

溴结构域蛋白 4 小分子抑制剂及其降解剂的研究进展

冯璐, 王贯, 欧阳亮*

(四川大学华西医院生物治疗国家重点实验室, 四川 成都 610041)

[摘要] 溴结构域和超末端 (BET) 家族是一类能特异性识别乙酰化赖氨酸调控基因转录过程的蛋白, 在多种疾病的发生发展中具有重要作用。溴结构域蛋白 4 (BRD4) 是 BET 家族的一员, 能够与乙酰化的组蛋白或非组蛋白结合, 进而调节基因复制和转录, 影响细胞周期、细胞分化、信号转导等过程。BRD4 的表达上调与多种肿瘤的恶性发展密切相关, 抑制或降解 BRD4 能有效控制肿瘤的恶性进展和远端转移。因此, BRD4 是一个具有广阔前景的肿瘤表观遗传学靶标。近年来, BRD4 的小分子抑制剂和降解剂受到了广泛的关注和研究, 其单药或与其他抗肿瘤药物联合使用均表现出较好的抗肿瘤作用。通过对 BRD4 的结构特点、生物学功能、小分子抑制剂和降解剂的研究进展进行综述, 以期对新型的 BRD4 抑制剂和降解剂的开发提供参考。

[关键词] 溴结构域和超末端家族; 溴结构域蛋白 4; 肿瘤; 小分子抑制剂; 降解剂

[中图分类号] R914

[文献标志码] A

[文章编号] 1001-5094 (2020) 09-0656-11

Research Progress of Bromodomain-containing Protein 4 Small-Molecule Inhibitors and Its Degraders

FENG Lu, WANG Guan, OUYANG Liang

(State Key Laboratory of Biotherapy, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

[Abstract] Bromodomain and extra-terminal (BET) family, a class of proteins that can specifically recognize acetylated lysine and regulate gene transcription, play an important role in the occurrence and development of diverse diseases. Bromodomain-containing protein 4 (BRD4), a member of the BET family, can combine with acetylated histones or non-histones, thereby regulating gene replication and transcription, and affecting the cell cycle, cell differentiation and signal transduction. The up-regulation of BRD4 expression is closely related to the malignant development of various tumors. Inhibition or degradation of BRD4 can effectively control the malignant progression and distant metastasis of tumors. Therefore, BRD4 is a promising tumor epigenetic target. In recent years, small-molecule inhibitors and degraders for BRD4 have received extensive attention and research, and have shown good anti-tumor effects used either alone or in combination with other anti-tumor drugs. The structural characteristics, biological functions and research progress of small molecule inhibitors and degraders of BRD4 are reviewed, in order to provide reference for the development of new inhibitors and degraders of BRD4.

[Key words] bromodomain and extra-terminal family; bromodomain-containing protein 4; tumor; small-molecule inhibitor; degrader

溴结构域蛋白 (bromodomain proteins, BRDs) 包含大约 110 个氨基酸, 具有高度保守的功能结构域, 可分为 8 大家族, 其中溴结构域和超末端 (bromodomain and extra-terminal, BET) 家族最受关注。BET 家族由 4 种蛋白组成, 即 BRD2、BRD3、BRD4 和睾丸特异性含溴结构域蛋白 (testis-specific bromodomain-containing protein, BRDT)。BRD4 能解读表观遗传密码, 识别乙

酰化的组蛋白或非组蛋白, 调控骨髓细胞瘤病毒癌基因 (cellular-myelocytomatosis viral oncogene, C-MYC)、核因子 κ B (nuclear factor kappa B, NF- κ B)、Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白 1 (kelch-like ECH associated protein 1, KEAP1) 等多条信号通路, 参与 DNA 的复制、转录以及细胞周期等过程^[1-2]。BRD4 的表达失调可导致白血病、乳腺癌、黑色素瘤等多种肿瘤的恶性发展。作为一个重要的抗肿瘤表观遗传学靶标, 多种 BRD4 小分子抑制剂和降解剂均表现出较好的抗肿瘤作用, 其中 OTX015、I-BET762 以及 I-BET151 等已进入不同的临床试验阶段。本文重点综述 BRD4 小分子抑制剂及其降解剂的研究进展, 为开发 BRD4 的新型抑制剂和降解剂提供参考。

接受日期: 2020-06-24

项目资助: 国家自然科学基金 (No. 81874290, No. 81922064, No. 81803755)

*** 通讯作者:** 欧阳亮, 研究员;

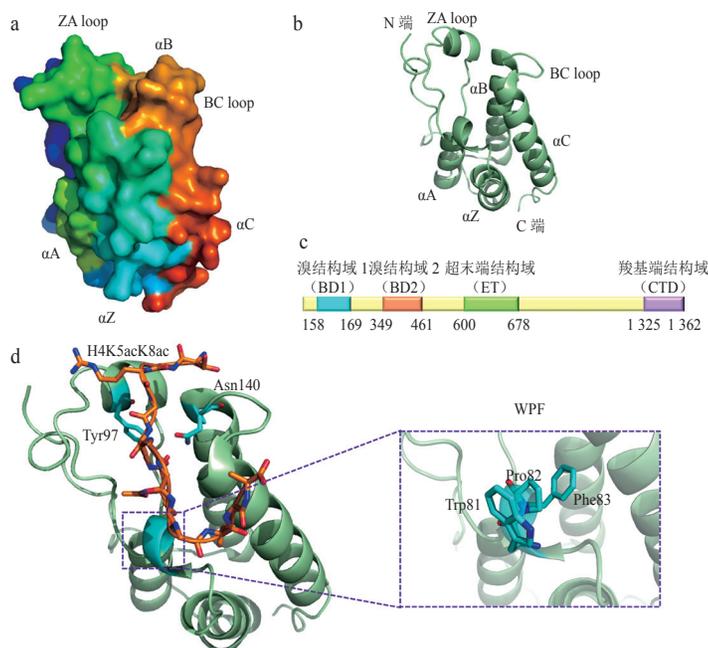
研究方向: 药物化学与药物发现的化学生物学;

Tel: 028-85503817; **E-mail:** ouyangliang@scu.edu.cn

1 BRD4 的蛋白结构和信号通路

BRD4 是 BET 家族重要的功能蛋白, 能识别组蛋白中乙酰化的赖氨酸, 在细胞周期、细胞分化和信号转导过程中具有重要作用。BRD4 的 N 末端包含 2 个串联的高度保守的溴结构域, 即 BD1 和 BD2^[3]。BRD4 的溴结构域由 4 个反向平行排列的 α 螺旋组成, 分别是 αZ 、 αA 、 αB 和 αC 。其中, αZ 和 αA 、 αB 和 αC 之间形成了 2 个疏水 loop 环, 能特异性地结合赖氨酸乙酰化物并辨别不同的蛋白复合物 (见图 1a 和 1b)。BD1 和 BD2 的环状区域在序列和长度上略有差异, 有助于提高 BRD4 与乙酰

化赖氨酸结合的特异性^[4]。BRD4 的 C 末端包含一个超末端 (extra-terminal, ET) 结构域 (见图 1c), 该结构域能与组蛋白修饰因子相互作用, 主要负责调节基因转录^[4]。其中, 溴结构域是 BRD4 能够特异性识别乙酰化赖氨酸的重要区域, 其 BC 环和 ZA 环在螺旋末端形成疏水空腔, 在空腔中心, 乙酰化赖氨酸能够与 Asn140 形成分子间氢键, 并与 Tyr97 通过水分子介导形成分子间氢键, 构成了抑制 BRD4 的重要位点。此外, BRD4 的 Trp81 (W81)、Pro82 (P82) 和 Phe83 (F83) 能够形成一个疏水区, 即 WPF, 对提高 BRD4 的亲合力具有促进作用^[5-6] (见图 1d)。



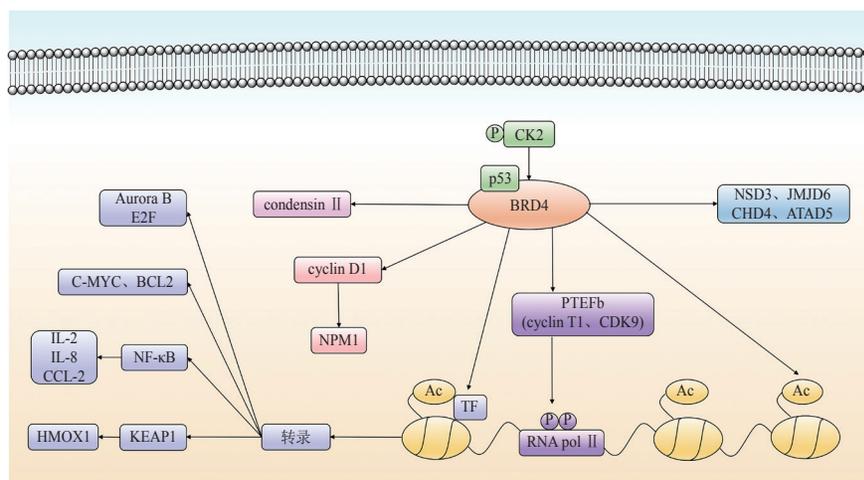
a: 人 BRD4 溴结构域 BD1 的蛋白表面图 (PDB ID: 3MXF)^[7]; b: 人 BRD4 溴结构域 BD1 的共晶结构 (PDB ID: 3MXF); c: 人 BRD4 的氨基酸序列简图; d: 人 BRD4 与双乙酰化组蛋白 4 肽 (H4K5acK8ac) 的晶体结构 (PDB ID: 3UVW)^[2]

图 1 溴结构域蛋白 4 蛋白结构

Figure 1 The structure of bromodomain-containing protein 4

BRD4 在细胞核中能够通过招募转录因子 (transcription factors, TF) 调控基因转录过程, 参与细胞周期、细胞增殖、染色质组装与重组、炎症以及氧化应激反应等进程, 被称为细胞分裂中的“有丝分裂书签”以及“蛋白支架”^[8]。基因转录过程中, BRD4 能招募正向转录延长因子 b (positive transcription elongation factor b, PTEFb), 促进转录延伸。PTEFb 是细胞周期蛋白 T1 (cyclin T1) 与细胞周期依赖性蛋白激酶 9 (cyclin-dependent kinase 9, CDK9) 形成的复合物, 与 BRD4 结合后能促

进 RNA 聚合酶 II (RNA pol II) C 端结构域的丝氨酸磷酸化^[9]。BRD4 能激活转录初始应答基因, 调节转录因子 C-MYC 和 B 淋巴细胞瘤-2 (B-cell lymphoma 2, BCL2) 等, 参与细胞周期、细胞增殖和细胞凋亡等进程^[9-10]。酪蛋白激酶 2 (casein kinase II, CK2) 磷酸化后, BRD4 能通过招募肿瘤抑制因子 p53, 并介导相关基因转录^[11]。BRD4 还能影响细胞周期蛋白 D1 (cyclin D1) 等相关因子, 调节 BRD4 与核仁磷酸蛋白 1 (nucleophosmin1, NPM1) 的相互作用, 抑制转录活性^[12] (见图 2)。



ATAD5: 三磷酸腺苷酶家族蛋白 5; Aurora B: 极光激酶 B; CCL-2: CC 趋化因子配体 2; CHD4: 色素域解旋酶 DNA 结合蛋白 4; condensin II: 凝缩蛋白 II; cyclin T1: 细胞周期蛋白 T1; E2F: 腺病毒 E2 转录结合因子; HMOX1: 血红素加氧酶 1; IL-2: 白细胞介素-2; IL-8: 白细胞介素-8; JMJD6: jumonji C 结构域 6; NSD3: 核受体结合域蛋白 3; p53: 肿瘤抑制因子 p53; Ac: 乙酰化; P: 磷酸化

图 2 溴结构域蛋白 4 介导的信号通路

Figure 2 Bromodomain-containing protein 4-mediated signaling pathways

DNA 合成中, BRD4 能参与细胞进程, 促进细胞周期向 S 期转化, 调控 Aurora B 激酶和 E2F, 影响 G1 相关基因的表达^[13]。在 DNA 损伤反应通路中, BRD4 能募集 condensin II, 重塑染色质结构, 抑制 DNA 的损伤^[14]。炎症反应中, BRD4 的溴结构域能与乙酰化的 NF- κ B p65 (Rel A) 结合, 促进 NF- κ B 的转录激活以及炎症基因 *IL-2*、*IL-8*、*CCL-2* 的表达, 增加其转录活性^[15]。在氧化应激反应中, 抑制 BRD4 能使 KEAP1 通路失调, 抑制 HMOX1 的表达和活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的生成, 使氧化应激条件下细胞活性增加, 发挥抗肿瘤作用^[16]。此外, ET 结构域能与 NSD3、JMJD6、CHD4 以及 ATAD5 结合, 在染色质组织中具有组装和重组等重要作用^[17-18] (见图 2)。

2 BRD4 与肿瘤的发生发展

作为表观遗传阅读器, BRD4 能激活 C-MYC 等多种转录因子, 从而调控基因转录, 影响细胞周期、增殖和凋亡等生理学过程, 在肿瘤细胞的浸润、转移以及肿瘤的恶性发展中具有重要作用。研究表明 BRD4 的表达上调会导致多种下游基因功能紊乱, 与多种恶性肿瘤的发生发展密切相关。Zuber 等^[19]发现在急性髓性白血病 (acute myelogenous leukemia, AML) 中 BRD4 表达失调, 功能紊乱。

2011 年, Dawson 等^[20]发现置换染色质中的 BET 蛋白能抑制 BCL2、C-MYC 和 CDK 等关键因子的表达, 对混合谱系白血病 (mixed lineage leukaemia, MLL) 有治疗作用。2016 年, Andrieu 等^[21]在研究 BRD4 在三阴性乳腺癌中的作用时发现, BRD4 小分子抑制剂在三阴性乳腺癌中的作用机制主要与 Notch 信号配体 Jagged1 (JAG1) /Notch 信号受体 1 (notch receptor 1, Notch1) 相关。在黑色素瘤模型中 BRD4 抑制剂能下调 S 期激酶相关蛋白 2 (s-phase kinase associated protein 2, SKP2)、细胞外信号调节激酶 (extracellular signal regulated kinase 1, ERK1) 和 C-MYC, 抑制黑色素瘤细胞的增殖以及肿瘤的生长和转移^[22]。Li 等^[23]发现 BRD4 抑制剂 JQ1 能抑制 C-MYC, 诱导 G1 细胞周期停滞, 抑制凋亡蛋白 BCL2 样蛋白 11 (Bcl-2-like protein 11, BCL2L11) 的表达, 从而抑制肝癌细胞生长, 表现出抗肝癌作用。BRD4 的高度表达与肺癌也密切相关, BRD4 抑制剂能抑制抗凋亡蛋白 BCL2, 与 BCL2 抑制剂联合使用能诱导小细胞肺癌细胞凋亡^[24]。

综上所述, BRD4 的表达上调会导致其下游基因表达异常, 在白血病、乳腺癌、黑色素瘤、肝癌、肺癌等肿瘤的发生发展中具有重要作用。BRD4 是重要的调控表观遗传的肿瘤相关蛋白, 并且其小分子抑制剂具有良好的抗肿瘤作用。因此, 开发抑制

BRD4 的小分子化合物是该领域的研究方向之一, 为肿瘤治疗提供了新的选择。

3 BRD4 小分子抑制剂

BRD4 小分子抑制剂能下调 C-MYC 等多种转录因子, 具有良好的抗肿瘤效果。因此, 寻找 BRD4 的小分子抑制剂具有重要意义: 一方面为全面深入研究 BRD4 抑制剂在不同肿瘤中的作用机制提供新分子; 另一方面为多种恶性肿瘤的治疗提供候选化合物。BRD4 小分子抑制剂与溴结构域有高度的亲和性, 按照其结合方式可分为 2 类, 即单价抑制剂和二价抑制剂。目前, BRD4 小分子抑制剂的研究主要集中于单价抑制剂。单价 BRD4 抑制剂能与 BD1 或 BD2 结合, 根据其化学结构的特征主要分为: 三氮唑类、异噁唑类、喹啉酮类、吡啶酮类以及四氢喹啉类等。二价抑制剂能同时与 BD1 和 BD2 结合, 亲和力较高。本文将针对 2 类 BRD4 小分子抑制剂的研究进行综述。

3.1 单价抑制剂

3.1.1 三氮唑类 JQ1 (1) 是通过高通量筛选发现的首个 BRD4 单价抑制剂, 属于三氮唑类化合物^[7]。共晶结果表明, JQ1 通过甲基三唑基团和 Asn140 形成了氢键, 噻唑环伸展于疏水的 ZA 环, 苯环位于 WPF 疏水区, 完全占据了 BRD4 的乙酰化赖氨酸结合位点(见图 3)。JQ1 对 BD1 的 IC_{50} 为 $77 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 平衡解离常数 (K_d) 为 $50 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。在多发性骨髓瘤模型中, JQ1 能抑制转录因子 C-MYC, 表现出较强的抗肿瘤作用^[25]。因此, JQ1 的发现表明 BRD4 小分子抑制剂在肿瘤治疗中具有较大的潜力。

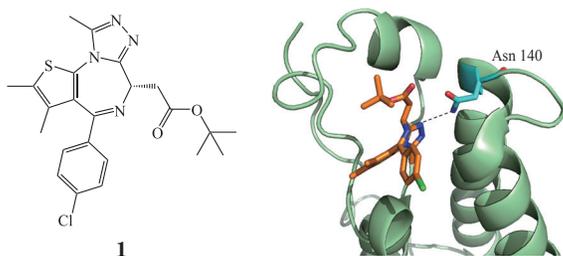
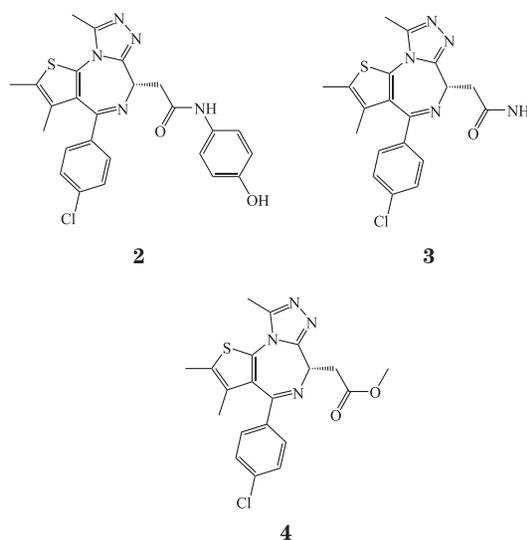


图 3 化合物 1 与溴结构域蛋白 4 共晶结构 (PDB ID: 3MXF)^[7]

Figure 3 Co-crystal structure of compound 1 with bromodomain-containing protein 4 (PDB ID: 3MXF)

为改善 JQ1 半衰期较短、用量和毒性较大的问题, 研究人员对 JQ1 进行优化, 并报道了多种三氮唑类 BRD4 小分子抑制剂, 如 OTX015 (2)、CPI203 (3) 和 MS417 (4)。其中, OTX015 能抑制 BRD4 和 C-MYC, 并已进入临床试验阶段 (NCT02698189/NCT02698176/NCT01713582/NCT02259114)^[26-27]。CPI203 的 IC_{50} 为 $37 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 与来那度胺联用能下调 C-MYC 和 IRF4, 诱导细胞凋亡^[28]。MS417 对 BD1 的 IC_{50} 为 $30 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, K_d 为 $36.1 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[29]。



2013 年, 葛兰素史克公司通过表型筛选发现载脂蛋白 A1 (apolipoprotein A1, ApoA1) 的调节剂化合物 5 对 BRD4 的 pIC_{50} 为 6.3, 并且研究表明 ApoA1 的上调是由 BET 蛋白介导的^[30]。随后以化合物 5 为先导化合物, 将氨基甲酸酯基团替换为酰胺, 在 2 个苯环上分别引入氯原子和甲氧基, 并用乙基取代苯基, 发现了具有优异理化性质的 I-BET762 (GSK525762, 6)。化合物 6 的 pIC_{50} 为 6.2, 代谢稳定性增强, 溶解度提高, 生物利用度良好, 并与 Asn140 形成了关键的氢键(见图 4)。目前, I-BET762 已进入临床试验阶段 (NCT01943851/NCT01587703/NCT02964507)^[31]。此外, 三氮唑类化合物 7 与 JQ1 的结合模式相似, 并能下调 IL-6 的表达^[32]。

3.1.2 异噁唑类 异噁唑类 BRD4 小分子抑制剂研究最多的是 I-BET151 (8, NCT02630251)^[34]。I-BET151

的异噁唑的氧原子与 Asn140 形成了关键的氢键, 2-甲基吡啶与 WPF 疏水区形成范德华力 (见图 5)。I-BET151 与 BET 家族的亲和力高, K_d 小于 $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。I-BET151 能够抑制 BD1, IC_{50} 为 $790 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 在 MLL-AF9 和 MLL-AF4 小鼠模型中表现出显著的抗白血病作用^[35]。此外, I-BET151 能降低炎症因子 IL-6 的水平, 具有抗炎作用。

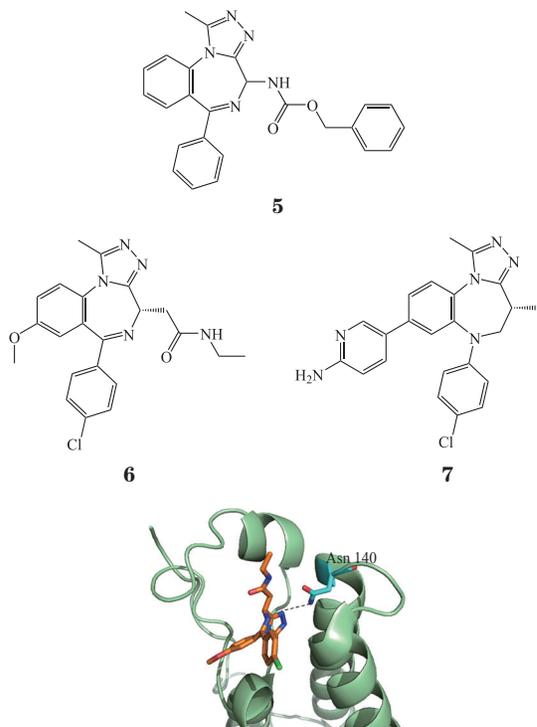


图 4 化合物 6 与溴结构域蛋白 4 共晶结构 (PDB ID: 3P5O)^[33]

Figure 4 Co-crystal structure of compound 6 with Bromodomain-containing protein 4 (PDB ID: 3P5O)

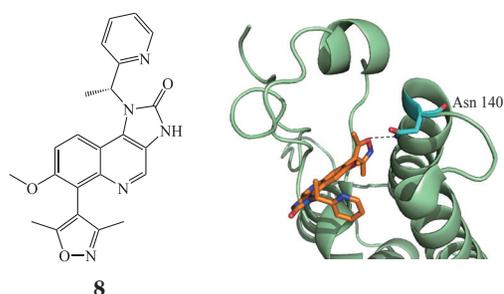


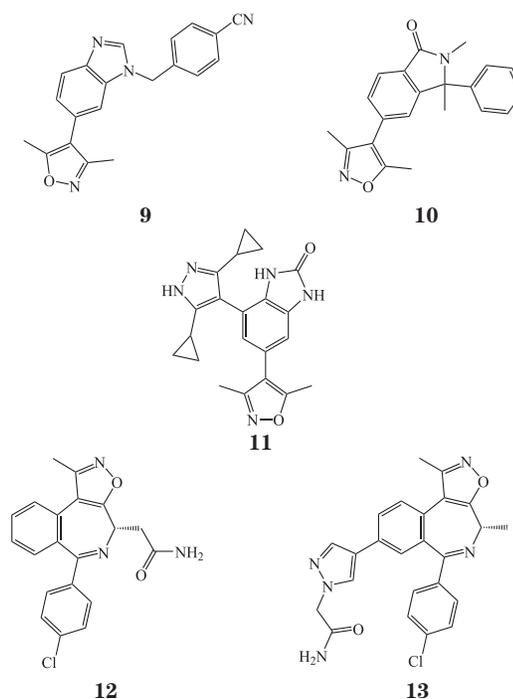
图 5 化合物 8 与溴结构域蛋白 4 共晶结构 (PDB ID: 3ZYU)^[20]

Figure 5 Co-crystal structure of compound 8 with bromodomain-containing protein 4 (PDB ID: 3ZYU)

2013 年, Hay 等^[36]发现了选择性的 BRD4 小分子抑制剂 9, 其 IC_{50} 为 $790 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。2014 年,

Engelhardt 等^[37]发现化合物 10 能抑制 BD1, 其 IC_{50} 为 $14 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。Aktoudianakis 等^[38]发现化合物 11 对 BD1 具有抑制活性, 其 IC_{50} 为 $12.9 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。此外, 化合物 11 还能下调 C-MYC, EC_{50} 为 $13.2 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2016 年, Albrecht 等^[39]发现异噁唑类 BRD4 抑制剂 CPI0610 (12) 抑制 BD1 的 IC_{50} 为 $39 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 药代动力学参数理想。Hewitt 等^[40]以 CPI0610 的结构为基础引入了乙酰胺取代的吡啶环, 生成了化合物 13。共晶结果表明, 化合物 13 的二甲基异噁唑的氧与 Asn140 的氨基形成了氢键, 氮原子与 Tyr97 的苯酚通过水分子相互作用, 甲基与 WPF 疏水区相互作用。



3.1.3 喹啉酮类 喹啉酮类的代表性化合物是辉瑞公司研发的 PFI-1 (14)^[41]。PFI-1 喹啉酮的羰基和氮能与 Asn140 形成氢键, 羰基与 Tyr97 形成由水分子介导的氢键, 磺酰胺的 NH 通过水分子介导与 ZA 环的 Val87 形成氢键 (见图 6)。PFI-1 对 BD1 的 IC_{50} 为 $220 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 能抑制白血病细胞的增殖, 影响白血病细胞周期, 下调 C-MYC, 诱导白血病细胞凋亡和分化。但 PFI-1 药代动力学特征差, 半衰期短, 生物利用度低, 仅为 32%。PFI-1 还能显著下调激酶 Aurora B, Aurora B 的活性与 C-MYC 的功能相关。

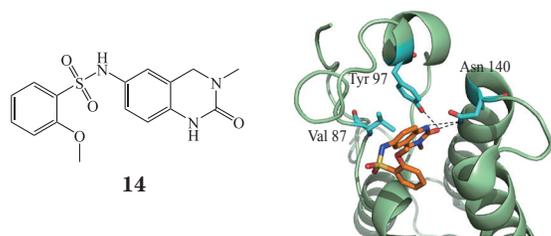
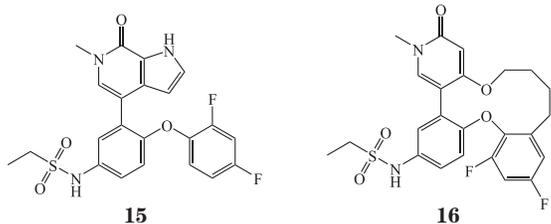


图 6 化合物 14 与溴结构域蛋白 4 共晶结构 (PDB ID: 4E96) [42]

Figure 6 Co-crystal structure of compound 14 with bromodomain-containing protein 4 (PDB ID: 4E96)

3.1.4 吡啶酮类 2017, McDaniel 等 [43] 发现 ABBV-075 (**15**, NCT02391480) 与 BRD4 结合的 K_i 为 $1.5 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 在 AML 小鼠模型中抗肿瘤活性和耐受性较好。ABBV-075 能抑制肿瘤细胞的增殖, EC_{50} 为 $13 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。此外, ABBV-075 药代动力学特征良好, 口服生物利用度为 50%, 半衰期 ($T_{1/2}$) 为 25 h。2017 年, Wang 等 [44] 基于 NMR 片段筛选发现了新型的吡啶酮类化合物 **16**。化合物 **16** 与 BRD4 的亲和力高, K_i 为 $1.5 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, EC_{50} 为 $5.6 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。共晶结果表明, 化合物 **16** 的吡啶酮的羰基和 BRD4 溴结构域 BD2 的 Asn433 形成了氢键, 碳环位于 WPF 疏水区, 磺酰胺和 Asp381 相互作用。



3.1.5 四氢喹啉类 2014 年, 葛兰素史克公司开发了一种新的、有选择性的四氢喹啉类 BRD4 小分子抑制剂 I-BET726 (GSK1324726A, **17**) [45]。共晶结果表明, I-BET726 的 N1 乙酰基与 Asn140 的氨基形成第 1 个氢键, 并通过水分子介导与 Tyr97 形成了第 2 个氢键 (见图 7)。此外, I-BET726 的 N1 乙酰基的甲基占据了水分子与 Phe83 所形成的口袋, C2 甲基占据了 ZA 环中 Leu110 附近的疏水空腔, 与 Leu94 直接接触, 氯苯基与 WPF 疏水区结合。I-BET726 具有高度的选择性和亲和性, 表面离子体共振实验中的 K_d 为 $23 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 等温滴定量热法中的 K_d 为 $4.4 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。I-BET726 能下调 BCL2 和骨髓细胞瘤病毒癌基因神经母细胞瘤衍生同源基因

MYCN, 强烈抑制神经细胞瘤细胞系的增殖, IC_{50} 为 $75 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ [46]。

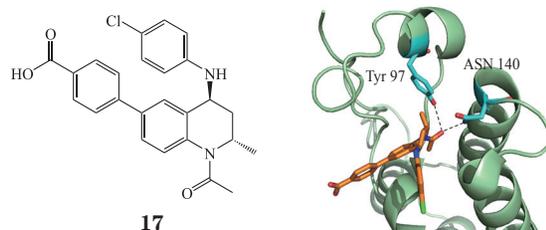
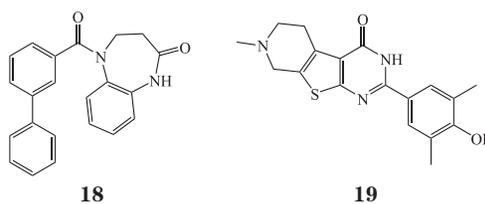


图 7 化合物 17 与溴结构域蛋白 4 共晶结构 (PDB ID: 4BJX) [46]

Figure 7 Co-crystal structure of compound 17 with bromodomain-containing protein 4 (PDB ID: 4BJX)

3.1.6 其他 BRD4 小分子单价抑制剂 2016 年, Li 等 [47] 发现了新的苯二氮草酮类 BRD4 小分子抑制剂 **18**。在白血病细胞中化合物 **18** 表现出显著的抗增殖活性, 并能通过线粒体途径诱导细胞凋亡。分子对接表明, 化合物 **18** 与 Gln85 形成了氢键, 并与 Phe83、Val87、Leu92、Cys136 和 Ile146 形成了疏水作用。2017 年, Ouyang 等 [48] 发现在乳腺癌中自噬相关蛋白腺苷酸活化蛋白激酶 (AMP-activated protein kinase, AMPK) 显著下调, 并设计了一种高效的选择性的 BRD4 小分子抑制剂 **19**。化合物 **19** 能阻断 BRD4 与 AMPK 的相互作用, 激活乳腺癌细胞中 AMPK-雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR)-UNC-51-样激酶 1 (UNC-51-like kinase 1, ULK1) 自噬通路, 诱导自噬相关基因-5 (autophagy related gene-5, ATG5) 依赖的自噬相关细胞死亡。在乳腺癌小鼠和斑马鱼模型中, 化合物 **19** 具有可观的治疗作用, 为乳腺癌的治疗提供了有希望的候选化合物。



3.2 二价抑制剂

目前针对 BRD4 已开发出多种小分子抑制剂, 但主要集中于抑制单一的溴结构域, 选择性不高, 抗肿瘤效果也有限。而且 BRD4 小分子抑制剂出现了耐药性的问题。为克服单价抑制剂的耐药问题,

发展了二价抑制剂, 与单价抑制剂相比, 二价抑制剂的亲和力大, 抑制效率高, 是实现与目标蛋白有效结合的一种新策略。因此, 也是研发 BRD4 小分子抑制剂研究热点之一。

2016 年, Bradbury 等^[49]对雄激素受体调节剂 AZD3514 (**20**) 进行结构优化时, 发现 BRD4 二价抑制剂 **21** 对 BRD4 的溴结构域 BD1 和 BD2 有较强的抑制作用, pK_d 分别为 7.2 和 6.1^[49-50]。为提

高化合物 **21** 与乙酰化赖氨酸的结合能力, 在结构中引入了三氮唑吡啶基团, 得到了化合物 **22** 和 **23** (AZD5153)。与化合物 **21** 相比, 化合物 **22** 的抗增殖活性提高, 抑制 BD1 和 BD2 的 pK_d 分别为 8.1 和 7.3。AZD5153 的哌嗪环的羰基和三唑环的氮与 Asn140 形成了氢键 (见图 8)。AZD5153 的 IC_{50} 为 $5 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 能显著抑制 C-MYC, 药代动力学特征良好, 并已进入临床试验阶段 (NCT03205176)^[51]。

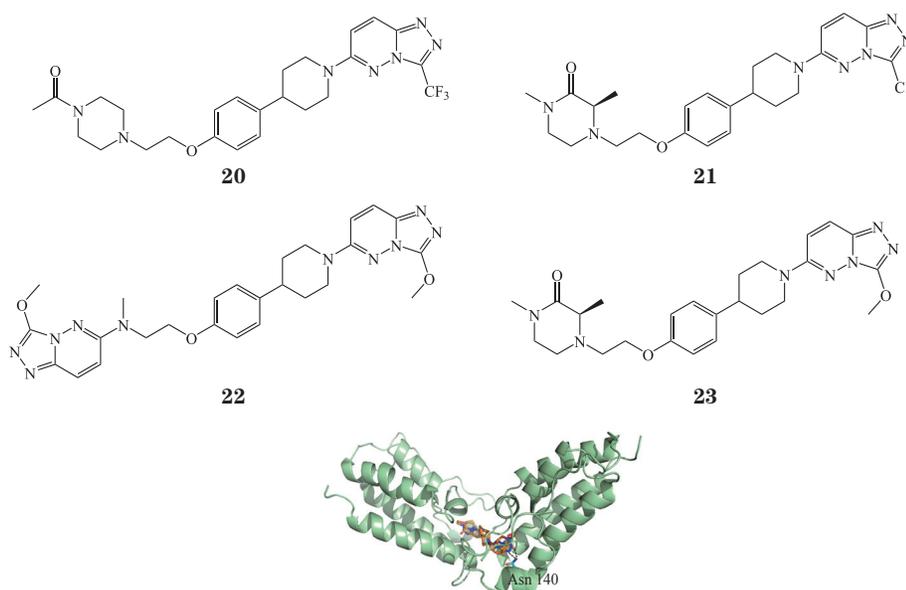
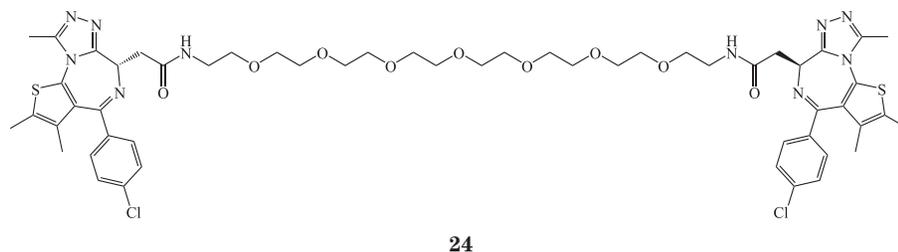


图 8 化合物 **23** 与溴结构域蛋白 4 的共晶结构 (PDB ID: 5KHM)^[49]

Figure 8 Co-crystal structure of compound **23** with bromodomain-containing protein 4 (PDB ID: 5KHM)

2016 年, Tanaka 等^[52]将 2 个 JQ1 分子用聚乙二醇链连接在一起, 设计了一种分子内的 BRD4 二价抑制剂 MT1 (**24**)。与 JQ1 相比, MT1 能显著延迟白血病的进展, 抗肿瘤活性提高, 主要与其对

BRD4 的二聚能力有关。此外, 在浓度为 $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时 MT1 能显著抑制 C-MYC, 上调环六亚甲基二乙酰胺诱导蛋白 (hexamethylene bis-acetamide inducible 1, HEXIM) 的表达。



4 BRD4 蛋白降解剂

BRD4 在多种恶性肿瘤的基因调控网络中具有重要作用, 是具有可观前景的肿瘤治疗靶标。但 Winter 等^[53]认为小分子抑制剂会破坏目标蛋白的区域活性, 而且研究表明 BRD4 抑制剂会导致

BRD4 蛋白在体内大量积累, 抑制效率降低。重要的是, BRD4 小分子抑制剂的耐药问题使其无法在临床上发挥理想的肿瘤治疗作用。因此, 开发有效的多结构域蛋白的小分子抑制剂具有较大挑战性。2001 年, Sakamoto 等^[54]提出了蛋白水解靶向嵌合

体 (proteolysis-targeting chimeras, PROTACs) 的概念。PROTACs 包含 3 个组成部分: 目标蛋白特异性配体、E3 泛素连接酶配体和连接配体的 Linker。PROTACs 通过设计双功能分子靶向目标蛋白和 E3 泛素连接酶, 从而促进 E3 连接酶将目标蛋白泛素化, 并通过蛋白酶体降解。因此, 与传统的小分子抑制剂相比, PROTACs 不仅能作用于非药物靶点, 降解目标蛋白, 还能克服耐药性问题, 为临床提供了一种新的思路。靶向 BRD4 的 PROTACs 主要分为 2 类: 第一种是募集 E3 泛素连接酶 Cereblon (CRBN) 的蛋白降解剂, 主要是基于沙利度胺衍生物的设计; 另一种是募集 E3 泛素连接酶 Von Hippel-Lindau (VHL) 的蛋白降解剂, 主要是基于 VHL 配体的设计。本文将对这 2 类 BRD4 蛋白降解剂进行综述。

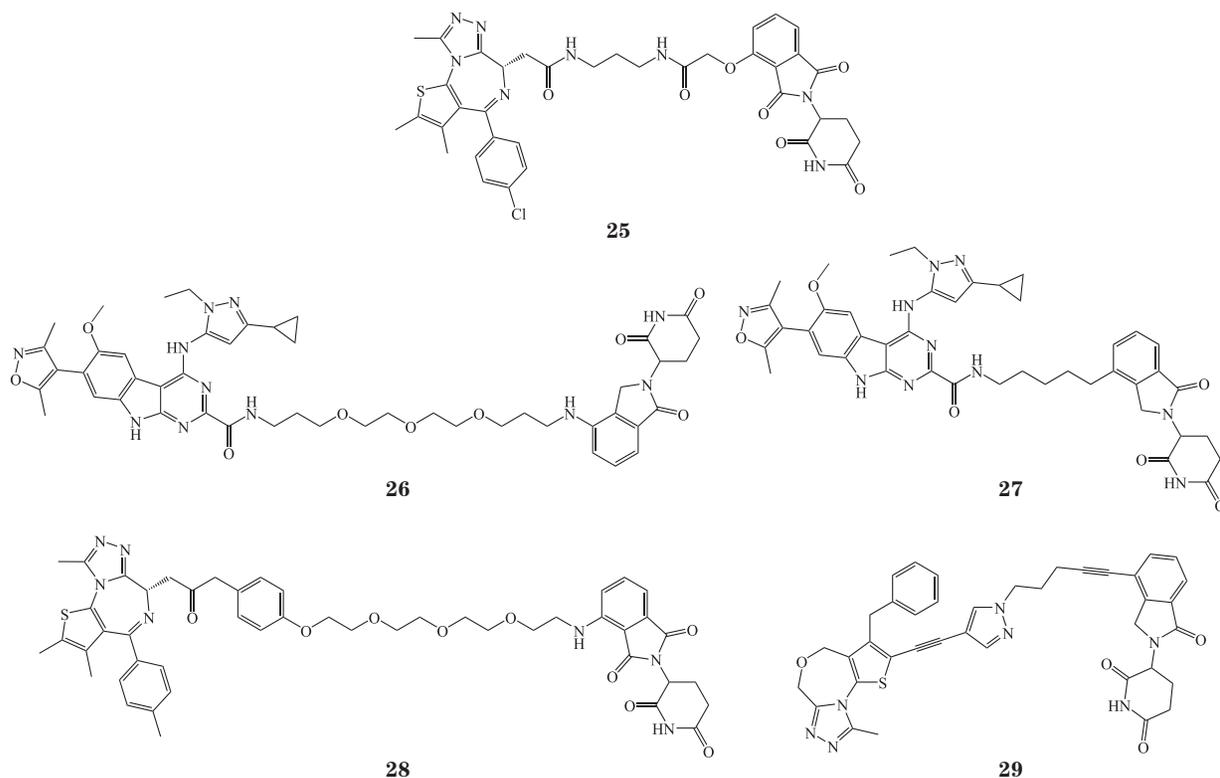
4.1 募集 E3 泛素连接酶 CRBN 的 PROTAC

2015 年, Winter 等^[53] 将沙利度胺衍生物与 BRD4 抑制剂 JQ1 相连接, 设计了一种募集 CRBN 的降解剂 dBET1 (**25**)。与 JQ1 相比, dBET1 在体内外均能选择性地诱导 BRD4 的降解, 在浓度低至 $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时可以完全降解 MV4-11 白血病细胞中的 BRD4, 并显著抑制 C-MYC 的转录。在 AML

小鼠模型中, dBET1 能降解 BRD4, 下调 C-MYC, 延缓小鼠白血病的进展。

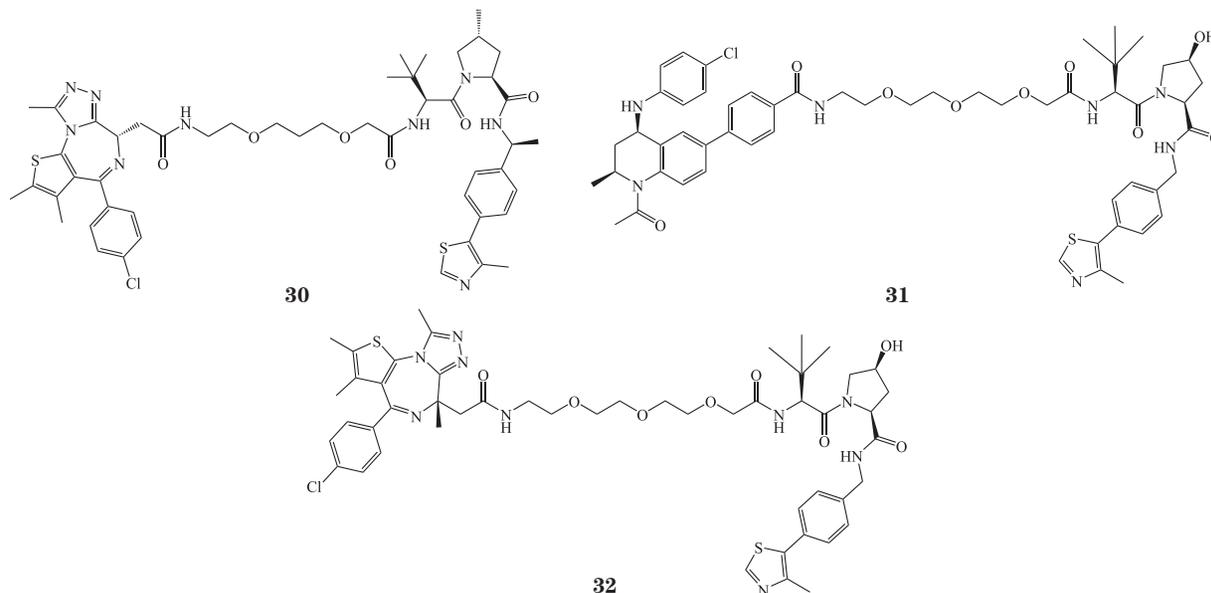
2017 年, Bai 等^[55] 通过聚乙二醇的柔性链连接了来那度胺和 BRD4 抑制剂 HJB97, 设计了第 2 代 BRD4 的降解剂 BETd-246 (**26**)。BETd-246 选择性高, 在三阴性乳腺癌细胞中 IC_{50} 小于 $10 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 并能导致生长抑制和细胞凋亡。BETd-246 诱导 BRD4 降解的关键下游因子是髓细胞白血病基因 1 (myeloid cell leukemia 1, MCL1)。Zhou 等^[56] 对 BETd-246 进一步优化, 发现与 BETd-246 相比, BETd-260 (**27**) 在乳腺癌 MDA-MB-231 和 MDA-MB-468 异种移植模型中的抗肿瘤活性提高。

基于 CRBN 配体的 BRD4 蛋白降解剂还包括 ARV-825 (**28**) 和 QCA-570 (**29**)^[57-58]。ARV-825 对 BD1 和 BD2 的 K_d 分别为 90 和 $28 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 在半数降解浓度 (DC_{50}) 小于 $1 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时能抑制细胞增殖, 并诱导细胞凋亡。QCA-570 可以有效地诱导 BET 蛋白的降解, 在小鼠白血病异种移植模型中, 能实现肿瘤完整和持久的消退, 并且没有明显的毒性。



4.2 募集 E3 泛素连接酶 VHL 的 PROTAC

2016 年, Raina 等^[59]发现 ARV-771 (**30**) 在去势抵抗性前列腺癌模型中表现出明显的抗肿瘤作用, DC_{50} 小于 $50 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时能显著诱导 BRD4 的降解, 并且在 IC_{50} 小于 $1 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时 C-MYC 蛋白降解完全。



5 结语与展望

BRD4 参与细胞增殖、细胞凋亡、染色质的组装与重组、炎症反应以及氧化应激等多种生理过程, 是基因调控网络中的关键因子。虽然研究表明 BRD4 在白血病、乳腺癌、黑色素瘤等多种恶性肿瘤的发生发展中具有关键作用, 且部分 BRD4 抑制剂在恶性肿瘤的临床试验中取得了一定成效, 但 BRD4 在不同肿瘤中的作用机制、耐药机制仍需多组学的全面研究。BRD4 单价抑制剂仅能抑制单一的溴结构域, 结构改造较为单一, 抑制效率和抗肿瘤效果受限。二价抑制剂虽提高了抑制效率和抗肿

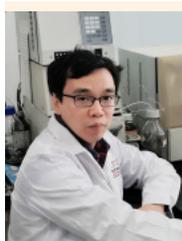
瘤效果, 但主要是通过柔性 Linker 连接了 2 种单价抑制剂, 相对分子质量大, 成药性差。PROTAC 的出现为解决 BRD4 小分子抑制剂的耐药问题提供了新的策略。与小分子抑制剂相比, BRD4 蛋白降解剂能降解靶蛋白, 抗肿瘤活性更强。但 BRD4 蛋白降解剂分子量大, 理化性质较差, 生物利用度低。因此, 仍然有必要且存在较大的空间研发结构多样的 BRD4 的小分子抑制剂、PROTACs 蛋白降解剂或双靶抑制剂, 一方面为研究 BRD4 的作用机制、耐药机制提供不同化学类型的 BRD4 抑制剂; 另一方面, 为以 BRD4 为靶点的肿瘤治疗带来新希望。

[参考文献]

- [1] Stonestrom A J, Hsu S C, Werner M T, et al. Erythropoiesis provides a BRD's eye view of BET protein function[J]. *Drug Discov Today Technol*, 2016, 19: 23-28[2020-06-24]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5116323/>. Doi: 10.1016/j.ddtec.2016.05.004.
- [2] Filippakopoulos P, Picaud S, Mangos M, et al. Histone recognition and large-scale structural analysis of the human bromodomain family[J]. *Cell*, 2012, 149(1): 214-231.
- [3] Wu S Y, Chiang C M. The double bromodomain-containing chromatin adaptor BRD4 and transcriptional regulation[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(18): 13141-13145.
- [4] Vollmuth F, Blankenfeldt W, Geyer M. Structures of the dual bromodomains of the P-TEFb-activating protein BRD4 at atomic resolution[J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(52): 36547-36556.
- [5] Barbieri I, Cannizzaro E, Dawson M A. Bromodomains as therapeutic targets in cancer[J]. *Brief Funct Genomics*, 2013, 12(3): 219-230.
- [6] Chung C W, Coste H, White J H, et al. Discovery and characterization of small molecule inhibitors of the BET family bromodomains[J]. *J Med Chem*, 2011, 54(11): 3827-3838.

- [7] Filippakopoulos P, Qi J, Picaud S, *et al.* Selective inhibition of BET bromodomains[J]. *Nature*, 2010, 468(7327): 1067-1073.
- [8] Fu L L, Tian M, Li X, *et al.* Inhibition of BET bromodomains as a therapeutic strategy for cancer drug discovery[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(8): 5501-5516.
- [9] Gallenkamp D, Gelato K A, Haendler B, *et al.* Bromodomains and their pharmacological inhibitors[J]. *ChemMedChem*, 2014, 9(3): 438-464.
- [10] Peirs S, Frismantas V, Matthijssens F, *et al.* Targeting BET proteins improves the therapeutic efficacy of BCL-2 inhibition in T-cell acute lymphoblastic leukemia[J]. *Leukemia*, 2017, 31(10): 2037-2047.
- [11] Wu S Y, Lee A Y, Lai H T, *et al.* Phospho switch triggers BRD4 chromatin binding and activator recruitment for gene-specific targeting[J]. *Mol Cell*, 2013, 49(5): 843-857.
- [12] Dawson M A, Gudgin E J, Horton S J, *et al.* Recurrent mutations, including NPM1c, activate a BRD4-dependent core transcriptional program in acute myeloid leukemia[J]. *Leukemia*, 2014, 28(2): 311-320.
- [13] Mochizuki K, Nishiyama A, Jang M K, *et al.* The bromodomain protein BRD4 stimulates G1 gene transcription and promotes progression to S phase[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(14): 9040-9048.
- [14] Floyd S R, Pacold M E, Huang Q Y, *et al.* The bromodomain protein BRD4 insulates chromatin from DNA damage signalling[J]. *Nature*, 2013, 498(7453): 246-250.
- [15] Huang B, Yang X D, Zhou M M, *et al.* BRD4 coactivates transcriptional activation of NF- κ B via specific binding to acetylated RelA[J]. *Mol Cell Biol*, 2009, 29(5): 1375-1387.
- [16] Hussong M, Börmö S T, Kerick M, *et al.* The bromodomain protein BRD4 regulates the KEAP1/NRF2-dependent oxidative stress response[J]. *Cell Death Dis*, 2014, 5(4): e1195[2020-06-24]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4001311/>. Doi: 10.1038/cddis.2014.157.
- [17] Liu W, Ma Q, Wong K, *et al.* BRD4 and JMJD6-associated anti-pause enhancers in regulation of transcriptional pause release[J]. *Cell*, 2013, 155(7): 1581-1595.
- [18] Jung M, Gelato K A, Fernández-Montalván A, *et al.* Targeting BET bromodomains for cancer treatment[J]. *Epigenomics*, 2015, 7(3): 487-501.
- [19] Zuber J, Shi J W, Wang E, *et al.* RNAi screen identifies BRD4 as a therapeutic target in acute myeloid leukaemia[J]. *Nature*, 2011, 478(7370): 524-528.
- [20] Dawson M A, Prinjha R K, Dittmann A, *et al.* Inhibition of BET recruitment to chromatin as an effective treatment for MLL-fusion leukaemia[J]. *Nature*, 2011, 478(7370): 529-533.
- [21] Andrieu G, Tran A H, Strissel K J, *et al.* BRD4 regulates breast cancer dissemination through Jagged1/Notch1 signaling[J]. *Cancer Res*, 2016, 76(22): 6555-6567.
- [22] Segura M F, Fontanals-Cirera B, Gaziél-Sovran A, *et al.* BRD4 sustains melanoma proliferation and represents a new target for epigenetic therapy[J]. *Cancer Res*, 2013, 73(20): 6264-6276.
- [23] Li G Q, Guo W Z, Zhang Y, *et al.* Suppression of BRD4 inhibits human hepatocellular carcinoma by repressing MYC and enhancing BIM expression[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(3): 2462-2474.
- [24] Lam L T, Lin X Y, Faivre E J, *et al.* Vulnerability of small-cell lung cancer to apoptosis induced by the combination of BET bromodomain proteins and BCL2 inhibitors[J]. *Mol Cancer Ther*, 2017, 16(8): 1511-1520.
- [25] Delmore J E, Issa G C, Lemieux M E, *et al.* BET bromodomain inhibition as a therapeutic strategy to target c-myc[J]. *Cell*, 2011, 146(6): 904-917.
- [26] Boi M, Gaudio E, Bonetti P, *et al.* The BET bromodomain inhibitor OTX015 affects pathogenetic pathways in preclinical B-cell tumor models and synergizes with targeted drugs[J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(7): 1628-1638.
- [27] Berthon C, Raffoux E, Thomas X, *et al.* Bromodomain inhibitor OTX015 in patients with acute leukaemia: a dose-escalation, phase 1 study[J]. *Lancet Haematol*, 2016, 3(4): e186-e195.
- [28] Moros A, Rodríguez V, Saborit-Villarroya I, *et al.* Synergistic antitumor activity of lenalidomide with the BET bromodomain inhibitor CPI203 in bortezomib-resistant mantle cell lymphoma[J]. *Leukemia*, 2014, 28(10): 2049-2059.
- [29] Zhang G T, Liu R J, Zhong Y F, *et al.* Down-regulation of NF- κ B transcriptional activity in HIV-associated kidney disease by BRD4 inhibition[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(34): 28840-28851.
- [30] Mirguet O, Gosmini R, Toum J, *et al.* Discovery of epigenetic regulator I-BET762: lead optimization to afford a clinical candidate inhibitor of the BET bromodomains[J]. *J Med Chem*, 2013, 56(19): 7501-7515.
- [31] Zhao Y J, Yang C Y, Wang S M. The making of I-BET762, a BET bromodomain inhibitor now in clinical development[J]. *J Med Chem*, 2013, 56(19): 7498-7500.
- [32] Taylor A M, Vaswani R G, Gehling V S, *et al.* Discovery of benzotriazolo[4,3-*d*][1,4]diazepines as orally active inhibitors of BET bromodomains[J]. *ACS Med Chem Lett*, 2015, 7(2): 145-150.
- [33] Nicodeme E, Jeffrey K L, Schaefer U, *et al.* Suppression of inflammation by a synthetic histone mimic[J]. *Nature*, 2010, 468(7327): 1119-1123.
- [34] Mirguet O, Lamotte Y, Donche F, *et al.* From ApoA1 upregulation to BET family bromodomain inhibition: discovery of I-BET151[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2012, 22(8): 2963-2967.
- [35] Seal J, Lamotte Y, Donche F, *et al.* Identification of a novel series of BET family bromodomain inhibitors: binding mode and profile of I-BET151 (GSK1210151A)[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2012, 22(8): 2968-2972.
- [36] Hay D, Fedorov O, Filippakopoulos P, *et al.* The design and synthesis of 5- and 6-isoxazolylbenzimidazoles as selective inhibitors of the BET bromodomains[J]. *MedChemComm*, 2013, 4(1): 140-144.
- [37] Engelhardt H, Gianni D, Mantoulidis A, *et al.* Preparation of indolinone analogues as BRD4 inhibitors: WO, 2014/0154760A1[P]. 2014-10-02.
- [38] Aktoudianakis E, Chin G, Corkey B K, *et al.* Preparation of benzimidazolone derivatives as bromodomain inhibitors: WO, 2014/0160873A1[P]. 2014-10-02.
- [39] Albrecht B K, Gehling V S, Hewitt M C, *et al.* Identification of a benzoisoxazoloazepine inhibitor (CPI-0610) of the bromodomain and extra-terminal (BET) family as a candidate for human clinical trials[J]. *J*

- Med Chem*, 2016, 59(4): 1330-1339.
- [40] Hewitt M C, Leblanc Y, Gehling V S, *et al.* Development of methyl isoxazoleazepines as inhibitors of BET[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2015, 25(9): 1842-1848.
- [41] Picaud S, Costa D D, Thanasopoulou A, *et al.* PFI-1, a highly selective protein interaction inhibitor, targeting BET bromodomains[J]. *Cancer Res*, 2013, 73(11): 3336-3346.
- [42] Fish P V, Filippakopoulos P, Bish G, *et al.* Identification of a chemical probe for bromo and extra C-terminal bromodomain inhibition through optimization of a fragment-derived hit[J]. *J Med Chem*, 2012, 55(22): 9831-9837.
- [43] Mcdaniel K F, Wang L, Soltwedel T, *et al.* Discovery of *N*-(4-(2,4-difluorophenoxy)-3-(6-methyl-7-oxo-6,7-dihydro-1*H*-pyrrolo[2,3-*c*]pyridin-4-yl)phenyl)ethanesulfonamide (ABBV-075/Mivebresib), a potent and orally available bromodomain and extraterminal domain (BET) family bromodomain inhibitor[J]. *J Med Chem*, 2017, 60(20): 8369-8384.
- [44] Wang L, Pratt J K, Soltwedel T, *et al.* Fragment-based, structure-enabled discovery of novel pyridones and pyridone macrocycles as potent bromodomain and extra-terminal domain (BET) family bromodomain inhibitors[J]. *J Med Chem*, 2017, 60(9): 3828-3850.
- [45] Gosmini R, Nguyen V L, Toum J, *et al.* The discovery of I-BET726 (GSK1324726A), a potent tetrahydroquinoline ApoA1 up-regulator and selective BET bromodomain inhibitor[J]. *J Med Chem*, 2014, 57(19): 8111-8131.
- [46] Wyce A, Ganji G, Smitheman K N, *et al.* BET inhibition silences expression of MYCN and BCL2 and induces cytotoxicity in neuroblastoma tumor models[J]. *PLoS One*, 2013, 8(8): e72967[2020-06-24]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3751846/>. Doi: 10.1371/journal.pone.0072967.
- [47] Li J, Wang P, Zhou B, *et al.* Development of 4,5-dihydro-benzodiazepinone derivatives as a new chemical series of BRD4 inhibitors[J/OL]. *Eur J Med Chem*, 2016, 121: 294-299[2020-06-24]. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.05.057>.
- [48] Ouyang L, Zhang L, Liu J, *et al.* Discovery of a small-molecule bromodomain-containing protein 4 (BRD4) inhibitor that induces AMP-activated protein kinase-modulated autophagy-associated cell death in breast cancer[J]. *J Med Chem*, 2017, 60(24): 9990-10012.
- [49] Bradbury R H, Callis R, Carr G R, *et al.* Optimization of a series of bivalent triazolopyridazine based bromodomain and extraterminal inhibitors: the discovery of (3*R*)-4-[2-[4-[1-(3-Methoxy-[1,2,4]triazolo[4,3-*b*]pyridazin-6-yl)-4-piperidyl]phenoxy]ethyl]-1,3-dimethyl-piperazin-2-one (AZD5153)[J]. *J Med Chem*, 2016, 59(17): 7801-7817.
- [50] Loddick S A, Ross S J, Thomason A G, *et al.* AZD3514: a small molecule that modulates androgen receptor signaling and function *in vitro* and *in vivo*[J]. *Mol Cancer Ther*, 2013, 12(9): 1715-1727.
- [51] Rhyasen G W, Hattersley M M, Yao Y, *et al.* AZD5153: a novel bivalent BET bromodomain inhibitor highly active against hematologic malignancies[J]. *Mol Cancer Ther*, 2016, 15(11): 2563-2574.
- [52] Tanaka M, Roberts J M, Seo H S, *et al.* Design and characterization of bivalent BET inhibitors[J]. *Nat Chem Biol*, 2016, 12(12): 1089-1096.
- [53] Winter G E, Buckley D L, Paulk J, *et al.* Phthalimide conjugation as a strategy for *in vivo* target protein degradation[J]. *Science*, 2015, 348(6241): 1376-1381.
- [54] 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.
- [55] Bai L C, Zhou B, Yang C Y, *et al.* Targeted degradation of BET proteins in triple-negative breast cancer[J]. *Cancer Res*, 2017, 77(9): 2476-2487.
- [56] Zhou B, Hu J T, Xu F M, *et al.* Discovery of a small-molecule degrader of bromodomain and extra-terminal (BET) proteins with picomolar cellular potencies and capable of achieving tumor regression[J]. *J Med Chem*, 2018, 61(2): 462-481.
- [57] Qin C, Hu Y, Zhou B, *et al.* Discovery of QCA570 as an exceptionally potent and efficacious proteolysis targeting chimera (PROTAC) degrader of the bromodomain and extra-terminal (BET) proteins capable of inducing complete and durable tumor regression[J]. *J Med Chem*, 2018, 61(15): 6685-6704.
- [58] 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.
- [59] Raina K, Lu J, Qian Y M, *et al.* PROTAC-induced BET protein degradation as a therapy for castration-resistant prostate cancer[J]. *Proc National Acad Sci USA*, 2016, 113(26): 7124-7129.
- [60] Chan K H, Zengerle M, Testa A, *et al.* Impact of target warhead and linkage vector on inducing protein degradation: comparison of bromodomain and extra-terminal (BET) degraders derived from triazolodiazepine (JQ1) and tetrahydroquinoline (I-BET726) BET inhibitor scaffolds[J]. *J Med Chem*, 2018, 61(2): 504-513.
- [61] 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.



【专家介绍】 欧阳亮：华西医院生物治疗国家重点实验室研究员。长期从事细胞自噬原靶标的药物设计合成，先导化合物发现应用基础研究。在相关领域取得了系统和创新的成果：发展针对自噬靶标识别的新方法，建立小分子库，为基于自噬靶标的药物筛选提供了普适性高效工具；围绕自噬性死亡通路中原创药物靶标 ULK1、BRD4-AMPK 等首次设计合成多个小分子先导化合物并揭示其自噬调控相关机制，为基于自噬全新药物靶标及先导化合物的发现奠定了科学基础。

主持国家自然科学基金 5 项，在 *Chem Sci*、*J Med Chem*、*Autophagy*、*Acta Pharmaceutica Sinica B* 等刊物发表 SCI 论文多篇，总引超 2 200 次，单篇最高引 781 次。申请发明专利 8 项，部分正实现临床转化和 IND 申报。入选四川大学“双百人才工程”计划，获第二十二届中国药学会-施维雅青年药物化学奖。