, C₁₈ 反相柱色谱分离 (MeOH : H₂O = 63 : 37), 得白色固体 (4) 59 mg (0.06 mmol), 两步收率 33%; ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 8.24 (dd, *J*=8.6, 3.9 Hz, 1 H), 8.17 (t, *J*=5.6 Hz, 1 H), 7.81 (t, *J*=1.7 Hz, 1 H), 7.69–7.65 (m, 1 H), 7.50–7.47 (m, 2 H), 7.42 (d, *J*=8.3 Hz, 2 H), 7.40–7.35 (m, 3 H), 7.34–7.30 (m, 1 H), 7.29–7.20 (m, 6 H), 5.89 (d, *J*=16.0 Hz, 1 H), 5.55 (d, *J*=10.6 Hz, 1 H), 5.06 (d, *J*=16.3 Hz, 1 H), 4.51 (dd, *J*=8.1, 5.9 Hz, 1 H), 3.30–3.23 (m, 3 H), 3.20–3.15 (m, 1 H), 3.15–3.09 (m, 1 H), 3.05–2.97 (m, 1 H), 2.79–2.71 (m, 1 H), 2.61 (s, 3 H), 2.58–2.54 (m, 1 H), 2.49 (d, *J*=7.0 Hz, 1 H), 2.42 (s, 3 H), 2.34 (s, 3 H), 1.87–1.76 (m, 2 H), 1.64–1.60 (m, 3 H), 1.40–1.31 (m, 5 H), 0.91 (d, *J*=6.4 Hz, 3 H), 0.82–0.87 (m, 1 H), 0.49 (d, *J*=6.2 Hz, 3 H); ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 172.44, 171.88, 169.76,

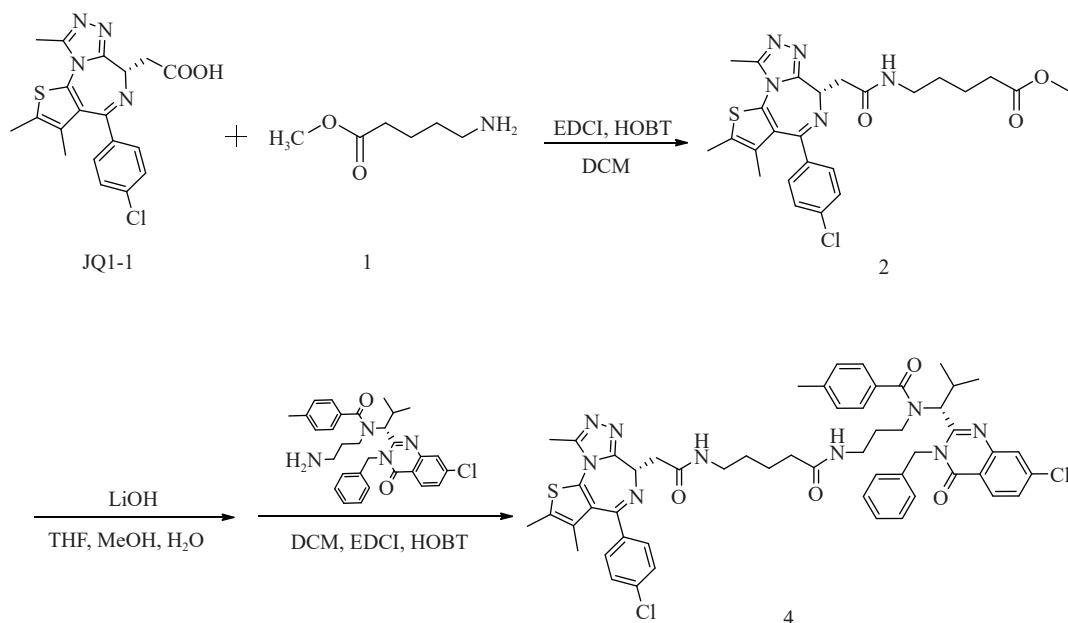


图 3 化合物 4 合成路线

163.43, 161.57, 155.70, 155.59, 150.23, 147.64, 139.97, 139.11, 137.22, 137.16, 135.64, 134.25, 132.72, 131.14, 130.57, 130.27, 130.02, 129.34, 129.11, 128.91, 128.48, 127.88, 127.11, 126.89, 126.33, 119.55, 59.44, 54.35, 45.61, 42.90, 38.74, 38.11, 36.17, 35.36, 30.71, 29.33, 28.81, 23.06, 21.36, 19.95, 18.61, 14.48, 13.13, 11.75; HRMS(ESI) m/z calcd for $C_{54}H_{56}Cl_2N_9O_4S$ (M-H)⁻ 996.3559, found 996.3542; 熔程: 143.1 ~ 146.3 °C。

化合物 5、6 合成路线如图 4 所示。

(*S*)-6-(2-(4-(4-氯苯基)-2,3,9-三甲基-6*H*-噻吩并[3,2-*f*][1,2,4]三唑并[4,3-*a*][1,4]二氮杂卓-6-基)乙酰氨基)己酸乙酯(4a)的制备:

将 JQ1-1 (100 mg, 0.25 mmol) 溶解于 DCM (10 ml), 加入化合物 6-氨基己酸甲酯(3a, 44 mg, 0.30 mmol)、EDCI (73 mg, 0.38 mmol) 和 HOBT (51 mg, 0.38 mmol), 室温反应 8 h。反应完后, 加水(200 ml)稀释, 并用 DCM(50 ml×3)萃取, 收集有机层, 使用无水硫酸钠干燥, 蒸干溶剂, 硅胶柱色谱分离(DCM:MeOH=98:2), 得淡黄色油状液体(4a)80 mg, 产率 59%; ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 8.17 (t, *J*=5.7 Hz, 1 H), 7.48 (d, *J*=8.8 Hz, 2 H), 7.42 (d, *J*=8.6 Hz, 2 H), 4.50 (dd, *J*=8.3, 5.8 Hz, 1 H), 4.04 (q, *J*=7.2 Hz, 2 H), 3.28–3.22 (m, 1 H), 3.20–3.10

(m, 2 H), 3.08–3.02 (m, 1 H), 2.59 (s, 3 H), 2.41 (s, 3 H), 2.26 (t, *J*=7.5 Hz, 2 H), 1.62 (s, 3 H), 1.56–1.50 (m, 2 H), 1.47–1.41 (m, 2 H), 1.34–1.27 (m, 2 H), 1.17 (t, *J*=7.1 Hz, 3 H)。

(*S*)-7-(2-(4-(4-氯苯基)-2,3,9-三甲基-6*H*-噻吩并[3,2-*f*][1,2,4]三唑并[4,3-*a*][1,4]二氮杂卓-6-基)乙酰氨基)庚酸乙酯(4b)的制备:

中间体 4b 的合成步骤参照中间体 4a 合成, 得淡黄色油状液体(4b)99 mg, 产率 76%; ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 8.16 (t, *J*=5.7 Hz, 1 H), 7.48 (d, *J*=8.8 Hz, 2 H), 7.42 (d, *J*=8.4 Hz, 2 H), 4.50 (dd, *J*=8.4, 5.9 Hz, 1 H), 4.04 (q, *J*=7.1 Hz, 2 H), 3.28–3.22 (m, 1 H), 3.20–3.10 (m, 2 H), 3.08–3.02 (m, 1 H), 2.59 (s, 3 H), 2.41 (s, 3 H), 2.26 (t, *J*=7.4 Hz, 2 H), 1.62 (s, 3 H), 1.54–1.47 (m, 2 H), 1.46–1.39 (m, 2 H), 1.31–1.26 (m, 4 H), 1.16 (t, *J*=7.1 Hz, 3 H)。

N-((*R*)-1-(3-苄基-7-氯-4-氧代-3,4-二氢喹啉-2-基)-2-甲基丙基)-*N*-(3-(6-(2-((*S*)-4-(4-氯苯基)-2,3,9-三甲基-6*H*-噻吩并[3,2-*f*][1,2,4]三唑并[4,3-*a*][1,4]二氮杂卓-6-基)乙酰胺基)己酰胺基)丙基)-4-甲基苯甲酰胺(5)的制备:

将化合物 4a (80 mg, 0.15 mmol) 溶于 THF-MeOH-H₂O(3:2:1)混合溶剂(6 ml), 加入 LiOH (14 mg, 0.6 mmol), 室温反应 5 h 后蒸干溶剂, 使

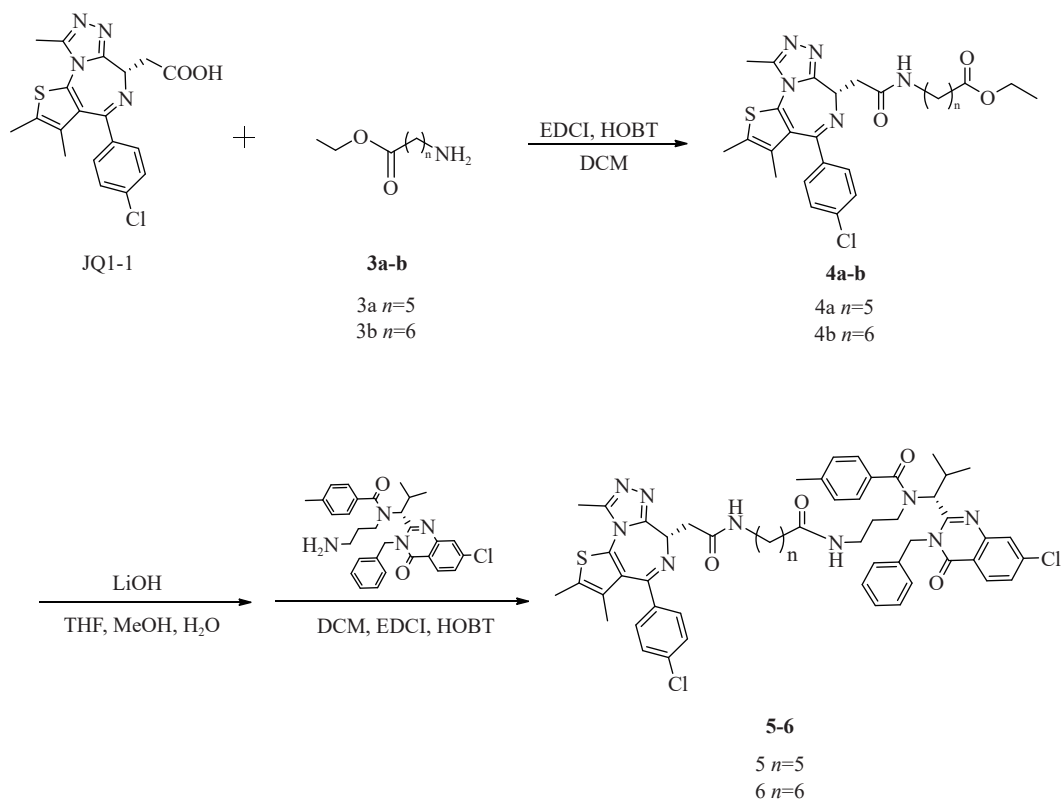


图 4 化合物 5 和 6 合成路线

用 1 mol/L 稀盐酸调 pH 至 6, 过滤, 收集固体并干燥, 得白色固体 61 mg (0.12 mmol); 将所得白色固体 (61 mg, 0.12 mmol) 溶于 DCM (15 ml) 中, 加入 EDCI (35 mg, 0.18 mmol)、HOBT (24 mg, 0.18 mmol) 和化合物 ispinesib (0.12 mmol, 62 mg), 室温下反应 8 h 后, 加水 (300 ml) 稀释, 并用 DCM (100 ml $\times$ 3) 萃取, 收集有机层, 使用无水硫酸钠干燥, 蒸干溶剂, C_{18} 反相柱色谱分离 (MeOH : H_2O = 63 : 37), 得白色固体 (**5**) (64 mg, 0.06 mmol), 两步收率 42%; 1H NMR (600 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 8.23 (d, J =8.6 Hz, 1 H), 8.17 (t, J =5.6 Hz, 1 H), 7.79 (d, J =1.8 Hz, 1 H), 7.68–7.65 (m, 1 H), 7.49–7.45 (m, 2 H), 7.42 (d, J =7.9 Hz, 2 H), 7.39–7.34 (m, 3 H), 7.33–7.28 (m, 1 H), 7.28–7.19 (m, 6 H), 5.88 (d, J =16.1 Hz, 1 H), 5.54 (d, J =10.3 Hz, 1 H), 5.05 (d, J =16.5 Hz, 1 H), 4.51 (dd, J =8.2, 6.1 Hz, 1 H), 3.29–3.21 (m, 3 H), 3.21–3.15 (m, 1 H), 3.14–3.07 (m, 1 H), 3.07–3.00 (m, 1 H), 2.77–2.69 (m, 1 H), 2.60 (d, J =1.3 Hz, 3 H), 2.55–2.52 (m, 1 H), 2.50–2.47 (m, 1 H), 2.41 (s, 3 H), 2.33 (s, 3 H), 1.83–1.71 (m, 2 H), 1.62 (s, 3 H), 1.43–1.37 (m, 2 H), 1.36–1.27 (m, 3 H), 1.22–1.15 (m, 2 H), 0.90 (d, J =6.6 Hz, 3 H), 0.87–0.80 (m, 1 H), 0.48 (d, J =5.9 Hz, 3 H); ^{13}C NMR (151 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 172.45, 171.96, 169.74, 163.43, 161.57, 155.70, 155.60, 150.24, 147.64, 139.96, 139.11, 137.22, 137.16, 135.67, 134.25, 132.71, 131.16, 130.55, 130.27, 130.03, 129.34, 129.11, 128.90, 128.48, 127.88, 127.13, 126.88, 126.33, 119.55, 59.44, 54.36, 45.62, 42.90, 38.89, 38.08, 36.18, 35.70, 30.69, 29.48, 28.81, 26.61, 25.35, 21.36, 19.95, 18.61, 14.49, 13.13, 11.74; HRMS(ESI) m/z calcd for $C_{55}H_{59}Cl_3N_9O_4S$ ($M+Cl$) $^-$ 1046.3482, found 1046.3443; 熔程: 143.0 ~ 145.2 $^{\circ}C$ 。

$N-((R)-1-(3-苄基-7-氯-4-氧代-3, 4-二氢喹啉-2-基)-2-甲基丙基)-N-(3-(7-(2-((S)-4-(4-氯苯基)-2, 3, 9-三甲基-6H-噻吩并 [3, 2- f] [1, 2, 4] 三唑并 [4, 3- a] [1, 4] 二氮杂卓-6-基) 乙酰胺基) 庚酰胺基) 丙基)-4-甲基苯甲酰胺 (**6**) 的制备:$

化合物 6 的合成步骤参照化合物 5 合成, 得白色固体 (**6**) (71 mg, 0.07 mmol), 两步收率 36%; 1H NMR (600 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 8.23 (d, J =8.6 Hz, 1 H), 8.17 (t, J =5.6 Hz, 1 H), 7.79 (d, J =2.0 Hz, 1 H), 7.66 (dd, J =8.6, 2.0 Hz, 1 H), 7.50–7.46 (m, 2 H), 7.44–7.40 (m, 2 H), 7.40–7.34 (m, 3 H), 7.33–7.28 (m, 1 H), 7.27–7.19 (m, 6 H), 5.88 (d, J =16.1 Hz, 1 H),

5.54 (d, J =10.5 Hz, 1 H), 5.05 (d, J =16.3 Hz, 1 H), 4.51 (dd, J =8.3, 6.1 Hz, 1 H), 3.29–3.21 (m, 3 H), 3.21–3.17 (m, 1 H), 3.16–3.09 (m, 1 H), 3.08–3.01 (m, 1 H), 2.77–2.69 (m, 1 H), 2.59 (s, 3 H), 2.57–2.53 (m, 1 H), 2.50–2.46 (m, 1 H), 2.41 (s, 3 H), 2.33 (s, 3 H), 1.84–1.70 (m, 2 H), 1.61 (s, 3 H), 1.44–1.38 (m, 2 H), 1.36–1.28 (m, 3 H), 1.27–1.25 (m, 1 H), 1.23–1.21 (m, 1 H), 1.19–1.12 (m, 2 H), 0.89 (d, J =6.6 Hz, 3 H), 0.87–0.81 (m, 1 H), 0.47 (d, J =6.2 Hz, 3 H); ^{13}C NMR (151 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 172.45, 172.00, 169.74, 163.44, 161.56, 155.70, 155.60, 150.24, 147.64, 139.95, 139.09, 137.21, 137.16, 135.69, 134.25, 132.71, 131.15, 130.54, 130.26, 130.04, 129.33, 129.11, 128.90, 128.47, 127.88, 127.12, 126.87, 126.32, 119.55, 59.44, 54.37, 45.62, 42.90, 38.90, 38.11, 36.16, 35.67, 30.71, 29.61, 28.89, 28.81, 26.61, 25.53, 21.36, 19.95, 18.60, 14.48, 13.13, 11.74; HRMS(ESI) m/z calcd for $C_{56}H_{61}Cl_2N_9O_4SNa$ ($M+Na$) $^+$ 1048.3836, found 1048.3892; 熔程: 142.0 ~ 144.7 $^{\circ}C$ 。

化合物 7、8 合成路线如图 5 所示。

(R)-(9-((3-(N -(1-(3-苄基-7-氯-4-氧代-3, 4-二氢喹啉-2-基)-2-甲基丙基)-4-甲基苯甲酰胺基)丙基)氨基)-9-氧代壬基)氨基甲酸叔丁酯 (**6a**) 的制备:

将 ispinesib (100 mg, 0.2 mmol) 溶解于 DCM (10 ml) 中, 加入化合物 9-((叔丁氧基羰基)氨基)壬酸 (**5a**) (66 mg, 0.24 mmol), EDCI (58 mg, 0.30 mmol) 和 HOBT (41 mg, 0.30 mmol), 室温下反应 8 h。反应完后, 加水 (200 ml) 稀释, 并用 DCM (50 ml $\times$ 3) 萃取, 收集有机层, 使用无水硫酸钠干燥, 蒸干溶剂, 硅胶柱色谱分离 (DCM : MeOH = 98 : 2), 得淡黄色油状液体 (**6a**) 93 mg, 产率 60%; 1H NMR (600 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 8.22 (d, J =8.4 Hz, 1 H), 7.77 (d, J =2.0 Hz, 1 H), 7.65 (dd, J =8.5, 2.1 Hz, 1 H), 7.38–7.31 (m, 3 H), 7.31–7.27 (m, 1 H), 7.26–7.19 (m, 6 H), 6.74 (t, J =5.5 Hz, 1 H), 5.88 (d, J =16.1 Hz, 1 H), 5.53 (d, J =10.5 Hz, 1 H), 5.05 (d, J =16.3 Hz, 1 H), 3.26–3.20 (m, 2 H), 2.87 (q, J =6.7 Hz, 2 H), 2.76–2.68 (m, 1 H), 2.55–2.51 (m, 1 H), 2.49–2.45 (m, 1 H), 2.33 (s, 3 H), 1.81–1.69 (m, 2 H), 1.36 (s, 9 H), 1.33–1.27 (m, 4 H), 1.23–1.15 (m, 7 H), 1.14–1.08 (m, 2 H), 0.89 (d, J =6.8 Hz, 3 H), 0.86–0.80 (m, 1 H), 0.47 (d, J =6.2 Hz, 3 H)。

(R)-(10-((3-(N -(1-(3-苄基-7-氯-4-氧代-3, 4-

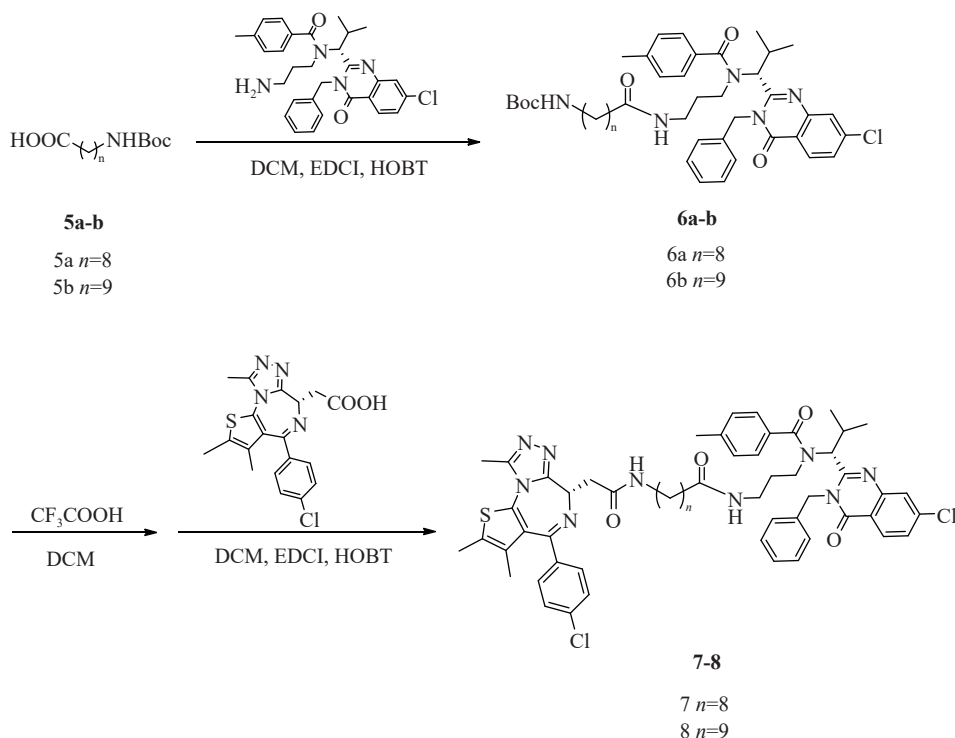


图 5 化合物 7、8 合成路线

二氢喹唑啉-2-基)-2-甲基丙基)-4-甲基苯甲酰胺基)丙基)氨基)-9-氧代壬基)氨基甲酸叔丁酯(**6b**)的制备:

中间体 **6b** 的合成步骤参照中间体 **6a** 合成, 得淡黄色油状液体(**6b**) 82 mg, 产率 52%; ^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 8.22 (d, $J=8.6$ Hz, 1 H), 7.78 (d, $J=2.0$ Hz, 1 H), 7.65 (dd, $J=8.6, 2.0$ Hz, 1 H), 7.38–7.28 (m, 4 H), 7.26–7.18 (m, 6 H), 6.75 (t, $J=5.5$ Hz, 1 H), 5.87 (d, $J=16.7$ Hz, 1 H), 5.53 (d, $J=10.5$ Hz, 1 H), 5.04 (d, $J=16.7$ Hz, 1 H), 3.25–3.19 (m, 2 H), 2.87 (q, $J=6.4$ Hz, 2 H), 2.75–2.68 (m, 1 H), 2.54–2.51 (m, 1 H), 2.49–2.46 (m, 1 H), 2.33 (s, 3 H), 1.81–1.68 (m, 2 H), 1.36 (s, 9 H), 1.34–1.09 (m, 15 H), 0.89 (d, $J=6.8$ Hz, 3 H), 0.86–0.80 (m, 1 H), 0.47 (d, $J=6.2$ Hz, 3 H)。

N-((*R*)-1-(3-苄基-7-氯-4-氧代-3, 4-二氢喹唑啉-2-基)-2-甲基丙基)-*N*-(3-(9-(2-((*S*)-4-(4-氯苯基)-2, 3, 9-三甲基-6*H*-噻吩并[3, 2-*f*][1, 2, 4]三唑并[4, 3-*a*][1, 4]二氮杂卓-6-基)乙酰胺基)壬酰胺基)丙基)-4-甲基苯甲酰胺(**7**)的制备:

将化合物 **6a** (93 mg, 0.12 mmol) 溶于 DCM (3 ml) 中, 加入 CF_3COOH (1 ml), 室温反应 4 h 后蒸干溶剂, 得无色油状液体 73 mg (0.11 mmol); 将所得无色油状液体 (73 mg, 0.11 mmol) 溶于 DCM (15 ml) 中, 加入 EDCI (31 mg, 0.16 mmol)、HOBT (22 mg, 0.16 mmol) 和化合物 JQ1-1 (0.11 mmol,

44 mg), 室温下反应 8 h, 加水 (300 ml) 稀释, 并用 DCM (100 ml $\times$ 3) 萃取, 收集有机层, 使用无水硫酸钠干燥, 蒸干溶剂, C_{18} 反相柱色谱分离 (MeOH : $\text{H}_2\text{O}=68 : 32$), 得白色固体(**7**) (53 mg, 0.05 mmol), 两步收率 46%; ^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 8.24 (d, $J=8.6$ Hz, 1 H), 8.19 (t, $J=5.5$ Hz, 1 H), 7.80 (d, $J=1.8$ Hz, 1 H), 7.67 (dd, $J=8.6, 2.0$ Hz, 1 H), 7.50–7.47 (m, 2 H), 7.46–7.42 (m, 2 H), 7.40–7.34 (m, 3 H), 7.34–7.29 (m, 1 H), 7.29–7.21 (m, 6 H), 5.89 (d, $J=16.0$ Hz, 1 H), 5.55 (d, $J=10.6$ Hz, 1 H), 5.06 (d, $J=16.3$ Hz, 1 H), 4.52 (dd, $J=8.3, 6.1$ Hz, 1 H), 3.30–3.22 (m, 3 H), 3.22–3.17 (m, 1 H), 3.16–3.05 (m, 2 H), 2.77–2.70 (m, 1 H), 2.61 (s, 3 H), 2.58–2.53 (m, 1 H), 2.51–2.47 (m, 1 H), 2.42 (s, 3 H), 2.34 (s, 3 H), 1.84–1.71 (m, 2 H), 1.63 (s, 3 H), 1.48–1.41 (m, 2 H), 1.35–1.25 (m, 7 H), 1.23–1.17 (m, 2 H), 1.17–1.11 (m, 2 H), 0.91 (d, $J=6.8$ Hz, 3 H), 0.88–0.82 (m, 1 H), 0.49 (d, $J=6.2$ Hz, 3 H); ^{13}C NMR (151 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 172.45, 172.02, 169.76, 163.41, 161.56, 155.70, 155.59, 150.23, 147.64, 139.94, 139.10, 137.20, 137.15, 135.68, 134.25, 132.71, 131.16, 130.56, 130.25, 130.03, 129.33, 129.11, 128.87, 128.46, 127.87, 127.12, 126.87, 126.33, 119.55, 59.44, 54.38, 45.63, 42.91, 38.91, 38.13, 36.17, 35.73, 30.69, 29.71, 29.23, 29.14, 28.81, 26.85, 25.57, 21.36, 19.96, 18.61, 14.48, 13.12, 11.74;

HRMS(ESI) m/z calcd for $C_{58}H_{66}Cl_2N_9O_4S$ (M+H)⁺ 1054.433, found 1054.4367; 熔程: 134.7 ~ 139.1 °C。

N-((*R*)-1-(3-苄基-7-氯-4-氧代-3,4-二氢喹唑啉-2-基)-2-甲基丙基)-*N*-(3-(10-(2-((*S*)-4-(4-氯苯基)-2,3,9-三甲基-6*H*-噻吩并[3,2-*f*][1,2,4]三唑并[4,3-*a*][1,4]二氮杂卓-6-基)乙酰胺基)癸酰胺基)丙基)-4-甲基苯甲酰胺(8)的制备:

化合物 8 的合成步骤参照化合物 7 合成,得白色固体 47 mg, 两步收率 49%; ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 8.24 (d, *J*=8.6 Hz, 1 H), 8.18 (t, *J*=5.6 Hz, 1 H), 7.80 (d, *J*=1.8 Hz, 1 H), 7.67 (dd, *J*=8.6, 2.0 Hz, 1 H), 7.50–7.47 (m, 2 H), 7.46–7.42 (m, 2 H), 7.40–7.34 (m, 3 H), 7.34–7.30 (m, 1 H), 7.29–7.21 (m, 6 H), 5.89 (d, *J*=16.0 Hz, 1 H), 5.55 (d, *J*=10.6 Hz, 1 H), 5.06 (d, *J*=16.5 Hz, 1 H), 4.52 (dd, *J*=8.3, 5.9 Hz, 1 H), 3.30–3.22 (m, 3 H), 3.21–3.16 (m, 1 H), 3.16–3.11 (m, 1 H), 3.11–3.04 (m, 1 H), 2.77–2.70 (m, 1 H), 2.61 (s, 3 H), 2.58–2.53 (m, 1 H), 2.51–2.47 (m, 1 H), 2.42 (s, 3 H), 2.34 (s, 3 H), 1.83–1.71 (m, 2 H), 1.63 (s, 3 H), 1.48–1.41 (m, 2 H), 1.35–1.25 (m, 8 H), 1.22–1.19 (m, 3 H), 1.16–1.09 (m, 2 H), 0.91 (d, *J*=6.8 Hz, 3 H), 0.89–0.82 (m, 1 H), 0.49 (d, *J*=6.2 Hz, 3 H); ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 172.45, 172.02, 169.76, 163.40, 161.56, 155.71, 155.60, 150.23, 147.64, 139.93, 139.10, 137.19, 137.15, 135.69, 134.26, 132.72, 131.16, 130.56, 130.25, 130.04, 129.33, 129.11, 128.87, 128.45, 127.87, 127.12, 126.87, 126.34, 119.55, 59.45, 54.39,

45.63, 42.91, 38.93, 38.15, 36.17, 35.74, 30.69, 29.73, 29.40, 29.27, 29.22, 29.15, 28.81, 26.87, 25.57, 21.36, 19.95, 18.62, 14.48, 13.12, 11.74; HRMS(ESI) m/z calcd for $C_{59}H_{68}Cl_2N_9O_4S$ (M+H)⁺ 1068.4487, found 1068.4488; 熔程: 132.9 ~ 138.5 °C。

2.3 蛋白印迹法测试目标化合物对 BRD4 的降解活性

将细胞以 4×10^5 个/孔的密度接种于 6 孔板中, 培养 24 h; 根据实验需要, 选取相应浓度的 PAGE 凝胶快速制备试剂盒, 取 40 μg 总蛋白及 5 μl 蛋白 marker 上样, 恒压 120 V 电泳 90 min; 然后恒流 300 mA 转膜 180 min 转至 PVDF 膜上; 转膜结束后, 根据 marker 剪下目的条带, 配制无蛋白快速封闭液(5×)封闭 30 min; 用 TBST 清洗残留封闭液, 用 5% BSA 稀释相应一抗, 4 °C 摇床孵育过夜; 用 TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min; 使用荧光兔二抗, 室温孵育 1 h; 用 TBST 洗膜 3 次, 每次 5 min; 最后在 Biorad ChemiDoc 成像仪下拍照。

3 实验结果

蛋白印迹法结果表明, Linker 长度与化合物降解活性密切相关, Linker 长度为 4 个碳原子长度时(化合物 4), BRD4 降解活性最强。化合物 4 在 HCT116、MDA-MB-231、Hela 和 A549 四种肿瘤细胞中均表现出下调 BRD4 蛋白水平的活性, 而其他化合物在 10 μmol/L 与 1 μmol/L 浓度下对胞内 BRD4 蛋白水平均无明显影响(图 6)。

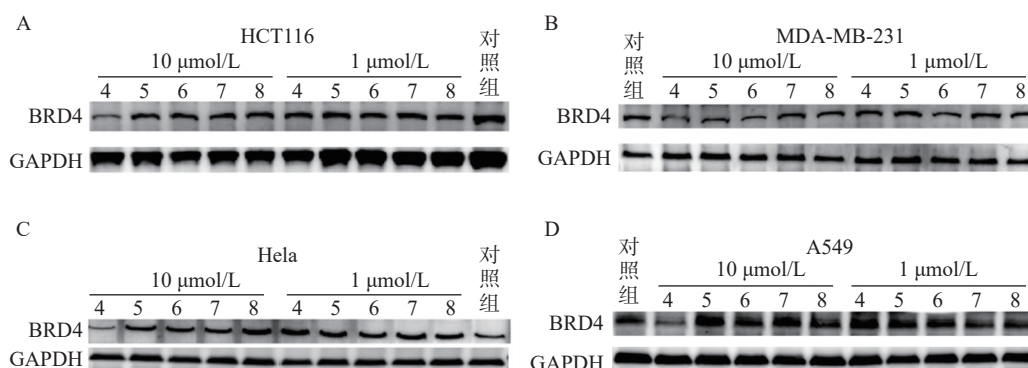


图 6 目标化合物降解 BRD4 蛋白

注: 化合物 4~8 处理(A)HCT116、(B)MDA-MB-231、(C)Hela 和(D)A549 细胞 24 h 后 BRD4 和 GAPDH 的免疫印迹。

4 讨论

基于 ATTEC 策略, 我们设计并成功合成 5 个 BRD4-ATTEC 分子, 所有目标化合物均经过了核磁和质谱结构确证, 纯度均高于 95%。在蛋白降解

活性测试中, 我们发现化合物 4 在 10 μmol/L 浓度下对 4 种肿瘤细胞均显示出诱导 BRD4 蛋白降解活性, 表现出广谱有效的特征, 为后续 BRD4 自噬降解的设计和结构优化提供了有效的先导化合

物。本研究验证了 ATTEC 策略能有效诱导 BRD4 蛋白降解, 并获得 BRD4 自噬降解剂先导化合物, 拓展了靶向自噬降解的适用范围, 后续的结构优化研究尚在进展之中。

【参考文献】

- [1] SAKAMOTO K M, KIM K B, KUMAGAI A, et al. Protacs: chimeric molecules that target proteins to the Skp1-Cullin-F box complex for ubiquitination and degradation[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(15): 8554-8559.
 - [2] LU K F, DEN BRAVE F, JENTSCH S. Pathway choice between proteasomal and autophagic degradation[J]. *Autophagy*, 2017, 13(10): 1799-1800.
 - [3] MIZUSHIMA N, LEVINE B, CUERVO A M, et al. Autophagy fights disease through cellular self-digestion[J]. *Nature*, 2008, 451(7182): 1069-1075.
 - [4] TAKAHASHI D, MORIYAMA J, NAKAMURA T, et al. AUTACs: cargo-specific degraders using selective autophagy [J]. *Mol Cell*, 2019, 76(5): 797-810.e10.
 - [5] NAKAGAWA I, AMANO A, MIZUSHIMA N, et al. Autophagy defends cells against invading group A *Streptococcus* [J]. *Science*, 2004, 306(5698): 1037-1040.
 - [6] LI Z Y, WANG C, WANG Z Y, et al. Allele-selective lowering of mutant HTT protein by HTT-LC3 linker compounds[J]. *Nature*, 2019, 575(7781): 203-209.
 - [7] GHOSHAL A, YUGANDHAR D, SRIVASTAVA A K. BET inhibitors in cancer therapeutics: a patent review[J]. *Expert Opin Ther Pat*, 2016, 26(4): 505-522.
 - [8] LU J, QIAN Y M, ALTIERI M, et al. Hijacking the E3 ubiquitin ligase cereblon to efficiently target BRD4[J]. *Chem Biol*, 2015, 22(6): 755-763.
 - [9] ZENGERLE M, CHAN K H, CIULLI A. Selective small molecule induced degradation of the BET bromodomain protein BRD4[J]. *ACS Chem Biol*, 2015, 10(8): 1770-1777.
 - [10] FILIPPAKOPOULOS P, QI J, PICAUD S, et al. Selective inhibition of BET bromodomains[J]. *Nature*, 2010, 468(7327): 1067-1073.
- [收稿日期] 2022-06-13 [修回日期] 2022-10-10
[本文编辑] 李睿旻