

## · 前沿与进展 ·

ADVANCES IN  
PHARMACEUTICAL SCIENCES

## 组蛋白甲基转移酶 G9a 抑制剂的研究进展

王楚楚<sup>1</sup>, 赵铜鑫<sup>1</sup>, 陈维琳<sup>1</sup>, 湛云鹏<sup>1</sup>, 张涵煦<sup>1</sup>, 尤启冬<sup>1,2</sup>, 郭小可<sup>1,2\*</sup>

(1. 中国药科大学江苏省药物分子设计与成药性优化重点实验室, 江苏 南京 210009; 2. 中国药科大学药物化学教研室, 江苏 南京 210009)

**[摘要]** 组蛋白甲基转移酶 G9a 可以催化组蛋白 H3K9 发生单甲基化、二甲基化及缓慢的三甲基化, 也可以特异性地催化一些非组蛋白如 p53 的甲基化。G9a 参与体内许多生物学过程, 并与人类的各种疾病特别是肿瘤的发生和发展密切相关, 被认为是一个具有广阔前景的肿瘤治疗新靶标。因此, G9a 抑制剂的开发受到广泛关注。综述近 10 年报道的 G9a 小分子抑制剂的研究进展, 以期为现有抑制剂的临床进展和新型抑制剂的开发提供参考。

**[关键词]** G9a; 抗肿瘤; 小分子抑制剂; 甲基转移酶

**[中图分类号]** R914.4; R979.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-5094 (2018) 04-0284-10

## Research Progress in Inhibitors of Histone Methyltransferase G9a

WANG Chuhui<sup>1</sup>, ZHAO Tongxin<sup>1</sup>, CHEN Weilin<sup>1</sup>, ZHAN Yunpeng<sup>1</sup>, ZHANG Hanxu<sup>1</sup>, YOU Qidong<sup>1,2</sup>, GUO Xiaoke<sup>1,2</sup>

(1. Jiangsu Key Laboratory of Drug Design and Optimization, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China; 2. Department of Medicinal Chemistry, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

**[Abstract]** Histone methyltransferase G9a is responsible for catalyzing the mono-, di- and slowly trimethylation of histone H3 lysine 9 (H3K9). It can also specifically methylate lysine 373 in tumor suppressor p53. G9a plays crucial roles in diverse biological processes and various human diseases especially in the pathogenesis and progress of cancer. It is considered as a promising novel antineoplastic target. Hence, the development of its inhibitors has received increased attention. The research advances in different classes of small molecular inhibitors of G9a reported over the past decade were reviewed, so as to provide reference for the clinical development of small molecular inhibitors and the discovery of novel inhibitors.

**[Key words]** G9a; antineoplastic target; small molecular inhibitor; methyltransferase

组蛋白甲基转移酶 G9a 又称作常染色质组蛋白赖氨酸 N-甲基转移酶 2 (euchromatic histone-lysine N-methyltransferase 2, EHMT2), 可以催化组蛋白 H3 第 9 位赖氨酸 (H3K9) 和 p53 的赖氨酸 373 (K373) 的甲基化。G9a 样蛋白 (G9a-like protein, GLP) 也称 EHMT1, 与 G9a 在 SET (suppressor of variegation 3-9, enhancer of zeste and trithorax) 结构域有 80% 的同源性, 且二者可以形成异质二聚体<sup>[1]</sup>。研究表明, G9a 与人免

疫缺陷病毒-1 (human immune deficiency virus-1, HIV-1) 潜伏期的维持<sup>[2]</sup>、可卡因的成瘾性<sup>[3-4]</sup>、中枢神经系统紊乱<sup>[5]</sup>、基因表达与转录<sup>[6-8]</sup>及造血干细胞的分化<sup>[9-11]</sup>等过程或疾病密切相关。此外, 其还可作为 p21 转录的辅助激活因子而导致细胞凋亡<sup>[12]</sup>。大量证据表明, G9a 在白血病<sup>[13]</sup>、前列腺癌<sup>[13-14]</sup>、肝癌<sup>[15]</sup>和肺癌<sup>[16]</sup>等多种癌症中均过度表达, G9a 基因的敲除可以抑制前列腺癌、肺癌等细胞的生长。在小鼠模型中, 当敲除 G9a 后, 可以观察到急性粒细胞性白血病 (acute megakaryoblastic leukemia, AML) 发展变缓<sup>[17]</sup>。由此可见, G9a 介导的组蛋白甲基化与肿瘤的发生发展密切相关, 因此 G9a 被认为是一个具有广阔前景的新型抗肿瘤靶点, 其抑制剂的开发也受到越来越多的关注。

目前 G9a 的抑制剂主要分为两类——天然产物抑

**接受日期:** 2017-09-27

**项目资助:** 国家自然科学基金青年基金 (No. 81502915); 国家级大学生创新创业训练计划项目 (No. G15052); 中国药科大学药基地科研训练及科研能力提高项目 (No. J1310032)

**\* 通讯作者:** 郭小可, 副教授;

**研究方向:** 生物活性分子的设计与合成;

**Tel:** 025-83271351; **E-mail:** kexin95@126.com

制剂及合成小分子抑制剂。天然产物结构较复杂且选择性低, 而化学合成小分子结构类型少、体内活性数据缺乏, 并且均处于临床前研究阶段, 这些都限制了其临床开发。因此, 研究和发现结构新颖、活性较高且理化性质优良的抑制剂也逐渐成为各个研究者的目标。本文主要综述近 10 年来报道的 G9a 小分子抑制剂, 以期对现有抑制剂的临床进展和新型小分子抑制剂的发现提供参考。

## 1 G9a 的潜在生物学功能及其与疾病的关系

G9a 属于蛋白质 su(var)3-9 (suppressor of variegation 3-9) 家族, 位于常染色体 chr6p21.31<sup>[18]</sup>, 含有保守的 su(var)、enhancer of zeste、trithorax (SET) 催化结构域<sup>[18-22]</sup>。研究表明, G9a 主要催化介导 H3K9 发生二甲基化 (H3K9me2)<sup>[18, 23]</sup>, 另外也催化 H3K9me、H3K9me3 及 H3K27 的甲基化修饰等<sup>[24]</sup>。其可以将辅因子 S-腺苷甲硫氨酸 (S-adenosyl methionine, SAM) 的甲基转移到底物的赖氨酸残基上 (见图 1), 使其发生甲基化修饰<sup>[18]</sup>。除了以组蛋白为底物外, G9a 还可以催化一些非组蛋白发生甲基化, 如催化 p53 Lys373 发生二甲基化, 从而使其丧失转录活性等<sup>[13]</sup>。大量证据表明, G9a 在基因表达、转录调控, 以及细胞分化、增殖、衰老等众多生物学过程中都扮演了重要的角色<sup>[1, 18, 25-29]</sup>。G9a 敲除的胚胎干细胞 (embryonic stem cells, ESCs) 虽然

没有表现出明显的生长缺陷, 但却显现出严重的分化缺陷<sup>[1]</sup>。G9a 也可以调控成人干细胞的分化, 如 G9a 的抑制会导致人类造血干细胞 (hematopoietic stem and progenitor cells, HSPCs) 分化停滞<sup>[30]</sup>。此外, 研究表明, G9a 在维持基因沉默及哺乳动物 DNA 甲基化中也发挥了重要作用<sup>[18]</sup>。当 G9a 因催化区域突变而丧失活性或基因敲除 G9a 后均可导致小鼠胚胎发育迟缓, 并在 9.5~12.5 d 后死亡<sup>[1]</sup>。G9a 重要且复杂的生物学功能决定了其在神经系统紊乱性疾病及恶性肿瘤中的重要作用。除了前文所提到的 G9a 与白血病等多种癌症的关系外, 还有研究表明, G9a 能够通过促进上皮细胞黏附分子 (epithelial cell adhesion molecule, EpCAM) 基因启动子区的 H3K9me2 修饰, 从而抑制 EpCAM 的表达, 最终促进肺癌的侵袭和转移<sup>[31]</sup>。在乳腺癌中 G9a 能够通过与 Snail 相互作用, 从而促进乳腺癌细胞发生上皮间叶细胞转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT)<sup>[32]</sup>。

综上所述, G9a 具有复杂的生物学功能, 与神经系统的功能和疾病密切相关, 并且在众多肿瘤中均过度表达。异常表达的 G9a 可通过直接或间接的方式引发基因突变、扩增, 或引起某些关键蛋白的表达和失活, 最终导致肿瘤的发生<sup>[33]</sup>。因此, G9a 在肿瘤中生物学功能的进一步研究对其抑制剂的开发具有重要的指导意义。

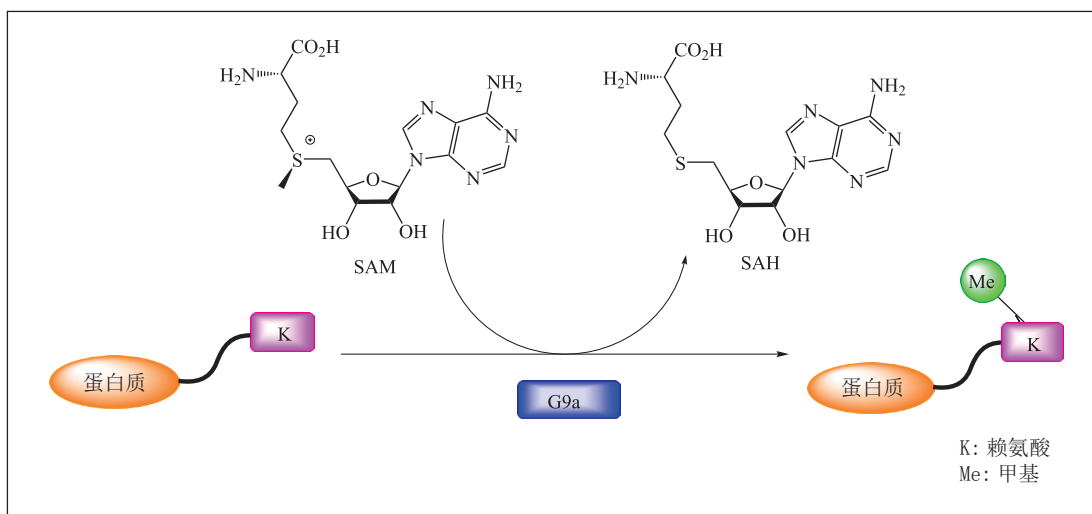


图 1 G9a 以 SAM 作为辅因子催化底物发生甲基化<sup>[18]</sup>

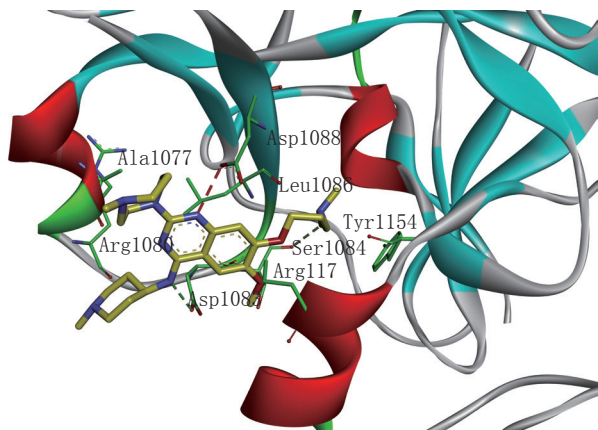
Figure 1 Methylation of lysine residue by G9a with SAM as a cofactor<sup>[18]</sup>

## 2 G9a 抑制剂

随着 G9a 在疾病尤其是肿瘤的发生发展中的重要作用不断被发现, G9a 抑制剂的开发也逐渐受到关注,

越来越多的 G9a 抑制剂被发现和合成。根据其来源不同, 主要分为天然产物及其衍生物抑制剂和合成小分子抑制剂两大类。其中, 按照作用方式, 又可将 G9a 抑制

剂分为: SAM 竞争性抑制剂和底物竞争性抑制剂。由于几乎所有的组蛋白甲基转移酶都可利用 SAM 催化底物发生甲基化, 因此 SAM 竞争性抑制剂对 G9a 不具有选择性; 而底物竞争性抑制剂对 G9a 相较其他甲基转移酶选择性较好, 抑制活性较佳, 其与 G9a 蛋白的复合物晶体结构如图 2 所示。

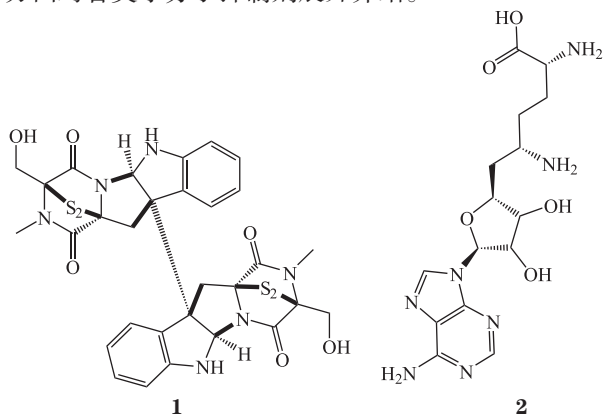


注: 其中黄色部分代表抑制剂的结构, 绿色部分代表底物 G9a 的关键氨基酸残基, 为了凸显赖氨酸结合槽, G9a 结构有所变换。

图 2 G9a 蛋白与底物竞争性抑制剂复合物的晶体结构<sup>[34]</sup>  
Figure 2 Co-crystal structure of the complex of G9a-substrate competitive inhibitor<sup>[34]</sup>

天然产物抑制剂主要有两类: 一是毛壳素 (chaetocin, **1**)<sup>[35]</sup> 及其结构简化得到的衍生物; 二是西奈芬净 (**2**, 对 G9a 的  $IC_{50}$  为  $509 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 及其结构修饰得到的类似物。

由于天然产物存在结构较复杂、活性低以及选择性较差等问题, G9a 小分子抑制剂的开发逐渐受到关注。本文主要针对 G9a 的小分子抑制剂进行综述。目前已被成功合成的小分子按结构主要分为以下 6 类: 喹啉类、苯并咪唑类、螺环-吡啶类、喹啉类、萘并异噻唑类及其他类抑制剂。本文从发现优化及生物活性等方面对各类小分子抑制剂展开介绍。



## 2.1 喹啉类抑制剂

2.1.1 BIX01294 化合物 BIX01294 (**3**) 是首个被报道的赖氨酸甲基转移酶小分子抑制剂, 也是最早被发现的 G9a 选择性小分子抑制剂。GLP 与 BIX01294 的晶体复合物解析<sup>[36]</sup> 表明其是底物竞争性抑制剂<sup>[37]</sup>。2007 年, Kubicek 等<sup>[37]</sup> 通过高通量筛选 125 000 个化合物后发现了能够选择性抑制 G9a/GLP 的 BIX01294。但是 BIX01294 对 GLP ( $IC_{50} = 0.7 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 的选择性高于 G9a ( $IC_{50} = 1.9 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )<sup>[36]</sup>。在细胞水平, BIX01294 在  $4.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时即可下调 H3K9me2 表达, 而不会改变 H3K9me1 和 H3K9me3 的表达水平, 也不改变 H3K27、H3K36 和 H4K20 的甲基化表达<sup>[36]</sup>。但是 BIX01294 也存在一些问题, 如对 G9a 的抑制活性低, 其产生相应细胞活性的浓度也会导致细胞毒性同时产生, 这也限制了 BIX01294 作为 G9a 和 GLP 化学探针的使用<sup>[38]</sup>。

2.1.2 UNC0224 为了提高化合物 BIX01294 的活性, Liu 等<sup>[39]</sup> 通过基于结构的药物合理设计与改造, 发现活性和选择性均较好的 G9a 抑制剂 UNC0224 (**4**,  $IC_{50} = 15 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )。通过对 GLP-BIX01294 共晶复合物的研究, Chang 等<sup>[36]</sup> 发现, BIX01294 的 4 位苄基位于结合口袋之外; 因此该团队推测, BIX01294 的 4 位 1-苄基哌啶-4-氨基可以被小基团如 1-甲基哌啶-4-亚氨基或更小的氨基取代, 而且还会降低其相对分子质量从而提高其细胞活性<sup>[40]</sup>。通过共晶复合物还发现, BIX01294 虽然占据了 GLP 绝大多数活性口袋, 但是并没有伸入赖氨酸口袋<sup>[36]</sup>。因此, 为了更好地占据狭长的赖氨酸口袋, Liu 等<sup>[40]</sup> 通过保留 BIX01294 的 2 位活性氨基, 并对 4 位氨基进行修饰, 同时在 7 位引入 7-氨烷氧基侧链, 合成了化合物 UNC0224。与化合物 BIX01294 相比, 化合物 UNC0224 的活性显著提高 [ $K_d = (23 \pm 8) \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ], 理化性质也得到改善, 并且毒性较低,  $IC_{50}/EC_{50}$  比值较高<sup>[34]</sup>。此外, 化合物 UNC0224 具有很好的选择性, 其对 G9a 和 GLP 的抑制活性为 SETD7 和 SETD8 的 1 000 倍, 因此其应用范围较广<sup>[38]</sup>, 被当作工具分子来使用<sup>[40]</sup>。

2.1.3 UNC0321 G9a-UNC0224 共晶复合物是 G9a 和小分子抑制剂的首个共晶结构。Liu 等<sup>[40]</sup> 通过对该结构的分析, 对 UNC0224 进行结构改造后发现了化合物 UNC0321 (**5**)。UNC0321 是目前所报道的活性最好的 G9a 抑制剂 ( $IC_{50} = 6 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ),  $K_i$  为  $63 \text{ pmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,

分别较化合物 BIX01294 和 UNC0224 提高了 250 和 40 倍<sup>[40]</sup>。与此同时, 化合物 UNC0321 对 G9a 具有高度的选择性<sup>[40]</sup>, 但是其对多种细胞株活性均较低<sup>[38]</sup>, 原因可能是其极性太大从而导致透膜性较差<sup>[41]</sup>。

**2.1.4 UNC0638** 为了改善 UNC0321 (**5**) 的细胞活性, Vedadi 等<sup>[38]</sup> 设计合成了一系列类似物, 最终发现了活性较好的化合物 UNC0638 (**6**)。其是 G9a ( $IC_{50} < 15 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $K_i = 3 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 和 GLP ( $IC_{50} = 19 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 的底物竞争性抑制剂<sup>[38]</sup>。与 UNC0321 相比, 化合物 UNC0638 透膜能力增强, 因此细胞活性得到较大提高, 能显著下调细胞内 H3K9me2 表达,  $IC_{50}$  为  $82 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ <sup>[38]</sup>。此外, UNC0638 具有很好的选择性, 其对 G9a 和 GLP 的抑制活性是对其他甲基转移酶或表观遗传靶点, 如 SUV39 同源蛋白 1 (suppressor of variegation 3-9 homologue 1, SUV39H1)、EZH2 (enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit, 也称 KMT6A) DNA 甲基转移酶 (DNA methyltransferases, DNMT1) 等的 200 倍, 是 G 蛋白偶联受体、激酶、离子通道和转运体的 100 倍<sup>[34]</sup>。相比于目前大部分直接敲除 G9a 和 GLP 的研究, UNC0638 仅抑制 G9a 与 GLP 的酶功能, 而不会影响 mRNA 与蛋白质的水平<sup>[42-46]</sup>。因此, UNC0638 可以用来区分 G9a/GLP 的酶功能和非酶功能<sup>[38]</sup>。研究表明, 在有效剂量下, UNC0638 在 7 个细胞株中的毒性都很低<sup>[38]</sup>,  $IC_{50}$  与  $EC_{50}$  的比值为 138<sup>[34]</sup>。与 BIX01294 ( $IC_{50}/EC_{50} = 5.6$ <sup>[34]</sup>) 相比, UNC0638 极大地提高了细胞毒性与活性之比, 使其应用范围更加广泛<sup>[38]</sup>。

综上所述, UNC0638 对 G9a 的抑制活性好, 细胞毒性小, 且理化性质良好, 使得研究人员对 G9a 和 GLP 在表观遗传领域的作用有了更深入的认识; 但是 UNC0638 体内药动学性质较差, 因此其不适用于动物实验<sup>[38]</sup>。

**2.1.5 UNC0631 和 UNC0646** 通过对啞啞啞骨架效关系的深入研究, Liu 等<sup>[41]</sup> 发现了新的化合物 UNC0631 (**7**,  $IC_{50} = 4 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 和 UNC0646 (**8**,  $IC_{50} = 6 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )。UNC0631 和 UNC0646 体外活性较高, 可以很好地降低 H3K9me2 表达, 并且都具有较好的脂溶性, 细胞毒性较低<sup>[41]</sup>。此外, UNC0631 和 UNC0646 对 G9a/GLP 的选择性均较好。与 UNC0638 相比, UNC0631 和 UNC0646 能作为工具分子对特定细胞株进行研究<sup>[41]</sup>。

**2.1.6 UNC0737** 为了验证 G9a-UNC0224 共晶复合物

中 G9a 的 Asp1083 与 UNC0224 啞啞啞母核 4 位亚氨基之间氢键的重要性<sup>[38]</sup>, Vedadi 等<sup>[38]</sup> 设计合成了 UNC0638 的 N-甲基化类似物 UNC0737 (**9**,  $GLP: IC_{50} > 1\,000 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $G9a: IC_{50} = 5\,000 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ); 活性测试结果显示, UNC0737 对 G9a 和 GLP 的活性不到 UNC0638 的 1/300, 因此其主要在研究过程中被作为阴性对照。

**2.1.7 UNC0642** 为了改善 UNC0638 的体内药动学性质, Liu 等<sup>[47]</sup> 对 UNC0638 进行结构优化, 得到 G9a 和 GLP 的首个体内化学探针——UNC0642 (**10**)。研究表明, UNC0642 在雄性瑞士白化小鼠 (Swiss Albino) 中血浆浓度远高于 UNC0638, 因此适用于动物实验<sup>[34]</sup>。UNC0642 是一个底物竞争性抑制剂,  $K_i$  为  $(3.7 \pm 1) \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 对 G9a 和 GLP 体外抑制活性较高 ( $IC_{50} < 2.5 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 且选择性良好; 此外, UNC0642 细胞活性高而细胞毒性较低, 可以显著下调肿瘤细胞和正常细胞 H3K9me2 表达<sup>[34]</sup>, 这使得其应用范围更加广泛。

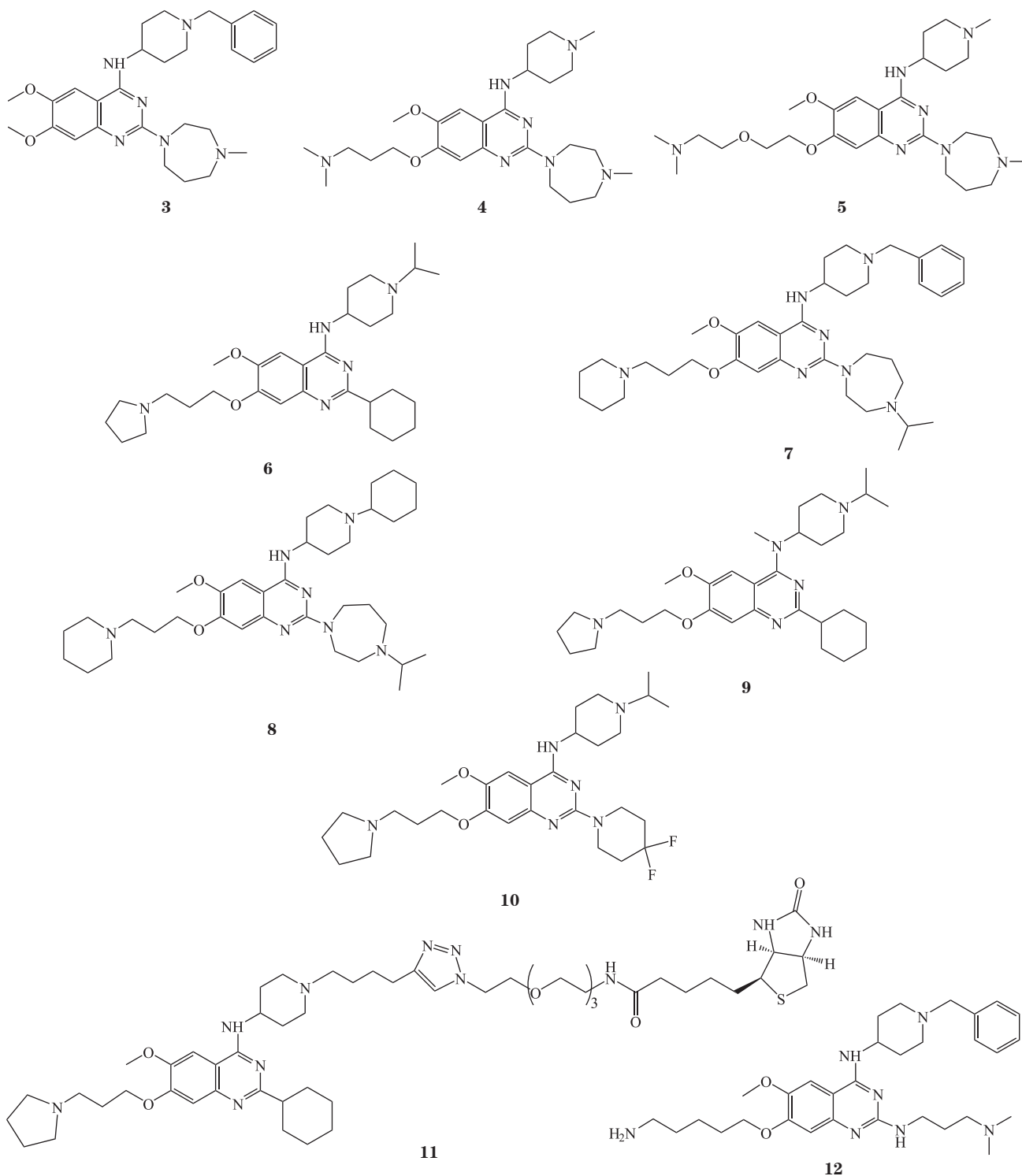
**2.1.8 UNC0965** Konze 等<sup>[48]</sup> 报道了 UNC0638 的生物素标记衍生物 UNC0965 (**11**,  $IC_{50} < 2.5 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )。其体外活性和细胞活性均较高, 可以作为一个有效的化学探针, 利用基于化学抑制剂的染色体免疫沉淀反应方法 (chemical inhibitor-based chromatin immunoprecipitation, chem-ChIP) 来定位 G9a 在染色体上的位置<sup>[48]</sup>。

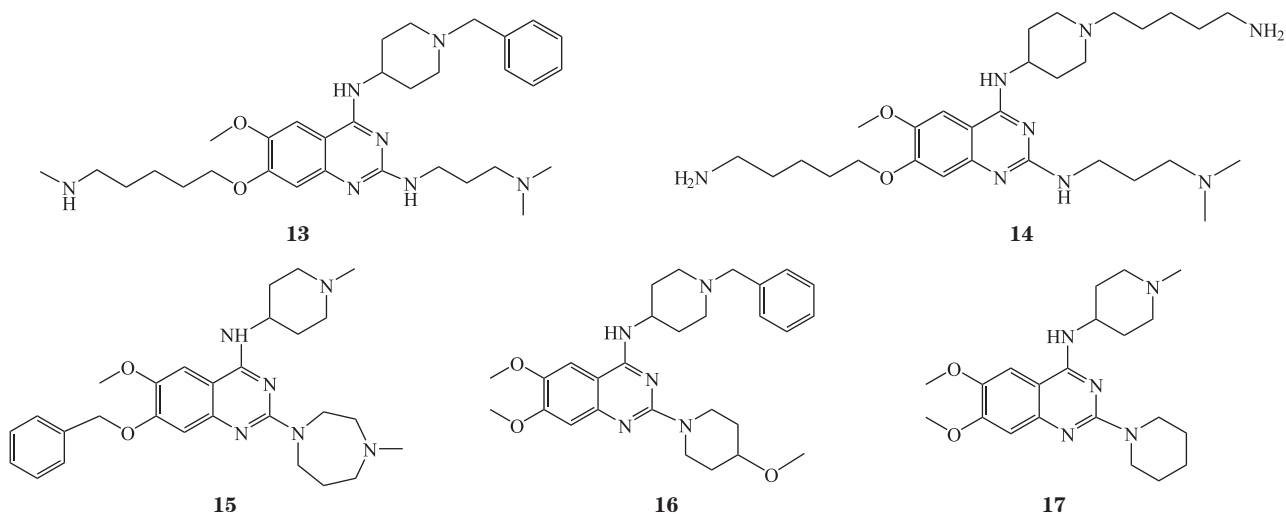
**2.1.9 E67、E70 和 E72** Chang 等<sup>[49]</sup> 基于对 BIX01294 (**3**) 结构修饰的启发, 设计合成了新的啞啞啞类衍生物 E67 (**12**)、E70 (**13**) 和 E72 (**14**)。该类化合物含有类似赖氨酸和甲基赖氨酸的结构。这些修饰很好地提升了化合物对 GLP 的抑制活性, E67 的  $IC_{50}$  为  $(273 \pm 10) \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $K_d$  为  $(244 \pm 29) \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ <sup>[49]</sup>。E70 为 E67 的单甲基化类似物, 其  $K_d$  与 E67 的相近 [ $(203 \pm 26) \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ], 但其  $IC_{50}$  较大 ( $1.3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )。除了与 E67 相似的结构修饰, E72 还引入了 5-氨基烷基, 进一步提升了化合物对 GLP 的抑制活性 [ $IC_{50} = (164 \pm 20) \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $K_d = (136 \pm 22) \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ]<sup>[48]</sup>。E72 细胞毒性较低, 但细胞活性较差, 因此还有待进一步修饰以获得细胞活性更高的化合物。

**2.1.10 TM2-115、867750 和 867751** 化合物 TM2-115 (**15**,  $IC_{50} = 32 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 在体外可通过抑制寄生虫组蛋白甲基转移酶的活性而快速且不可逆地杀死疟原虫<sup>[50]</sup>, 因此作为特异性的寄生虫组蛋白甲基转移酶抑

制剂被研究和开发<sup>[51]</sup>; 且其在小鼠模型上对抗伯氏疟原虫和恶性疟原虫均口服有效<sup>[50]</sup>。为了进一步提高该类化合物体外抗疟活性及其对伯氏疟原虫抗增殖的选择性, 通过对其构效关系的深入研究, 发现了具有很高的抗 *Pf3D7* (*P. falciparum*) 活性的化合物 867750 (**16**,  $IC_{50} = 37.6 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )<sup>[52]</sup>。该化合物所具有的 2

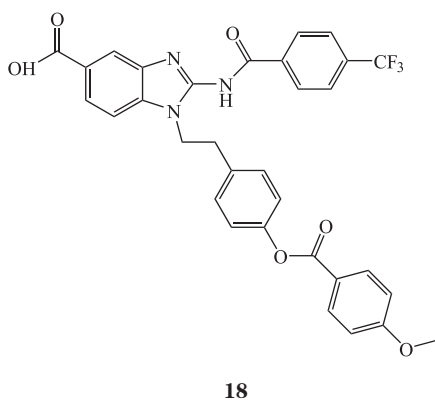
位哌啶环可阻止 CYP450 的氧化, 因此代谢稳定。化合物 867751 (**17**) 以甲基取代化合物 867750 的 4 位哌啶胺上的苄基, 其对 G9a 的抑制活性与化合物 867750 接近 ( $IC_{50} = 36.6 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )<sup>[52]</sup>。因此, 推测二氨基喹啉骨架结构的化合物极有可能发展成为目前急需的新型抗疟药物, 但其药动学性质还有待进一步改善。





## 2.2 苯并咪唑类抑制剂

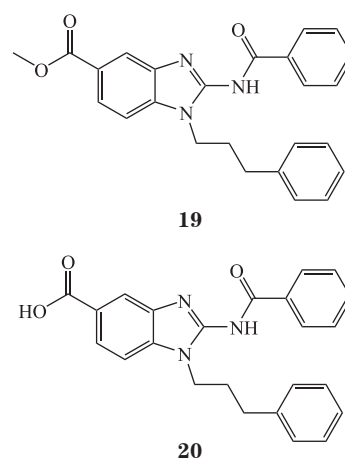
**2.2.1 BIX01338** BIX01338 (**18**) 也是 Kubicek 等<sup>[37]</sup> 通过高通量筛选得到的活性较好 ( $IC_{50} = 4.7 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 的化合物。其抑制作用相对广泛, 机制研究表明, BIX01338 为 SAM 竞争性抑制剂, 故对 G9a 选择性较差<sup>[37]</sup>。



**2.2.2 BRD9539 和 BRD4770** 2012 年, Yuan 等<sup>[53]</sup> 以 BIX01338 为基础, 通过合成一系列 2-取代苯并咪唑结构的化合物而发现了 BRD9539 (**19**) 及其甲酯化产物 BRD4770 (**20**)。化合物 BRD9539 对 G9a 的  $IC_{50}$  为  $6.3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 且为 SAM 竞争性抑制剂, 抑制率随着 SAM 浓度的升高而降低<sup>[37]</sup>。虽然相比其他甲基转移酶, 如 SUV39H1、SUV39 同源蛋白 2 (suppressor of variegation 3-9 homologue 2, SUV39H2)、赖氨酸特异性甲基转移酶 2A (lysine(K)-specific methyltransferase 2A, KMT2A)、含有 SET 结构域的赖氨酸甲基转移酶 7 (SET domain containing lysine methyltransferase 7, SETD7)、SETD8、蛋白质精氨酸甲基转移酶 1 (protein arginine methyltransferase 1, PRMT1)、

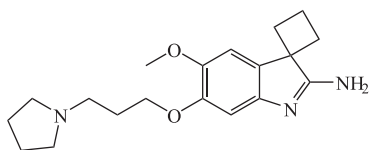
PRMT3、PRMT5、DNMT1 和组蛋白去乙酰化酶 1-9 (histone deacetylases 1-9, HDAC1-9), BRD9539 对 G9a 选择性较佳, 但其也可以同样的活性抑制 PRC2-EZH2 (polycomb repressive complex 2-enhancer of zeste homolog 2), 并可在  $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的浓度下抑制结合 SET 结构域细胞核受体蛋白 1 (nuclear receptor binding SET domain protein 1, NSD1)。目前关于其抑制 GLP 的活性尚少见报道, 因此其是否是一个 G9a 和 GLP 的选择性抑制剂还有待考证<sup>[34]</sup>。

化合物 BRD4770 (**20**,  $IC_{50} = 5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 的活性及选择性均优于化合物 BRD9539。其在浓度为  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时可以显著降低细胞 H3K9me2 和 H3K9me3 表达, 提高 H3K9me1 表达<sup>[53]</sup>, H3K27me3 表达则不受影响<sup>[34]</sup>。此外, 研究表明, 即使给药 72 h, BRD4770 也不会诱导胰腺癌-1 (pancreatic cancer-1, PANC-1) 细胞中细胞凋亡蛋白酶 Caspase 3/7 的活性, 而用 BIX01294 仅给药 12 h 即可增加细胞内该酶的活性, 表明 BRD4770 细胞毒性较低<sup>[34]</sup>。



### 2.3 螺环-咪唑类抑制剂

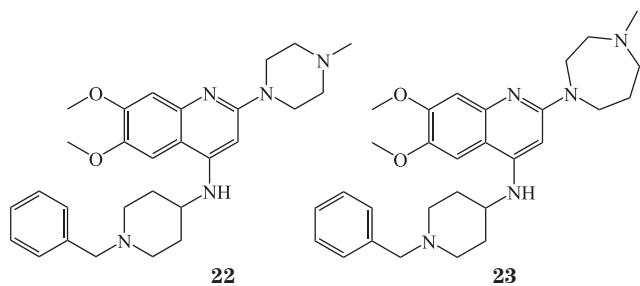
2014年, Sweis等<sup>[54]</sup>报道了化合物 A-366 (**21**), 其对 G9a 和 GLP 的  $IC_{50}$  分别为 3.3 和 38  $nmol \cdot L^{-1}$ 。A-366 具有全新的螺环 (环丁基-1, 3'-咪唑)-2'-胺的母核结构<sup>[54]</sup>。机制研究表明, 化合物 A-366 为底物竞争性抑制剂, 其与 G9a 的共晶复合物也证实了这一点; 该共晶结构还揭示, A-366 与 G9a/GLP 的 Asp1074 和 Asp1078 以氢键结合, 其 7-氮环丙氧基与赖氨酸结合通道结合, 类似于化合物 UNC0224 和 UNC0638 与 G9a 的结合模式<sup>[54]</sup>。A-366 对 G9a 和 GLP 选择性高于其他甲基转移酶, 包括 SUV39H2、MLL1、SETDB1、SETD7、SETD8、PRMTs (1, 3, 5, 6, 8)、SMYD2 (SET and MYND domain containing 2)、SMYD3、EZH1、EZH2、SUV420H1、SUV420H2 和 DNMT1<sup>[54]</sup>。对于人类前列腺癌细胞株 PC3, 用 A-366 在 3  $\mu mol \cdot L^{-1}$  浓度下给药 72 h 后, 其 H3K9me2 表达可下降约 50%, H3K27me3 和 H3K36me2 的表达则不受影响<sup>[54]</sup>。



21

### 2.4 喹啉类抑制剂

Srimongkolpithak 等<sup>[55]</sup>发现了具有喹啉骨架的全新的 G9a 抑制剂——HKMTI-1-247 (**22**) 和 HKMTI-1-248 (**23**)。机制研究表明, 该类化合物为底物竞争性抑制剂, 化合物 HKMTI-1-247 和 HKMTI-1-248 活性较高, 约为化合物 BIX01294 的 5 倍, 其抑制 G9a 的  $IC_{50}$  分别为 (13 ± 1) 和 (31 ± 3)  $nmol \cdot L^{-1}$ ; 此外, HKMTI-1-247 和 HKMTI-1-248 对 G9a 有很好的选择性, 在 50  $\mu mol \cdot L^{-1}$  的浓度下, 除了对 SETD2 和 EZH2 有中等程度的抑制活性外, 对其他甲基转移酶抑制活性均很低<sup>[55]</sup>。

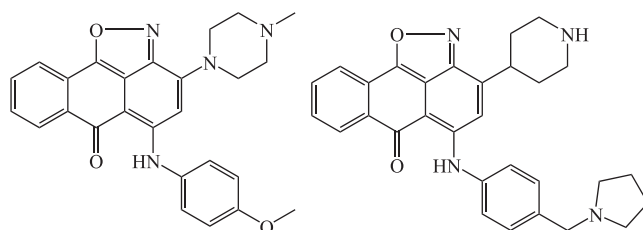


22

23

### 2.5 萘环并异噻唑类抑制剂

目前抑制剂的发现主要倾向于高通量筛选 (high-throughput screen, HTS) 和对现有抑制剂如 BIX01294 等的结构修饰。笔者课题组通过计算机辅助药物设计中形状相似性搜索 (shape-based virtual screening) 方法, 对商业化合物库进行虚拟筛选, 发现、设计和合成了一类以“6H-萘环 [1, 9-cd] 异噻唑-6-酮”为骨架的全新的 G9a 抑制剂<sup>[56]</sup>。课题组先以化合物 UNC0638 为基础构建形状相似性 ROCS (rapid overlay of chemical structures) 模型, 对 ChemDiv 数据库进行虚拟筛选, 得到了以“6H-萘环 [1, 9-cd] 异噻唑-6-酮”为骨架的化合物 CPUY074001 (**24**); 其在 10  $\mu mol \cdot L^{-1}$  浓度下对 G9a 的抑制率为 39.34%<sup>[56]</sup>。课题组继续以 CPUY074001 作为苗头化合物, 通过对 CPUY074001 与 G9a 结合模式和三维-定量构效关系 (3D quantitative structure-activity relationship, 3D-QSAR) 的结果分析, 设计合成了 2 个系列的化合物; 其中有部分化合物表现出较好的活性, 且对多株肿瘤细胞表现出很好的抗增殖活性; 其中, CPUY074020 (**25**) 不仅具有良好的 G9a 抑制活性和肿瘤细胞株抗增殖活性, 而且还可以降低 H3K9me2 的表达, 诱导肿瘤细胞的凋亡。此外, CPUY074020 还表现出很好的体内药动学性质<sup>[56]</sup>, 有望成为一个具有开发前景的先导化合物, 为后续新型 G9a 抑制剂的研究提供参考。



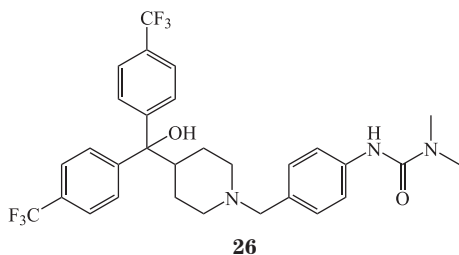
24

25

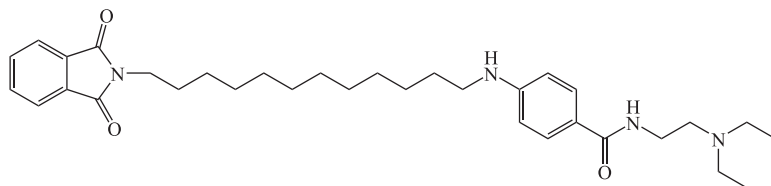
### 2.6 其他类抑制剂

2.6.1 DCG066 Kondengaden 等<sup>[57]</sup>通过虚拟筛选, 发现了一个具有全新骨架结构的 G9a 抑制剂 DCG066 (**26**)。DCG066 可以直接与 G9a 结合并在体外抑制其甲基转移酶的活性。DCG066 抑制 G9a 高表达的白血病细胞株 K562 的  $IC_{50}$  为 (1.7 ± 0.1)  $\mu mol \cdot L^{-1}$ , 且其细胞毒性较低<sup>[57]</sup>。因此, DCG066 既可以作为先导化合物为 G9a 抑制剂的后续研究提供参考, 也可以作为探索 G9a 生物学功能的化学探针<sup>[57]</sup>。

2.6.2 CBC-12、AO-153 和 CM-272 近期研究发现, DNMT 抑制剂 CBC-12 (27) 在体外也具有 G9a 抑制活性 ( $IC_{50} = 70 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )<sup>[58]</sup>。CBC-12 所具有的长链骨架也提示新的抑制剂骨架的发现。分子对接结果显示, 化合物 CBC-12 可能通过占据辅因子结合口袋来抑



26



27

### 3 结语与展望

综上所述, 组蛋白甲基转移酶 G9a 可以催化组蛋白和非组蛋白靶点发生甲基化。其在众多生物学过程中都扮演了很重要的角色, 与肿瘤细胞的增殖、凋亡、分化以及运动能力改变等密切相关。基于这些重要的功能, G9a 逐渐被认为是一个有前景的新型抗肿瘤靶点。近 10 年来关于 G9a 生物学作用的研究也推动了其选择性小分子抑制剂的开发。

尽管 G9a 复杂的生物学功能已不断被揭示, 但其抑制剂的开发仍处于起步阶段。首先, 自 2007 年首个合成小分子 BIX01294 被报道以来, 目前已有不少结构类型的小分子 G9a 抑制剂被发现, 但其发现途径仅限于化合物的高通量筛选和对已知化合物的结构改造, 利用计算机辅助药物设计 (computer-aided drug design, CADD) 等其他手段发现具有全新结构的 G9a 抑制剂仍然具有较大的研究空间。其次, 为了更好地探索 G9a 的生物学作用, 还需要发现更多的具有良好的体内外活性、较好的选择性以及优良理化性质的高质量化的

制 G9a, 因此推测其为 SAM 竞争性抑制剂<sup>[59]</sup>。此外, AO-153<sup>[60]</sup> 和 CM-272<sup>[61]</sup> 作为 2 种新的 G9a 抑制剂也被发现, 但其结构信息目前尚不明确。因此, 发现和寻找具有全新结构骨架及活性良好的 G9a 抑制剂仍具有广阔的前景。

学探针。此外, 由于 G9a 与 GLP 高度同源, 所以几乎全部的抑制剂对 G9a 和 GLP 均无很好的选择性。因此迫切需要发现特异性的高选择性的 G9a 抑制剂, 以有效区分 G9a 和 GLP, 进而研究各自的生物学作用。最后, 虽然临床前研究结果显示小分子抑制剂能较快地抑制 G9a 的酶活性, 下调相应组蛋白甲基化的表达。但是通常需要作用 7~10 d 后才能显著抑制相应细胞的增殖, 提示抑制剂可能起效较缓慢, 这也可能是阻碍其向临床推进的一个原因。

综上所述, 本文阐述了 G9a 的生物学功能及其在人类众多疾病中的作用, 以及目前所报道的各类 G9a 小分子抑制剂, 而目前对 G9a 生物学功能的认知仍不全面, 其抑制剂的研究更是处于起步阶段。因此, 对 G9a 在肿瘤中生物学功能的进一步研究也将指导其抑制剂的开发。本文旨在为靶向 G9a 的成药性小分子抑制剂的开发提供参考, 希望能为现有抑制剂的临床进展和新型抑制剂的开发提供帮助。

### [ 参考文献 ]

- [1] Tachibana M, Sugimoto K, Nozaki M, *et al.* G9a histone methyltransferase plays a dominant role in euchromatic histone H3 lysine9 methylation and is essential for early embryogenesis[J]. *Genes Dev*, 2002, 16(14): 1779-1791.
- [2] Imai K, Togami H, Okamoto T. Involvement of histone H3 lysine 9 (H3K9) methyl transferase G9a in the maintenance of HIV-1 latency and its reactivation by BIX01294[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(22): 16538-16545.
- [3] Maze I, Covington III H E, Dietz D M, *et al.* Essential role of the histone methyltransferase G9a in cocaine-induced plasticity[J]. *Science*, 2010, 327(5962): 213-216.
- [4] Covington H E, Maze I, Sun H S, *et al.* A role for repressive histone methylation in cocaine-induced vulnerability to stress[J]. *Neuron*, 2011, 71(4): 656-670.
- [5] Schaefer A, Sampath S C, Intrator A, *et al.* Control of cognition and adaptive behavior by the GLP/G9a epigenetic suppressor complex[J]. *Neuron*, 2009, 64(5): 678-691.
- [6] Link P A, Gangisetty O, James S R, *et al.* Distinct roles for histone methyltransferases G9a and GLP in cancer germ-line antigen gene regulation in human cancer cells and murine embryonic stem cells[J]. *Mol*



- Cancer Res*, 2009, 7(6): 851-862.
- [7] Tachibana M, Matsumura Y, Fukuda M, *et al.* G9a/GLP complexes independently mediate H3K9 and DNA methylation to silence transcription[J]. *EMBO J*, 2008, 27(20): 2681-2690.
- [8] Dong K B, Maksakova I A, Mohn F, *et al.* DNA methylation in ES cells requires the lysine methyltransferase G9a but not its catalytic activity[J]. *EMBO J*, 2008, 27(20): 2691-2701.
- [9] Shi Y, Despons C, Do J T, *et al.* Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic fibroblasts by Oct4 and Klf4 with small-molecule compounds[J]. *Cell Stem Cell*, 2008, 3(5): 568-574.
- [10] Shi Y, Do J T, Despons C, *et al.* A combined chemical and genetic approach for the generation of induced pluripotent stem cells[J]. *Cell Stem Cell*, 2008, 2(1): 525-528.
- [11] Chen X J, Skutt-Kakaria K, Davison J, *et al.* G9a/GLP-dependent histone H3K9me2 patterning during human hematopoietic stem cell lineage commitment[J]. *Genes Dev*, 2012, 26(22): 2499-2511.
- [12] Oh S T, Kim K B, Chae Y C, *et al.* H3K9 histone methyltransferase G9a-mediated transcriptional activation of p21[J]. *FEBS Lett*, 2014, 588(5): 685-691.
- [13] Huang J, Dorsey J, Chuikov S, *et al.* G9a and Glp methylate lysine 373 in the tumor suppressor p53[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(13): 9636-9641.
- [14] Kondo Y, Shen L, Ahmed S, *et al.* Downregulation of histone H3 lysine 9 methyltransferase G9a induces centrosome disruption and chromosome instability in cancer cells[J]. *PLoS One*, 2008, 3(4): e2037.
- [15] Kondo Y, Shen L L, Suzuki S, *et al.* Alterations of DNA methylation and histone modifications contribute to gene silencing in hepatocellular carcinomas[J]. *Hepatology*, 2007, 45(3): 974-983.
- [16] Watanabe H, Soejima K, Yasuda H, *et al.* Deregulation of histone lysine methyltransferases contributes to oncogenic transformation of human bronchoepithelial cells[J]. *Cancer Cell Int*, 2008, 8(1): 1-12.
- [17] Lehnertz B, Pabst C, Su L, *et al.* The methyltransferase G9a regulates HoxA9-dependent transcription in AML[J]. *Genes Dev*, 2014, 28(4): 317-327.
- [18] Tachibana M, Sugimoto K, Fukushima T, *et al.* SET domain-containing protein, G9a, is a novel lysine-preferring mammalian histone methyltransferase with hyperactivity and specific selectivity to lysines 9 and 27 of histone H3[J]. *Biol Chem*, 2001, 276 (27): 25309-25317.
- [19] Real S, Eisenhaber F, O'Carroll D, *et al.* Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases[J]. *Nature*, 2000, 406(6796): 593-599.
- [20] O'Carroll D, Scherthan H, Peters A H, *et al.* Isolation and characterization of Suv39h2, a second histone H3 methyltransferase gene that displays testis-specific expression[J]. *Mol Cell Biol*, 2000, 20(24): 9423-9433.
- [21] Tamaru H, Selker E U. A histone H3 methyltransferase controls DNA methylation in *Neurospora crassa*[J]. *Nature*, 2001, 414(6861): 277-283.
- [22] Zhang X, Tamaru H, Khan S I, *et al.* Structure of the *Neurospora* SET domain protein DIM-5, a histone H3 lysine methyltransferase[J]. *Cell*, 2002, 111(1): 117-127.
- [23] Ogawa H, Ishiguro K, Gaubatz S, *et al.* A complex with chromatin modifiers that occupies E2F- and Myc-responsive genes in G0 cells[J]. *Science*, 2002, 296 (5570): 1132-1136.
- [24] Wu H, Chen X Z, Xiong J, *et al.* Histone methyltransferase G9a contributes to H3K27 methylation *in vivo*[J]. *Cell Res*, 2010, 21(2): 365-367.
- [25] Shankar S R, Bahirvani A G, Rao V K, *et al.* G9a, a multipotent regulator of gene expression[J]. *Epigenetics*, 2013, 8(1): 16-22.
- [26] Tachibana M, Ueda J, Fukuda M, *et al.* Histone methyltransferases G9a and GLP form heteromeric complexes and are both crucial for methylation of euchromatin at H3-K9[J]. *Genes Dev*, 2005, 19(7): 815-826.
- [27] Jenuwein T, Laible G, Dorn R, *et al.* SET domain proteins modulate chromatin domains in eu- and heterochromatin[J]. *Cell Mol Life Sci*, 1998, 54(1): 80-93.
- [28] Peters A, Kubicek M S, Mechtler K, *et al.* Partitioning and plasticity of repressive histone methylation states in mammalian chromatin[J]. *Mol Cell*, 2003, 12(6): 1577-1589.
- [29] Rice J C, Briggs S D, Ueberheide B, *et al.* Histone methyltransferases direct different degrees of methylation to define distinct chromatin domains[J]. *Mol Cell*, 2003, 12(6): 1591-1598.
- [30] Chen X J, Skutt-Kakaria K, Davison J, *et al.* G9a/GLP-dependent histone H3K9me2 patterning during human hematopoietic stem cell lineage commitment[J]. *Genes Dev*, 2012, 26(22): 2499-2511.
- [31] Chen M W, Hua K T, Kao H J, *et al.* H3K9 histone methyltransferase G9a promotes lung cancer invasion and metastasis by silencing the cell adhesion molecule Ep-CAM[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(20): 7830-7840.
- [32] Dong C, Wu Y, Yao J, *et al.* G9a interacts with Snail and is critical for Snail-mediated E-cadherin repression in human breast cancer[J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(4): 1469-1486.
- [33] 张洁, 丁健, 陈奕. 组蛋白甲基转移酶及其相应抑制剂在抗肿瘤领域的研究进展 [J]. *中国新药杂志*, 2014, 23(5): 533-540.
- [34] Kaniskan H U, Konze K D, Jin J. Selective inhibitors of protein methyltransferases[J]. *J Med Chem*, 2015, 58(4): 1596-1629.
- [35] Greiner D, Bonaldi T, Eskeland R, *et al.* Identification of a specific inhibitor of the histone methyltransferase SU(VAR)3-9[J]. *Nat Chem Biol*, 2005, 1(3): 143-145.
- [36] Chang Y Q, Zhang X, Horton J R, *et al.* Structural basis for G9a-like protein

- lysine methyltransferase inhibition by BIX-01294[J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2009, 16(3): 312-317.
- [37] Kubicek S, O'Sullivan R J, August E M, *et al.* Reversal of H3K9me2 by a small-molecule inhibitor for the G9a histone methyltransferase[J]. *Mol Cell*, 2007, 25(3): 473-481.
- [38] Vedadi M, Barsyte-Lovejoy D, Liu F, *et al.* A Chemical probe selectively inhibits G9a and GLP methyltransferase activity in cells[J]. *Nat Chem Biol*, 2011, 7(8): 566-574.
- [39] Liu F, Chen X, Allali-Hassani A, *et al.* Discovery of a 2,4-diamino-7-aminoalkoxyquinazoline as a potent and selective inhibitor of histone lysine methyltransferase G9a[J]. *J Med Chem*, 2009, 52(24): 7950-7953.
- [40] Liu F, Chen X, Allali-Hassani A, *et al.* Protein lysine methyltransferase G9a inhibitors: design, synthesis, and structure activity relationships of 2,4-diamino-7-aminoalkoxy-quinazolines[J]. *J Med Chem*, 2010, 53(15): 5844-5857.
- [41] Liu F, Barsyte-Lovejoy D, Allali-Hassani A, *et al.* Optimization of cellular activity of G9a inhibitors 7-aminoalkoxy-quinazolines[J]. *J Med Chem*, 2011, 54(17): 6139-6150.
- [42] Epsztejn-Litman S, Feldman N, Abu-Remaileh M, *et al.* De novo DNA methylation promoted by G9a prevents reprogramming of embryonically silenced genes[J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2008, 15(11): 1176-1183.
- [43] Estève P O, Hang G C, Smallwood A, *et al.* Direct interaction between DNMT1 and G9a coordinates DNA and histone methylation during replication[J]. *Genes Dev*, 2006, 20(22): 3089-3103.
- [44] Chen L H, Li Z Y, Zwolinska A K, *et al.* MDM2 recruitment of lysine methyltransferases regulates p53 transcriptional output[J]. *EMBO J*, 2010, 29(15): 2538-2552.
- [45] Fritsch L, Robin P, Mathieu J, *et al.* A subset of the histone H3 lysine 9 methyltransferases Suv39h1, G9a, GLP, and SETDB1 participate in a multimeric complex[J]. *Mol Cell*, 2010, 37(1): 46-56.
- [46] Stadtfeld M, Maherali N, Breault D T, *et al.* Defining molecular cornerstones during fibroblast to iPS cell reprogramming in mouse[J]. *Cell Stem Cell*, 2008, 2(3): 230-240.
- [47] Liu F, Barsyte-Lovejoy D, Li F L, *et al.* Discovery of an *in vivo* chemical probe of the lysine methyltransferases G9a and GLP[J]. *J Med Chem*, 2013, 56(21): 8931-8942.
- [48] Konze K D, Pattenden S G, Liu F, *et al.* A chemical tool for *in vitro* and *in vivo* precipitation of lysine methyltransferase G9a[J]. *ChemMedChem*, 2014, 9(3): 549-553.
- [49] Chang Y Q, Ganesh T, Horton J R, *et al.* Adding a lysine mimic in the design of potent inhibitors of histone lysine methyltransferases[J]. *J Mol Biol*, 2010, 400(1): 1-7.
- [50] Malmquist N A, Moss T A, Mecheri S, *et al.* Small-molecule histone methyltransferase inhibitors display rapid antimalarial activity against all blood stage forms in *Plasmodium falciparum*[J]. *Proc Nat Acad Sci*, 2012, 109(41): 16708-16713.
- [51] Pang A L, Title A C, Rennert O M. Modulation of microRNA expression in human lung cancer cells by the G9a histone methyltransferase inhibitor BIX01294[J]. *Oncol Lett*, 2014, 7(6): 1819-1825.
- [52] Sundriyal S, Malmquist N A, Caron J, *et al.* Development of diamino-quinazoline histone lysine methyltransferase inhibitors as potent blood-stage antimalarial compounds[J]. *ChemMedChem*, 2014, 9(10): 2360-2373.
- [53] Yuan Y, Wang Q, Paulk J, *et al.* A small-molecule probe of the histone methyltransferase G9a induces cellular senescence in pancreatic adenocarcinoma[J]. *ACS Chem Biol*, 2012, 7(7): 1152-1157.
- [54] Sweis R F, Pliushchev M, Brown P J, *et al.* Discovery and development of potent and selective inhibitors of histone methyltransferase G9a[J]. *ACS Med Chem Lett*, 2014, 5(2): 205-209.
- [55] Srimongkolpithak N, Sundriyal S, Li F, *et al.* Identification of 2,4-diamino-6,7-dimethoxyquinoline derivatives as G9a inhibitors[J]. *Med Chem Comm*, 2014, 5(12): 1821-1828.
- [56] Chen W L, Wang Z H, Feng T T, *et al.* Discovery, design and synthesis of 6H-anthra [1,9-cd] isoxazol-6-one scaffold as G9a inhibitor through a combination of shape-based virtual screening and structure-based molecular modification[J]. *Bioorg Med Chem*, 2016, 24(22): 6102-6108.
- [57] Kondengaden S M, Luo L F, Huang K, *et al.* Discovery of novel small molecule inhibitors of lysine methyltransferase G9a and their mechanism in leukemia cell lines[J]. *Eur J Med Chem*, 2016, 122: 382-393.
- [58] Halby L, Champion C, Sénamaud-Beaufort C, *et al.* Rapid synthesis of new DNMT inhibitors derivatives of procainamide[J]. *ChemBioChem*, 2012, 13(1): 157-165.
- [59] Yoo J, Choi S, Medina-Franco J L. Molecular modeling studies of the novel inhibitors of DNA methyltransferases SGI-1027 and CBC12: implications for the mechanism of inhibition of DNMTs[J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e1-13.
- [60] Ito A. Identification of novel histone H3K9 methyltransferase inhibitors using a fluorescent based-screening system and visualization of histone H3K9 methylation in living cells[C]// 9th AFMC Int Med Chem Symp (AIMECS), October 15-18, 2013, Taipei. 2013: Abst S1-02.
- [61] Edurne S J, Xabier A, Obdulia R, *et al.* Discovery of first-in-class reversible dual small molecule inhibitors against G9a and DNMTs in hematological malignancies[J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 15424-15433.