

综述与专论

基于 PROTACs 技术的表观遗传抗肿瘤药物研究进展

吕倩倩, 梁嘉杰, 季红*

(广州医科大学 药学院, 广东 广州 511436)

摘要:蛋白水解靶向嵌合体(Proteolysis Targeting Chimeras, PROTACs)是异型双功能分子,可通过天然泛素蛋白酶体系统选择性地降解目标蛋白质。这种化学诱导蛋白质降解的新策略为药物发现提供了新的可能性,因此已被应用于各种靶标,包括(核)受体、激酶和转录因子等。表观遗传蛋白在肿瘤的发生、发展、转移和侵袭中发挥着重要作用,被认为是抗肿瘤药物研发的重要靶点。由于其小分子抑制剂易产生脱靶效应和耐药性,而 PROTACs 技术为解决这些问题提供了一种全新的策略,在表观遗传抗肿瘤药物研发中具有重要意义。介绍了 PROTACs 的原理及优势,系统综述了采用该技术靶向降解表观遗传蛋白的最新研究进展,并展望了基于 PROTACs 技术的表观遗传靶向抗肿瘤药物的发展前景。

关键词:蛋白水解靶向嵌合体;表观遗传;抗肿瘤药物;研究进展

中图分类号:R914 **文献标识码:**A **文章编号:**0258-3283(2024)05-0001-09

DOI:10.13822/j.cnki.hxsj.2023.0790

Recent Advances in Epigenetic Antitumor Drugs Based on Proteolysis Targeting Chimeras LV Qian-qian, LIANG Jia-jie, JI Hong* (School of Pharmaceutical Sciences, Guangzhou Medical University, Guangzhou 511436, China)

Abstract:Proteolysis targeting chimeras (PROTACs) are heteromorphous bifunctional molecules designed to selectively degrade target proteins through the natural ubiquitin-proteasome system. This novel strategy of chemically induced protein degradation has offered exciting avenues for drug discovery, with applications across various targets, including nuclear receptors, kinases, and transcription factors. Epigenetic proteins play an important role in tumor initiation, progression, metastasis, and invasion, making them promising targets for the development of anti-tumor drugs. Given that conventional small molecule inhibitors directed at epigenetic targets may lead to off-target effects and drug resistance, PROTACs technology provides a promising solution to these challenges. Therefore, it holds significant promise for advancing the field of epigenetic anti-tumor therapy. Herein, this discussion will delve into the principles and advantages of PROTACs, providing comprehensive overview of the recent research progress of epigenetic protein degradation using PROTACs technology, and offer insights into the future prospects of epigenetic targeted anti-tumor drugs based on PROTACs technology.

Key words:proteolysis targeting chimeras; epigenetics; antitumor drugs; research progress

癌症作为一种高发性的重大疾病,一直严重威胁着人类健康。数十年来,其发病率和死亡率一直呈现上升趋势^[1]。2020 年全球癌症统计报告显示,新发癌症病例已达 1 929 万,其中死亡患者总数将近 1 000 万^[2]。药物是治疗癌症必不可少的重要手段,开发新的抗肿瘤药物一直是新药研究的重要方向之一。

近年来,蛋白水解靶向嵌合体(Proteolysis Targeting Chimeras, PROTACs)技术飞速发展起来。与传统小分子抑制剂相比,PROTACs 通过靶向降解目标蛋白显示出独特的优势,例如作用更有效和持久、选择性更强、潜在毒性更低、克服耐药性、靶点范围广等^[3]。迄今为止,已经开发出的 PROTACs 药物涉及的靶蛋白有 50 多种,包括

ALK^[4]、ER^[5]、PI3K^[6]、STAT3^[7]、CD71^[8]等,已被成功用于癌症、神经退行性疾病、自身免疫性疾病等多种疾病的治疗研究中。表观遗传调控是一个动态、可逆、可遗传的过程,不涉及 DNA 序列的变化,但与细胞增殖、分化和凋亡密切相关,这使

收稿日期:2023-12-02;网络首发日期:2024-01-18

基金项目:广东省自然科学基金项目(2018A0303130139);广州医科大学科研能力提升计划项目(强基项目)。

作者简介:吕倩倩(1997-),女,甘肃庆阳人,硕士生,主要研究方向为抗肿瘤药物的活性评价及机制研究。

通讯作者:季红, E-mail: dljih@126.com。

引用本文:吕倩倩,梁嘉杰,季红.基于 PROTACs 技术的表观遗传抗肿瘤药物研究进展[J].化学试剂,2024,46(5):1-9。

得表观遗传靶点在肿瘤治疗中具有重要意义^[9]。目前,靶向表观遗传靶点的 PROTACs 药物取得了重要进展,在体内外活性评价中显示出良好的效果,例如 FHD-609、CFT-9634 和 RNK-05047 已进入临床 I/II 期研究^[10]。本文介绍了 PROTACs 技术的原理及优势,系统综述了基于 PROTACs 技术的表观遗传学靶向抗肿瘤药物的最新研究进展,并展望了该技术在表观遗传抗肿瘤药物研发中的应用前景。

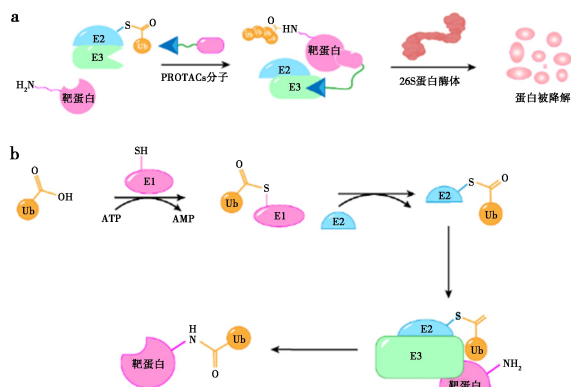
1 PROTACs 概述

2022 年, Crews 等^[11]提出了 PROTACs 概念,即利用细胞内的天然泛素蛋白酶体系统诱导靶蛋白降解的全新药物开发技术。PROTACs 是由靶蛋白的配体和 E3 泛素连接酶配体通过连接子相连接组成的异源双功能化合物^[12]。PROTACs 分子结构中的靶蛋白配体可以靶向捕获靶蛋白,分子结构另一端的 E3 泛素连接酶配体便开始招募 E3 泛素连接酶到靶蛋白附近,形成“靶蛋白-PROTAC-E3 泛素连接酶”三元复合物,为靶蛋白贴上“废弃物”(泛素化, Ubiquitin, Ub) 标签。被 Ub 标记的靶蛋白通过细胞内的蛋白酶体 26S 识别并降解。当靶蛋白被降解后,这种双功能分子能够多次循环发挥新一轮的降解作用^[13](图 1a)。PROTACs 的泛素化过程是由一系列名为 E1、E2、E3 的泛素化酶介导的。首先,泛素甘氨酸端的羧基(—COOH) 连接到泛素活化酶 E1 的巯基(—SH), 这个步骤需要以 ATP 作为能量,使其在泛素和 E1 之间形成一个硫酯键(—S—CO—)。然后, E1 将活化后的泛素通过交酯化过程交给泛素结合酶 E2。最后,泛素连接酶 E3 介

导泛素从 E2 上转运到靶蛋白的赖氨酸残基上,完成对靶蛋白的泛素化标记^[14](图 1b)。

与传统的小分子蛋白抑制剂相比, PROTACs 显示出很多突出的优势。PROTACs 对靶蛋白的结合力要求并不严格,只需极低的结合力便能诱导靶蛋白发生泛素化从而被降解^[15]。由于 PROTACs 药物对目标蛋白的降解过程相当于一种催化作用,不需要直接抑制目标蛋白的功能活性,也不需要与目标蛋白长时间和高强度的结合,对于没有活性位点的支架蛋白等不可成药靶点也同样具有作用潜力^[15]。因此, PROTACs 可以靶向不可成药的靶点。降解后的 PROTACs 分子可循环作用,只需催化剂量即可触发靶蛋白降解。这种小剂量即可达到高降解活性的特点,大大减少了给药剂量,降低了毒副作用^[16]。在克服耐药性方面, PROTACs 也明显优于小分子抑制剂。由于大多数蛋白质的再合成速度很慢, PROTACs 药物一旦催化先前存在的蛋白被降解耗尽,即使在 PROTACs 药物完全清除后,细胞可能仍需要一段相当长的时间才能将蛋白质库恢复生理信号水平,从而使其具备不易耐药、作用时间延长的优点^[17]。

在对 PROTACs 的研究中,除了靶蛋白的配体外,对 E3 泛素连接酶的研究也较为深入。目前在人类基因组中已经发现了 600 多个 E3 泛素连接酶,但仅有少数被应用于 PROTACs 药物设计中,主要为 MDM2、IAPs、VHL 和 CRBN 等^[18]。其中, VHL 和 CRBN 是 PROTACs 药物中应用最多的两种。VHL-1、泊马度胺和来那度胺分别是 VHL 和 CRBN 最常用的配体。由于 VHL-1 分子量适中,成药性高,2015 年 Ciulli 团队首次报告了以 VHL-1 作为 E3 连接酶配体靶向 BRD4 的 PROTACs 分子 MZ1^[19]。MZ1 可以高效、迅速地诱导 BRD4 降解,为高选择性、高效能靶向 BRD4 的 PROTACs 药物开发奠定了基础。此后报道的 ARV-766、VZ-185、DT-2216、ARD-69^[20] 和 XTF-262 等均是基于 VHL 配体设计合成的 PROTACs 分子。此外,度胺类化合物以其分子量较低、口服生物利用度高、蛋白结合面大、靶点适应性广等特点,也被广泛用于 PROTACs 药物的设计中^[21]。以泊马度胺和来那度胺作为 E3 连接酶配体的 PROTACs 药物有 CC-885、CFT8919、MT-802、ARV-110 和 ARV-471 等,其中 ARV-110 和 ARV-471 已进入临床 I 期研究, ARV-471 已进入临床 III 期研究。



a. PROTACs 降解靶蛋白过程; b. 泛素化过程

图 1 PROTACs 降解靶蛋白的原理

Fig.1 Principle of PROTACs degrading target protein

2 表观遗传与肿瘤

表观遗传是指在基因的 DNA 序列不发生改变的情况下,对基因表达进行各类修饰,引起基因的功能发生可遗传的改变。表观遗传主要包括 DNA 甲基化、组蛋白修饰、染色质结构调控和非编码 RNA 调控^[22]。作为一个新兴的研究领域,表观遗传学不仅对基因的表达、调控、遗传有重要作用,而且在人体生长发育、肿瘤、炎症等疾病的发生、发展、诊断和治疗中也起着十分重要的作用^[23]。特别是在肿瘤领域,表观遗传为肿瘤的发生机制、环境影响和治疗方法等提供了重要线索,成为肿瘤研究的热点。

随着对恶性肿瘤研究的不断深入,DNA 甲基化和组蛋白修饰被认为是与肿瘤相关的最重要的两个表观遗传分子调控机制^[23]。DNA 甲基化是 DNA 分子在 DNA 甲基转移酶(DNMT)的作用下将甲基选择性地添加到特定碱基上的过程。研究表明,DNMT 表达水平在乳腺癌、子宫内膜癌和胃癌中异常上调,从而促进了肿瘤的发生、转移和侵袭^[24]。因此,DNMT 被视为 DNA 甲基化的重要靶点。组蛋白修饰是组蛋白在相关酶作用下发生甲基化、乙酰化、磷酸化、腺苷酸化、泛素化、ADP 核糖基化等修饰的过程,其中组蛋白甲基化和乙酰化是最常见的修饰形式。组蛋白甲基化主要由组蛋白甲基转移酶催化,EZH2 和 DOT1L 是研究最深入的重要的组蛋白甲基转移酶靶点^[25]。葛兰素史克(GSK)、诺华和 Epizyme 等医药公司对 EZH2、DOT1L 和其他甲基转移酶靶点(EED、LSD1 等)抑制剂都进行了研究开发。对组蛋白乙酰化的研究主要集中在组蛋白去乙酰化酶(HDACs)和溴结构域蛋白 4(BRD4)靶点上。研究表明,HDACs 与多种类型的癌症密切相关,例如淋巴瘤、非小细胞肺癌、结直肠癌和前列腺癌等^[26]。在肿瘤细胞中,HDACs 的过表达会导致细胞增殖、分化的失衡,以及抑癌基因的失活^[27]。BRD4 也被确认为许多类型肿瘤的治疗靶点,包括急性淋巴细胞白血病、多发性骨髓瘤、结肠癌和乳腺癌等^[28]。BRD4 通过组蛋白乙酰化调节 DNA 的复制和基因的表达,从而影响细胞周期的进程^[29]。

3 靶向表观遗传靶点的 PROTACs 抗肿瘤药物

在过去的几年里,靶向表观遗传靶点的小分子抑制剂取得重要进展。多个针对 EZH2、

DOT1L、EED、PRMT、PRMT5、HDAC、BRD4 等靶点的抑制剂先后上市或进入临床试验阶段。其中,EZH2 抑制剂他泽司他和伐美妥司他已成功上市,主要用于治疗手术切除的转移性或晚期上皮样肉瘤^[30]。恒瑞医药研发的 EZH2 抑制剂 SHR2554 对复发难治的滤泡性淋巴瘤、外周 T 细胞淋巴瘤和经典霍奇金淋巴瘤均显示出良好的抗肿瘤活性,目前已进入临床 III 期研究。EED 靶向小分子抑制剂,例如 FTX-6058、AZJH-16P、HJM-353 和 G-5918 等^[31],大多数还处于早期临床研究阶段,多用于治疗血液肿瘤和某些实体瘤。HDAC 抑制剂伏立诺他、FK-228、P×D101、LBH-589 和西达本胺等药物可引起乙酰化组蛋白蓄积,进而诱导肿瘤细胞周期停滞和细胞凋亡^[32]。伏立诺他和西达本胺已用于治疗皮肤 T-细胞淋巴瘤。BRD4 抑制剂的研究领域也较为活跃,各大制药公司研发的小分子 TEN-010、INCB057643、ABBV-075、CPI-0610 和 AZD-5153 等相继进入临床研究,但大多都在肿瘤适应症上遭遇失败^[33]。

近年来,随着 PROTACs 技术的兴起和在药物研究开发中的应用,将该技术与表观遗传学相结合,在有前景的表观遗传靶点上寻找新的突破口,研究开发新型的表观遗传抗肿瘤药物成为一个新的方向。近几年来,靶向 EZH2、EED、HDAC 和 BRD4 的 PROTACs 药物研究发展迅速,而针对 DOT1L、PRMT 和 PRMT5 等靶点的 PROTACs 分子尚未见报道。在此,综述了近 5 年来国内外在表观遗传 PROTACs 类抗肿瘤药物方面的研究进展。

3.1 PRC2 降解剂

组蛋白甲基化是蛋白质和核酸的一种重要修饰,受组蛋白甲基转移酶和组蛋白脱甲基化酶调控,能调节基因的表达和关闭、DNA 修复、干细胞的发育和分化以及 DNA 的复制等,与癌症、衰老、老年痴呆等许多疾病密切相关是表观遗传学的重要研究内容之一。核心蛋白复合体(Polycomb Repressive Complex2,PRC2)是组蛋白甲基转移酶复合体,可以催化三甲基化 H3K27(H3K27me3)的形成,抑制靶基因的转录^[34]。PRC2 的失调会导致恶性肿瘤的发生,因此 PRC2 被认为是肿瘤治疗的一个重要靶点。EZH2 作为 PRC2 的核心催化亚基,其过表达与几种预后不良的肿瘤紧密相关,包括乳腺癌、前列腺癌、肺癌和卵巢癌。EZH2 能催化组蛋白 H3 第 27 位赖氨酸发生三甲基化(H3K27me3),促进染色质缩合,抑制 PRC2

的转录^[35]。PRC2 的另一个亚基 EED 可以与细胞中的 H3K27me3 结合,增强 PRC2 的酶活性,从而提高其催化效率^[36]。研究表明,通过干扰 EZH2-EED 相互作用或 EZH2-EED-PROTAC 引起的 EZH2 和 EED 降解可以有效阻断 PRC2 的致癌活性^[37]。因此,通过靶向降解 EZH2 或 EED 阻断 PRC2 是一个非常具有前景的抗肿瘤策略。

3.1.1 EZH2 降解剂

2020 年, Ma 等^[38]设计了第一个口服的靶向 EZH2 降解剂 MS1943(图 2), MS1943 可以选择性降解 EZH2(IC₅₀为 120 nmol/L),体内活性评价显示,其能有效抑制三阴性乳腺癌细胞 MDA-MB-468 的生长。由于 EZH2 蛋白在多种癌细胞中均呈高表达,由此引起了生物医药学界的广泛关注。随后, Dale 等^[39]报道了一种新的选择性 EZH2-PROTAC 分子 MS8815(图 2)。该分子由他泽司他和 VHL 配体通过连接链相连接,在乳腺癌细胞 MDA-MB-453 中能以浓度依赖性、时间依赖性和蛋白酶体依赖性的方式诱导 EZH2 的高效降解,有效抑制多种三阴性乳腺癌细胞和原发性患者乳腺癌细胞的生长。金健课题组通过短链聚乙二醇将泊马度胺配体和 EZH2 抑制剂 C24(抑制 EZH2 的 IC₅₀为 12 nmol/L)连接起来,合成了 MS177(图 2)^[40]。MS177 在嗜酸性粒细胞白血病细胞 EOL-1 和人髓性单核细胞白血病细胞 MV4-11 中的半数最大降解浓度(DC₅₀)分别为(0.2±0.1) μmol/L 和(1.5±0.2) μmol/L,对 EZH2 的降解率分别可达到 82%和 68%。相比 EZH2 的小分子抑制剂, MS177 显示出更突出的抗肿瘤效应。

3.1.2 EED 降解剂

Potjewyd 等^[41]基于 EED 抑制剂和 VHL 配体(VH032)设计合成了 UNC6852(图 2)。UNC6852 采用含有 3 个亚甲基的短链烷基作为连接链,可

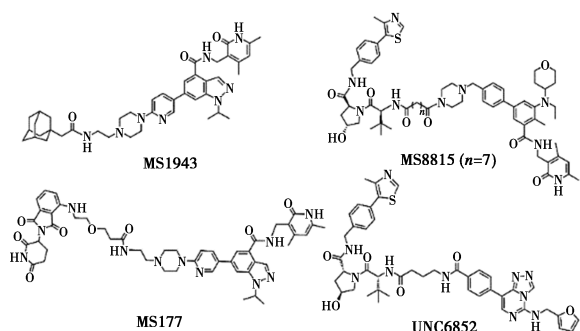


图 2 EZH2 和 EED 降解剂结构图

Fig.2 Structures of EZH2 and EED degraders

以高选择性地降解 EED、EZH2 和 SUZ3,导致 H3K27me3 水平降低,在弥漫大细胞淋巴瘤 DLBCL 中具有明显的抗增殖作用。

3.2 HDAC 降解剂

组蛋白的乙酰化修饰是由组蛋白乙酰化酶(Histoneacetyltransferase, HAT)和 HDACs 共同调控的。通常情况下,组蛋白的乙酰化会激活基因表达,而去乙酰化则会抑制基因表达^[42]。HDAC 是一类参与染色质重塑和基因表达的关键蛋白,目前在人体中已经发现 18 种 HDAC,分别属于 4 种类别(I、II、III 和 IV)^[43]。I 类 HDAC 包括 HDAC 1、2、3 和 8,其与酵母 RPD3 蛋白同源,分布在细胞核内,主要发挥抑制基因转录的功能。II 类 HDAC(HDAC 4、5、6、7、9 和 10),与酵母 HDA 1 蛋白具有同源性,分布在细胞质,同时在细胞核与细胞质之间穿梭^[44]。III 类 HDAC 是 NAD⁺依赖性蛋白脱乙酰酶,与 ADP 核糖基化转移酶共同参与调节多种细胞过程,如存活、衰老、应激反应和新陈代谢。唯一的 IV 类 HDAC 是 HDAC 11,其与 I 类和 II 类酶的催化核心区域具有序列同源性,但是不具有足够的相似性^[45]。靶向 HDAC 的 PROTACs 分子由 3 个部分组成:HDAC 的小分子抑制剂、连接子和 E3 连接酶配体。HDAC 小分子抑制剂、连接子的组成和长度、E3 连接酶配体以及其连接点都会对 HDAC 靶蛋白的降解产生重要影响。

3.2.1 HDAC 1、2、3 降解剂

CI-994 是早期研发的 HDAC 1、2、3 的选择性抑制剂。基于 CI-994,以泊马度胺作为 E3 连接酶配体开发的一系列 PROTACs,化合物 1(图 3)是最有效的非选择性 HDAC 降解剂^[46]。在低浓度下能降解巨噬细胞 RAW 264.7 中的 HDAC 3,在较高浓度下可降解 RAW 264.7 中的 HDAC 1

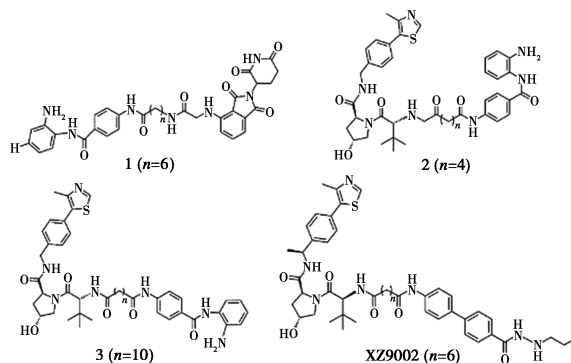


图 3 HDAC 1、2、3 降解剂结构图

Fig.3 Structures of HDAC 1, 2, 3 degraders

和 HDAC 2。在 CI-994 的基础上, Hodgkinson 团队开发了 4 个 PROTACs, 其中化合物 2、3(图 3)可降解结肠癌细胞 HCT-116 中的 HDAC 1、2、3, 不具有亚型选择性^[47]。后来开发的 XZ9002(图 3)是基于苯甲酰肼抑制剂的选择性 HDAC 3 降解剂, 在乳腺癌细胞 MDA-MB-468 中, 对 HDAC 3 显示出较高的亚型选择性, 而对 HDAC 1、HDAC 2 和 HDAC 6 均未出现明显的降解作用^[48]。

3.2.2 HDAC 6 降解剂

大量研究表明, HDAC 6 在口腔鳞状细胞癌、急性髓系白血病、卵巢癌、肝癌等肿瘤中过表达, 并与肿瘤进展、转移发生率和生存率下降呈现高度相关性, 因此 HDAC 6 成为重要的抗肿瘤靶标之一^[49]。Nexturastat A 是一个重要的选择性 HDAC 6 抑制剂^[50], 目前的 HDAC 6 降解剂大多都是以 Nexturastat A 作为靶蛋白配体, 利用 E3 连接酶 CRBN 或者 VHL 开发的。

2018 年, Yang 等^[51]合成了第一个 HDAC 6 降解剂 4(图 4), 利用 Nexturastat A 与沙利度胺类似物构建了 PROTACs 分子, 选择性地降解了乳腺癌细胞 MCF-7 中的 HDAC 6, 为 HDAC 6 降解剂的后续研究打下了良好的基础。2019 年, An 等^[52]也利用 Nexturastat A 合成了新的 PROTACs 分子 5(图 4)。该分子在 100 nmol/L 的浓度下, 可以高效降解多发性骨髓瘤细胞 MM. 1S 中的 HDAC 6, 其抗肿瘤活性与 Nexturastat A 相当, 为骨髓瘤的药物治疗开辟了可能的新途径。随后, 该研究小组又开发了一系列靶向 HDAC 6 的 PROTACs, 其中化合物 6(图 4)对多种肿瘤细胞的 HDAC 6 均有显著的降解效果, 且对 HDAC 6 体现出良好的亚型选择性^[53]。2019 年, Wu 等^[54]也设计了一系列靶向 HDAC 6 的 PROTACs, 其中化合物 7(图 4)活性最高($IC_{50} = 74.9$ nmol/L), 在 10 nmol/L 浓度下对 HDAC 6 的降解率即可达到 74.9%, 被认为是一类很有前景的治疗多发性骨髓瘤的潜在药物。

与此同时, 利用 E3 连接酶 VHL-1 与 Nexturastat A 设计的 HDAC 6 降解剂也取得很多进展。2020 年, Wu 课题组合成的化合物 8(图 4)^[55], 在 MM. 1S 细胞中对 HDAC 6 具有极高的降解率。2022 年, Sinatra 等^[56]采用固相平行合成法合成了两个系列的 HDAC 6 降解剂, 其中降解效果最好的化合物 9(图 4)在 3.5 nmol/L 浓度下即可达到 50% 的降解率, 显示出良好的抗肿瘤细胞增殖和诱导

其凋亡的活性。

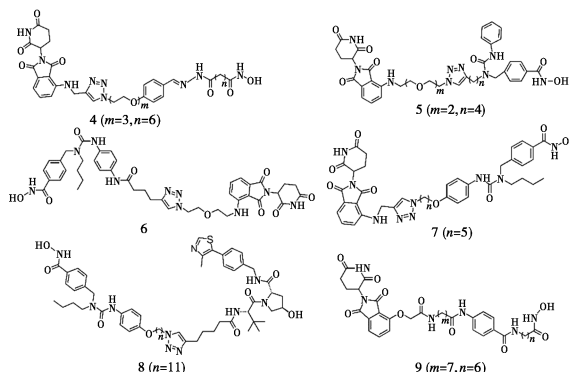


图 4 HDAC 6 降解剂结构图

Fig.4 Structures of HDAC 6 degraders

3.2.3 HDAC 8 降解剂

2022 年, Chotitumnavet 等^[57]基于 HDAC 8 亚型选择性抑制剂 NCC-149 设计合成了一系列 PROTACs, 从中获得了首个 HDAC 8 亚型选择性降解剂 10(图 5), 在人 T 淋巴瘤细胞 Jurkat 中对 HDAC 8 降解的 DC_{50} 为 0.70 μ mol/L, 对 HDAC 1、HDAC 2 和 HDAC 6 亚型未显示出明显的降解。PCI-34051 是 HDAC 8 的特异性抑制剂。Huang 等^[58]基于 PCI-34051 开发了一系列靶向 HDAC 8 的 PROTACs, 降解活性最好的化合物 11($DC_{50} = 0.58$ μ mol/L, 图 5), 不仅在细胞水平显示出良好的亚型选择性和抗肿瘤作用, 在裸鼠体内模型中也表现出显著的抗肿瘤活性, 成为迄今为止报道的唯一一个进行了体内研究的选择性 HDAC 8 降解剂。2023 年, Zhao 等^[59]通过可变长度的脂肪族连接器将已知的 HDAC 8 抑制剂与泊马度胺连接, 从而开发了一系列新的 HDAC 8-PROTACs。其中, 化合物 12(图 5)为 HDAC 8 高效抑制剂, 对乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的 DC_{50} 为 1.8 nmol/L, 对人 T 淋巴瘤细胞 Jurkat 的 DC_{50} 为 4.7 nmol/L。在两种细胞系中, 化合物 12 的抗肿瘤表现比 HDAC 8 抑制剂高效很多, 因此证实了 HDAC 8 降解剂在肿瘤学中的降解潜力。

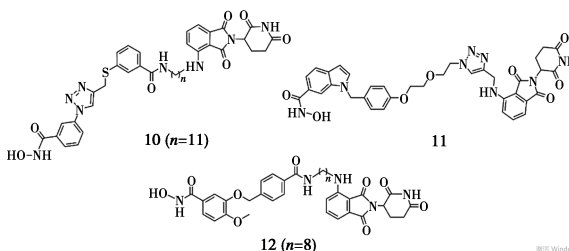


图 5 HDAC 8 降解剂结构图

Fig.5 Structures of HDAC 8 degraders

3.3 BRD4 降解剂

溴结构域蛋白 (Bromodomain-containing proteins, BRDs) 可通过识别组蛋白的乙酰化赖氨酸残基并与之特异性结合, 从而参与调控基因转录和染色质重塑等生命过程, 是肿瘤细胞中最重要的表观遗传转录调控因子之一^[60]。BRDs 家族可分为 8 个亚家族, 目前研究最多的是结构域和超末端结构域 (BET) 家族。BET 家族由 BRD2、BRD3、BRD4 和 睾丸特异性蛋白 (BRDT) 组成。研究表明, BET 家族不仅参与肥胖、肺纤维化、慢性阻塞性肺和癫痫等多种复杂疾病的发生和发展, 而且在多种肿瘤中均呈高表达, 参与肿瘤的发生、浸润和转移等过程^[61]。作为 BET 家族中最重要的功能蛋白, BRD4 可以通过溴结构域与乙酰化组蛋白赖氨酸位点 (Kac) 结合, 募集正向转录延伸因子 b (P-TEFb), 促进核糖核酸聚合酶 (RNA-Pol II) 活性, 然后刺激转录开始和延伸, 从而调节细胞的 DNA 复制、基因的转录和细胞周期^[62]。此外, BRD4 表达的上调与肺癌、乳腺癌、急性髓系淋巴瘤、肝癌等多种肿瘤的发生发展密切相关^[63]。

最早报道的 BET 家族抑制剂是 JQ1, 其对 BRD4 的作用最强, 可以竞争性地与 BRD4 中溴结构域结合, 从而使 BRD4 蛋白和组蛋白中乙酰化的赖氨酸分离, 进而干扰 BRD4 发挥其生物学作用。然而, JQ1 的半衰期较短, 需要大剂量给药才能维持疗效, 大大增加了其毒副作用。后来, 科学家们采用 PROTACs 技术, 设计了首个 BRD4 降解剂 MZ1 (图 6)^[64]。它对 BRD4 具有一定的选择性和较强的降解作用, 但同时对 BRD2 和 BRD3 也产生了不同程度的降解。ARV-771 (图 6) 是研发出的另一个有效的非选择性 BET 降解剂, 对 BRD2、BRD3 和 BRD4 均表现出降解活性, 且在小鼠肿瘤模型中表现出显著的抑制肿瘤生长的作用^[65]。2019 年, Genentech 在美国癌症研究协会上报了采用“降解尾巴”策略合成的新型单价 BRD4 降解剂 GNE-0011 (图 6)。该化合物能选择性降解 BRD4, 随后抑制其下游原癌基因的表达。体内研究表明, GNE-0011 在 10 mg/kg 剂量下能够使小鼠皮下肿瘤显著消退, 效果优于 JQ1。然而令人遗憾的是, GNE-0011 在低剂量下就表现出不可忽略的毒性, 由此限制了其进一步开发^[66]。2020 年, Zhang 等^[67] 基于二氢喹唑啉酮类衍生物和度胺类 E3 连接酶配体设计了一系列新的 BRD4

降解剂, 其中化合物 13 (图 6) 对人单核白血病细胞 THP-1 的生长具有显著抑制作用。Jiang 等^[68] 则基于 1,8-萘内酰亚胺和度胺类 E3 连接酶配体设计了化合物 14 (图 6), 低浓度下即可降解人髓性单核细胞白血病细胞 MV4-11 中的 BRD4。此外, ARV-825 (图 6) 也被报道可以快速、有效地降解弥漫大 B 细胞 DLBCL 中的 BRD4^[69]。2023 年, 珞诺生物自主研发的 BRD4 降解剂 RNK-05047 显示出良好的安全性和有效性, 目前已进入临床 II 期研究, 化合物结构仍未披露。

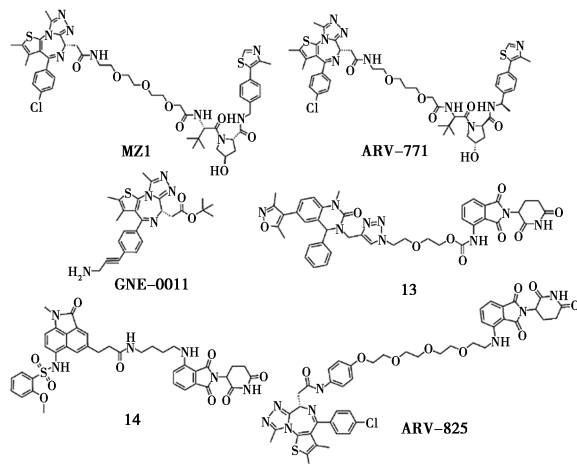


图 6 BRD4 降解剂结构图

Fig.6 Structures of BRD4 degraders

4 总结与展望

表观遗传修饰与肿瘤的发生发展密切相关, 其主要通过 DNA 甲基化和组蛋白修饰等方式参与基因表达的调控, 从而促进肿瘤的发生和发展。在许多实体肿瘤中, DNA 甲基化通常表现为全基因组的下调, 而组蛋白修饰则可能导致肿瘤细胞中重要的信号转导通路的异常激活等。因此, 表观遗传靶点一直是抗肿瘤药物发现的重要靶标。目前, 靶向表观遗传靶点的小分子抗肿瘤药物主要包括 DNA 甲基转移酶抑制剂、组蛋白去甲基化酶抑制剂和 HDAC 抑制剂等。虽然这些小分子抑制剂的研发已取得很多重要进展, 多个品种已上市或进入临床试验研究, 但疗效不理想、毒性大、易耐药等仍然是其难以克服的缺点。

随着生物医学的发展以及交叉学科的飞速进步, PROTACs 技术的出现彻底改变了药物开发的格局。PROTACs 技术在抗肿瘤药物研究开发中的成功应用使很多有前景的蛋白靶向降解剂类药物不断涌现出来。靶向表观遗传靶点的药物研发

也取得了很多重要进展,弥补了现有的表观遗传抗肿瘤药物的不足。当前已有很多基于 E3 连接酶 CRBN 和 VHL,靶向表观遗传靶点 EZH2、EED、HDAC 和 BRD4 等的 PROTACs 分子问世,大部分都显示出较突出的体内外抗肿瘤活性,其中一些已进入临床研究,展现出广阔的应用前景。然而,在 PROTACs 药物研发的过程中也遇到很多挑战,例如脱靶、低细胞渗透性、不稳定性、不易吸收、耐药性等问题。如何有效解决这些问题是靶向表观遗传靶点的 PROTACs 药物向前发展的关键。简化 PROTACs 分子结构中特定靶点的小分子抑制剂的结构可能是优化 PROTACs 分子的一条有效途径。利用 PROTAC 原理和动态组合化学开发的细胞内点击形成的蛋白水解靶向嵌合体(CLIPTAC)技术可以通过快速点击反应自组装,并在细胞内形成功能性 PROTACs 分子,可以使其在细胞渗透性、溶解度上有明显改善,解决 PROTACs 分子因分子量大引起的问题。另外,综合运用各种药物制剂或递送技术,也可能为 PROTACs 药物面临的问题提供新的解决方案。例如,采用纳米技术进行 PROTACs 药物的递送,载药纳米粒微小的粒径可以加速药物在肿瘤组织中的深层渗透,改善 PROTAC 药物溶解性差、不易吸收等缺点。此外,PROTACs 分子的设计中,E3 泛素连接酶的选择对于该类药物的研发也至关重要。当前仅有 CRBN 和 VHL 的配体成功应用于 PROTACs 分子的设计合成中,未来还需要开发更多的 E3 泛素连接酶配体来实现表观遗传 PROTACs 的合理药物设计。借助高通量筛选和计算机模拟对接技术,对 PROTACs 分子结构中的 E3 泛素连接酶配体部分进行结构扩展。针对各种泛素连接酶对化合物库进行筛选,获得更多结构类型的 E3 泛素连接酶的小分子抑制剂或激动剂,为 PROTACs 药物的发展提供更多机遇。相信随着 PROTACs 技术的不断发展和应用,靶向表观遗传靶点的 PROTACs 药物将在抗肿瘤治疗领域大放异彩。

参考文献:

- [1] 王志刚,费荣杰.CYP1B1 抑制剂研究进展[J].化学试剂,2023,45(2):69-74.
- [2] SIEGEL R L, MILLER K D, FUCHS H E, et al. Cancer statistics, 2022 [J]. *CA Cancer J. Clin.*, 2022, 72(1): 7-33.
- [3] KAUR S D, BEDI N, KUMAR D, et al. PROTACs: Promising approach for anticancer therapy [J]. *Cancer Lett.*, 2023, 556: 216 065-216 072.
- [4] YAN G, ZHONG X, YUE L, et al. Discovery of a PROTAC targeting ALK with in vivo activity [J]. *Eur. J. Med. Chem.*, 2021, 212: 113 150-113 162.
- [5] QIN H, ZHANG Y, LOU Y, et al. Overview of PROTACs targeting the estrogen receptor: Achievements for biological and drug discovery [J]. *Curr. Med. Chem.*, 2022, 29(22): 3 922-3 944.
- [6] WANG H, LI C, LIU X, et al. Design, synthesis and activity study of a novel PI3K degradation by hijacking VHL E3 ubiquitin ligase [J]. *Bioorg. Med. Chem.*, 2022, 61: 116 707-116 719.
- [7] JIN J, WU Y, ZHAO Z, et al. Small-molecule PROTAC mediates targeted protein degradation to treat STAT3-dependent epithelial cancer [J]. *JCI. Insight*, 2022, 7(22): e160 606.
- [8] CANDELARIA P V, LEOH L S, PENICHERET M L, et al. Antibodies targeting the transferrin receptor 1 (TfR1) as direct anti-cancer agents [J]. *Front. Immunol.*, 2021, 12: 607 692-607 704.
- [9] MIRANDA FURTADO C L, DOS SANTOS LUCIANO M C, SILVA SANTOS R D, et al. Epidrugs: Targeting epigenetic marks in cancer treatment [J]. *Epigenetics*, 2019, 14(12): 1 164-1 176.
- [10] 邓玥,黄洵.表观遗传抗肿瘤药物的研发进展[J].中国肿瘤临床,2023,50(6):278-285.
- [11] BÉKÉS M, LANGLEY D R, CREWS C M. PROTAC targeted protein degraders: The past is prologue [J]. *Nat. Rev. Drug. Discov.*, 2022, 21(3): 181-200.
- [12] 徐颖若,张沁松,吴菁艺,等.基于 PROTAC 技术靶向降解 FAK 蛋白的研究进展[J].药学报,2021,56(6):1 571-1 579.
- [13] JIN J, WU Y, CHEN J, et al. The peptide PROTAC modality: A novel strategy for targeted protein ubiquitination [J]. *Theranostics*, 2020, 10(22): 10 141-10 153.
- [14] ZENG S, HUANG W, ZHENG X, et al. Proteolysis targeting chimera (PROTAC) in drug discovery paradigm: Recent progress and future challenges [J]. *Eur. J. Med. Chem.*, 2021, 210: 112 981-113 004.
- [15] XIONG Y, ZHONG Y, YIM H, et al. Bridged proteolysis targeting chimera (PROTAC) enables degradation of undruggable targets [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2022, 144(49): 22 622-22 632.
- [16] GUENETTE R G, YANG S W, MIN J, et al. Target and tissue selectivity of PROTAC degraders [J]. *Chem. Soc. Rev.*, 2022, 51(14): 5 740-5 756.
- [17] KOROLEVA O A, DUTIKOVA Y V, TRUBNIKOV A

- V, et al. PROTAC: Targeted drug strategy. Principles and limitations [J]. *Russ. Chem. Bull.*, 2022, **71**(11): 2 310-2 334.
- [18] LEE J, LEE Y, JUNG Y M, et al. Discovery of E3 ligase ligands for target protein degradation [J]. *Molecules*, 2022, **27**(19): 6 515-6 538.
- [19] 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): 1 770-1 777.
- [20] HAN X, WANG C, QIN C, et al. Discovery of ARD-69 as a highly potent proteolysis targeting chimera (PROTAC) degrader of androgen receptor (AR) for the treatment of prostate cancer [J]. *J. Med. Chem.*, 2019, **62**(2): 941-964.
- [21] WANG C, ZHANG Y, WU Y, et al. Developments of CRBN-based PROTACs as potential therapeutic agents [J]. *Eur. J. Med. Chem.*, 2021, **225**: 113 749-113 785.
- [22] DEANS C, MAGGERT K A. What do you mean, "epigenetic"? [J]. *Genetics*, 2015, **199**(4): 887-896.
- [23] ZHANG P, ZHANG M. Epigenetic alterations and advancement of treatment in peripheral T-cell lymphoma [J]. *Clin. Epigenetics*, 2020, **12**(1): 169-186.
- [24] YUAN Z, SUN Q, LI D, et al. Design, synthesis and anticancer potential of NSC-319745 hydroxamic acid derivatives as DNMT and HDAC inhibitors [J]. *Eur. J. Med. Chem.*, 2017, **134**: 281-292.
- [25] ZENG J, ZHANG J, SUN Y, et al. Targeting EZH2 for cancer therapy: From current progress to novel strategies [J]. *Eur. J. Med. Chem.*, 2022, **238**: 114 419-114 441.
- [26] RAMAIAH M J, TANGUTUR A D, MANYAM R R. Epigenetic modulation and understanding of HDAC inhibitors in cancer therapy [J]. *Life Sci.*, 2021, **277**: 119 504-119 523.
- [27] SETO E, YOSHIDA M. Erasers of histone acetylation: The histone deacetylase enzymes [J]. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 2014, **6**(4): a018 713.
- [28] LI W, ZHANG C, ZHANG H E, et al. Design, synthesis, and anticancer evaluation of ammosamide B with pyroloquinoline derivatives as novel BRD4 inhibitors [J]. *Bioorg. Chem.*, 2022, **127**: 105 917-105 929.
- [29] MA L, WANG J, ZHANG Y, et al. BRD4 PROTAC degrader MZ1 exerts anticancer effects in acute myeloid leukemia by targeting c-Myc and ANP32B genes [J]. *Cancer Biol. Ther.*, 2022, **23**(1): 1-15.
- [30] HANAOKI S, SHIMADA M. Targeting EZH2 as cancer therapy [J]. *J. Biochem.*, 2021, **170**(1): 1-4.
- [31] DONG H, LIU S, ZHANG X, et al. An allosteric PRC2 inhibitor targeting EED suppresses tumor progression by modulating the immune response [J]. *Cancer Res.*, 2019, **79**(21): 5 587-5 596.
- [32] SU M, GONG X, LIU F. An update on the emerging approaches for histone deacetylase (HDAC) inhibitor drug discovery and future perspectives [J]. *Expert Opin. Drug Discov.*, 2021, **16**(7): 745-761.
- [33] CHEN L, LIU Z P, LI X. Recent advances in dual BRD4-kinase inhibitors based on polypharmacology [J]. *Chem. Med. Chem.*, 2022, **17**(6): e202 100 731.
- [34] LAUGESEN A, HØJFELDT J W, HELIN K. Molecular mechanisms directing PRC2 recruitment and H3K27 methylation [J]. *Mol. Cell.*, 2019, **74**(1): 8-18.
- [35] VERMA A, SINGH A, SINGH M P, et al. EZH2-H3K27me3 mediated KRT14 upregulation promotes TNBC peritoneal metastasis [J]. *Nat. Commun.*, 2022, **13**(1): 7 344-7 466.
- [36] COOK N, CHEN J, ZHOU J, et al. Embryonic ectoderm development (EED) as a novel target for cancer treatment [J]. *Curr. Top. Med. Chem.*, 2021, **21**(31): 2 771-2 778.
- [37] HSU J H, RASMUSSEN T, ROBINSON J, et al. EED-targeted PROTACs degrade EED, EZH2, and SUZ12 in the PRC2 complex [J]. *Cell Chem. Biol.*, 2020, **27**(1): 41-47.
- [38] MA A, STRATIKOPOULOS E, PARK K S, et al. Discovery of a first-in-class EZH2 selective degrader [J]. *Nat. Chem. Biol.*, 2020, **16**(2): 214-236.
- [39] DALE B, ANDERSON C, PARK K S, et al. Targeting triple-negative breast cancer by a novel proteolysis targeting chimera degrader of enhancer of zeste homolog 2 [J]. *ACS Pharmacol. Transl. Sci.*, 2022, **5**(7): 491-507.
- [40] YU X, WANG J, GONG W, et al. Dissecting and targeting noncanonical functions of EZH2 in multiple myeloma via an EZH2 degrader [J]. *Oncogene*, 2023, **42**(13): 994-1 009.
- [41] POTJEWYD F, TURNER A W, BERI J, et al. Degradation of polycomb repressive complex 2 with an EED-targeted bivalent chemical degrader [J]. *Cell Chem. Biol.*, 2020, **27**(1): 47-56.
- [42] 何格, 张明明, 李志, 等. 以 3,5-二芳基取代吡啶为 Cap 的新型选择性 HDAC6 抑制剂: 设计、合成及抑酶活性评价 [J]. *化学试剂*, 2022, **44**(6): 816-821.
- [43] LI Y, SETO E. HDACs and HDAC inhibitors in cancer development and therapy [J]. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, 2016, **6**(10): a026 831.
- [44] BONDAREV A D, ATTWOOD M M, JONSSON J, et al. Recent developments of HDAC inhibitors: Emerging in-

- dications and novel molecules [J]. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 2021, **87**(12): 4 577-4 597.
- [45] LI Y, SETO E. HDACs and HDAC inhibitors in cancer development and therapy [J]. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, 2016, **6**(10): a026 831.
- [46] CAO F, DE WEERD S, CHEN D, et al. Induced protein degradation of histone deacetylases 3 (HDAC3) by proteolysis targeting chimera (PROTAC) [J]. *Eur. J. Med. Chem.*, 2020, **208**: 112 800-112 812.
- [47] SMALLEY J P, ADAMS G E, MILLARD C J, et al. PROTAC-mediated degradation of class I histone deacetylase enzymes in corepressor complexes [J]. *Chem. Commun. (Camb)*, 2020, **56**(32): 4 476-4 485.
- [48] XIAO Y, WANG J, ZHAO L Y, et al. Discovery of histone deacetylase 3 (HDAC3)-specific PROTACs [J]. *Chem. Commun. (Camb)*, 2020, **56**(68): 9 866-9 875.
- [49] PULYA S, AMIN S A, ADHIKARI N, et al. HDAC6 as privileged target in drug discovery: A perspective [J]. *Pharmacol. Res.*, 2021, **163**: 105 274-105 312.
- [50] SUN X, XIE Y, SUN X, et al. The selective HDAC6 inhibitor nexturastat a induces apoptosis, overcomes drug resistance and inhibits tumor growth in multiple myeloma [J]. *Biosci. Rep.*, 2019, **39**(3): BSR20 181 916.
- [51] YANG K, SONG Y, XIE H, et al. Development of the first small molecule histone deacetylase 6 (HDAC6) degraders [J]. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2018, **28**(14): 2 493-2 500.
- [52] AN Z, LV W, SU S, et al. Developing potent PROTACs tools for selective degradation of HDAC6 protein [J]. *Protein Cell*, 2019, **10**(8): 606-615.
- [53] YANG H, LV W, HE M, et al. Plasticity in designing PROTACs for selective and potent degradation of HDAC6 [J]. *Chem. Commun. (Camb)*, 2019, **55**(98): 14 848-14 851.
- [54] WU H, YANG K, ZHANG Z, et al. Development of multifunctional histone deacetylase 6 degraders with potent antimyeloma activity [J]. *J. Med. Chem.*, 2019, **62**(15): 7 042-7 057.
- [55] YANG K, ZHAO Y, NIE X, et al. A cell-based target engagement assay for the identification of cereblon E3 ubiquitin ligase ligands and their application in HDAC6 degraders [J]. *Cell Chem. Biol.*, 2020, **27**(7): 866-876.
- [56] SINATRA L, YANG J, SCHLIEHE-DIECKS J, et al. Solid-phase synthesis of cereblon-recruiting selective histone deacetylase 6 degraders (HDAC6 PROTACs) with antileukemic activity [J]. *J. Med. Chem.*, 2022, **65**(24): 16 860-16 878.
- [57] CHOTITUMNAVEE J, YAMASHITA Y, TAKAHASHI Y, et al. Selective degradation of histone deacetylase 8 mediated by a proteolysis targeting chimera (PROTAC) [J]. *Chem. Commun. (Camb)*, 2022, **58**(29): 4 635-4 643.
- [58] HUANG J, ZHANG J, XU W, et al. Structure-based discovery of selective histone deacetylase 8 degraders with potent anticancer activity [J]. *J. Med. Chem.*, 2023, **66**(2): 1 186-1 209.
- [59] ZHAO C, CHEN D, SUO F, et al. Discovery of highly potent HDAC8 PROTACs with anti-tumor activity [J]. *Bioorg. Chem.*, 2023, **136**: 106 546-106 561.
- [60] WANG C, ZHANG Y, YANG S, et al. PROTACs for BRDs proteins in cancer therapy: A review [J]. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, 2022, **37**(1): 1 694-1 703.
- [61] GUO J, ZHENG Q, PENG Y. BET proteins: Biological functions and therapeutic interventions [J]. *Pharmacol. Ther.*, 2023, **243**: 108 354-108 371.
- [62] ALTENDORFER E, MOCHALOVA Y, MAYER A. BRD4: A general regulator of transcription elongation [J]. *Transcription*, 2022, **13**(1/3): 70-81.
- [63] WHITE M E, FENGER J M, CARSON W E. Emerging roles of and therapeutic strategies targeting BRD4 in cancer [J]. *Cell Immunol.*, 2019, **337**: 48-53.
- [64] 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): 1 770-1 777.
- [65] 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.
- [66] ROBERT A B. Abstract 4452: GNE-0011, a novel monovalent BRD4 degrader [R]. Atlanta, GA: Proceedings of the American association for cancer research annual meeting, 2019, **79**(13): 4 452.
- [67] ZHANG F, WU Z, CHEN P, et al. Discovery of a new class of PROTAC BRD4 degraders based on a dihydroquinazolinone derivative and lenalidomide/pomalidomide [J]. *Bioorg. Med. Chem.*, 2020, **28**(1): 115 228-115 240.
- [68] JIANG F, WEI Q, LI H, et al. Discovery of novel small molecule induced selective degradation of the bromodomain and extra-terminal (BET) bromodomain protein BRD4 and BRD2 with cellular potencies [J]. *Bioorg. Med. Chem.*, 2020, **28**(1): 115 181-115 192.
- [69] 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.