

溴结构域蛋白4的抑制策略及其在肿瘤治疗中的研究进展

刘晓庆, 梁爽, 刘永军*, 张娜**

(山东大学药学院, 天然产物化学生物学教育部重点实验室, 济南 250012)

摘要 溴结构域蛋白4(bromodomain-containing protein 4, BRD4)是溴结构域和超末端结构域家族中最重要的蛋白, 其过度表达与多种肿瘤的发生发展密切相关, 成为肿瘤治疗的新靶点。BRD4的抑制策略主要包括BRD4抑制剂和BRD4降解剂, 其单独用药或与化学治疗、光热治疗、免疫治疗等治疗手段联合使用均显示出良好的抗肿瘤效果, 为肿瘤治疗开辟了新的方向。本文介绍了BRD4的结构及其在肿瘤发生发展中的作用, 综述了BRD4的抑制策略、在肿瘤联合治疗中应用以及耐药性的研究进展, 为以BRD4为靶点的肿瘤治疗提供理论参考。

关键词 BRD4; 抑制剂; 降解剂; 肿瘤联合治疗; 耐药性

中图分类号 R966; R730.5 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2021)03-0270-09

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.20210302

引用本文 刘晓庆, 梁爽, 刘永军, 等. 溴结构域蛋白4的抑制策略及其在肿瘤治疗中的研究进展[J]. 中国药科大学学报, 2021, 52(3): 270–278.

Cite this article as: LIU Xiaoqing, LIANG Shuang, LIU Yongjun, et al. Progress of research on inhibition strategy of bromodomain-containing protein 4 and its application in tumor therapy[J]. J China Pharm Univ, 2021, 52(3): 270–278.

Progress of research on inhibition strategy of bromodomain-containing protein 4 and its application in tumor therapy

LIU Xiaoqing, LIANG Shuang, LIU Yongjun*, ZHANG Na**

Key Laboratory of Chemical Biology (Ministry of Education), School of Pharmaceutical Sciences, Shandong University, Ji'nan 250012, China

Abstract Bromodomain-containing protein 4 (BRD4), a new target for tumor therapy, is the most important member of the bromodomain and extra-terminal family. The overexpression of BRD4 is associated with genesis and development of various cancers. Used either alone or in combination with other treatments such as chemotherapy, photothermal therapy and immunotherapy, the BRD4 inhibitors or degraders exhibited excellent antitumor effects, providing a new direction in tumor treatment. In this review, the structure and function of BRD4, the inhibition strategies of BRD4, the application in tumor combination therapy and drug resistance are introduced, which provides reference for targeting BRD4 in tumor therapy.

Key words BRD4; inhibitor; degrader; tumor combination therapy; drug resistance

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81974498)

表观遗传调控是一种不涉及DNA序列改变的基因表达调控方式, 在肿瘤的发生、发展和转移中发挥重要的作用, 包括DNA甲基化、组蛋白修饰、非编码RNA及染色质重塑等^[1-2]。其中, 组蛋白修

饰构成了一类超越基因序列的组蛋白密码, 控制着遗传信息的表达。组蛋白赖氨酸乙酰化是组蛋白尾部的主要修饰之一, 乙酰化赖氨酸的识别是其参与表观遗传调控的关键步骤^[1,3]。溴结构域是

收稿日期 2020-05-23 通信作者 *Tel: 0531-88382015 E-mail: liuyongjun@sdu.edu.cn

**Tel: 0531-88382015 E-mail: zhangnancy9@sdu.edu.cn

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 81974498)

组蛋白中乙酰化赖氨酸的“阅读器”^[1], 存在于 8 个亚家族的 46 种蛋白质中^[4]。其中, 溴结构域蛋白 4 (bromodomain-containing protein 4, BRD4) 是溴结构域和超末端结构域家族中最重要的蛋白, 与其他 3 个成员 BRD2、BRD3 和 BRDT 相比, BRD4 研究最为广泛^[5]。BRD4 在多种肿瘤细胞中过度表达^[6-7], 识别组蛋白乙酰化赖氨酸并与之结合, 招募染色质调控因子, 促进基因转录, 促进肿瘤的发生、发展和转移^[8]。因此, 开发 BRD4 的抑制策略是表观遗传药物研究中极为重要的一部分。

1 BRD4 的结构及在肿瘤中的作用

1.1 BRD4 的结构

BRD4 由两个保守的溴结构域(BD1、BD2)和一个超末端结构域(ET)构成^[1], 根据氨基酸链的长度可分为 3 个亚型(图 1-A), 分别为富含脯氨酸结构域的长亚型 BRD4A 和短亚型 BRD4B、BRD4C^[5]。溴结构域由 4 个反向平行的 α 螺旋 αZ 、 αA 、 αB 和 αC 构成, 形成 ZA 环和 BC 环(图 1-B)^[9]。两个环中的氨基酸残基形成一个疏水空腔, 可识别并以氢键形式结合乙酰化赖氨酸残基, 进而调控相关功能。BRD4 被形象地称为乙酰化赖氨酸表观遗传“阅读器”^[10]。

1.2 BRD4 在肿瘤中的作用

BRD4 在多种肿瘤中过度表达, 如黑色素瘤、卵巢癌等^[6-7], 促进肿瘤的发生、发展和转移。BRD4 在肿瘤中的作用主要有: ①促进 c-Myc 基因、B 淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)基因等的转录, 促进肿瘤细胞增殖; ②上调肿瘤细胞中 PD-L1 的表达, 加剧免疫抑制; ③修复损伤 DNA; ④促进端粒延伸。

BRD4 识别染色质上乙酰化的组蛋白赖氨酸, 并作为支架将 RNA 聚合酶 II、正性转录延伸因子 b、转录中介体亚基等募集到活性基因的启动子和增强子上, 刺激转录的起始和延伸^[11]。BRD4 驱动 *C-MYC*、*BCL-2* 等关键致癌基因的转录, 使其过度表达, 从而加速肿瘤增殖和发展^[12]。还可与多种 G₁ 基因启动子结合来刺激 G₁ 基因表达, 调控细胞周期, 促进细胞增殖^[13]。另外, BRD4 在肿瘤细胞的 *CD274* 基因(编码 PD-L1)启动子处富集, 促进 *CD274* 基因转录而上调 PD-L1。BRD4 基因敲除可有效降低 BRD4 和 PD-L1 表达, 表明 BRD4 与肿瘤细胞 PD-L1 水平的增加息息相关, BRD4 会加剧肿瘤的免疫抑制^[14]。Andrieu 等^[15]证实 BRD4 能调节三阴性乳腺癌(triple negative breast cancer, TNBC) PD-1/PD-L1 轴, 上调 T 细胞 PD-1 和 TNBC 细胞 PD-L1 的表达, 促进肿瘤免疫逃逸。

BRD4 不仅是 DNA 修复系统中多种基因的主要调控子, 激活 DNA 损伤检查点, 还以转录独立的方式修复损伤 DNA^[16]。C-末端结合蛋白相互作用蛋白(C-terminal binding protein interacting protein, CtIP)是受损 DNA 同源重组修复的关键蛋白, BRD4 通过调控 CtIP 表达, 促使肿瘤细胞修复损伤 DNA^[17]。乙酰化组蛋白在损伤的 DNA 处聚集并招募 BRD4, BRD4 作为支架稳定 P53 结合蛋白 53BP1, 进而激活损伤 DNA 的修复和组装^[18]。因此, 抑制 BRD4 可导致或加剧 DNA 损伤, 为肿瘤治疗提供了新的思路。端粒长短影响细胞增殖速度。端粒上积累的乙酰化组蛋白招募 BRD4, 促进端粒保护复合物的组装, 增强端粒酶活性, 从而促进端粒延长, 加速肿瘤增殖^[16, 19]。

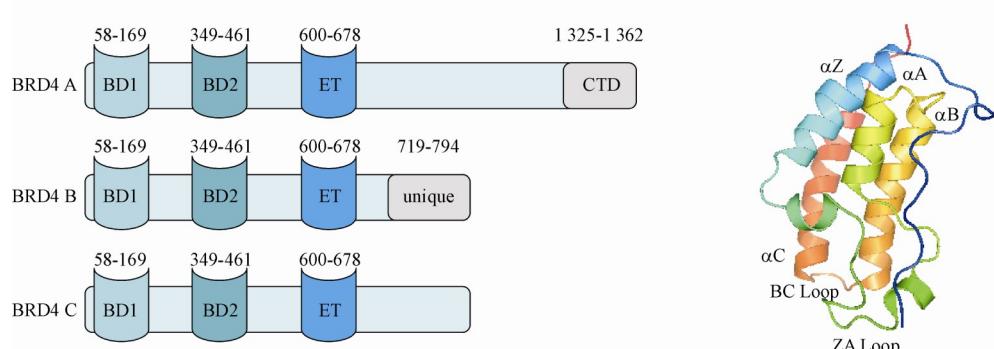


Figure 1 Structures of bromodomain-containing protein 4 (BRD4) (A)^[5] and crystal structure of bromodomain (B)^[9]

2 BRD4的抑制策略

BRD4对肿瘤发生发展的促进作用使其成为肿瘤治疗中极具研究价值的靶点之一。采用合适的策略抑制肿瘤细胞中过度表达的BRD4,是肿瘤治疗新的切入点。研究表明,多种BRD4抑制剂和BRD4降解剂均具有良好的抗肿瘤效果。

2.1 BRD4抑制剂

近年来,大量BRD4抑制剂被开发出来,代表性BRD4抑制剂的化学结构见图2。已有多种处于

临床试验阶段(表1),表现出良好的应用前景。根据BRD4抑制剂与溴结构域的相互作用方式,可将其分为两类:一价型和二价型。一价型BRD4抑制剂与单个溴结构域结合,而二价型BRD4抑制剂能够同时结合两个溴结构域。

目前,一价型BRD4抑制剂最为常见。Beren-guer-Daizé等^[20]发现三氮唑类BRD4抑制剂OTX015可导致细胞周期阻滞,抑制肿瘤细胞增殖,经口给予OTX015可显著提高U87MG异种移植小鼠的存活率。在OTX015的血液恶性肿瘤I期临

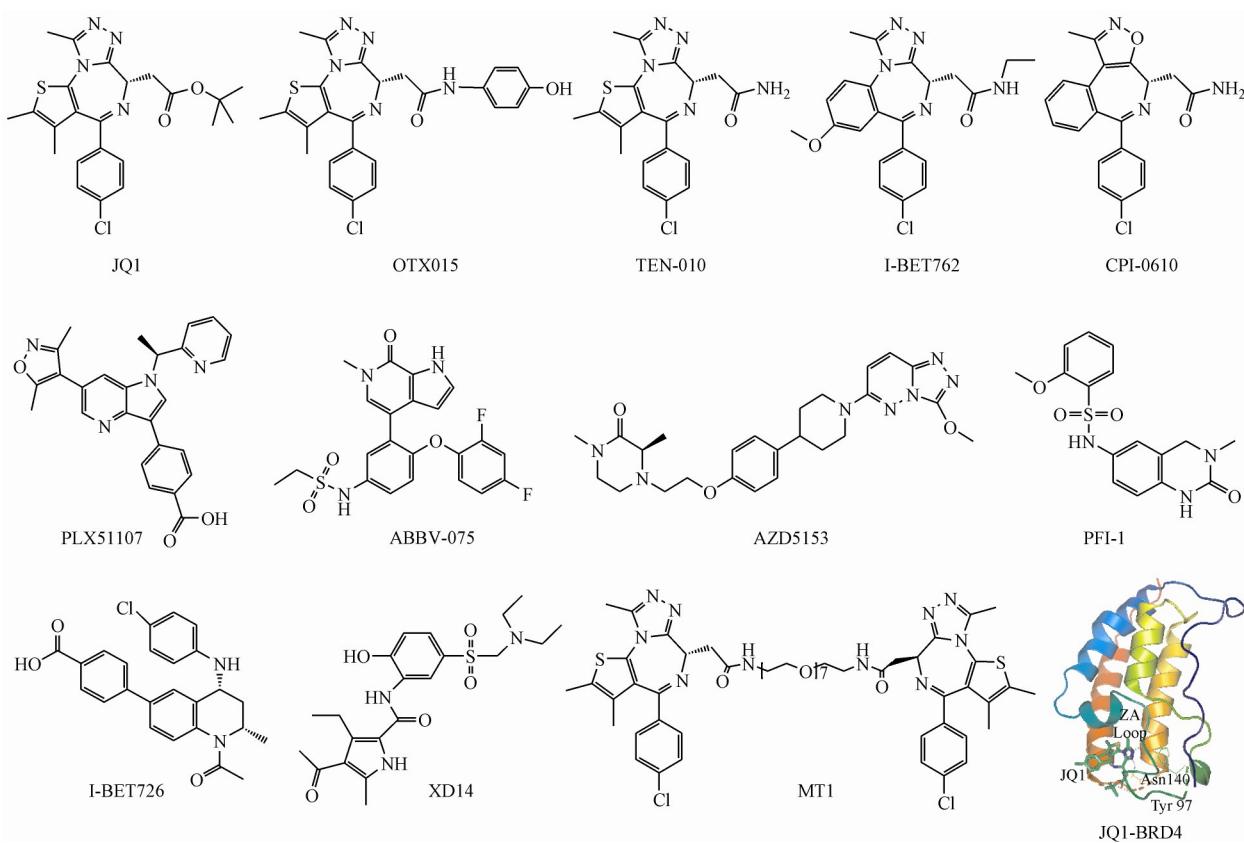


Figure 2 Structures of some BRD4 inhibitors and crystal structure of JQ1-BRD4

Table 1 BRD4 inhibitors in clinical trials^[4,8,11]

Category	Drug (administration)	Indication	Clinical phase
Monovalent	OTX015/MK-8628 (po)	Multiple myelom, AML, glioblastoma multiforme, NMC, TNBC, CRPC, NSCLC	Phase 1/2
BRD4 inhibitors	TEN-010/RO6870810 (sc)	Solid tumors, AML, advanced solid tumors	Phase 1
	I-BET762/GSK252762 (po)	Solid tumours, carcinoma, midline carcinoma	Phase 1/2
	CPI-0610 (po)	Multiple myeloma, lymphoma	Phase 1/2
	PLX51107 (po)	Solid tumors, AML, myeloproliferative neoplasm	Phase 1
	ABBV-075 (po)	Breast cancer, AML, NSCLC multiple myeloma, prostate cancer	Phase 1
Bivalent BRD4 inhibitors	AZD5153 (po)	Malignant solid tumors, lymphoma, ovarian cancer, breast cancer, pancreatic cancer, prostate cancer	Phase 1

AML: Acute myeloid leukemia; NMC: NUT midline carcinoma; TNBC: Triple-negative breast cancer; CRPC: Castration resistant prostate cancer; NSCLC: Non-small-cell lung cancer

床试验中(NCT01713582),口服剂量从 10 mg/d 增加到 160 mg/d(3 周为一疗程,前 2 周给药),最终确定了其安全给药剂量为 80 mg/d,作为Ⅱ期临床试验的推荐剂量^[21]。治疗过程中,部分患者出现血小板减少、胃肠道毒性、胆红素升高、疲劳等轻中度不良反应^[21]。这些不良反应是可控的,且随着治疗的中断而消退。TEN-010 的Ⅰ期临床试验(NCT01987362)采用皮下给药方式,剂量从 0.03 mg/kg 增加到 0.85 mg/kg(3 周为一疗程,前 2 周给药)。接受高剂量治疗(0.45 mg/kg)的患者均有不同程度的肿瘤消退。CPI-0610 是一种异噁唑类 BRD4 抑制剂,已经完成多发性骨髓瘤、淋巴瘤的Ⅰ期临床试验,与鲁索替尼联合治疗多种肿瘤的Ⅰ、Ⅱ期临床试验正在进行中。在 CPI-0610 的淋巴瘤Ⅰ期临床试验中(NCT01949883),评估了从 6 mg/d 增加到 300 mg/d(3 周为一疗程,前 2 周给药)的口服剂量。结果显示,CPI-0610 耐受性良好,最大耐受剂量是 225 mg/d,不良反应与 OTX015 类似,在晚期淋巴瘤患者中具有抗肿瘤活性^[22]。在多发性骨髓瘤细胞中,CPI-0610 抑制 Ikaros 家族锌指蛋白 1、干扰素调节因子 4 和致癌基因 MYC 的表达,通过 G₁ 细胞周期阻滞和半胱氨酸蛋白酶依赖的凋亡途径对肿瘤细胞产生强大的毒性^[23]。

AZD5153 是一种新型二价型 BRD4 抑制剂,可同时结合 BRD4 中的两个溴结构域,具有更强的抗肿瘤活性,正在进行Ⅰ期临床试验(NCT03205176、NCT03527147)。AZD5153 抑制 Myc、E2F 和哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)信号通路,在急性髓系白血病、多发性骨髓瘤和淋巴瘤的异种移植模型中显著抑制肿瘤生长^[24]。Shen 等^[25]发现,AZD5153 下调前列腺癌细胞中细胞周期蛋白 D1(cyclin D1)、Myc、Bcl-2、FOS 样抗原 1(FOSL1)和细胞周期蛋白依赖性激酶 4(CDK4)的表达,引起细胞周期阻滞和细胞凋亡。进一步研究表明,蛋白激酶 B(protein kinase B, AKT)是 AZD5153 的主要耐药因子,AZD5153 处理前列腺癌异种移植小鼠可抑制肿瘤的生长,联合 AKT 抑制剂 MK-2206 可进一步增强抗肿瘤活性。另外,AZD5153 可下调肿瘤相关巨噬细胞上 PD-L1 的表达,并使其从 M2 型向 M1 型转化,同时增强 CD₈⁺T 细胞的活化,从而重塑卵巢癌中的免疫微环境^[26]。

BRD4 抑制剂竞争性结合 BRD4 的乙酰赖氨酸结合位点,阻断 BRD4 与组蛋白乙酰化赖氨酸的结合,拮抗 BRD4 对肿瘤发生发展的促进作用。2010 年,Filippakopoulos 等^[9]报道了第 1 个三氮唑类 BRD4 抑制剂 JQ1,它在多项研究中均表现出良好的抗肿瘤活性,Maggisano 等^[27]制备了包载 JQ1 的聚乳酸-羟基乙酸共聚物纳米粒 N-JQ1。用 N-JQ1 处理三阴性乳腺癌细胞后,可显著降低细胞活力,减少细胞迁移。为了改善 JQ1 半衰期短的问题,研究人员对其叔丁酯基进行结构修饰,得到一系列药效持久且抑制活性较好的 BRD4 抑制剂。三氮唑类 BRD4 抑制剂(JQ1、OTX015、TEN-010、I-BET762 等)三氮唑环上的 3 位氮原子与乙酰化赖氨酸识别口袋的 Asn140 以氢键方式结合,2 位氮原子与 Tyr97 通过水分子以氢键相连,氯苯基位于 WPF 区域(ZA 环、BC 环和 αZ 形成),通过疏水作用与 BRD4 结合^[1,3](图 2)。研究表明,该类抑制剂三氮唑环上的 3 位氮原子与 Asn140 形成氢键是 BRD4 抑制活性所必需的;三氮唑环上的甲基作为最优基团与 BRD4 的甲基疏水空腔结合,若以其他基团取代,与 BRD4 的结合能力则大大下降;氮杂草环上的侧链也会影响化合物与 BRD4 的结合能力^[28]。氯苯基是与 WPF 区域结合能力最好且有较低不良反应的官能团,决定了 BRD4 抑制剂对 BRD4 的选择性。基于此,以对羟基苯羧酰胺取代 JQ1 氮杂草环上的叔丁酯侧链,得到 OTX015,其 IC₅₀ 为 92~112 nmol/L,抑制活性较 JQ1 (IC₅₀ 为 77 nmol/L)略有降低,但半衰期有所延长^[8]。以酰胺替换酯基,化合物的抗水解能力增强,TEN-010 和 I-BET762 的稳定性较 JQ1 大大提高。此外,I-BET762 稠合芳环上的甲氧基也关系着与 BRD4 的结合能力。

异噁唑类 BRD4 抑制剂(CPI-0610, PLX51107 等)的异噁唑环上的氧原子与 Asn140 以氢键方式结合,所以该氧原子是 BRD4 抑制活性所必需的。CPI-0610 对 BD1 的 IC₅₀ 为 39 nmol/L,具有良好的药代动力学参数;PLX51107 与 BD1 或 BD2 结合,K_d 分别为 1.7 nmol/L 和 6.1 nmol/L,是一种有效的 BRD4 抑制剂^[4]。PFI-1 是一种喹啉酮类 BRD4 抑制剂,喹啉酮中的羰基氧及氮氢同时与 Asn140 形成氢键,从而与 BRD4 结合。PFI-1 对白血病细胞具有活性,但其有效性比 JQ1 低^[8]。Gosmini 等^[29]

经构效关系分析,得到抑制活性很强的四氢喹啉类BRD4抑制剂I-BET726,其乙酰基上的氧、羧基分别与Asn140、Tyr97形成氢键,此外,甲基的构象也对BRD4抑制活性影响较大。I-BET726可强效抑制神经母细胞瘤细胞的增殖,IC₅₀为75 nmol/L^[29]。乙酰吡咯类BRD4抑制剂(如XD14)与BRD4的作用方式与上述各类抑制剂略有不同,XD14的羰基氧与Asn140和Tyr97形成氢键,吡咯环的氮原子与Pro82以氢键结合,苯磺酰胺与WPF区域形成CH-π共轭,增强了与BRD4的结合能力^[3,8]。Tanaka等^[30]以聚乙二醇将两个JQ1分子连在一起,开发了一种二价型BRD4抑制剂MT1,其对BD1的IC₅₀为0.789 nmol/L,大大提高了抗肿瘤活性。

2.2 BRD4降解剂

BRD4降解剂可有效诱导BRD4降解,在抑制肿瘤细胞生长和促进细胞凋亡方面比相应的BRD4抑制剂更有效,是一种极具前景的BRD4抑制策略。基于蛋白水解靶向嵌合分子(protein proteolysis-targeting chimeras, PROTACs)技术开发的BRD4降解剂由3部分组成:BRD4抑制剂、E3泛素连接酶配体和连接链^[31]。BRD4降解剂分别与BRD4和E3泛素连接酶结合,形成一种三元复合物,诱导BRD4泛素化,进而使BRD4被蛋白酶体降解,发挥抗肿瘤作用^[4](图3)。近年来,研究人员设计出一系列BRD4降解剂(图4),根据E3泛素连接酶的类型,可将其分为两类:基于CRBN(Cul4-Rbx1-DDB1-cereblon)的BRD4降解剂和基于VHL(Von Hippel-Lindau)的BRD4降解剂^[4](表2)。

基于CRBN的BRD4降解剂主要有dBET1和ARV-825等。dBET1是由JQ1和沙利度胺合成得到的,以人白血病细胞MV4-11荷瘤小鼠为模型评价其体内效果,发现可显著抑制肿瘤生长^[32]。ARV-825是由OTX015和泊马度胺(pomalidomide)合成的另一个BRD4降解剂,研究表明ARV-825可

将BRD4招募到E3泛素连接酶上,使Burkitt淋巴瘤细胞中的BRD4快速降解,抑制下游c-Myc表达,且与OTX015相比,其抑制增殖和诱导凋亡的能力更强^[33]。He等^[34]研究发现,ARV-825可诱导甲状腺癌细胞中BRD4蛋白降解进而下调c-Myc、Bcl-xL和cyclin D1的表达。体内研究表明,经口给予ARV-825能显著抑制TPC-1异种移植小鼠肿瘤的生长。最近,基于光控释放的新型BRD4降解剂受到研究人员青睐。Xue等^[31]和Liu等^[35]将4,5-二甲氧基-2-硝基苄基盐酸盐作为光活性部分修饰到dBET1上,分别得到化合物pc-PROTAC和opto-dBET1,实现了dBET1在365 nm光照下的特异性释放,以减轻全身给药时的不良反应。这为新型BRD4降解剂的开发提供了重要参考。

以肿瘤抑制蛋白VHL为E3泛素连接酶设计的BRD4降解剂也具有良好的抗肿瘤效果。MZ1由JQ1和VH-032连接而成,与dBET1相比,它可优先降解BRD4,表现出良好的选择性。Raina等^[36]利用OTX015和VHL-2合成得到另一种BRD4降解剂ARV-771。在去势抵抗前列腺癌细胞中,ARV-771降解BRD4,抑制雄激素受体FL-AR和AR-V7的表达。体内抑瘤实验表明,ARV-771可抑制22Rv1异种移植小鼠肿瘤的生长。Sun等^[37]研究发现ARV-771对BRD4的降解能力比ARV-825更强,且与OTX015相比,ARV-771能显著延长套细胞淋巴瘤MCL Z138异种移植小鼠的生存期。

3 在肿瘤联合治疗中的应用

抑制BRD4可抑制肿瘤细胞中关键基因的转录,阻止DNA损伤修复,下调PD-L1表达,从而抑制肿瘤的增殖和转移。多项研究表明,将BRD4抑制策略与其他治疗方法联合应用,协同不同的治疗机制,产生更好的治疗效果(图5)。

3.1 BRD4抑制与化学治疗

化疗药物直接杀伤肿瘤细胞,在临床肿瘤治

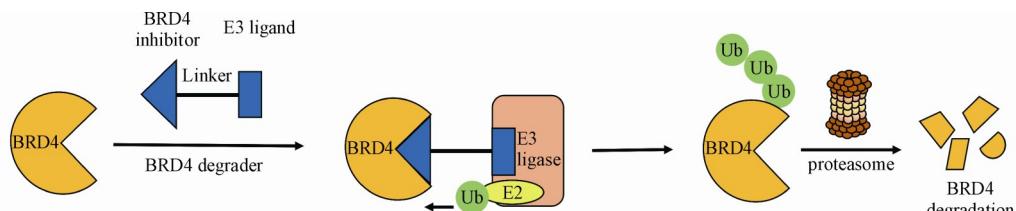


Figure 3 Mechanism of BRD4 degraders^[4,31]

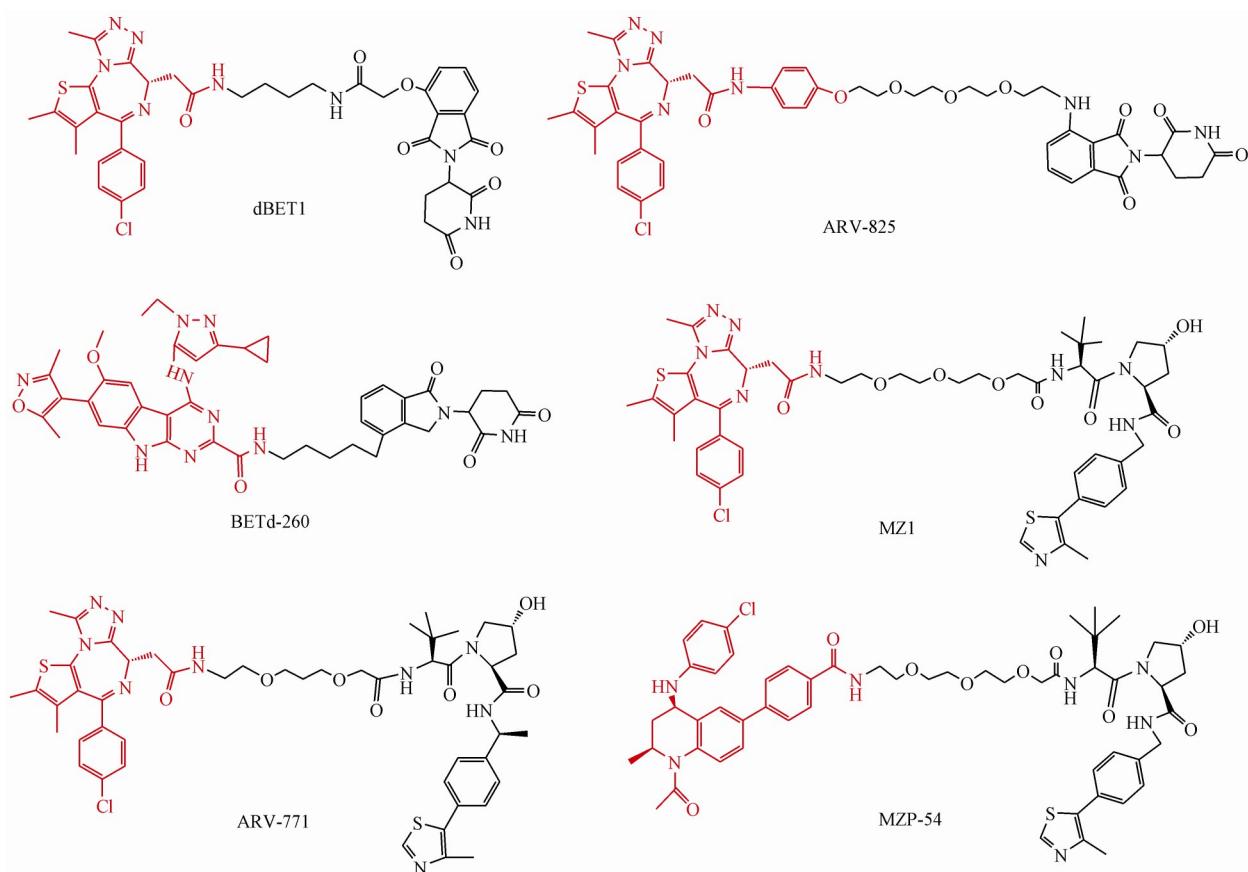


Figure 4 Structures of some BRD4 degraders

Table 2 BRD4 degraders and their components

E3 ligase	Drug	BRD4 inhibitor	E3 ligand
CRBN	dBET1	JQ1	Thalidomide
	ARV-825	OTX015	Pomalidomide
	BETd-260	HJB97	Lenalidomide
VHL	MZ1	JQ1	VH-032
	ARV-771	OTX015	VHL-2
	MZP-54	I-BET726	VH-032

CRBN: Cul4-Rbx1-DDB1-cereblon; VHL: Von Hippel-Lindau

疗中应用广泛。BRD4 抑制剂与化疗药物联用, 是一种极具临床治疗潜力的策略。烷化剂破坏肿瘤细胞 DNA, BRD4 抑制剂阻止 DNA 损伤修复, 二者联合使用, 可加剧 DNA 损伤。Lam 等^[38]开发了一种共载替莫唑胺和 JQ1 的转铁蛋白功能化纳米粒 (Tf-NP), 利用共载两药的 Tf-NP 处理胶质瘤荷瘤小鼠后, DNA 损伤标志物和细胞凋亡标志物增加, 小鼠存活率显著高于单独给药组。I-BET762 与吉西他滨联用在胰腺癌荷瘤小鼠中显著降低了肿瘤体积和质量, 表现出比单药更好的效果^[39]。I-BET762 诱导胰腺癌细胞 G₀/G₁ 期细胞周期阻滞, 抑

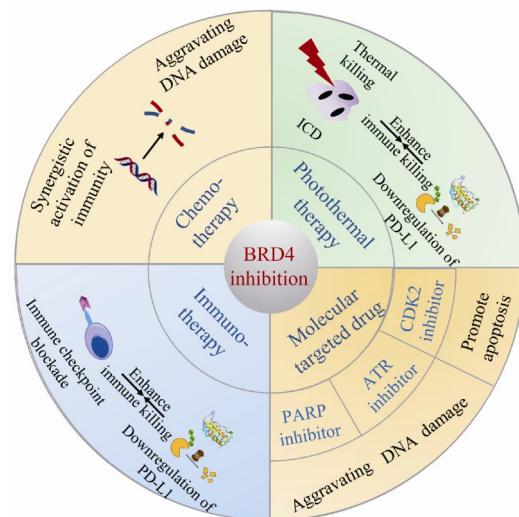


Figure 5 Mechanism of combination therapy with BRD4 inhibitors

制转移干细胞因子, 上调与化疗耐药相关的唯 BH3 蛋白 Bim 的表达, 可协同吉西他滨发挥细胞杀伤作用, 同时延缓耐药。Wang 等^[40]制备了共载紫草素和 JQ1 的乳铁蛋白仿生纳米粒 (Man-LF NPs), 紫草素诱导 ICD 效应, JQ1 下调 PD-L1 的表达, 二者

协同激活免疫系统,提高抗肿瘤能力。在以CT26荷瘤小鼠为模型的体内抑瘤实验中,Man-LF NPs组抑瘤率为84%,两游离药混合组和紫草素单药组分别为61%和45%,说明共载两药的Man-LF NPs比两药单独使用有更好的抗肿瘤效果。

3.2 BRD4抑制与光热治疗

近红外光照射后,光热剂产生的热可杀伤肿瘤细胞,还能产生ICD效应,激活肿瘤免疫。BRD4抑制联合光热治疗,可以强化机体免疫应答,协同消灭肿瘤细胞。Wang等^[41]将JQ1和吲哚菁绿共载于自体肿瘤细胞并以水凝胶包封,获得疫苗PVAX,用于术后肿瘤治疗。在808 nm近红外光照射下,4T1荷瘤小鼠体内的吲哚菁绿产热破坏肿瘤细胞,触发肿瘤抗原释放,激活机体抗原递呈与免疫治疗;同时PVAX释放JQ1,下调PD-L1表达,增强CD₈⁺T细胞活性,增强免疫治疗效果。另有研究发现,负载JQ1的聚多巴胺纳米粒(PDMN-JQ1)对治疗PD-L1抗体反应有限三阴性乳腺癌具有积极意义^[42]。JQ1抑制BRD4-c-Myc轴,下调PD-L1的表达,载体聚多巴胺可发挥光热治疗作用。用药物处理4T1荷瘤小鼠后,PDMN-JQ1组的抑瘤效果明显优于游离的JQ1组($P = 0.02$)和单独的PDMNs组($P = 0.02$)。PDMN-JQ1同时发挥了c-Myc靶向治疗、光热治疗和免疫治疗的作用,这种治疗策略具有推广到其他实体瘤治疗的潜力。

3.3 BRD4抑制与免疫治疗

BRD4抑制可下调PD-L1的表达,解除肿瘤细胞的免疫抑制,与免疫检查点阻断剂联合,具有巨大的潜力和临床应用价值。将JQ1与CTLA-4单抗联合使用能有效治疗前列腺癌^[43]。JQ1阻断CD274编码的PD-L1表达,增加肿瘤MHC-I的递呈,增强CD₈⁺T细胞作用,与CTLA-4单抗联合使用对DU145和PC3异种移植小鼠的抑瘤效果更好,延长了荷瘤小鼠生存期。Hogg等^[44]将JQ1和PD-1单抗联合用于淋巴瘤荷瘤小鼠,与单独用药组相比,联合用药组可显著延长小鼠生存期,表明联合治疗可协同激活免疫。

3.4 BRD4抑制与分子靶向药物

多项研究表明,BRD4抑制剂与聚腺苷二磷酸核糖聚合酶(poly ADP-ribose polymerase, PARP)抑制剂、共济失调毛细血管扩张突变基因Rad3相关激酶(ataxia telangiectasia and Rad3-related,

ATR)抑制剂、细胞周期蛋白依赖性激酶2(cyclin-dependent kinases 2, CDK2)抑制剂等分子靶向药物联合使用,可增强抗肿瘤效果。Fehling等^[45]研究了BRD4抑制剂JQ1或I-BET762与PARP抑制剂奥拉帕尼或维利帕尼联用对于胆管癌细胞系的影响,发现JQ1使c-Myc及其下游靶点Chk1的表达下降,DNA损伤标志物γH2AX增加,而PARP抑制剂抑制DNA损伤修复,联合使用产生协同毒性作用。体内抑瘤实验表明,JQ1和奥拉帕尼同时使用可显著抑制KKU-055胆管癌荷瘤小鼠肿瘤的生长。BRD4抑制剂RVX2135可增强细胞对ATR抑制剂AZ20的敏感性,二者联合使用可加剧DNA损伤,协同诱导淋巴瘤细胞死亡,抑制荷瘤小鼠肿瘤的生长^[46]。CDK2抑制剂Milciclib和JQ1联用可共同抑制c-Myc的表达,引起细胞周期阻滞和细胞凋亡,联合治疗显著延长了髓母细胞瘤GTML2同种异体移植小鼠的生存期^[47]。

4 耐药性

抑制BRD4的策略虽然具有确切的抗肿瘤作用,但是在白血病、前列腺癌、乳腺癌等多种肿瘤中显示出一定的耐药性。主要表现为对c-Myc等肿瘤相关基因抑制效率降低、诱导肿瘤细胞凋亡能力不强和抗增殖活性低下等^[48]。耐药机制之一是肿瘤细胞相关基因转录的恢复。Rathert等^[48]发现,持续使用JQ1可通过Wnt信号通路代偿性上调c-Myc,使治疗效果下降。在三阴性乳腺癌中,蛋白磷酸酶2A下调而导致的BRD4过磷酸化可恢复BCL2L1/BCL-XL基因转录,产生对BRD4抑制剂的耐药现象^[49]。另外,肿瘤细胞BRD4的积累也可产生耐药性。例如,核受体辅阻遏物2-组蛋白去乙酰化酶10-去泛素化酶3-溴结构域蛋白4(nuclear receptor corepressor 2-histone deacetylase 10-deubiquitylating enzyme 3-bromodomain-containing protein 4, NCOR2-HDAC10-DUB3-BRD4)信号通路中NCOR2-HDAC10复合物的破坏会引起BRD4上调^[50]。一些肿瘤中,NCOR2基因缺失或突变使去泛素化酶DUB3过度表达,拮抗E3-泛素连接酶介导的BRD4的泛素化降解,使BRD4水平升高。斑点型锌指结构蛋白/BRD4信号轴的阻断也会引起BRD4无法通过泛素化降解而上调,抵抗以BRD4为靶点的治疗手段诱导的细胞生长停滞和凋亡^[51]。

5 总结展望

本文介绍了 BRD4 的结构及其在肿瘤中的作用,综述了 BRD4 的抑制策略、在肿瘤联合治疗中应用以及耐药性的研究进展。BRD4 抑制剂和降解剂可强效抑制 BRD4,进而抑制肿瘤细胞增殖,促进免疫杀伤,具有良好的抗肿瘤活性。目前,OTX015、CPI-0610、AZD5153 等多种 BRD4 抑制剂已经进入临床研究阶段;将 BRD4 抑制与化学治疗、光热治疗、免疫治疗等联合用于肿瘤治疗,可产生协同抗肿瘤作用,极具临床应用前景。

虽然 BRD4 的抑制策略已取得很多进展,但仍有一些问题需要解决:一是临床试验中患者具有轻中度的不良反应,可进一步进行结构改造或开发安全性更好的 BRD4 抑制剂;二是积极开发二价型 BRD4 抑制剂和新型 BRD4 降解剂,提高抗肿瘤活性;三是持续用药产生耐药性,应深入研究其耐药机制并找寻降低耐药性的方法;再者,结合纳米药物递送系统,实现体内靶向递送,提高治疗效果。相信在不久的将来,靶向 BRD4 的治疗策略会在临床肿瘤治疗中发挥更大的作用。

References

- [1] Pérez-Salvia M, Esteller M. Bromodomain inhibitors and cancer therapy: from structures to applications [J]. *Epigenetics*, 2017, **12**(5):323-339.
- [2] Ghasemi S. Cancer's epigenetic drugs: where are they in the cancer medicines [J]? *Pharmacogenomics J*, 2020, **20**(3): 367-379.
- [3] Liu KJ, Zhang ZM, Ran T, et al. Advances in BET bromodomain protein inhibitors [J]. *J China Pharm Univ(中国药科大学学报)*, 2015, **46**(3):264-271.
- [4] Duan YC, Guan YY, Qin WP, et al. Targeting Brd4 for cancer therapy: inhibitors and degraders [J]. *Medchemcomm*, 2018, **9**(11):1779-1802.
- [5] Shi JW, Vakoc CR. The mechanisms behind the therapeutic activity of BET bromodomain inhibition [J]. *Mol Cell*, 2014, **54**(5):728-736.
- [6] Segura MF, Fontanals-Cirera B, Gaziel-Sovran A, et al. BRD4 sustains melanoma proliferation and represents a new target for epigenetic therapy [J]. *Cancer Res*, 2013, **73**(20):6264-6276.
- [7] Goundiam O, Gestraud P, Popova T, et al. Histo-genomic stratification reveals the frequent amplification/overexpression of CCNE1 and BRD4 genes in non-BRCAneSS high grade ovarian carcinoma [J]. *Int J Cancer*, 2015, **137**(8):1890-1900.
- [8] Ferri E, Petosa C, McKenna CE. Bromodomains: structure, function and pharmacology of inhibition [J]. *Biochem Pharmacol*, 2016, **106**:1-18.
- [9] Filippakopoulos P, Qi J, Picaud S, et al. Selective inhibition of BET bromodomains [J]. *Nature*, 2010, **468**(7327):1067-1073.
- [10] Filippakopoulos P, Knapp S. Targeting bromodomains: epigenetic readers of lysine acetylation [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2014, **13**(5):337-356.
- [11] Stathis A, Bertoni F. BET proteins as targets for anticancer treatment [J]. *Cancer Discov*, 2018, **8**(1):24-36.
- [12] Doroshow DB, Eder JP, LoRusso PM. BET inhibitors: a novel epigenetic approach [J]. *Ann Oncol*, 2017, **28**(8):1776-1787.
- [13] Mochizuki K, Nishiyama A, Jang MK, 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] Zhu HR, Bengsch F, Svoronos N, et al. BET bromodomain inhibition promotes anti-tumor immunity by suppressing PD-L1 expression [J]. *Cell Rep*, 2016, **16**(11):2829-2837.
- [15] Andrieu GP, Shafran JS, Smith CL, et al. BET protein targeting suppresses the PD-1/PD-L1 pathway in triple-negative breast cancer and elicits anti-tumor immune response [J]. *Cancer Lett*, 2019, **465**:45-58.
- [16] Donati B, Lorenzini E, Ciarrocchi A. BRD4 and cancer: going beyond transcriptional regulation [J]. *Mol Cancer*, 2018, **17**(1):164.
- [17] Sun CY, Yin J, Fang Y, et al. BRD4 inhibition is synthetic lethal with PARP inhibitors through the induction of homologous recombination deficiency [J]. *Cancer Cell*, 2018, **33**(3): 401-416.e8.
- [18] Li X, Baek G, Ramanand SG, et al. BRD4 promotes DNA repair and mediates the formation of TMPRSS₂-ERG gene rearrangements in prostate cancer [J]. *Cell Rep*, 2018, **22**(3):796-808.
- [19] Bandaria JN, Qin PW, Berk V, et al. Shelterin protects chromosome ends by compacting telomeric chromatin [J]. *Cell*, 2016, **164**(4):735-746.
- [20] Berenguer-Daizé C, Astorgues-Xerri L, Odore E, et al. OTX015 (MK-8628), a novel BET inhibitor, displays *in vitro* and *in vivo* antitumor effects alone and in combination with conventional therapies in glioblastoma models [J]. *Int J Cancer*, 2016, **139**(9):2047-2055.
- [21] 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.
- [22] Blum KA, Abramson J, Maris M, et al. A phase I study of CPI-0610, a bromodomain and extra terminal protein (BET) inhibitor in patients with relapsed or refractory lymphoma [J]. *Ann Oncol*, 2018, **29**:iii7.
- [23] Siu KT, Ramachandran J, Yee AJ, et al. Preclinical activity of CPI-0610, a novel small-molecule bromodomain and extra-

- terminal protein inhibitor in the therapy of multiple myeloma [J]. *Leukemia*, 2017, **31**(8): 1760-1769.
- [24] Rhyasen GW, Hattersley MM, 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.
- [25] Shen G, Chen JC, Zhou YQ, et al. AZD5153 inhibits prostate cancer cell growth *in vitro* and *in vivo* [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, **50**(2): 798-809.
- [26] Li X, Fu Y, Yang B, et al. BRD4 inhibition by AZD5153 promotes antitumor immunity via depolarizing M2 macrophages [J]. *Front Immunol*, 2020, **11**: 89.
- [27] Maggiano V, Celano M, Malivindi R, et al. Nanoparticles loaded with the BET inhibitor JQ1 block the growth of triple negative breast cancer cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *Cancers*, 2019, **12**(1): 91.
- [28] Hewings DS, Rooney TP, Jennings LE, et al. Progress in the development and application of small molecule inhibitors of bromodomain-acetyl-lysine interactions [J]. *J Med Chem*, 2012, **55**(22): 9393-9413.
- [29] Gosmini R, Nguyen VL, 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.
- [30] Tanaka M, Roberts JM, Seo HS, et al. Design and characterization of bivalent BET inhibitors [J]. *Nat Chem Biol*, 2016, **12**(12): 1089-1096.
- [31] Xue G, Wang K, Zhou DL, et al. Light-induced protein degradation with photocaged PROTACs [J]. *J Am Chem Soc*, 2019, **141**(46): 18370-18374.
- [32] Winter GE, Buckley DL, Paulk J, et al. Drug development. Phthalimide conjugation as a strategy for *in vivo* target protein degradation [J]. *Science*, 2015, **348**(6241): 1376-1381.
- [33] Lu J, Qian Y, Altieri M, et al. Hijacking the E3 ubiquitin ligase cereblon to efficiently target BRD4 [J]. *Chem Biol*, 2015, **22**(6): 755-763.
- [34] He L, Chen C, Gao GY, et al. ARV-825-induced BRD4 protein degradation as a therapy for thyroid carcinoma [J]. *Aging*, 2020, **12**(5): 4547-4557.
- [35] Liu J, Chen H, Ma LN, et al. Light-induced control of protein destruction by opto-PROTAC [J]. *Sci Adv*, 2020, **6**(8): eaay5154.
- [36] Raina K, Lu J, Qian YM, et al. PROTAC-induced BET protein degradation as a therapy for castration-resistant prostate cancer [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, **113**(26): 7124-7129.
- [37] Sun B, Fiskus W, Qian Y, et al. BET protein proteolysis targeting chimera (PROTAC) exerts potent lethal activity against mantle cell lymphoma cells [J]. *Leukemia*, 2018, **32**(2): 343-352.
- [38] Lam FC, Morton SW, Wyckoff J, et al. Enhanced efficacy of combined temozolamide and bromodomain inhibitor therapy for gliomas using targeted nanoparticles [J]. *Nat Commun*, 2018, **9**(1): 1991.
- [39] Xie F, Huang M, Lin X, et al. The BET inhibitor I-BET762 inhibits pancreatic ductal adenocarcinoma cell proliferation and enhances the therapeutic effect of gemcitabine [J]. *Sci Rep*, 2018, **8**(1): 8102.
- [40] Wang H, Tang Y, Fang Y, et al. Reprogramming tumor immune microenvironment (TIME) and metabolism via biomimetic targeting codelivery of shikonin/JQ1 [J]. *Nano Lett*, 2019, **19**(5): 2935-2944.
- [41] Wang TT, Wang DG, Yu HJ, et al. A cancer vaccine-mediated postoperative immunotherapy for recurrent and metastatic tumors [J]. *Nat Commun*, 2018, **9**(1): 1532.
- [42] Tian Y, Wang XF, Zhao S, et al. JQ1-loaded polydopamine nanoplatform inhibits c-MYC/programmed cell death ligand 1 to enhance photothermal therapy for triple-negative breast cancer [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2019, **11**(50): 46626-46636.
- [43] Mao W, Ghasemzadeh A, Freeman ZT, et al. Immunogenicity of prostate cancer is augmented by BET bromodomain inhibition [J]. *J Immunother Cancer*, 2019, **7**(1): 277.
- [44] Hogg SJ, Vervoort SJ, Deswal S, et al. BET-bromodomain inhibitors engage the host immune system and regulate expression of the immune checkpoint ligand PD-L1 [J]. *Cell Rep*, 2017, **18**(9): 2162-2174.
- [45] Fehling SC, Miller AL, Garcia PL, et al. The combination of BET and PARP inhibitors is synergistic in models of cholangiocarcinoma [J]. *Cancer Lett*, 2020, **468**: 48-58.
- [46] Muralidharan SV, Bhadury J, Nilsson LM, et al. BET bromodomain inhibitors synergize with ATR inhibitors to induce DNA damage, apoptosis, senescence-associated secretory pathway and ER stress in Myc-induced lymphoma cells [J]. *Oncogene*, 2016, **35**(36): 4689-4697.
- [47] Bolin S, Borgenvik A, Persson CU, et al. Combined BET bromodomain and CDK2 inhibition in MYC-driven medulloblastoma [J]. *Oncogene*, 2018, **37**(21): 2850-2862.
- [48] Rathert P, Roth M, Neumann T, et al. Transcriptional plasticity promotes primary and acquired resistance to BET inhibition [J]. *Nature*, 2015, **525**(7570): 543-547.
- [49] Shu SK, Lin CY, He HH, et al. Response and resistance to BET bromodomain inhibitors in triple-negative breast cancer [J]. *Nature*, 2016, **529**(7586): 413-417.
- [50] Jin X, Yan Y, Wang D, et al. DUB₃ promotes BET inhibitor resistance and cancer progression by deubiquitinating BRD4 [J]. *Mol Cell*, 2018, **71**(4): 592-605.
- [51] Dai X, Gan W, Li X, et al. Prostate cancer-associated SP0P mutations confer resistance to BET inhibitors through stabilization of BRD4 [J]. *Nat Med*, 2017, **23**(9): 1063-1071.