

## 核苷类甲基转移酶抑制剂的研究进展

张俊杰<sup>1,2</sup>, 刘同超<sup>1\*</sup>, 熊兵<sup>1,2\*</sup>

(1. 中国科学院上海药物研究所, 上海 201203; 2. 中国科学院大学, 北京 100049)

**摘要:** *S*-腺苷-*L*-蛋氨酸 (SAM) 作为仅次于 ATP 第二普遍存在的辅助因子, 其主要的功能是作为 SAM 依赖性甲基转移酶的甲基供体, 对 DNA、RNA、蛋白质等基本生命物质进行甲基化修饰。此过程构成了表观遗传调控、细胞信号转导和生物代谢循环的重要一环, 参与多种疾病的发生与发展, 因此, SAM 依赖性甲基转移酶已成为药物研发的潜在靶点。最近, 许多核苷类分子已经被开发为甲基转移酶的 SAM 竞争性抑制剂, 从而阻断下游的信号通路, 达到治疗相关疾病的目的。本文系统性回顾基于 SAM 结构开展改造的甲基转移酶抑制剂设计策略和研发过程, 分析核苷类甲基转移酶抑制剂研发的不足和解决方法, 为未来设计靶向甲基转移酶 SAM 结合位点的核苷类分子提供更多的思路。

**关键词:** 表观遗传学; *S*-腺苷-*L*-蛋氨酸; 甲基转移酶; 核苷类似物

中图分类号: R914 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)05-1126-25

## Advances in nucleoside analogues as methyltransferase inhibitors

ZHANG Jun-jie<sup>1,2</sup>, LIU Tong-chao<sup>1\*</sup>, XIONG Bing<sup>1,2\*</sup>

(1. Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Abstract:** As the second largest cofactor after ATP in body, *S*-adenosyl-*L*-methionine (SAM) is responsible for methyl donor in SAM-dependent methyltransferases (MTases). The methylation of essential ingredients (*e. g.*, DNA, RNA, protein) plays a critical role in epigenetic regulation, cellular signal transduction and metabolic cycles, which is closely related to different kinds of diseases. Therefore, SAM-dependent methyltransferases are considered as promising drug targets. Currently, a growing number of nucleoside analogues have been developed as SAM-competitive inhibitors, blocking the downstream signaling pathways to cure diseases. In the review, we outline the design strategy and optimization process of methyltransferase inhibitors, analyze the shortcomings and solutions of developing nucleoside derivatives as MTase inhibitors, to provide guidance and broad direction to the development of nucleoside MTase inhibitors.

**Key words:** epigenetics; *S*-adenosyl-*L*-methionine; methyltransferase; nucleoside analogue

*S*-腺苷-*L*-蛋氨酸 (*S*-adenosyl-*L*-methionine, AdoMet, SAM) 作为体内第二普遍的辅助因子, 是一类由蛋氨酸和腺苷构成的带有正电荷的硫鎓离子化合物。如图 1 所示<sup>[1,2]</sup>, 在生物体内的 SAM 由底物 *L*-蛋氨酸 (methio-

nine) 和 ATP (adenosine triphosphate) 在甲硫氨酸腺苷转移酶 (methionine adenosyltransferase, MAT) 催化下合成<sup>[3]</sup>。在 SAM 依赖性甲基转移酶 (SAM-dependent methyltransferases, MTases) 催化下, 体内具有亲核性的原子 (N、C、O 和 S), 通过  $S_N2$  机制对 SAM 的硫中心进行亲核进攻, 实现甲基从 SAM 向多种物质的转移。甲基转移酶作用的底物不仅包括生物大分子 (如 DNA、组蛋白、RNA、病毒蛋白等), 而且也包括体内代

收稿日期: 2023-12-17; 修回日期: 2024-03-06.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82204187, 82173658, 81773572).

\*通讯作者 Tel: 86-21-68077888, E-mail: tongchao\_liu@simm.ac.cn;

Tel: 13661970096, E-mail: bxiong@simm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-1406

谢小分子物质(如儿茶酚胺、苯乙醇胺、烟酰胺、组胺等)<sup>[4]</sup>。上述底物的甲基化过程在表观遗传调控、蛋白质功能调节、代谢物及信号分子的合成和降解等方面发挥着至关重要的作用<sup>[5]</sup>,与肿瘤、神经疾病、炎症、代谢性疾病等密切相关<sup>[6]</sup>。

核苷和核苷酸作为内源性物质,参与多种细胞过程,例如DNA和RNA合成、细胞信号传导、酶调节和代谢。经过化学修饰的核苷和核苷酸类似物,模拟其内源性物质,利用细胞代谢掺入DNA和RNA中以抑制细胞分裂和病毒复制。除此之外,核苷类似物与聚合酶、激酶、核糖核苷酸还原酶、甲基转移酶、核苷磷酸化酶等相互作用,达到抑制酶活的目的<sup>[7]</sup>。因此,核苷类似物常被开发为抗肿瘤药物(如吉西他滨、地西他滨、阿糖胞苷、5氟尿嘧啶等)和抗病毒药物(如利巴韦林、替诺福韦、莫诺拉韦、瑞德西韦等)<sup>[8]</sup>。特别地,基于

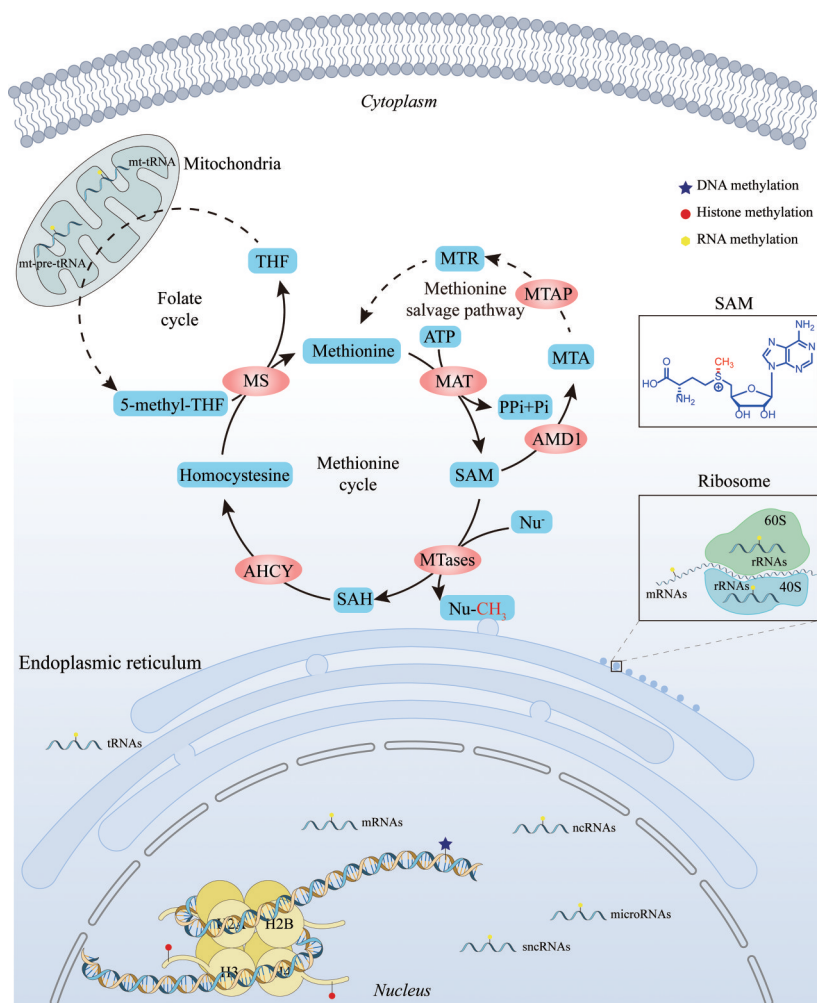
SAM结构开发的甲基转移酶SAM竞争性抑制剂成为了近几年抗肿瘤药物研发的热门方向,本课题组也在此领域开展了较多的研究工作。因此,本文总结了核苷类甲基转移酶抑制剂的研究进展,重点关注与表观遗传相关的甲基转移酶核苷类抑制剂。

## 1 非特异性甲基转移酶抑制剂

作为SAM的结构类似物,SAH(*S*-adenosyl-*L*-homocysteine,化合物1,图2)、西奈芬净(sinefungin,化合物2)和5'-脱氧-5'-甲硫腺苷(methylthioadenosine, MTA,化合物3)均可在一定程度上抑制不同的以SAM为甲基供体的甲基转移酶的催化活性。

### 1.1 SAH

SAH作为甲基转移过程的产物,与蛋白的SAM口袋有较好的结合。在甲硫氨酸循环中,生成的SAH被腺苷同型半胱氨酸酶(adenosylhomocysteinase, AHCY)



**Figure 1** The overview of SAM metabolism<sup>[1]</sup> and subcellular localization of the methylation modifications in the cell<sup>[2]</sup>. MAT: Methionine adenosyltransferase; SAM: *S*-Adenosyl-*L*-methionine; MTase: Methyltransferases; SAH: *S*-Adenosyl-*L*-homocysteine; AHCY: Adenosylhomocysteinase; MS: Methionine synthase; THF: Tetra-hydrofolate; AMD1: Adenosylmethionine decarboxylase 1; MTA: Methylthioadenosine; MTAP: Methylthioadenosine phosphorylase; MTR: Methylthioribose; Nu: Nucleophile; ATP: Adenosine triphosphate; PPi: Pyrophosphoric acid; Pi: Phosphoric acid

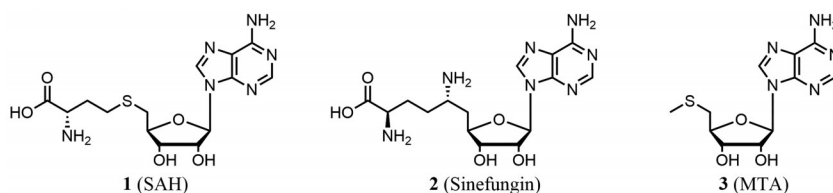


Figure 2 The chemical structures of the representative MTase pan-inhibitors

转化为同型半胱氨酸<sup>[7]</sup> (图1)。由于各种甲基转移酶具有产物负反馈抑制的特性,因此SAH对甲基转移酶的活性具有一定的抑制作用<sup>[9]</sup>。在多种甲基转移酶的晶体结构中,SAH均占据了SAM的结合口袋,Richon等<sup>[9]</sup>报道了SAH对于不同种类的甲基转移酶具有较高的亲和力。另一方面,抑制AHCY的水解活性从而增加SAH的含量,同样能起到抑制甲基转移酶活性的作用<sup>[10]</sup>。

### 1.2 Sinefungin

Sinefungin在结构上与SAH较为类似,也能一定程度地抑制大多数甲基转移酶的活性。2016年,Sinefungin被报道作为SET7/9 (SET domain-containing lysine methyltransferase 7/9)的抑制剂,并抑制H3K4单甲基化 (H3K4me1),从而改善肾纤维化<sup>[11]</sup>。Sinefungin被披露作为SETDB2 (SET domain bifurcated histone lysine methyltransferase 2)的抑制剂,SETDB2的下调将会导致趋化因子 (CXC基序) 配体CXCL1和CXCL8的分泌增强,增强中性粒细胞的免疫反应,该化合物可以治疗多种的病毒或细菌感染<sup>[12]</sup>。Sala等<sup>[13]</sup>发现,Sinefungin作为I型PRMTs (protein arginine methyltransferases)的抑制剂,在鼠乳腺癌模型中可降低肿瘤基质中的肌成纤维细胞活性,而对正常的肌成纤维细胞无影响。

### 1.3 MTA

MTA是普遍存在于生物体内的含硫核苷,对几乎所有的SAM依赖性甲基转移酶均有抑制活性<sup>[14]</sup>。由于腺苷5'位的羟基被甲硫基取代,MTA具有良好的细胞渗透性。在约15%的实体瘤患者中,由于靠近经常缺失的肿瘤抑制基因CDKN2A (cyclin dependent kinase inhibitor 2A),编码甲硫腺苷磷酸化酶 (methylthioadenosine phosphorylase, MATP)的基因也会随之丢失,造成MTA在细胞中累积,从而抑制PRMT5的活性,同时也提升了细胞对PRMT5抑制的敏感性,因此MTA依赖性的PRMT5抑制剂也为MTAP-CDKN2A缺失肿瘤患者提供了一种治疗选择<sup>[15]</sup>。在细菌脂多糖 (lipopolysaccharides, LPS) 处理的小鼠模型中,MTA可以抑制肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) 的表达以及刺激白细胞介素10 (inter-

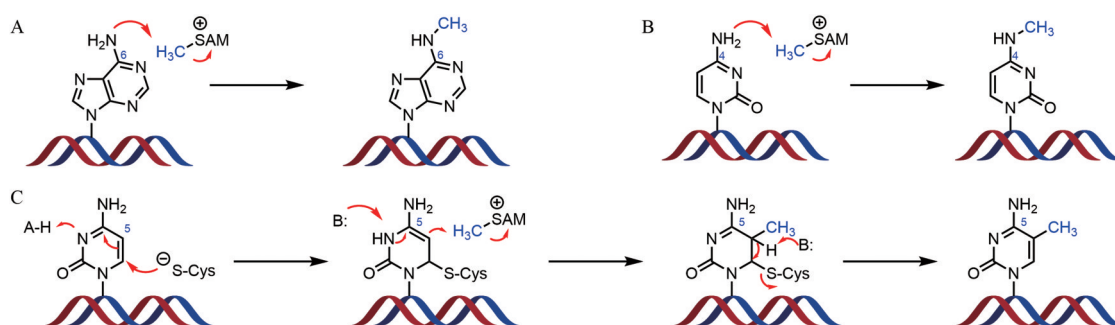
leukin-10, IL-10)的合成,从而减弱免疫反应,对炎症疾病的治疗有一定价值<sup>[16]</sup>。

## 2 DNA甲基转移酶特异性抑制剂

如图3所示,DNA发生甲基化的位点在胞嘧啶的C<sup>5</sup> (C<sup>5</sup>-methylcytosine, 5mC)和N<sup>4</sup> (N<sup>4</sup>-methylcytosine, 4mC)位置,以及腺嘌呤的N<sup>6</sup>位置 (N<sup>6</sup>-methyladenosine, 6mA)。胞嘧啶4位氨基与腺嘌呤6位氨基,可以对SAM直接进行S<sub>N</sub>2亲核进攻,无需形成中间体<sup>[17]</sup>。由于胞嘧啶属于缺电子的芳杂环,C<sup>5</sup>位置并不能对SAM直接进行亲核取代,而是遵循酶催化的Michael加成的反应机制<sup>[18]</sup>。位于CpG序列上的5mC最为常见,该修饰对于沉默逆转录转座子元件序列、X染色体失活、调节基因表达和细胞转化至关重要<sup>[19-21]</sup>。DNA甲基转移酶 (DNA methyltransferase, DNMT)一共有5个亚型,分别是DNMT1、DNMT2、DNMT3A、DNMT3B和DNMT3L,其中只有DNMT1、DNMT3A和DNMT3B能催化DNA甲基化。DNMT1是一种维持甲基转移酶,负责在新DNA复制后的甲基化标记。而DNMT3A和DNMT3B则是一种从头甲基化酶,在非甲基化DNA上启动甲基化标记,对于发育和细胞分化至关重要<sup>[22]</sup>。5mC修饰增加DNA螺旋的稳定性,抑制基因的表达,而6mA修饰破坏螺旋的稳定性并导致DNA解旋<sup>[23]</sup>。对于DNA的6mA修饰催化酶研究尚不明确,一些团队也报道了N6AMT1 (N-6 adenine-specific DNA methyltransferase 1)<sup>[24]</sup>和METTL4 (methyltransferase like 4)可能催化6mA过程,但是有研究显示N6AMT1是蛋白eRF1 (eukaryotic translation termination factor 1)的甲基转移酶而无法结合和催化DNA甲基化<sup>[25]</sup>。因此,下文对DNA的6mA修饰酶抑制剂不做讨论,重点关注DNMT1和DNMT3抑制剂的研究进展。

### 2.1 DNMT1抑制剂

2004年,由Celgene公司研发的DNMT1核苷类抑制剂阿扎胞苷 (azacitidine, 化合物4,图4)被批准上市,用于治疗幼年型粒单核细胞白血病 (juvenile myelomonocytic leukemia, JMML)、急性髓系白血病 (acute myeloid leukemia, AML)、骨髓增生异常综合征 (myelodysplastic syndromes, MDS)、慢性髓细胞白血病 (chronic myelocytic leukemia, CML)和慢性粒单核细



**Figure 3** The catalytic mechanism of DNA methyltransferases (DNMTs). A:  $N^6$ -methyladenine (6mA); B:  $N^4$ -methylcytosine (4mC); C:  $C^5$ -methylcytosine (5mC)

胞白血病 (chronic myelomonocytic leukemia, CMML)。随后在 2006 年, Eisai 公司研发的地西他滨 (decitabine, 化合物 **5**) 也被批准上市, 用于治疗 AML 和 MDS。阿扎胞苷与地西他滨进入体内后, 都被转化为脱氧核苷酸三磷酸, 然后代替胞嘧啶掺入复制的 DNA 中, 修饰后的碱基与 DNMT1 形成共价键, 导致酶的耗尽和 DNA 的去甲基化<sup>[26]</sup>。两种药物进入体内易被水解和在胞苷脱氨酶的作用下脱氨, 因此在临床给药后体内半衰期都很短。接受地西他滨静脉注射治疗的患者在输注后 1 h 内显示出大于 90% 的药物清除率<sup>[27]</sup>。阿扎胞苷具有类似的快速清除率<sup>[28,29]</sup>。Guadecitabine (SGI-110, 化合物 **6**) 是由 Astex 公司开发的第二代 DNMT1 抑制剂, 为地西他滨和脱氧鸟苷通过磷酸二酯键连接的二核苷酸, 解决了第一代 DNMT1 抑制剂的不足。Guadecitabine 不易被体内多个器官中胞苷脱氨酶所代谢, 半衰期较第一代 DNMT1 抑制剂更长, 暴露效果更佳, 增强了融入分裂细胞 DNA 的能力。截至目前, Guadecitabine 已经完成用于治疗 AML<sup>[30,31]</sup>、MDS<sup>[32]</sup> 和 CMML<sup>[32]</sup> 的 III 期临床试验, 但由于疗效不显著, 均未达到预期的临床终点<sup>[33]</sup>。由美国国立癌症研究所 (National Cancer Institute, NCI) 研发的化合物 **7** 在胞嘧啶的 5 位引入氟原子, 于 2018 年开展 I/II 期临床试验, 用于评价在非小细胞肺癌和食管癌患者中的疗效, 但是在 2023 年 5 月终止了临床试验<sup>[34]</sup>。由 Rexahn 公司研发的 RX-3117 (化合物 **8**) 对胞苷的呋喃糖环进行结构优化, 与阿扎胞苷和地西他滨激活机制不同的是, 该化合物通过 UCK2 (uridine-cytidine kinase 2) 激活磷酸化, 因此可以克服阿扎胞苷和地西他滨的交叉耐药问题<sup>[35]</sup>。RX-3117 开展了两项 I/II 期临床试验<sup>[36,37]</sup>, 旨在评价治疗转移性胰腺癌和晚期实体瘤的疗效, 临床结果显示疗效较好, 且安全性与耐受性良好<sup>[38,39]</sup>。由 Southern Research Institute 研发的 NTX-301 (化合物 **9**) 将地西他滨的呋喃环中的氧原子替换为硫原子, 与地西他滨相比, NTX-301 作为单一疗法以及联用 BCL-2

抑制剂维奈托克 (Venetoclax) 的治疗指数有所改善。此外, NTX-301 的口服给药优于传统 DNA 甲基转移酶抑制剂的腹腔给药, 凸显了额外的临床优势<sup>[40]</sup>。NTX-301 在 2022 年终止了一项 I/II 期临床试验<sup>[41]</sup>, 除此之外, 另外一项 I 期临床试验<sup>[42]</sup>正在招募患者中, 旨在评价在 MDS 和 AML 患者中的安全性和耐受性<sup>[43]</sup>。

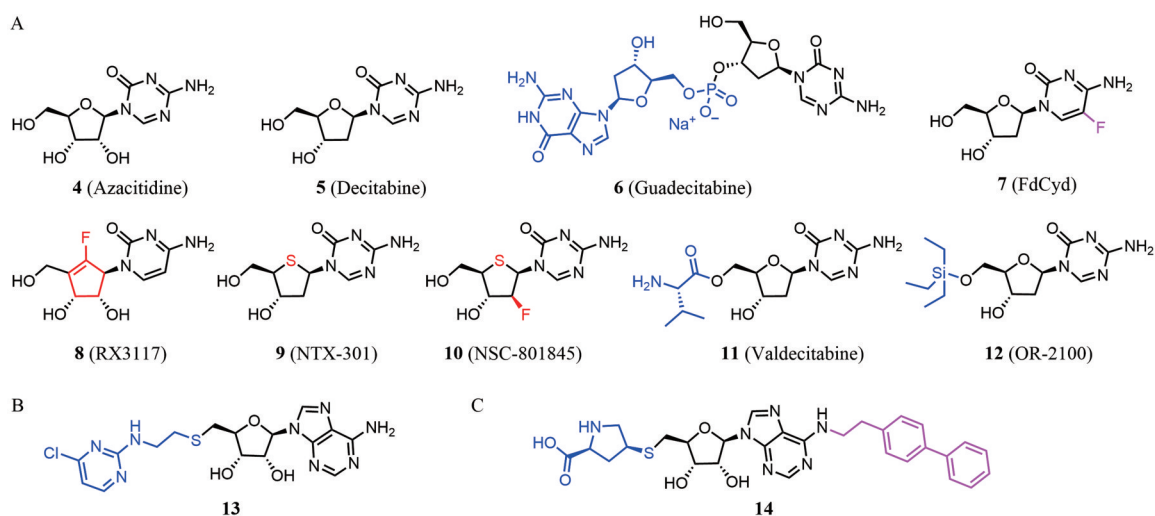
NCI 基于 NTX-301 的结构在呋喃糖环 2' 位引入氟原子, 设计出 NSC-801845 (化合物 **10**)<sup>[44]</sup>, 相较于 NTX-301 具有更佳的体内外药效。Zhang 等<sup>[45]</sup>报道了一个缬氨酸修饰的地西他滨前药 (化合物 **11**), 进入体内之后快速被酯酶水解形成地西他滨, 血浆暴露量和生物利用度有所提高。类似地, Ohara 公司对地西他滨进行硅烷化修饰, 设计了前药 OR-2100 (化合物 **12**), 其 DNA 去甲基化能力和抗肿瘤效果与地西他滨相当, 且体内不良反应较少, 对胞苷脱氨酶表现出较高的稳定性, 口服生物利用度显著提高<sup>[46-48]</sup>。

## 2.2 DNMT3 抑制剂

在不同癌症的发生与进展中, DNMT3 往往会发生失调和突变<sup>[49]</sup>。DNMT3A 在 AML<sup>[50]</sup>、胃癌<sup>[51]</sup>、肺癌<sup>[52]</sup> 和结直肠癌<sup>[53]</sup> 中表达上调, 同时在男性不育<sup>[54]</sup>、衰老<sup>[54]</sup> 过程中具有一定的作用。DNMT3B 在子宫内膜癌<sup>[55]</sup>、结肠癌<sup>[56]</sup> 和乳腺癌<sup>[57]</sup> 中表达上调, 但在淋巴瘤<sup>[58]</sup> 中表达下调。相比于 DNMT1 抑制剂, DNMT3A 和 DNMT3B 抑制剂报道较少。2013 年, GlaxoSmithKline 公司披露了 DNMT3A 的特异性抑制剂 (化合物 **13**)<sup>[59]</sup>, 选择性抑制 DNMT3A 的活性 (DNMT3A:  $IC_{50} = 3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  vs DNMT1:  $IC_{50} > 300 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。2006 年, Mirati 公司披露了 DNMT3B2 的特异性抑制剂 (化合物 **14**)<sup>[60]</sup>, 显著地抑制 DNMT3B2 的活性 ( $IC_{50} = 0.26 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 但对 DNMT1A 的抑制活性较弱 ( $IC_{50} = 3.7 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。

## 3 组蛋白甲基转移酶特异性抑制剂

组蛋白甲基化修饰是研究较为深入的蛋白翻译后修饰 (post-translational modification, PTM), 参与异染色质形成和维持、转录调控、DNA 修复、X 染色体失活



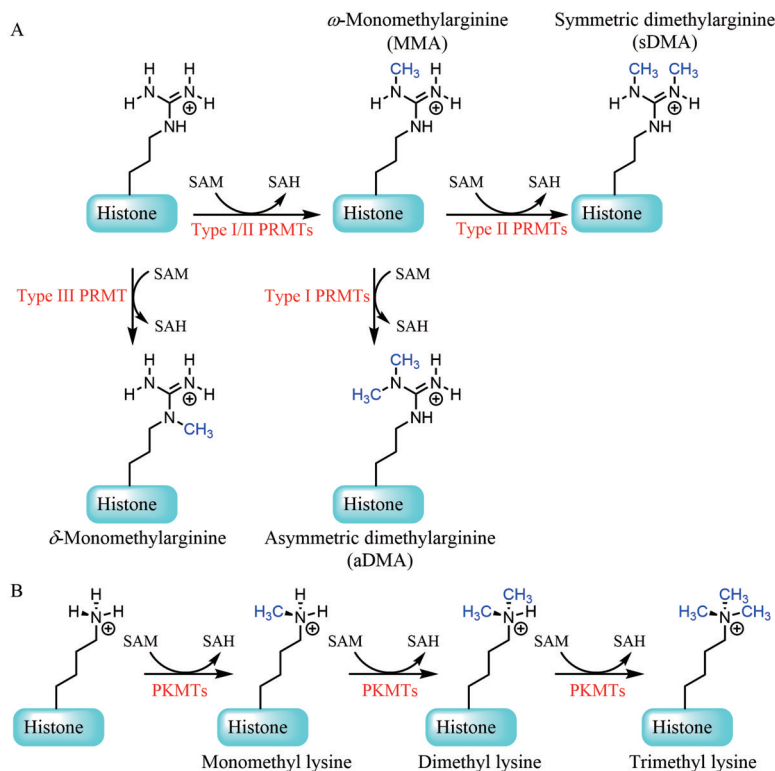
**Figure 4** The chemical structures of the representative DNMT inhibitors. A: DNMT1 inhibitors; B: DNMT3A inhibitor; C: DNMT3B inhibitor

和 RNA 成熟等生物过程<sup>[61]</sup>。根据修饰的残基类型的不同, 组蛋白甲基转移酶可以分为蛋白质精氨酸甲基转移酶 (protein arginine methyltransferase, PRMT) 和蛋白质赖氨酸甲基转移酶 (protein lysine methyltransferase, PKMT)。组蛋白甲基化是通过改变蛋白质的体积和疏水性, 从而影响组蛋白甲基化阅读器对组蛋白的识别<sup>[4]</sup>。如图 5 所示, 在组蛋白甲基转移酶的催化下, SAM 的甲基可以转移至精氨酸和赖氨酸残基上,

在精氨酸残基上形成单甲基化和二甲基化基团<sup>[62]</sup>, 但是在赖氨酸残基上形成单甲基化、二甲基化和三甲基化基团<sup>[61]</sup>。

### 3.1 PRMTs 抑制剂

如图 5 所示, 组蛋白精氨酸残基首先在 PRMTs 催化下得到单甲基化精氨酸产物 (monomethylation of arginine, MMA), 随后继续在 PRMTs 的催化下发生第二次甲基转移, 生成对称的双甲基精氨酸产物 (sym-



**Figure 5** The catalytic mechanism of histone methyltransferases. A: Protein arginine methyltransferases (PRMTs); B: Protein lysine methyltransferases (PKMTs)

metrically demethylated arginine, sDMA) 或不对称的双甲基精氨酸产物 (asymmetrically demethylated arginine, aDMA)。按照催化底物甲基化状态的不同, 可以将 PRMTs 分为三大类 (图 5A): ① I 型 PRMTs (PRMT1, 2, 3, 4, 6, 8), 负责催化精氨酸胍基的  $\omega$  氮原子的单甲基化以及不对称双甲基化过程; ② II 型 PRMTs (PRMT5 和 PRMT9), 负责催化  $\omega$  氮原子的单甲基化以及对称双甲基化过程; ③ III 型 PRMT (PRMT7), 负责催化精氨酸胍基的  $\delta$  氮原子的单甲基化过程<sup>[62]</sup>。组蛋白 H3 的第 2、8、17、26 位和 H4 的第 2 位精氨酸是常见的甲基化位点<sup>[61]</sup>。下文将详细介绍核苷类的 PRMTs 抑制剂的研究进展。

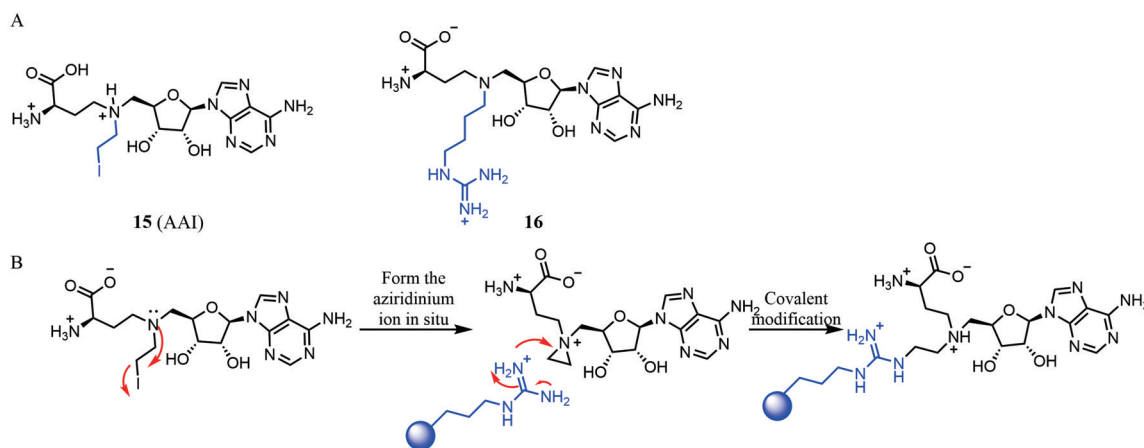
### 3.1.1 PRMT1 抑制剂

PRMT1 是第一个被鉴定的哺乳动物 PRMT<sup>[63]</sup>, 承担哺乳动物细胞中大部分 I 型 PRMTs 的活性<sup>[64]</sup>。PRMT1 负责催化组蛋白 H4R3 精氨酸侧链的不对称二甲甲基化, 该过程参与基因转录、DNA 修复和信号转导<sup>[65-67]</sup>。PRMT1 的过度表达和异常剪接与多种疾病有关, 包括乳腺癌<sup>[68]</sup>、前列腺癌<sup>[69]</sup>、结肠癌<sup>[70]</sup>、肺癌和膀胱癌等<sup>[71]</sup>。2008 年, Osborne 等<sup>[72]</sup>报道一类 PRMT1 的共价抑制剂 AAI (化合物 15, 图 6), 在精氨酸残基的催

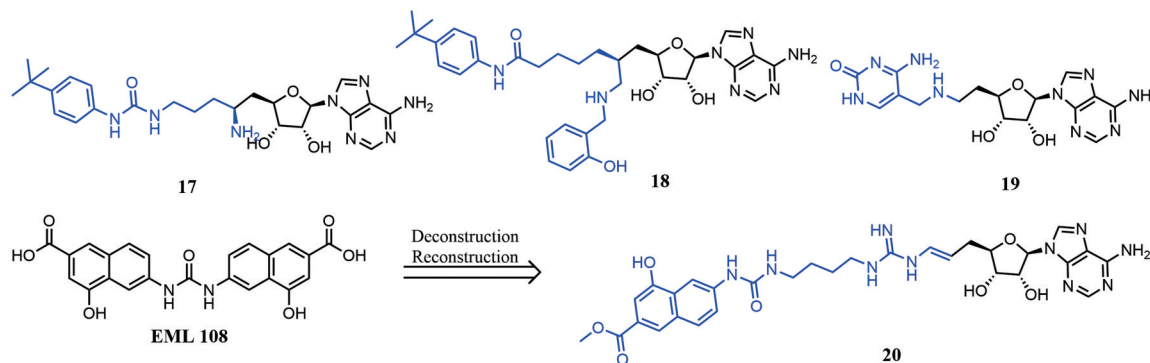
化下原位生成氮杂环丙烷片段, 随后被精氨酸的胍基进攻, 开环形成共价键, 为探索其他的 PRMTs 的功能提供了一个工具分子。2010 年, Dowden 等<sup>[73]</sup>基于 SAM 结构引入精氨酸残基片段设计化合物 16, 对 PRMT1 具有较有效的抑制作用 ( $IC_{50} = 3 \sim 6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 对于同属于 I 型的 PRMT4 抑制活性较弱, 从对接结果分析, 胍基片段与 PRMT1 的底物口袋中 Glu47 形成静电相互作用, 而在 PRMT4 中相同位置则为组氨酸和天冬酰胺残基<sup>[74]</sup>。

### 3.1.2 PRMT4 抑制剂

PRMT4 属于 I 型 PRMT, 能催化组蛋白 H3R2、H3R17 和 H3R26 精氨酸侧链的单甲基化和不对称双甲基化<sup>[75,76]</sup>, 该过程参与了转录激活、RNA 剪接、细胞周期进程和 DNA 修复<sup>[77]</sup>。PRMT4 在多种肿瘤中异常表达, 如乳腺癌<sup>[78]</sup>、结肠癌<sup>[79,80]</sup>、膀胱癌<sup>[81]</sup>、肺癌<sup>[82]</sup>、肝癌<sup>[83]</sup> 与卵巢癌等。2014 年, Memorial Sloan Kettering Cancer Center 披露了一类 PRMT4 的核苷抑制剂 (化合物 17, 图 7)<sup>[84]</sup>, 该化合物对 PRMT4 和 DOT1L 具有较好的抑制活性 (PRMT4:  $IC_{50} = 0.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , DOT1L:  $IC_{50} = 0.14 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 对于其他组蛋白甲基转移酶具有较好的选择性。随后, 基于化合物 17 引入苯基侧链 (化合



**Figure 6** The representative PRMT1 inhibitors. A: The chemical structures of PRMT1 inhibitors; B: The mechanism of covalent inhibitor AAI



**Figure 7** The chemical structures of PRMT4 inhibitors

物 **18**)<sup>[85]</sup>, 活性有了进一步提升 ( $IC_{50} = 0.045 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 同时保持了对于其他甲基转移酶的选择性。同年, Pierre Fabre 公司也披露一类核苷类 PRMT4 抑制剂 (化合物 **19**)<sup>[86]</sup>, 对 PRMT4 抑制活性在微摩尔水平 ( $IC_{50} = 1.9 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 对 PRMT1、PRMT6 和 PRMT7 具有较好的选择性。2022年, Gianluca Sbardella 课题组<sup>[87]</sup> 基于选择性 PRMT4 小分子抑制剂 EML108, 保留一半的片段, 随后引入胍基片段模拟带有精氨酸的多肽底物, 最后引入腺苷片段占据 SAM 口袋, 获得化合物 EML981 (化合物 **20**)。有趣的是, 从构效关系 (structure-activity relationship, SAR) 分析中发现, EML108 片段、胍基片段与腺苷之间的距离对于其他的 PRMT 的活性至关重要。当增加 linker 的长度, 化合物则呈现扭曲的 U 形构象, 从而减少与 double-E 环以及底物结合区域的有利结合。相反, 当缩短 linker 的长度, 将会对 PRMT7 具有较高的活性, 这部分将在下面部分进行分析。

### 3.1.3 PRMT5 抑制剂

PRMT5 是第一个被确定的 II 型 PRMT, 催化精氨酸残基的单甲基化和对称性双甲基化过程<sup>[88]</sup>。在体内 PRMT5 负责催化 H2AR3、H4R3、H3R2 和 H3R8 位点, 参与多种转录信号的调控<sup>[89-93]</sup>。WD40 蛋白质家族的 MEP50 是 PRMT5 最常见的分子伴侣, 对 PRMT5 的催化活性十分关键, PRMT5-MEP50 复合物的催化活性显著强于单独的 PRMT5<sup>[94]</sup>。据报道, PRMT5 在多种人类恶性肿瘤中过度表达, 包括淋巴瘤<sup>[91,95,96]</sup>、黑色素瘤<sup>[97]</sup>、肺癌<sup>[98]</sup>、乳腺癌<sup>[99]</sup>和结直肠癌<sup>[100]</sup>。

近几年来, 核苷类 PRMT5 的抑制剂报道逐渐增多, 在结构上多为修饰腺苷与结构多样的片段相连接而成的化合物。根据与核苷所连接片段的结构类型大致分为三类 (图 8): ① 以 LLY-283 为代表的手性苯醇类; ② 以 PF-06939999 为代表的脂肪胺类; ③ 以 JNJ-64619178 为代表的氨基喹啉类。

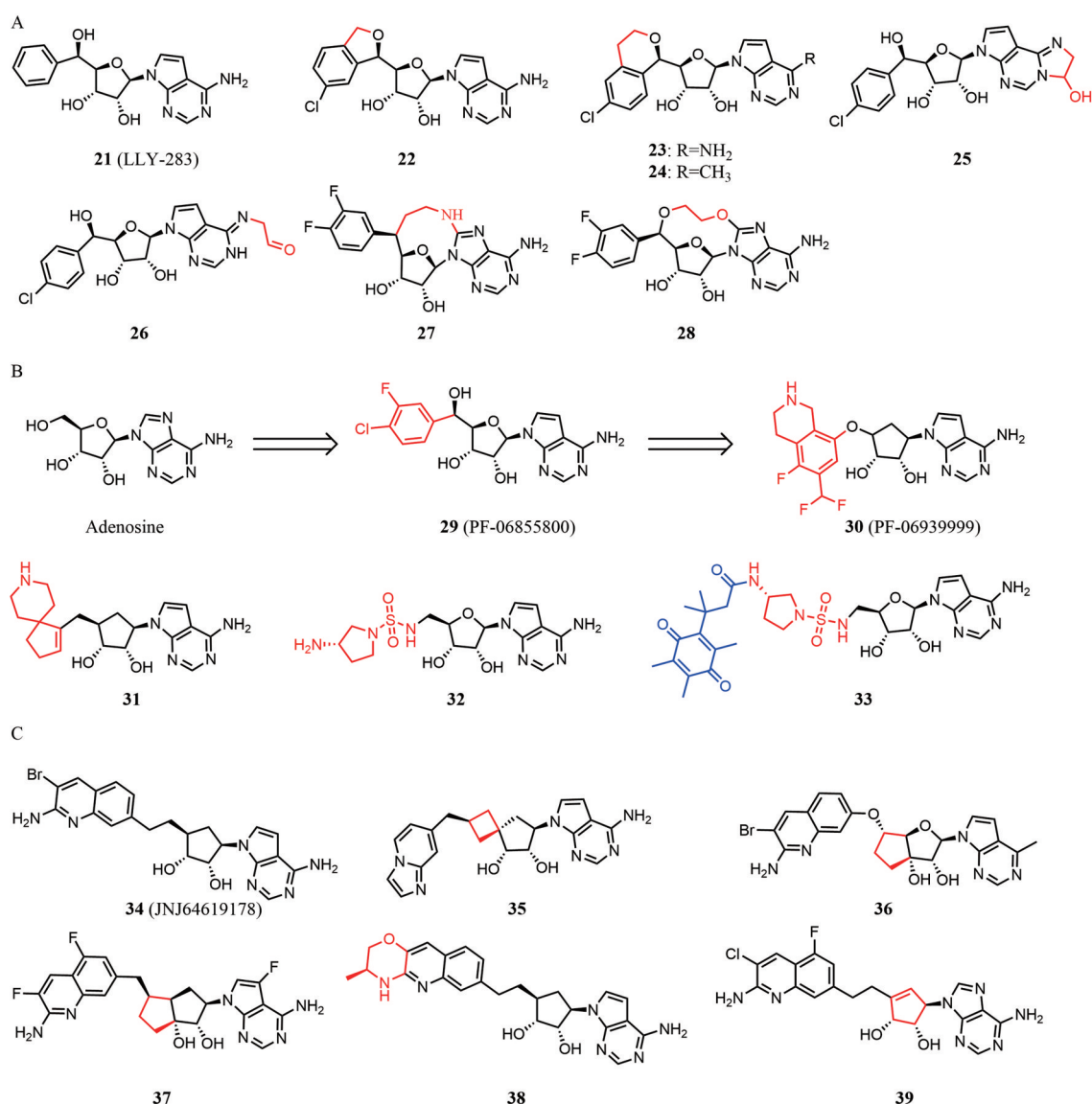
**3.1.3.1 手性苯醇类** 2018年, Eli Lilly 公司报道了一个核苷类抑制剂 LLY-283 (化合物 **21**, 图 8A)<sup>[101]</sup>, 在酶 ( $IC_{50} = 22 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 和细胞 ( $IC_{50} = 25 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 上表现出较高的抑制活性, 对 31 种甲基转移酶具有较好的选择性, 在小鼠异种移植瘤模型中也显示出明显的抗肿瘤活性。共晶结构 (图 9A, PDB code: 6CKC) 显示, 腺嘌呤与 Asp419 的侧链和 Met420 的主链形成氢键, 而呋喃糖的双羟基与 Glu392 形成一对氢键, 并与 Tyr324 的侧链形成一个氢键。5'位苯环的引入占据了 PRMT5 蛋白中柔性较大的 Phe327 位置, 并与该残基侧链之间形成 face to edge 的  $\pi$ - $\pi$  堆积作用。柔性的 Phe327 被诱导后发生构象的改变, 对于 PRMT5 是独特的, 这也是

形成 PRMT5 选择性的原因。

Prelude 公司针对 LLY-283 进行了一系列的结构优化, 在苯环上引入氯原子可以使得活性有所提升, 采用环化策略将手性羟基环化成醚, 得到化合物 **22**<sup>[102]</sup>, 活性显著提升 ( $IC_{50} = 3.8 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 当将五元环扩大成六元环后 (化合物 **23**), 活性进一步提升 ( $IC_{50} = 1.2 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 脱氮腺嘌呤的 6 位氨基被甲基取代 (化合物 **24**), 活性依然得到保持 ( $IC_{50} = 4.8 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )<sup>[103]</sup>。PRMT5 的 SAM 结合口袋中带有 Cys449, 该氨基酸残基与 LLY-283 的 6 位氨基相邻, 为 PRMT5 共价抑制剂的开发提供了结构基础。除此之外, 在其他的 PRMT 中该位置缺少半胱氨酸, 因此开发共价抑制剂也是提高选择性的一种策略。该公司研发人员从 LLY-283 出发, 在碱基上引入一个半缩醛结构 (化合物 **25**), 在生理条件下开环转变为醛基 (化合物 **26**), 与 Cys449 的巯基发生加成反应形成共价键, 表现出良好的酶抑制活性 ( $IC_{50} = 11 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )<sup>[104]</sup>。该公司开发的结构尚未披露的 PRT543<sup>[105]</sup>和 PRT811<sup>[106]</sup>已经完成 I 期临床试验, 用于治疗晚期实体瘤、血液瘤、中枢神经系统淋巴瘤和神经胶质瘤, 临床试验结果显示, PRT543 具有良好的耐受性, 并且在一些患者中能使肿瘤消退<sup>[107]</sup>。PRT811 在神经胶质瘤和转移性葡萄膜黑色素瘤患者中表现出可接受的安全性和临床活性<sup>[108]</sup>。

Merck 公司分析了共晶结构, 发现呋喃糖环的 5' 位和碱基的 8 位之间的空间较大, 表明 8,5'-环核苷 (化合物 **27** 和 **28**)<sup>[109]</sup>可以容纳在 SAM 结合袋中。两种化合物均可降低 H4R3Me2 水平,  $IC_{50}$  值分别为 5.7 和  $1.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。与 LLY-283 相比, 活性下降较大, 可能的原因是生物活性构象与能量最低构象有较大的能垒, 造成了整体吉布斯自由能的升高。

**3.1.3.2 脂肪胺类** Pfizer 公司从腺苷结构出发, 发现 5'位羟基的与周围水分子形成氢键相互作用, 在周围有一个较深的结合口袋, 引入 3-氟-4-氯苯基之后可以占据该口袋, 并且与 Tyr324 形成 face to edge 的  $\pi$ - $\pi$  堆积作用, 该化合物与 LLY-283 的结合模式类似。随后在 PF-06855800 (化合物 **29**, 图 8B) 共晶结构的指导下, 去除 5'位的碳原子和手性羟基, 并将呋喃糖环氧原子从糖环内移至 5'位, 将苯环定位在口袋中, 在苯环上引入碱性的脂肪胺片段以指向关键残基 Glu444, 获得 PF-06939999 (化合物 **30**)<sup>[110]</sup>。从晶体结构 (图 9B, PDB code: 7MX7) 中可以发现, 四氢异喹啉片段和 Glu444 形成盐桥相互作用, 与 Leu437 和 Glu435 的主链羰基氧之间形成氢键作用, 这些额外的相互作用导致 PF-06939999 与 PRMT5 具有更高的结合亲和力 ( $K_D = 11.4 \text{ pmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。2019年, PF-06939999 开展 I 期临



**Figure 8** The chemical structures of PRMT5 inhibitors. A: PRMT5 inhibitors with chiral benzyl alcohol; B: PRMT5 inhibitors with aliphatic amine; C: PRMT5 inhibitors with aminoquinoline

床试验<sup>[111]</sup>,但是在I期剂量递增研究中表现出剂量限制性毒性,出现血小板减少症不良反应<sup>[112]</sup>,该临床试验于2022年8月终止。

2017年, Janssen公司也披露了该结构类型的化合物 $31^{[113]}$ ,使用氮杂螺烷烃作为与Glu444结合的片段,对PRMT5保持了较好的抑制活性( $IC_{50} = 0.6 \sim 1.9 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )。2023年, Chen等<sup>[114]</sup>报道用磺酰胺作为linker将脂肪胺片段锚定到Glu444(化合物 $32$ ),抑制活性较强( $IC_{50} = 8 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ),由于该化合物 $32$ 透膜性较差,采用Trimethyl Lock的前药策略(化合物 $33$ )提升细胞活性。

**3.1.3.3 氨基喹啉类** Janssen公司发现了一种全新结构的核苷类PRMT5抑制剂JNJ64619178(化合物 $34$ ,

图8C)<sup>[115]</sup>,从共晶结构(图9C, PDB code: 6RLQ)中可以看出,该化合物同时占据SAM和底物口袋,在SAM结合口袋中,与LLY-283结合模式相同,脱氮嘌呤部分与Asp419的侧链和Met420的主链形成与LLY-283相同的氢键,环戊烷环的两个羟基与Glu392和Tyr324的侧链形成一对氢键。JNJ64619178以“伪不可逆”的结合方式伸入底物结合口袋,氨基喹啉基团向底物结合位点延伸,并与Glu444侧链形成双齿氢键相互作用,溴原子与Ser578的氧原子形成氢键相互作用,因此降低了化合物与PRMT5的解离速率,拥有持续的抑制效果。值得注意的是, Phe327的构象发生明显变化以容纳较大体积的氨基喹啉片段,与之形成face to face的 $\pi$ - $\pi$ 堆积作用。这一独特的结合模式,使得JNJ64619178对于

其他甲基转移酶具有较好的选择性,表现出优异的体内外抗肿瘤活性。2018年, JNJ64619178开展I期临床试验,用于治疗非霍奇金淋巴瘤、MDS和实体瘤<sup>[116]</sup>。随后, Janssen公司又披露一类螺[3.4]壬烷类核苷化合物**35**<sup>[117]</sup>,保持了对PRMT5较高的抑制活性( $IC_{50} = 9.1 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。

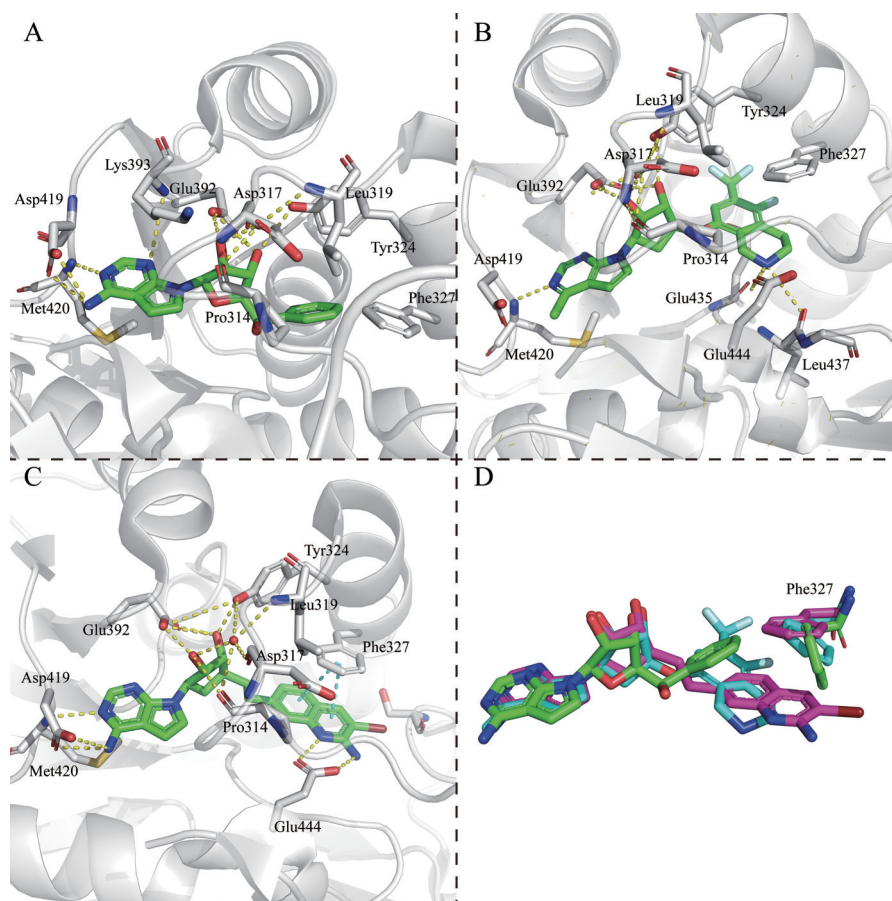
Merck公司在分析JNJ64619178的结构基础上,借助计算机预测筛选不同的linker,巧妙地将中间核糖的连接方式用五元稠合双环进行替换,设计了化合物**36**和**37**<sup>[118]</sup>,化合物**36**表现出更高的亲和力( $EC_{50} = 4.7 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ),有效抑制Z138细胞系的增殖( $EC_{50} = 17 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ),显示出良好的药代动力学特性。化合物**37**为全碳五元稠合双环,比化合物**36**表现出更高的结合亲和力( $EC_{50} = 0.84 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )和更强的抗增殖细胞活性( $EC_{50} = 5.8 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。其中,化合物**36**具有平衡的药效和代谢性质、低人类剂量预测和差异化药物相互作用风险等特点,在体内表现出显著的抗肿瘤增殖活性。

Angex公司对喹啉环进行修饰,将双环修饰为三

环结构(化合物**38**),活性也有了一定的提升( $IC_{50} < 1 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )<sup>[119,120]</sup>。Lupin公司基于JNJ64619178的结构将环戊烷环中引入双键(化合物**39**)<sup>[121]</sup>,表现出最佳的抑制活性( $IC_{50} = 0.25\sim 0.95 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; Z-138:  $IC_{50} = 0.1\sim 100 \text{ pmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。

### 3.1.4 PRMT7抑制剂

PRMT7作为唯一被报道的III型PRMT,负责在组蛋白上添加单甲基化标记。与PRMT9类似,PRMT7存在两个SAM结构域<sup>[122]</sup>。PRMT7含有两个底物结合序列,但是每个结构域无法单独发挥作用<sup>[123]</sup>。PRMT7参与了DNA修复、胚胎干细胞多能性、雄性生殖基因印记等多种生物过程<sup>[124]</sup>。PRMT7可以诱导上皮间质转化(epithelial-to-mesenchymal transition, EMT)并促进乳腺癌转移,被认为是治疗乳腺癌的潜在靶标<sup>[125]</sup>。2020年, Szewczyk等<sup>[126]</sup>通过筛选得到化合物SGC0911(化合物**40**,图10,  $IC_{50} = 1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ),引入联苯基团获得的化合物SGC8172(化合物**41**),活性显著提升( $IC_{50} < 2.5 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ),但是缺乏对PRMT7的选择性。



**Figure 9** The crystal structures of PRMT5 bound to PRMT5 inhibitors. A: LLY-283 (PDB code: 6CKC); B: PF-06939999 (PDB code: 7MX7); C: JNJ64619178 (PDB code: 6RLQ); D: Superimposition of LLY-283 (green), PF-06939999 (cyan) and JNJ64619178 (magenta) models. The conformation of Phe327 is flexible when binding with various ligands. The key residues are labeled as stick structures, hydrogen bonds are indicated as yellow dashed lines,  $\pi$ - $\pi$  stacking is indicated as blue dashed lines

随后对 linker 的长度进行调整, 获得的化合物 SGC8158 (化合物 **42**) 在保持活性 ( $IC_{50} < 2.5 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 的基础上, 对其他的 PRMT 具有较好的选择性, 其选择性可能是由于 PRMT7 的 THW loop 的长度和构象与其他的 PRMT 不同。根据动力学验证, 该化合物是 SAM 竞争性抑制剂, 而不是底物竞争性抑制剂。为了增加 SGC8158 的细胞膜渗透性, 采用了 Trimethyl Lock 的前药设计策略, 降低分子的极性。前药 SGC3027 (化合物 **43**) 透过细胞膜之后, 在细胞内还原酶的作用下, 将对苯醌还原成对苯酚, 酚羟基对酰胺进行加成消除反应, 释放活性药物 SGC8158。在细胞中, SGC3027 能抑制 HSP70 (heat shock protein 70) 的甲基化, 并导致对蛋白质稳态扰动的耐受性降低。

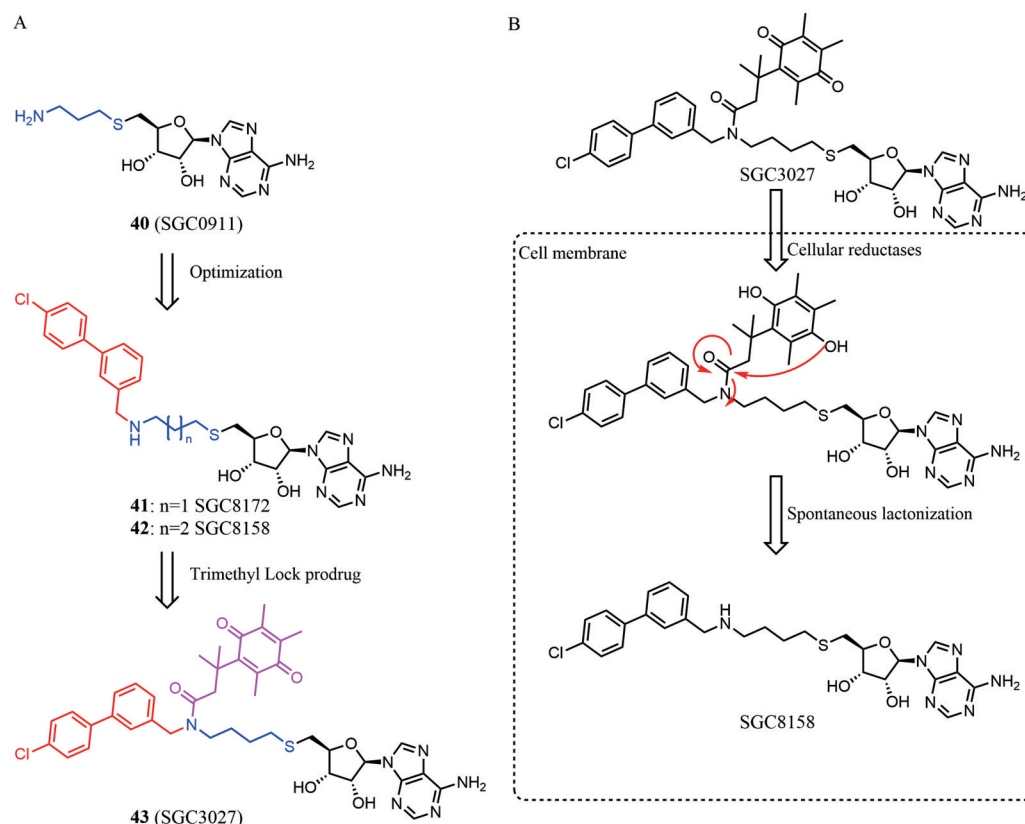
### 3.1.5 PRMT9 抑制剂

由于 PRMT9 已被证明能合成 MMA 和 sDMA, 因此与 PRMT5 同属 II 型 PRMT<sup>[127]</sup>, 在选择性剪接的调节中发挥重要作用<sup>[128,129]</sup>。与 PRMT7 相同, PRMT9 包含两个 SAM 结合域。与其他 PRMTs 不同, PRMT9 中特征性的 34 肽重复序列可促进蛋白-蛋白相互作用<sup>[77]</sup>。有文献报道, PRMT9 在肝癌<sup>[130,131]</sup>、AML<sup>[132]</sup> 和前列腺癌<sup>[133]</sup> 的治疗中发挥重要的作用。PRMT9 通过精氨酸甲基化减弱线粒体抗病毒信号蛋白的激活, 从而降低

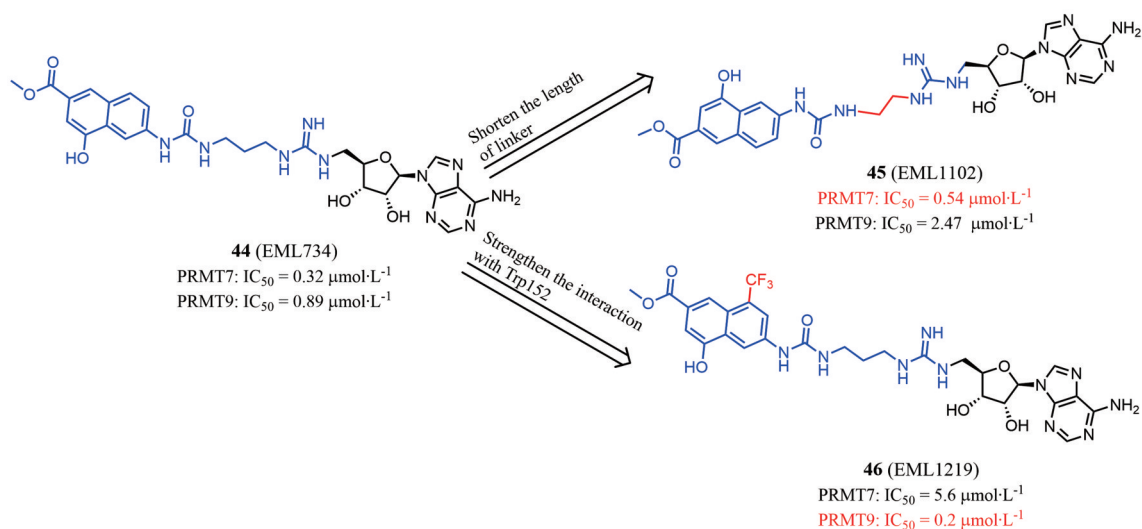
先天抗病毒免疫反应<sup>[134]</sup>。2023 年, Feoli 等<sup>[135]</sup> 基于之前的 PRMT4 抑制剂研发工作, 发现化合物 EML734 对 PRMT7 具有较好的抑制活性 ( $IC_{50} = 0.32 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 并且对其他 PRMTs 具有较好的选择性, 从 EML734 (化合物 **44**, 图 11) 出发, 调整萘环片段、胍基和腺苷片段之间的长度, 获得化合物 EML1102 (化合物 **45**), 在保留了对于 PRMT7 的抑制活性的基础上, 进一步改善了对于 PRMT1、PRMT3 和 PRMT6 的选择性。随后通过动力学模拟发现, 相比于 PRMT7, 化合物 EML734 的萘环面向 PRMT9 的溶剂区, 萘环片段与 Trp152 的  $\pi$ - $\pi$  相互作用较弱, 因此在萘环引入三氟甲基 (化合物 **46**), 对 PRMT9 的抑制活性显著提升, 同时也降低了对 PRMT7 的抑制活性, 实现了选择性的反转。

### 3.2 PKMTs 抑制剂

PKMT 根据是否含有 SET (Su(var), enhancer of zeste, Trithorax) 结构域, 可以分为两类: 含 SET 结构域的 PKMT 和不含 SET 结构域的 PKMT。含有 SET 结构域的 PKMT 主要分为五个家族: SUV、SET1、SET2、EZ 和 RIZ, 而不含 SET 结构域的只有 DOT1L<sup>[136,137]</sup>。最近提出的新分类方法, 可以将 PKMTs 分为 8 个组: KMT1 到 KMT8<sup>[138]</sup>。组蛋白 H3 的第 4、9、27、36 和 79 位以及组蛋白 H4 第 5 和 20 位的赖氨酸是常见的甲基化位



**Figure 10** The chemical structures of representative PRMT7 inhibitors. A: The optimization process of SGC3027; B: The mechanism of SGC3027 as prodrug



**Figure 11** The optimization process of PRMT7/9 inhibitors from PRMT4 inhibitor

点<sup>[61]</sup>。H3K4、H3K36 和 H3K79 的甲基化与转录激活有关，而 H3K9 的双甲基和三甲基化以及 H3K27 的三甲基化与转录相关<sup>[139-142]</sup>。下文将按照新的分类方法分别阐述 PKMTs 的生物学功能及其核苷类抑制剂的进展 (图 12)。

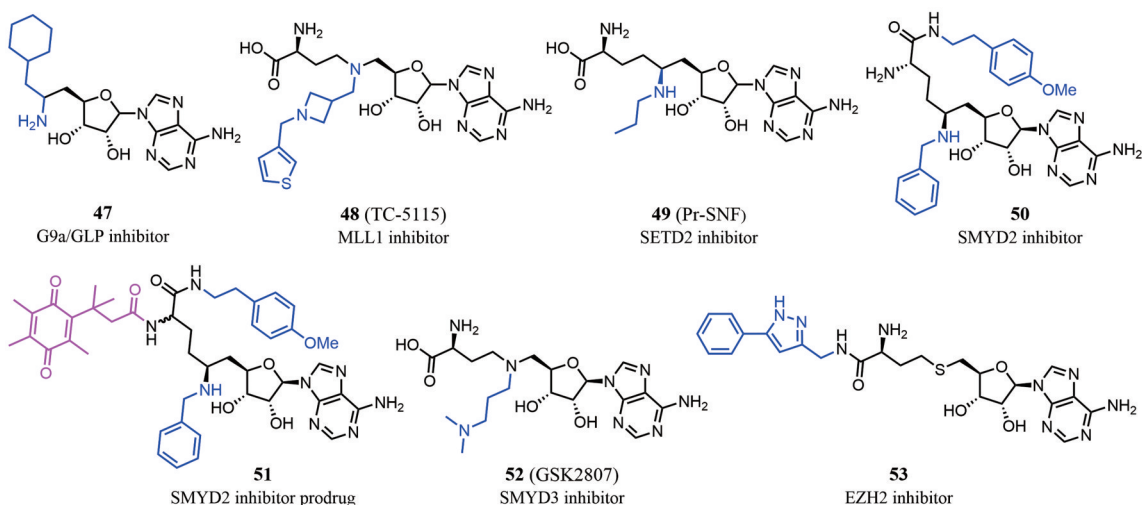
### 3.2.1 G9a/GLP 抑制剂

组蛋白 H3K9 的单、双甲基化主要由 G9a (euchromatic histone-lysine *N*-methyltransferase 2, EHMT2, KMT1C) 和 GLP (G9a-like protein, EHMT1, KMT1D) 催化，两者都具有 SET 结构域，具有约 80% 的序列相似性，可形成异二聚体<sup>[143,144]</sup>。G9a 不仅与多种肿瘤的发生发展密切相关<sup>[145,146]</sup>，也在 HIV-1 病毒潜伏<sup>[147]</sup>、可卡因成瘾<sup>[148]</sup> 和 炎性结肠炎<sup>[149]</sup> 中发挥重要作用。

Devkota 等<sup>[150]</sup> 基于 Sinefungin 的结构报道了一个 G9a/GLP 抑制剂 (化合物 **47**, 图 12)，有微弱的抑制活性 (GLP:  $IC_{50} = 1.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; G9a:  $IC_{50} = 1.6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )，对 DNMT1、PRMT1 和 SET7/9 具有选择性。

### 3.2.2 MLL 抑制剂

MLL (lysine-specific methyltransferase 2A, KMT2A, TRX1, MLL1) 蛋白是一种负责组蛋白 H3K4 的单、双和三甲基化的 PKMT<sup>[151]</sup>。与 MLL 相关的染色体重排已被证明可导致 AML、急性淋巴细胞白血病 (acute lymphoblastic leukemia, ALL) 或混合谱系白血病 (mixed lineage leukemia, MLL) 的发生<sup>[152]</sup>。尽管 MLL 蛋白含有 SET 结构域，但该蛋白本身甲基转移酶活性很低，而当与 WDR5 (WD repeat domain 5)、RBBP5



**Figure 12** The chemical structures of the representative PKMTs bearing SET (Su(var), enhancer of zeste, Trithorax) domain inhibitors. G9a: Euchromatic histone-lysine *N*-methyltransferase 2; GLP: G9a-like protein; MLL1: Lysine methyltransferase 2A; SETD2: SET domain containing 2; SMYD2: SET and MYND domain containing 2; SMYD3: SET and MYND domain containing 3; EZH2: Enhancer of zeste homologue 2

(RB binding protein 5) 和 ASH2L (ASH2 Like) 形成复合物时, 其活性显著增强<sup>[153]</sup>。因此, 阻断 MLL 复合物之间的蛋白质-蛋白质相互作用, 已被视为抑制 MLL 甲基转移酶活性的一大策略。2020 年, Chern 等<sup>[154]</sup>模拟甲基转移酶 SET 结构域中的过渡态构型, 报道了一个核苷类 MLL 抑制剂 TC-5115 (化合物 48), 对于 MLL1 抑制作用较强 ( $IC_{50} = 15.2 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 该化合物直接作用于 SET 结构域, 诱导 SET 结构域打开而处于非活性状态。

### 3.2.3 SETD2 抑制剂

SETD2 (SET domain containing 2, KMT3A) 属于含有 SET 结构域的 PKMT, 负责催化组蛋白 H3K36 的甲基化过程。SETD2 与 p53 依赖性基因的调控以及转录延伸和内含子-外显子剪接相关, 是一种肿瘤抑制因子<sup>[155-157]</sup>。SETD2 突变经常在肾细胞癌<sup>[158,159]</sup>和非小细胞肺癌中被发现<sup>[160]</sup>。2012 年, Zheng 等<sup>[161]</sup>基于 Sinefungin 的结构报道了核苷类似物 Pr-SNF (化合物 49), 相比于 Sinefungin, 对处于激活的状态 SETD2 的抑制活性提升 10 倍, 但是对于当 SAH 存在时的非激活状态的 SETD2 (Arg1670 占据底物赖氨酸结合口袋) 没有抑制作用。Pr-SNF 对其他的 PKMT 有 2~200 倍的选择性, 分析其原因是处于激活状态的 SETD2 包含两个位置良好的主链羰基 (Arg1625 和 Tyr1604), 可与 Pr-SNF 形成氢键作用, 在其他的 PKMT 中该位置缺乏合适的氨基酸残基。

### 3.2.4 SMYD 抑制剂

SMYD (SET and MYND domain-containing) 蛋白家族作为 PKMT 的一个亚家族, 包括 SMYD1、SMYD2 (KMT3C)、SMYD3 (KMT3E)。其中 SMYD1 是发育过程中的重要因子<sup>[162]</sup>, SMYD3 是癌症的直接调节因子<sup>[163]</sup>。SMYD2 通过组蛋白底物 H3K36、H3K4 和 H4K20 以及非组蛋白底物的甲基化来调节这些蛋白质的功能, 从而影响细胞增殖, 并不直接参与癌细胞的生存信号转导<sup>[164]</sup>。

2018 年, Memorial Sloan Kettering Cancer Center<sup>[165]</sup>基于 Sinefungin 结构, 披露了核苷类 SMYD2 抑制剂 (化合物 50), 其分子抑制活性较好 ( $IC_{50} = 0.39 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 但是在 MCF-7 细胞中抑制活性较弱 ( $EC_{50} = 15 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。考虑到化合物透膜性质较差, 采用了 Trimethyl Lock 的前药设计策略, 获得化合物 51, 其在 MDA-MB-231 细胞中的抑制活性得到显著提升 ( $EC_{50} < 0.5 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。

2016 年, GlaxoSmithKline 公司解析了 SAH、SMYD3 和底物肽段复合物的晶体结构, 发现 SAH 的碱性侧链深入底物肽段的结合口袋, 经过一系列结构优化, 获得化合物 GSK2807 (化合物 52)<sup>[166]</sup>。GSK2807 对 SMYD3

显示出较好的抑制活性 ( $IC_{50} = 130 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 对 SMYD3 的选择性优于 SMYD2 (SMYD3:  $K_i = 14 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; SMYD2:  $K_i = 345 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 和其他的甲基转移酶。在 MOA (mechanism of action) 研究中显示 GSK2807 是 SAM 的竞争性抑制, 并不是底物竞争性抑制剂。

### 3.2.5 EZH1/2 抑制剂

H3K27 的甲基化是由高度保守的、多亚基蛋白复合物 PRC2 (polycomb repressive complex 2) 催化进行的<sup>[167]</sup>, PRC2 复合物包括 EZH1 (enhancer of zeste homologue 1, KMT6B) 或 EZH2 (enhancer of zeste homologue 2, KMT6A)、EED (embryonic ectoderm development)、SUZ12 (suppressor of zeste 12) 和 RbAp46/48 (retinoblastoma-associated protein 46/48)。EZH1 或 EZH2 作为 PRC2 的催化亚基<sup>[167-169]</sup>, 其 SET 结构域有 96% 的序列相似性, 只是分布于不同的组织。EZH1 主要分布于分化细胞和分裂细胞中, 而 EZH2 仅分布于分裂细胞群中<sup>[170,171]</sup>。EZH1 和 EZH2 单独作用无催化活性, 至少需要两个其他亚基 (EED 和 SUZ12), 才能发挥催化作用<sup>[172-174]</sup>。EZH2 中 Y641 的点突变在 7% 的滤泡性淋巴瘤和 22% 的生发中心 B 细胞和弥漫性大 B 细胞淋巴瘤中观察到<sup>[175]</sup>。EZH2 过度表达和 H3K27 过度三甲基化与多种癌症有关<sup>[176,177]</sup>, EZH1 和 EZH2 可以相互补偿, 都可以维持细胞增殖和抑制细胞分化以维持侵袭性 MLL 重排白血病的发展<sup>[178-180]</sup>。截至目前, 与小分子抑制剂相比, EZH1/2 的核苷类抑制剂报道较少。2015 年, Pfizer 公司报道了一类 SAH 类似物作为 EZH2 抑制剂 (化合物 53)<sup>[181]</sup>, 与野生型 EZH2 相比 ( $IC_{50} = 270 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 其对于 Y641N 突变的 EZH2 具有更强的抑制活性 ( $IC_{50} = 70 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。化合物 53 对于其他的 PKMT 具有较好的选择性, 尤其是 EZH1 ( $IC_{50} = 6.4 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 但是对于 PRMT4 有较强的抑制作用 ( $IC_{50} = 30 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。该化合物由于透膜性较差, 并没有表现出细胞活性。

### 3.2.6 DOT1L 抑制剂

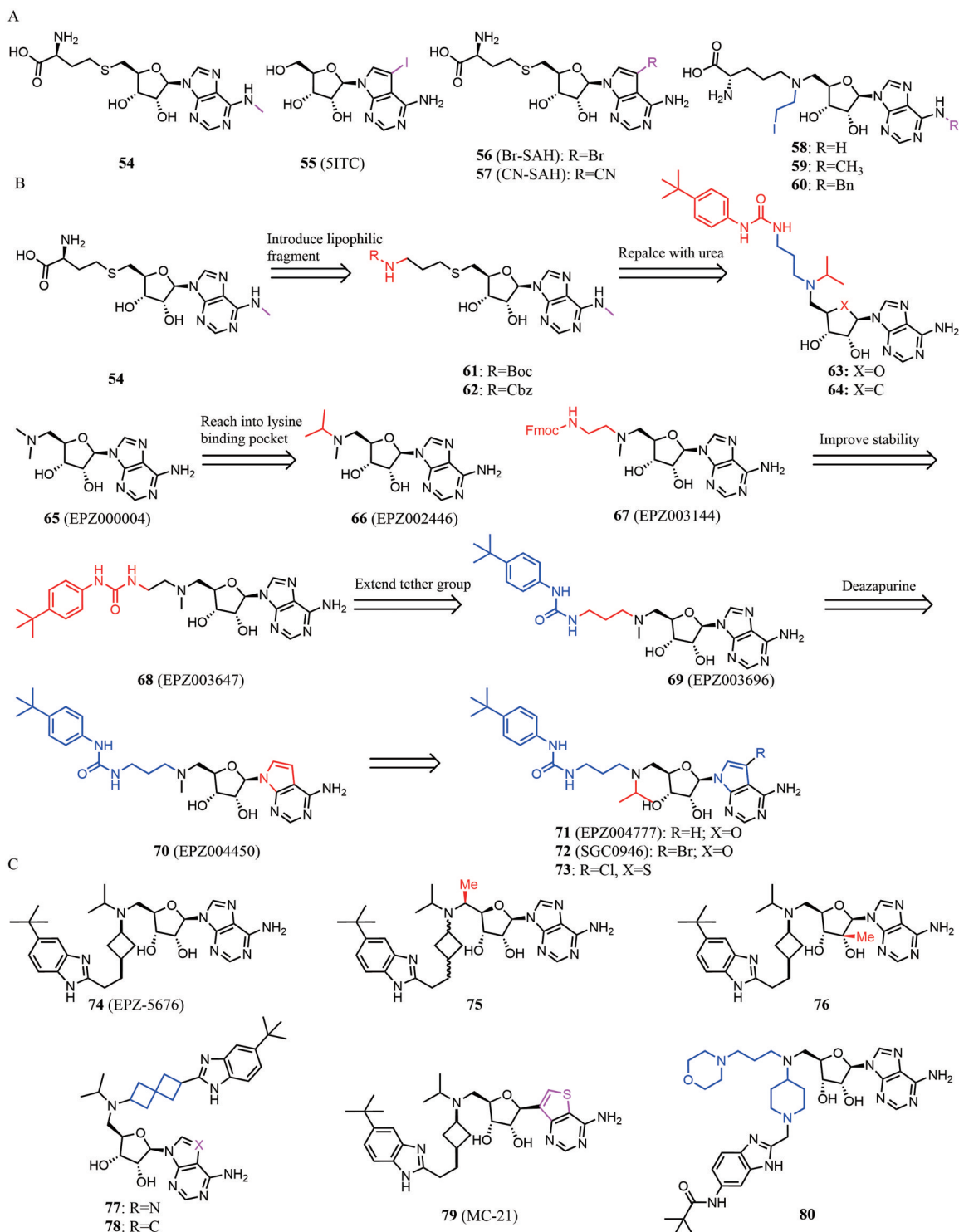
DOT1L (disruptor of telomeric silencing 1-like, KMT4) 是唯一一个没有 SET 结构域的 PKMT<sup>[182]</sup>, 催化结构域类似于 PRMTs 和 DNMTs 的折叠拓扑构象<sup>[183]</sup>。DOT1L 负责催化 H3K79 的单、双和三甲基化<sup>[182,184]</sup>, 与转录激活、DNA 修复、胚胎发育、细胞周期调节、造血和心脏功能相关<sup>[185-187]</sup>。DOT1L 与 MLL 重排 (MLL-rearrangement, MLL-r) 白血病中最常见的 MLL 融合蛋白 (AF4、AF9、AF10、AF6 和 ENL) 相互作用<sup>[188-192]</sup>, 并被招募到它们的靶基因 (*HOXA9* 和 *MEIS1*)<sup>[186]</sup>, 促进这些基因位点的甲基化, 增强其表达, 从而驱动 MLL-r 白血病的发生。因此, DOT1L 作为治疗 MLL-r 白血病的

潜在靶点受到越来越多的关注。截至目前,大量的核苷类 DOT1L 抑制剂被报道,如图 13 所示,根据结构的类型可分为以下几类:① SAH 类似物抑制剂;② 氨基甲酸酯类抑制剂;③ 脲类抑制剂;④ 苯并吡啶类抑制剂。下文将对以下四类结构分别进行阐述。

### 3.2.6.1 SAH 类似物

2011 年,美国贝勒医学院 Yao

等<sup>[193]</sup>发现 SAM 的腺嘌呤 6 位氨基与 DOT1L 仅形成一个氢键,且附近有一个大的疏水空腔。然而,与 PRMTs 形成两个氢键,且与其他的 PKMT 作用模式完全不同。因此,在腺嘌呤的 6 位氨基上引入甲基,获得化合物 **54** (图 13),与 SAH ( $K_i = 0.16 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 相比,抑制活性基本保持 ( $K_i = 0.29 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ),但是对



**Figure 13** The chemical structures of disruptor of telomeric silencing 1-like (DOT1L) inhibitors. A: SAH-like derivatives; B: The optimization process of compound **63** and **71** as urea DOT1L inhibitors; C: Benzimidazole derivatives

于 PRMTs (PRMT4 和 PRMT1) 和 PKMTs (G9a 和 SUV39H1) 的选择性显著提升。2013 年, 加拿大的多伦多大学 Yu 等<sup>[194]</sup>通过对激酶抑制剂进行筛选, 获得一个对 DOT1L 具有微弱抑制活性的化合物 5ITC (化合物 **55**,  $IC_{50} = 18.2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 随后基于 SAH 和 5ITC 的结构进行优化, 被溴原子取代 (化合物 **56**) 后具有更强的抑制活性 ( $IC_{50} = 77 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 和更高的选择性。晶体结构 (PDB code: 3SX0) 表明, 溴原子占据了 DOT1L 中由疏水侧链形成的裂缝, 而在 PRMTs 中并不存在这样的疏水口袋。同时, 溴原子在 DNMT1 蛋白中可能与大体积的疏水氨基酸残基产生空间位阻, 这也解释了化合物 Br-SAH 对其他甲基转移酶具有较好选择性的原因<sup>[194]</sup>。2016 年, 英国伦敦大学 Spurr 等<sup>[195]</sup>基于 Br-SAH 的结构, 用氰基取代溴原子设计了 CN-SAH (化合物 **57**), 活性和选择性得到进一步提升 ( $IC_{50} = 13 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。

与 PRMT1 抑制剂 (AAI, 化合物 **15**) 相类似, Yao 等<sup>[193]</sup>也报道了基于共价修饰策略的抑制剂 (化合物 **58**), 其抑制活性得到显著提升 ( $IC_{50} = 38 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 对其他甲基转移酶有较好的选择性。为了进一步提升其选择性, 基于之前的研究成果, 在腺嘌呤 6 位氨基上引入取代基 (化合物 **59** 和 **60**), 在保持活性的基础上 (**59**:  $IC_{50} = 120 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; **60**:  $IC_{50} = 110 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 表现出更优异的选择性 ( $> 1\ 000$  倍)。

**3.2.6.2 氨基甲酸酯/脲类** 2012 年, 美国贝勒医学院 Anglin 等<sup>[196]</sup>与 Epizyme 公司<sup>[197]</sup>几乎同时报道了氨基甲酸酯/脲类 DOT1L 抑制剂。Anglin 等<sup>[196]</sup>为了降低 SAH 类似物的极性和电荷, 以提高核苷类化合物的生物利用度。在 5' 位引入一些亲脂性的保护基 Boc (化合物 **61**,  $K_i = 50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 和 Cbz (化合物 **62**,  $K_i = 46 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 活性并未完全丧失。基于上述的氨基甲酸酯类化合物进行了多轮结构优化, 发现将氨基甲酸酯替换为脲基, 活性提升 25~50 倍。随后在脲基苯环的 3、4 位引入亲脂基团, 呋喃糖环 5' 位的胺基引入异丙基, 去除腺嘌呤 6 位氨基的取代基, 调节 5' 位 N 原子与脲基间的长度, 获得化合物 **63**, 该化合物的抑制活性显著提升 ( $K_i = 0.46 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 对其他甲基转移酶有  $> 4\ 500$  倍的选择性, 在 MV4-11 和 THP1 细胞中表现出显著的抗增殖活性 (MV4-11:  $EC_{50} = 4.4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; THP1:  $EC_{50} = 8.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。研究显示, 该化合物可以与 SAM/SAH 竞争性结合, 但是和核小体不存在竞争关系, 推测可能是 DOT1L 与抑制剂结合之后, 蛋白构象发生改变, 能同时结合抑制剂和底物核小体。2013 年, Deng 等<sup>[198]</sup>考虑到腺苷代谢稳定性不佳的问题, 将四氢呋喃糖环修饰为环戊烷, 得到化合物 **64**, 对于

DOT1L 的抑制活性得到保持 ( $K_i = 1.1 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 并且对于其他甲基转移酶拥有较好的选择性, 在 MV4-11 细胞中剂量依赖性地抑制 H3K79 的甲基化 ( $IC_{50} = 200 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 并且在血浆和肝微粒体中均表现稳定。

2012 年, Epizyme 公司最初为了优化 SAM 中高度极化的硫原子和氨基酸部分上的带电基团, 获得化合物 EPZ000004 (化合物 **65**), 仅有微弱的亲和力 ( $K_i = 38 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。随后探索 SAM 与底物结合口袋, 当引入异丙基之后 (EPZ002446, 化合物 **66**) 活性提升了约 3 倍 ( $K_i = 12 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 当继续延长 5' 位置的取代基, 意外发现连有 Fmoc 保护基的化合物 **67** (EPZ003144) 活性依然得到保持 ( $K_i = 20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 考虑到氨基甲酸酯的不稳定性, 将之转化为脲基片段得到 EPZ003647 (化合物 **68**), 活性有了较为显著的提升 ( $K_i = 845 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 在优化 liker 长度之后, EPZ003696 (化合物 **69**) 的活性又得到大幅度提升 ( $K_i = 13 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 叔丁基苯基脲通过改变 Phe239、Tyr312、Met147 和 Leu143 的侧链构象, 打开了一个新的疏水口袋。随后对腺嘌呤进行改造, 脱氮化合物 EPZ004450 (化合物 **70**) 活性又有所提升 ( $K_i = 4 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 最后将脱氮腺嘌呤和 5' 位的异丙基优势片段组合获得化合物 EPZ004777 (化合物 **71**),  $IC_{50}$  值达到  $0.3 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。EPZ004777 对于其他甲基转移酶均有  $> 1\ 000$  倍以上的选择性, 有效地抑制细胞中 H3K79 的甲基化, 阻断 MLL 融合目标基因的表达, 选择性诱导 MLL-r 细胞的分化和凋亡, 达到了抑制肿瘤细胞增殖的效果, 在小鼠异种移植模型中表现出优异的药效<sup>[199]</sup>。美国 Dana-Farber 癌症研究院 Yu 等<sup>[200]</sup>从 EPZ004777 的结合模式发现, 7-脱氮腺嘌呤环的 7 位周围存在一个疏水性裂口, 因此在该位置引入溴原子 (SGC0946, 化合物 **72**), 与 EPZ004777 ( $IC_{50} = 0.5 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 相比, 对于 DOT1L 的抑制活性有所提升 ( $IC_{50} = 0.3 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 同时增强了对 PRMT5 的选择性, 更显著地降低了 MCF10A 细胞中 H3K79 的甲基化水平 (SGC0946:  $IC_{50} = 8.8 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  vs EPZ004777:  $IC_{50} = 84 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。该团队对 7-脱氮腺嘌呤引入氯原子, 选用硫脲替换脲基片段, 报道了结构类似的化合物 **73**, 同样比 EPZ004777 具有更好的抑制活性, 并且能选择性地抑制 H3K79 的二甲基化过程<sup>[201]</sup>。

**3.2.6.3 苯并吡唑类** 2013 年, Epizyme 公司<sup>[202]</sup>基于 EPZ004777 进行进一步的结构优化获得苯并吡唑类化合物 EPZ-5676 (化合物 **74**)。EPZ-5676 占据 SAM 口袋并诱导 DOT1L 构象变化, 从而导致超出 SAM 氨基酸部分的疏水袋打开, 这种结构重排产生了额外的相互作用表面, 有助于提高其亲和力和选择性。与 EPZ004777 相比, EPZ-5676 具有更高的亲和力 ( $K_i =$

80 pmol·L<sup>-1</sup>), 对于其他的甲基转移酶拥有 > 37 000 倍的选择性。在细胞研究中, EPZ-5676 抑制 H3K79 甲基化和 MLL 融合靶基因表达, 并选择性地杀伤带有 MLL 基因易位的急性白血病细胞。在 MLL-r 白血病大鼠异种移植模型中连续静脉输注 EPZ-5676, 可以使肿瘤完全消退, 在化合物输注结束后效果仍持续存在, 且没有明显毒性迹象。2019 年 1 月, EPZ-5676 在美国开展 I/II 期临床试验, 旨在评价与标准化疗手段联用治疗 MLL 重排 AML 的疗效<sup>[203]</sup>, 但是在 2022 年 11 月该临床试验被终止。2020 年 3 月, EPZ-5676 开展了另一项 I/II 期临床试验<sup>[204]</sup>, 以评估与阿扎胞苷联用治疗 AML 的疗效。

针对 EPZ-5676 的优异药效, 在结构公布之后有多家机构进行跟踪研究。2017 年, Liu 等<sup>[205]</sup>报道在呋喃糖环 5' 位引入甲基 (化合物 **75**), 抑制活性较好 (IC<sub>50</sub> = 6.34 nmol·L<sup>-1</sup>)。2019 年, 上海药物研究所<sup>[206]</sup>披露一类在呋喃糖环 2' 位引入甲基的衍生物 (化合物 **76**), IC<sub>50</sub> 值为 0.1~100 nmol·L<sup>-1</sup>。同年, 广州盈升生物科技有限公司披露了两篇专利 (化合物 **77** 和 **78**)<sup>[207,208]</sup>, 将四元环链修饰为螺[3.3]庚烷, 降低分子的柔性, 其中 7-脱氮腺嘌呤的活性较好 (IC<sub>50</sub> = 6.53 nmol·L<sup>-1</sup>)。2022 年, Mayo Foundation for Medical Education and Research<sup>[209]</sup>将腺嘌呤碱基修饰为噻吩并嘧啶, 获得 MC-21 (化合物 **79**), 保持了较强的抑制活性 (EC<sub>50</sub> = 5.77 nmol·L<sup>-1</sup>)。2021 年, 沈阳药科大学<sup>[210]</sup>将 EPZ-5676 中的异丙基修饰为吗啉烷基片段 (化合物 **80**), 对 DOT1L 抑制活性较好 (IC<sub>50</sub> = 6.7 nmol·L<sup>-1</sup>), 并在肿瘤移植瘤模型中显示较好的抑制活性。

#### 4 RNA 甲基转移酶特异性抑制剂

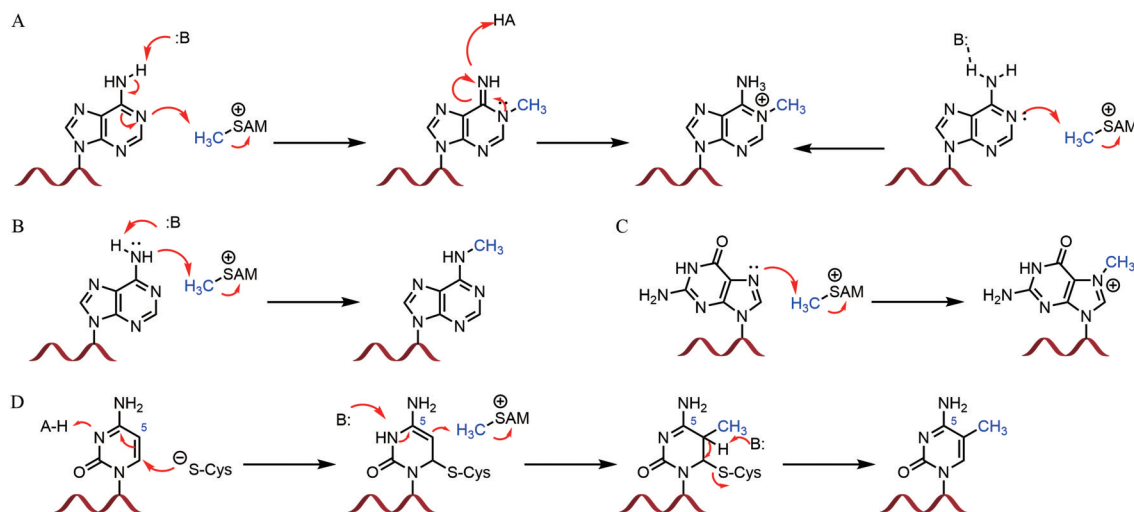
RNA 甲基转移酶 (RNA methyltransferase, RNMT) 催化 RNA 的甲基化, 影响翻译、基因组稳定性和线粒体基因表达等过程, 参与细胞分化、应激反应和肿瘤发生等许多生物过程<sup>[8]</sup>。根据 RNA 修饰的碱基类型的不同, RNMT 可以分为四类<sup>[211]</sup>: ① 介导 N<sup>6</sup>-甲基腺苷 (N<sup>6</sup>-methyladenosine, m<sup>6</sup>A) 的甲基转移酶, 包括 METTL3 (methyltransferase-like 3)、METTL14 (methyltransferase-like 14)、METTL16 (methyltransferase-like 16)、METTL5 (methyltransferase-like 5) 和 ZCCHC4 (Zinc finger CCHC-type containing 4); ② 介导 N<sup>1</sup>-甲基腺苷 (N<sup>1</sup>-methyladenosine, m<sup>1</sup>A) 的甲基转移酶, 包括 TRMT10 (transfer RNA methyltransferase 10) 和 TRM6/61 (transfer RNA methyltransferase non-catalytic subunit 6/61); ③ 介导 N<sup>7</sup>-甲基鸟苷 (7-methylguanosine, m<sup>7</sup>G) 的甲基转移酶, 包括 METTL1 (methyltransferase-like 1)、WBSR22 (Williams-Beuren syndrome chromosomal region 22

protein) 和 RNMT (RNA guanine-7 methyltransferase); ④ 介导 C<sup>5</sup>-甲基胞苷 (5-methylcytosine, m<sup>5</sup>C) 的甲基转移酶, 包括 NSUN (NOL1/NOP2/SUN domain family member) 1-7 和 DNMT2 (DNA methyltransferase-like 2)。腺嘌呤的 1 位和 6 位氮原子是真核生物中腺苷甲基化的常见位置。如图 14 所示, m<sup>6</sup>A 的机制表明, 腺嘌呤 6 位氨基在碱催化去质子后直接进攻 SAM<sup>[212]</sup>。m<sup>1</sup>A 的作用机制尚未确定, 主要有两种机制<sup>[213]</sup>。一方面, 在腺嘌呤 6 位氨基发生碱催化的去质子化, 随后 1 位氮原子通过嘧啶上的电子流进攻 SAM。另一方面, 1 位氮原子的孤对电子直接进攻 SAM。m<sup>7</sup>G 的作用机制与 m<sup>1</sup>A 类似<sup>[214]</sup>, 而 RNA 的 m<sup>5</sup>C 修饰<sup>[215]</sup>与 DNA 的 5mC 修饰的机制类似。由于对 RNMTs 的生物学功能研究仍处于起步阶段, 抑制剂的报道也较为稀少, 下文将重点阐述 METTL3 和 DNMT2 的核苷类抑制剂的研究进展。

##### 4.1 METTL3-METTL14 抑制剂

METTL3-METTL14 复合物作为 m<sup>6</sup>A 修饰的关键甲基化酶, METTL3 以 SAM 作为甲基供体, 为底物 RNA 甲基化提供催化场所, 而 METTL14 没有催化活性, 起到识别底物和稳定复合物的作用<sup>[216]</sup>。METTL3 可以通过特定靶转录本的甲基化来调节胚胎发育、细胞重编程、精子产生、T 细胞稳态以及内皮-造血转化 (endothelial-to-hematopoietic transition, EHT)<sup>[217]</sup>。METTL3 的异常表达会诱导各种类型肿瘤的发生发展<sup>[218]</sup>。在 AML 中, 转录因子 CEBPZ (CCAAT enhancer binding protein zeta) 将 METTL3 稳定地募集至特定活性基因组的启动子, 导致相应 mRNA 的 m<sup>6</sup>A 甲基化以增加其翻译, 其中一个重要的靶点 SP1 (specificity protein 1) 调节 c-Myc 表达<sup>[219,220]</sup>。在常染色体显性遗传多囊肾病 (autosomal dominant polycystic kidney disease, ADPKD) 中, METTL3 往往表现出高表达, 抑制 METTL3 则会减缓囊肿的生长<sup>[221]</sup>。

2020 年, Bedi 等<sup>[222]</sup>筛选了近 4 000 个腺嘌呤类似物的化合物库, 发现一个核苷类化合物 **81**, 其对 METTL3 有微弱的抑制活性 (IC<sub>50</sub> = 8.7 μmol·L<sup>-1</sup>), 从晶体结构 (PDB code: 6TTT) 中发现, 化合物 **81** (图 15) 的腺嘌呤部分与 SAM 作用模式相同, 但是由于柔性尾部的影响, 结构解析并不完全。2022 年, Wang 等<sup>[223]</sup>通过虚拟筛选获得一个潜在的 METTL3 抑制剂 Cpd-564 (化合物 **34**), 与 SAH 相比, Cpd-564 通过抑制 TAB3 (TGF-β activated kinase 1 binding protein 3) 的 m<sup>6</sup>A 修饰, 并通过 IGF2BP2 (insulin-like growth factor 2 binding protein 2) 依赖性机制降低 TAB3 的稳定性, 从而对顺铂和缺血/再灌注引起的肾脏损伤和炎症具有更好的保护作用



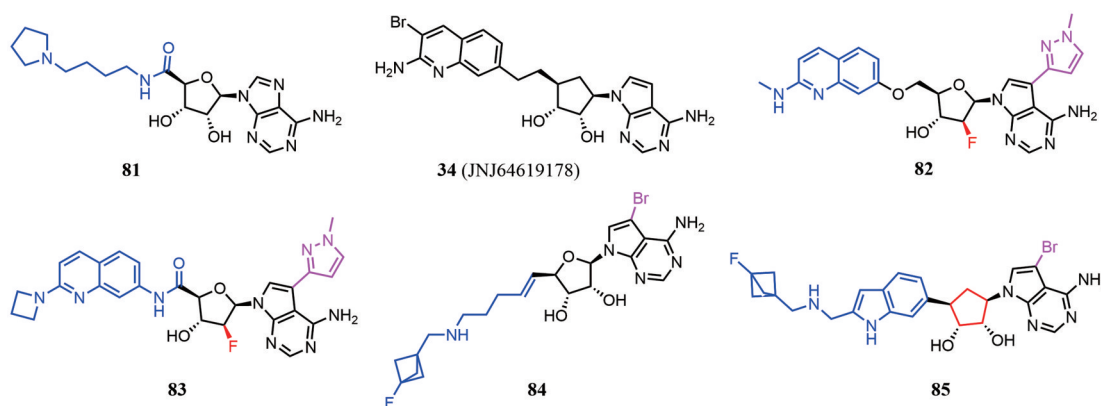
**Figure 14** The catalytic mechanism of RNA methylation. A:  $N^1$ -Methyladenosine ( $m^1A$ ); B:  $N^6$ -Methyladenosine ( $m^6A$ ); C: 7-Methylguanosine ( $m^7G$ ); D: 5-Methylcytosine ( $m^5C$ )

用。2021年, Accent公司披露了两类核苷类化合物, 化合物 **82**<sup>[224]</sup>和化合物 **83**<sup>[225]</sup>对METTL3具有高效的抑制活性 ( $IC_{50} < 10 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 对其他甲基化酶 (PRMT5、METTL1 和 METTL16) 选择性较好, 在MOLM-13细胞中显著抑制  $m^6A$  修饰 ( $IC_{50} < 1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。同年, Storm公司也披露了两种核苷类似物<sup>[226]</sup>, 化合物 **84**和化合物 **85**能显著抑制METTL3的活性 ( $IC_{50} < 6 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 有效地抑制Kasumi细胞和Caov3细胞的增殖 (**84**: Kasumi  $IC_{50} = 1.6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ /Caov3  $IC_{50} = 0.95 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; **85**: Kasumi  $IC_{50} = 0.4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ /Caov3  $IC_{50} = 0.25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。

#### 4.2 DNMT2抑制剂

DNMT2是DNMTs的成员, 催化结构域与其他的DNMT相似<sup>[227]</sup>。但是, 与DNMT1和DNMT3相比, DNMT2主要存在于细胞质中, 因此缺乏DNA甲基化酶的特征, DNMT2主要功能是催化tRNA<sup>Asp</sup>的反密码子环中第38位胞嘧啶的甲基化<sup>[228]</sup>。DNMT2对tRNA的甲基化可防止核糖核酸酶介导的tRNA裂解<sup>[229]</sup>, 从

而调节RNA稳定性并提高蛋白质的合成率<sup>[230]</sup>。DNMT2在多种癌症组织中过度表达, 如宫颈癌和膀胱癌<sup>[231]</sup>。2022年, Schwickert等<sup>[232]</sup>基于SAH的结构, 兼顾氮原子在特定的pH下可被质子化的特性, 将硫原子替换为氮原子 (化合物 **86**, 图16), 从而降低分子带电荷量。对呋喃糖环5'位氮原子的两个取代基进行分别探索, 获得化合物 **87**, 具有中等的抑制活性 ( $K_D = 8.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 对其他的  $m^5C$  甲基转移酶 (NSUN2和NSUN6) 具有选择性, 但对于DNMT3A和G9a缺乏选择性。从预测的结合模式来看, 分子的Y型分叉结构对于活性至关重要, 亲脂性的炔基能占据一个疏水口袋 (Cyt-site), 去除在该口袋中不利的水分子。由于化合物 **87**的透膜性质较差导致缺乏细胞活性, 即使在羧基上引入乙酯制备成前药, 也会被快速降解。2023年, 该团队<sup>[233]</sup>对炔基部分替换为苯基取代基进行进一步的结构优化, 发现当引入缺电子的苯环时, 尤其是苯环上有易离去的取代基 (化合物 **88**), 其活性有所提升



**Figure 15** The chemical structures of representative methyltransferase-like 3 (METTL3) inhibitors

( $K_D = 4.9 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 对于 NSUN2 和 NSUN6 依然保持较好的选择性。蛋白质质谱显示, 化合物 **88** 与能疏水口袋中的 Cys79 形成共价键 (图 16B)。

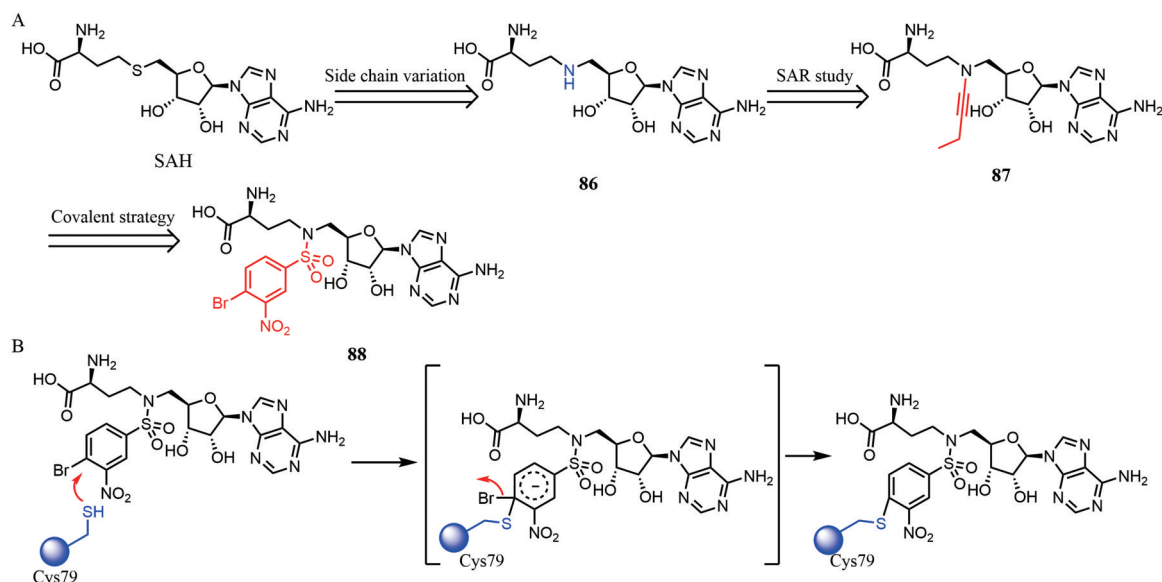
## 5 总结与展望

SAM 作为体内仅次于 ATP 的第二普遍的辅助因子, 在生命活动中扮演着十分重要的角色。通过调控 SAM 依赖性甲基转移酶的活性, 以调节 DNA、RNA、蛋白质以及体内代谢小分子的结构与功能, 从而影响各种生理功能和疾病的发生发展。开发 SAM 依赖性甲基转移酶的调节剂, 对于相关疾病的诊断与治疗具有重要的意义。截至目前, 在核苷类甲基转移酶抑制剂中, 有两款药物 (阿扎胞苷和地西他滨) 作为抗肿瘤药物已经成功上市, 7 款药物 (guadecitabine、FdCyd、RX3117、NTX-301、PF-06939999、JNJ64619178 和 EPZ-5676) 进入临床研究阶段, 虽然有个别的临床试验被终止, 但是大多数药物在临床疗效上表现优秀, 同时大量的临床前化合物也不断被报道, 开发核苷类甲基转移酶抑制剂逐渐成为热门研究领域。

已报道的核苷类抑制剂大多是以 SAM/SAH 的结构为模板进行修饰, 天然的核苷化合物在结构上有点不足: ① 分子中带有电荷与极性基团, 造成分子的细胞渗透性不佳, 生物利用度较低; ② 天然核苷的糖苷键对于酸碱环境或者水解酶不稳定, 进入体内容易被代谢; ③ 由于 SAM/SAH 是甲基转移酶的非特异性底物, 在结构优化过程中, 提高对于特定靶点的选择性是一个难点。针对以上的不足, 本文对以往的策略进行了详细的叙述: ① 针对化合物细胞渗透性不佳的问题, 可采用减少酸碱基团和带电基团, 在极性基团上

引入亲脂性片段等手段; ② 针对化合物稳定性的问题, 可对糖苷键进行修饰, 如用碳环或含硫糖环取代呋喃糖环; 对糖环进行甲基、氟原子的取代以改变糖环的构象; 对碱基的片段进行氟代或采用电子等排策略替换, 以封闭代谢软点; ③ 针对选择性差的问题, 以组蛋白甲基转移酶为例, 设计同时占据 SAM 结合位点和底物结合位点的化合物, 根据底物的多样性, 设计多样性的片段以适应不同的底物结合位点, 或者修饰碱基片段引入其他基团, 探索特有的结合口袋, 从而提升对其他甲基转移酶的选择性。

未来以 SAM/SAH 的结构为模板设计核苷类甲基转移酶抑制剂有以下可供考虑的方向: ① 如本文提及的 PRMT1 抑制剂 (化合物 **15**)、PRMT5 抑制剂 (化合物 **25**)、DOTL1 抑制剂 (化合物 **58**) 和 DNMT2 抑制剂 (化合物 **88**), 针对特有的氨基酸残基, 开发共价抑制剂一方面可以提高其抑制活性, 另一方面也可以提高对其他甲基转移酶的选择性; ② 开发基于核苷抑制剂的 PROTAC 蛋白降解技术, 有望调控蛋白的非催化功能, 最近在 DOT1L 抑制剂的研发中也被采用<sup>[234-236]</sup>; ③ 对核苷类化合物进行合理的设计, 探索蛋白独特的作用模式。如本文提及的 PRMT5 抑制剂 (化合物 **21**), DOT1L 抑制剂 (化合物 **56**) 和 DNMT2 抑制剂 (化合物 **87**), 当甲基转移酶抑制剂与蛋白结构后, 会诱导相关氨基酸残基的构象的改变, 从而产生全新的作用模式, 同样能达到提升活性和选择性的目的; ④ 对生物利用度低的核苷类抑制剂采用前药策略, 可以提升其细胞渗透性, 如本文提及的 Trimethyl Lock 前药策略, 新冠口服药民得维的三异丁酸酯前药策略<sup>[237]</sup>等。总之, 基



**Figure 16** The chemical structures of DNMT2 inhibitors. A: The optimization process of DNMT2 inhibitors; B: The proposed mechanism of compound **88** as covalent inhibitor

于SAM/SAH的结构进行修饰和优化,是开发核苷类SAM依赖性甲基转移酶抑制剂的一大重要的策略,未来将会有更多的高活性、高选择性以及代谢性质优良的核苷化合物进入临床试验,最终上市造福患者。

**作者贡献:** 张俊杰负责文献调研、全文撰写与图表绘制;刘同超负责论文修改与校对工作;熊兵负责综述选题、框架组织、论文修改等工作。

**利益冲突:** 所有作者均声明不存在利益冲突。

## References

- [1] Sanderson SM, Gao X, Dai Z, et al. Methionine metabolism in health and cancer: a nexus of diet and precision medicine [J]. *Nat Rev Cancer*, 2019, 19: 625-637.
- [2] Orsolic I, Carrier A, Esteller M. Genetic and epigenetic defects of the RNA modification machinery in cancer [J]. *Trends Genet*, 2023, 39: 74-88.
- [3] Park J, Tai J, Roessner CA, et al. Enzymatic synthesis of *S*-adenosyl-*L*-methionine on the preparative scale [J]. *Bioorg Med Chem*, 1996, 4: 2179-2185.
- [4] Li J, Sun C, Cai W, et al. Insights into *S*-adenosyl-*L*-methionine (SAM)-dependent methyltransferase related diseases and genetic polymorphisms [J]. *Mutat Res*, 2021, 788: 108396.
- [5] Zhang J, Zheng YG. SAM/SAH analogs as versatile tools for SAM-dependent methyltransferases [J]. *ACS Chem Biol*, 2016, 11: 583-597.
- [6] Arrowsmith CH, Bountra C, Fish PV, et al. Epigenetic protein families: a new frontier for drug discovery [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2012, 11: 384-400.
- [7] Jordheim LP, Durantel D, Zoulim F, et al. Advances in the development of nucleoside and nucleotide analogues for cancer and viral diseases [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2013, 12: 447-464.
- [8] Lin X, Liang C, Zou L, et al. Advance of structural modification of nucleosides scaffold [J]. *Eur J Med Chem*, 2021, 214: 113233.
- [9] Richon VM, Johnston D, Sneeringer CJ, et al. Chemogenetic analysis of human protein methyltransferases [J]. *Chem Biol Drug Des*, 2011, 78: 199-210.
- [10] Vizán P, Di-Croce L, Aranda S. Functional and pathological roles of AHCY [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 654344.
- [11] Sasaki K, Doi S, Nakashima A, et al. Inhibition of SET domain-containing lysine methyltransferase 7/9 ameliorates renal fibrosis [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2016, 27: 203.
- [12] Bergthaler A, Schliehe C. Antagonists of setdb2 for use in the therapy of infectious diseases: WO, 2016079321 [P]. 2016-05-26.
- [13] Sala L, Franco - Valls H, Stanisavljevic J, et al. Abrogation of myofibroblast activities in metastasis and fibrosis by methyltransferase inhibition [J]. *Int J Cancer*, 2019, 145: 3064-3077.
- [14] Williams-Ashman HG, Seidenfeld J, Galletti P. Trends in the biochemical pharmacology of 5'-deoxy-5'-methylthioadenosine [J]. *Biochem Pharmacol*, 1982, 31: 277-288.
- [15] Kryukov GV, Wilson FH, Ruth JR, et al. *MTAP* deletion confers enhanced dependency on the PRMT5 arginine methyltransferase in cancer cells [J]. *Science*, 2016, 351: 1214-1218.
- [16] Hevia H, Varela-Rey M, Corrales FJ, et al. 5'-Methylthioadenosine modulates the inflammatory response to endotoxin in mice and in rat hepatocytes [J]. *Hepatology*, 2004, 39: 1088-1098.
- [17] Pogolotti AL, Ono A, Subramaniam R, et al. On the mechanism of DNA-adenine methylase [J]. *J Biol Chem*, 1988, 263: 7461-7464.
- [18] Wu JC, Santi DV. Kinetic and catalytic mechanism of *HhaI* methyltransferase [J]. *J Biol Chem*, 1987, 262: 4778-4786.
- [19] Baylin SB, Ohm JE. Epigenetic gene silencing in cancer: a mechanism for early oncogenic pathway addiction? [J]. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6: 107-116.
- [20] Miranda TB, Jones PA. DNA methylation: the nuts and bolts of repression [J]. *J Cell Physiol*, 2007, 213: 384-390.
- [21] Taberlay PC, Jones PA. DNA methylation and cancer [M]// Gasser SM, Li E. *Epigenetics and Disease*. Basel: Springer Basel, 2011: 1-23.
- [22] Okano M, Bell DW, Haber DA, et al. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for *de novo* methylation and mammalian development [J]. *Cell*, 1999, 99: 247-257.
- [23] Kweon SM, Chen Y, Moon E, et al. An adversarial DNA *N*<sup>6</sup>-methyladenine-sensor network preserves polycomb silencing [J]. *Mol Cell*, 2019, 74: 1138-1147.e6.
- [24] Xiao CL, Zhu S, He M, et al. *N*<sup>6</sup>-methyladenine DNA modification in the human genome [J]. *Mol Cell*, 2018, 71: 306-318.e7.
- [25] Li W, Shi Y, Zhang T, et al. Structural insight into human N6amt1-Trm112 complex functioning as a protein methyltransferase [J]. *Cell Discov*, 2019, 5: 51.
- [26] Egger G, Liang G, Aparicio A, et al. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy [J]. *Nature*, 2004, 429: 457-463.
- [27] Van-Groeningen CJ, Leyva A, O'Brien AM, et al. Phase I and pharmacokinetic study of 5-aza-2'-deoxycytidine (NSC 127716) in cancer patients [J]. *Cancer Res*, 1986, 46: 4831-4836.
- [28] Chabot GG, Bouchard J, Momparler RL. Kinetics of deamination of 5-aza-2'-deoxycytidine and cytosine arabinoside by human liver cytidine deaminase and its inhibition by 3-deazauridine, thymidine or uracil arabinoside [J]. *Biochem Pharmacol*, 1983, 32: 1327-1328.
- [29] Chabner BA, Drake JC, Johns DG. Deamination of 5-azacytidine by a human leukemia cell cytidine deaminase [J]. *Biochem Pharmacol*, 1973, 22: 2763-2765.
- [30] Astex Pharmaceuticals, Inc. A phase 3, multicenter, open-label, randomized study of SGI-110 versus treatment choice (TC) in adults with previously untreated acute myeloid leukemia (AML)

- who are not considered candidates for intensive remission induction chemotherapy [DB/OL]. 2021 [2024-02-04]. <https://www.clinicaltrials.gov/study/NCT02348489>.
- [31] Astex Pharmaceuticals, Inc. A phase 3, multicenter, randomized, open-label study of guadecitabine (SGI-110) versus treatment choice in adults with previously treated acute myeloid leukemia [DB/OL]. 2023 [2024-02-04]. <https://www.clinicaltrials.gov/study/NCT02920008>.
- [32] Astex Pharmaceuticals, Inc. A phase 3, multicenter, randomized, open-label study of guadecitabine (SGI-110) versus treatment choice in adults with myelodysplastic syndromes (MDS) or chronic myelomonocytic leukemia (CMML) previously treated with hypomethylating agents [DB/OL]. 2023 [2024-02-04]. <https://www.clinicaltrials.gov/study/NCT02907359>.
- [33] Fenaux P, Gobbi M, Kropf PL, et al. Guadecitabine vs treatment choice in newly diagnosed acute myeloid leukemia: a global phase 3 randomized study [J]. *Blood Adv*, 2023, 7: 5027-5037.
- [34] National Cancer Institute (NCI). Phase I/II evaluation of oral decitabine/tetrahydrouridine as epigenetic priming for pembrolizumab immune checkpoint blockade in inoperable locally advanced or metastatic non-small cell lung cancers, esophageal carcinomas, or pleural mesotheliomas [DB/OL]. 2023 [2024-02-04]. <https://www.clinicaltrials.gov/study/NCT03233724>.
- [35] Sarkisjan D, Julsing JR, Smid K, et al. The cytidine analog fluorocyclopentenylcytosine (RX-3117) is activated by uridine-cytidine kinase 2 [J]. *PLoS One*, 2016, 11: e0162901.
- [36] Processa Pharmaceuticals. A phase 1, open-label, dose-ranging, safety and pharmacokinetic study to determine the maximum tolerated dose of RX-3117 administered orally as a single-agent to subjects with advanced malignancies [DB/OL]. 2023 [2024-02-04]. <https://www.clinicaltrials.gov/study/NCT02030067>.
- [37] Processa Pharmaceuticals. A phase 1/2 open-label, safety, pharmacokinetic, pharmacodynamic and efficacy study of RX-3117 in combination with Abraxane® in subjects with metastatic pancreatic cancer [DB/OL]. 2023 [2024-02-04]. <https://www.clinicaltrials.gov/study/NCT03189914>.
- [38] Babiker HM, Schlegel PJ, Hicks LG, et al. A phase I/II study of RX-3117, an oral antimetabolite nucleoside, in combination with nab-paclitaxel (nab-pac) as first-line treatment of metastatic pancreatic cancer (met-PC): preliminary results [J]. *J Clin Oncol*, 2019, 37: 420.
- [39] Salgia N, Pal SK, Chung V, et al. Activity of RX-3117, an oral antimetabolite nucleoside, in subjects with advanced urothelial cancer: preliminary results of a phase IIa study [J]. *J Clin Oncol*, 2019, 37: 455.
- [40] Lim B, Yoo D, Chun Y, et al. The preclinical efficacy of the novel hypomethylating agent NTX-301 as a monotherapy and in combination with venetoclax in acute myeloid leukemia [J]. *Blood Cancer J*, 2022, 12: 57.
- [41] Xenicals Therapeutics Australia Pty Ltd. A phase 1/2, open-label, dose-exploration and expansion study to evaluate the safety, tolerability, pharmacokinetics and pharmacodynamics of NTX-301 monotherapy in advanced solid tumours, and in combination with platinum-based chemotherapy in advanced ovarian & bladder cancer, and in combination with temozolomide as adjuvant (maintenance) therapy in high-grade glioma (optional arm) [DB/OL]. 2022 [2024-02-04]. <https://www.clinicaltrials.gov/study/NCT04851834>.
- [42] Vachhani P. A phase 1 study of NTX-301, an oral DNMT1 inhibitor, in patients with MDS and AML [DB/OL]. 2023 [2024-02-04]. <https://www.clinicaltrials.gov/study/NCT04167917>.
- [43] Vachhani P, Murthy GSG, Jamy O, et al. A phase 1 study of NTX-301, an oral DNMT1 inhibitor, in patients with MDS and AML (trial in progress) [J]. *J Clin Oncol*, 2022, 40: TPS7077.
- [44] Morris J, Wishka D, Lopez O, et al. Preclinical development of NSC-801845, a new cytidine analog, in comparative cell culture and xenograft studies with the clinical candidates T-dCyd and aza-T-dCyd [J]. *Cancer Res*, 2020, 80: 1961.
- [45] Zhang Y, Sun J, Gao Y, et al. An HPLC – MS/MS method for simultaneous determination of decitabine and its valyl prodrug valdecitabine in rat plasma [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2013, 917-918: 78-83.
- [46] Watanabe T, Yamashita S, Ureshino H, et al. Targeting aberrant DNA hypermethylation as a driver of ATL leukemogenesis by using the new oral demethylating agent OR-2100 [J]. *Blood*, 2020, 136: 871-884.
- [47] Ureshino H, Kurahashi Y, Watanabe T, et al. Silylation of deoxy-nucleotide analog yields an orally available drug with antileukemia effects [J]. *Mol Cancer Ther*, 2021, 20: 1412-1421.
- [48] Hattori N, Sako M, Kimura K, et al. Novel prodrugs of decitabine with greater metabolic stability and less toxicity [J]. *J Clin Epigenet*, 2019, 11: 111.
- [49] Saravanaraman P, Selvam M, Ashok C, et al. *De novo* methyltransferases: potential players in diseases and new directions for targeted therapy [J]. *Biochimie*, 2020, 176: 85-102.
- [50] Narayanan D, Pozdnyakova O, Hasserjian RP, et al. Effect of *DNMT3A* variant allele frequency and double mutation on clinicopathologic features of patients with *de novo* AML [J]. *Blood Adv*, 2021, 5: 2539-2549.
- [51] Sun W, Ma G, Zhang L, et al. DNMT3A-mediated silence in ADAMTS9 expression is restored by RNF180 to inhibit viability and motility in gastric cancer cells [J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12: 428.
- [52] Husni RE, Shiba-Ishii A, Iiyama S, et al. DNMT3a expression pattern and its prognostic value in lung adenocarcinoma [J]. *Lung Cancer*, 2016, 97: 59-65.
- [53] Miao J, Zhao C, Tang K, et al. TDG suppresses the migration and invasion of human colon cancer cells *via* the DNMT3A/TIMP2 axis [J]. *Int J Biol Sci*, 2022, 18: 2527-2539.
- [54] Dura M, Teissandier A, Armand M, et al. DNMT3A-dependent

- DNA methylation is required for spermatogonial stem cells to commit to spermatogenesis [J]. *Nat Genet*, 2022, 54: 469-480.
- [55] Gui T, Liu M, Yao B, et al. TCF3 is epigenetically silenced by EZH2 and DNMT3B and functions as a tumor suppressor in endometrial cancer [J]. *Cell Death Differ*, 2021, 28: 3316-3328.
- [56] Ibrahim ML, Klement JD, Lu C, et al. Myeloid-derived suppressor cells produce IL-10 to elicit DNMT3b-dependent IRF8 silencing to promote colitis-associated colon tumorigenesis [J]. *Cell Rep*, 2018, 25: 3036-3046.e6.
- [57] Tang X, Tu G, Yang G, et al. Autocrine TGF- $\beta$ 1/miR-200s/miR-221/DNMT3B regulatory loop maintains CAF status to fuel breast cancer cell proliferation [J]. *Cancer Lett*, 2019, 452: 79-89.
- [58] Hlady RA, Novakova S, Opavska J, et al. Loss of Dnmt3b function upregulates the tumor modifier *Ment* and accelerates mouse lymphomagenesis [J]. *J Clin Invest*, 2012, 122: 163-177.
- [59] Hendrickson TF, Ho KK, Saunders MD, et al. New compounds: WO, 2013062943 [P]. 2013-05-02.
- [60] Wahhab A, Besterman JM, Delorme D, et al. Inhibitors of DNA methyltransferase: WO, 2006078752 [P]. 2006-07-27.
- [61] Kaniskan HÜ, Martini ML, Jin J. Inhibitors of protein methyltransferases and demethylases [J]. *Chem Rev*, 2018, 118: 989-1068.
- [62] Wolf SS. The protein arginine methyltransferase family: an update about function, new perspectives and the physiological role in humans [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2009, 66: 2109-2121.
- [63] Lin WJ, Gary JD, Yang MC, et al. The mammalian immediate-early TIS21 protein and the leukemia-associated BTG1 protein interact with a protein-arginine *N*-methyltransferase [J]. *J Biol Chem*, 1996, 271: 15034-15044.
- [64] Tang J, Frankel A, Cook RJ, et al. PRMT1 is the predominant type I protein arginine methyltransferase in mammalian cells [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275: 7723-7730.
- [65] Iwasaki H, Yada T. Protein arginine methylation regulates insulin signaling in L6 skeletal muscle cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 364: 1015-1021.
- [66] Scorilas A, Black MH, Talieri M, et al. Genomic organization, physical mapping, and expression analysis of the human protein arginine methyltransferase 1 gene [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 278: 349-359.
- [67] Wang H, Huang ZQ, Xia L, et al. Methylation of histone H4 at arginine 3 facilitating transcriptional activation by nuclear hormone receptor [J]. *Science*, 2001, 293: 853-857.
- [68] Baldwin RM, Morettin A, Paris G, et al. Alternatively spliced protein arginine methyltransferase 1 isoform PRMT1v2 promotes the survival and invasiveness of breast cancer cells [J]. *Cell Cycle*, 2012, 11: 4597-4612.
- [69] Seligson DB, Horvath S, Shi T, et al. Global histone modification patterns predict risk of prostate cancer recurrence [J]. *Nature*, 2005, 435: 1262-1266.
- [70] Mathioudaki K, Papadokostopoulou A, Scorilas A, et al. The *PRMT1* gene expression pattern in colon cancer [J]. *Br J Cancer*, 2008, 99: 2094-2099.
- [71] Yoshimatsu M, Toyokawa G, Hayami S, et al. Dysregulation of PRMT1 and PRMT6, type I arginine methyltransferases, is involved in various types of human cancers [J]. *Int J Cancer*, 2011, 128: 562-573.
- [72] Osborne T, Weller Roska RL, Rajskei SR, et al. *In situ* generation of a bisubstrate analogue for protein arginine methyltransferase 1 [J]. *J Am Chem Soc*, 2008, 130: 4574-4575.
- [73] Dowden J, Hong W, Parry RV, et al. Toward the development of potent and selective bisubstrate inhibitors of protein arginine methyltransferases [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2010, 20: 2103-2105.
- [74] Dowden J, Pike RA, Parry RV, et al. Small molecule inhibitors that discriminate between protein arginine *N*-methyltransferases PRMT1 and CARM1 [J]. *Org Biomol Chem*, 2011, 9: 7814-7821.
- [75] Schurter BT, Koh SS, Chen D, et al. Methylation of histone H3 by coactivator-associated arginine methyltransferase 1 [J]. *Biochemistry*, 2001, 40: 5747-5756.
- [76] Selvi BR, Batta K, Kishore AH, et al. Identification of a novel inhibitor of coactivator-associated arginine methyltransferase 1 (CARM1)-mediated methylation of histone H3 Arg-17 [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285: 7143-7152.
- [77] Yang Y, Bedford MT. Protein arginine methyltransferases and cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2013, 13: 37-50.
- [78] Al-Dhaheri M, Wu J, Skliris GP, et al. CARM1 is an important determinant of ER $\alpha$ -dependent breast cancer cell differentiation and proliferation in breast cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2011, 71: 2118-2128.
- [79] Kim YR, Lee BK, Park RY, et al. Differential CARM1 expression in prostate and colorectal cancers [J]. *BMC Cancer*, 2010, 10: 197.
- [80] Ou CY, LaBonte MJ, Manegold PC, et al. A coactivator role of CARM1 in the dysregulation of  $\beta$ -catenin activity in colorectal cancer cell growth and gene expression [J]. *Mol Cancer Res*, 2011, 9: 660-670.
- [81] Hong H, Kao C, Jeng MH, et al. Aberrant expression of CARM1, a transcriptional coactivator of androgen receptor, in the development of prostate carcinoma and androgen-independent status [J]. *Cancer*, 2004, 101: 83-89.
- [82] Elakoum R, Gauchotte G, Oussalah A, et al. CARM1 and PRMT1 are dysregulated in lung cancer without hierarchical features [J]. *Biochimie*, 2014, 97: 210-218.
- [83] Osada S, Suzuki S, Yoshimi C, et al. Elevated expression of coactivator-associated arginine methyltransferase 1 is associated with early hepatocarcinogenesis [J]. *Oncol Rep*, 2013, 30: 1669-1674.
- [84] Luo M, Zheng W. Methyltransferase inhibitors for treating cancer: WO, 2014172330 [P]. 2014-10-23.

- [85] Luo M, Cai X, Wang K, et al. Cofactor analogs as methyltransferase inhibitors for treating cancer: WO, 2017070464 [P]. 2017-04-27.
- [86] Cavarelli J, Halby L, Arimondo PB. Protein arginine *N*-methyltransferases inhibitors and uses thereof: WO, 2017211958 [P]. 2017-12-14.
- [87] Iannelli G, Milite C, Marechal N, et al. Turning nonselective inhibitors of type I protein arginine methyltransferases into potent and selective inhibitors of protein arginine methyltransferase 4 through a deconstruction-reconstruction and fragment-growing approach [J]. *J Med Chem*, 2022, 65: 11574-11606.
- [88] Branscombe TL, Frankel A, Lee JH, et al. PRMT5 (janus kinase-binding protein 1) catalyzes the formation of symmetric dimethylarginine residues in proteins [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276: 32971-32976.
- [89] Pal S, Vishwanath SN, Erdjument-Bromage H, et al. Human SWI/SNF-associated PRMT5 methylates histone H3 arginine 8 and negatively regulates expression of *ST7* and *NM23* tumor suppressor genes [J]. *Mol Cell Biol*, 2004, 24: 9630-9645.
- [90] Xu X, Hoang S, Mayo MW, et al. Application of machine learning methods to histone methylation ChIP-Seq data reveals H4R3me2 globally represses gene expression [J]. *BMC Bioinformatics*, 2010, 11: 396.
- [91] Wang L, Pal S, Sif S. Protein arginine methyltransferase 5 suppresses the transcription of the RB family of tumor suppressors in leukemia and lymphoma cells [J]. *Mol Cell Biol*, 2008, 28: 6262-6277.
- [92] Fabbrizio E, Messaoudi SE, Polanowska J, et al. Negative regulation of transcription by the typeII arginine methyltransferase PRMT5 [J]. *EMBO Rep*, 2002, 3: 641-645.
- [93] Seth-Vollenweider T, Joshi S, Dhawan P, et al. Novel mechanism of negative regulation of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-induced 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> 24-hydroxylase (*Cyp24a1*) transcription [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289: 33958-33970.
- [94] Antonysamy S, Bonday Z, Campbell RM, et al. Crystal structure of the human PRMT5:MEP50 complex [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109: 17960-17965.
- [95] Pal S, Baiocchi RA, Byrd JC, et al. Low levels of miR-92b/96 induce PRMT5 translation and H3R8/H4R3 methylation in mantle cell lymphoma [J]. *EMBO J*, 2007, 26: 3558-3569.
- [96] Chung J, Karkhanis V, Tae S, et al. Protein arginine methyltransferase 5 (PRMT5) inhibition induces lymphoma cell death through reactivation of the retinoblastoma tumor suppressor pathway and polycomb repressor complex 2 (PRC2) silencing [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288: 35534-35547.
- [97] Nicholas C, Yang J, Peters SB, et al. PRMT5 is upregulated in malignant and metastatic melanoma and regulates expression of MITF and p27<sup>kip1</sup> [J]. *PLoS One*, 2013, 8: e74710.
- [98] Wei TW, Juan C, Hisa J, et al. Protein arginine methyltransferase 5 is a potential oncoprotein that upregulates G1 cyclins/cyclin-dependent kinases and the phosphoinositide 3 - kinase/AKT signaling cascade [J]. *Cancer Sci*, 2012, 103: 1640-1650.
- [99] Powers MA, Fay MM, Factor RE, et al. Protein arginine methyltransferase 5 accelerates tumor growth by arginine methylation of the tumor suppressor programmed cell death 4 [J]. *Cancer Res*, 2011, 71: 5579-5587.
- [100] Cho EC, Zheng S, Munro S, et al. Arginine methylation controls growth regulation by E2F-1 [J]. *EMBO J*, 2012, 31: 1785-1797.
- [101] Bonday ZQ, Cortez GS, Grogan MJ, et al. LLY-283, a potent and selective inhibitor of arginine methyltransferase 5, PRMT5, with antitumor activity [J]. *ACS Med Chem Lett*, 2018, 9: 612-617.
- [102] Lin H, Luengo J, Shetty R, et al. Selective inhibitors of protein arginine methyltransferase 5: WO, 2020206299 [P]. 2020-10-08.
- [103] Cao G. Selective inhibitors of protein arginine methyltransferase 5 (PRMT5): WO, 2021055797 [P]. 2021-03-25.
- [104] Lin H, Wang M, Zhang YW, et al. Discovery of potent and selective covalent protein arginine methyltransferase 5 (PRMT5) inhibitors [J]. *ACS Med Chem Lett*, 2019, 10: 1033-1038.
- [105] Prelude Therapeutics. A phase 1, open-label, multicenter, dose escalation, dose expansion study of PRT543 in patients with advanced solid tumors and hematologic malignancies [DB/OL]. 2023 [2024-02-04]. <https://www.clinicaltrials.gov/study/NCT03886831>.
- [106] Prelude Therapeutics. A phase 1, open-label, multicenter, dose escalation and expansion study of PRT811 in subjects with advanced solid tumors, CNS lymphoma, and recurrent high-grade gliomas [DB/OL]. 2023 [2024-02-04]. <https://www.clinicaltrials.gov/study/NCT04089449>.
- [107] Ferrarotto R, Swiecicki PL, Zandberg DP, et al. PRT543, a protein arginine methyltransferase 5 inhibitor, in patients with advanced adenoid cystic carcinoma: an open-label, phase I dose-expansion study [J]. *Oral Oncol*, 2024, 149: 106634.
- [108] Monga V, Johanns TM, Stupp R, et al. A phase 1 study of the protein arginine methyltransferase 5 (PRMT5) brain-penetrant inhibitor PRT811 in patients (pts) with recurrent high-grade glioma or uveal melanoma (UM) [J]. *J Clin Oncol*, 2023, 41: 3008.
- [109] Kawamura S, Palte RL, Kim HY, et al. Design and synthesis of unprecedented 9- and 10-membered cyclonucleosides with PRMT5 inhibitory activity [J]. *Bioorg Med Chem*, 2022, 66: 116820.
- [110] Jensen-Pergakes K, Tatlock J, Maegley KA, et al. SAM-competitive PRMT5 inhibitor PF-06939999 demonstrates antitumor activity in splicing dysregulated NSCLC with decreased liability of drug resistance [J]. *Mol Cancer Ther*, 2022, 21: 3-15.
- [111] Pfizer. A phase 1 study to evaluate the safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of escalating doses of PF-06939999 (PRMT5 inhibitor) in participants with advanced or metastatic non-small cell lung cancer, head and neck squamous cell carcinoma, esophageal cancer, endometrial cancer, cervical cancer

- and bladder cancer [DB/OL]. 2022 [2024-02-04]. <https://www.clinicaltrials.gov/study/NCT03854227>.
- [112] Guo C, Liao KH, Li M, et al. PK/PD model-informed dose selection for oncology phase I expansion: case study based on PF-06939999, a PRMT5 inhibitor [J]. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol*, 2023, 12: 1619-1625.
- [113] Berthelot DJC, Brehmer D, Beke L, et al. Substituted nucleoside analogues for use as PRMT5 inhibitors: WO, 2017153186 [P]. 2017-09-14.
- [114] Chen Y, Shi Q, Yang H, et al. Structure-activity relationship study of a series of nucleoside derivatives bearing sulfonamide scaffold as potent and selective PRMT5 inhibitors [J]. *Bioorg Chem*, 2023, 130: 106228.
- [115] Brehmer D, Beke L, Wu T, et al. Discovery and pharmacological characterization of JNJ-64619178, a novel small-molecule inhibitor of PRMT5 with potent antitumor activity [J]. *Mol Cancer Ther*, 2021, 20: 2317-2328.
- [116] Janssen Research & Development, LLC. A phase 1, first-in-human, open-label study of the safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of JNJ-64619178, an inhibitor of protein arginine methyltransferase 5 (PRMT5) in subjects with advanced cancers [DB/OL]. 2024 [2024-02-04]. <https://www.clinicaltrials.gov/study/NCT03573310>.
- [117] Verhoeven J, Verniest GAF, Thuring JWJF, et al. Novel spirobicyclic analogues: WO, 2019110734 [P]. 2019-06-13.
- [118] Quiroz RV, Reutershan MH, Schneider SE, et al. The discovery of two novel classes of 5,5-bicyclic nucleoside-derived PRMT5 inhibitors for the treatment of cancer [J]. *J Med Chem*, 2021, 64: 3911-3939.
- [119] Wu WL, Yang Z, Lee F, et al. Heterocyclic compounds as PRMT5 inhibitors: WO, 2019112719 [P]. 2019-06-13.
- [120] Wu WL, Yang Z, Lee F, et al. Heterocyclic compounds as PRMT5 inhibitors: WO, 2020243178 [P]. 2020-12-03.
- [121] Nair P, Gudade G, Tryambake M, et al. PRMT5 inhibitors: WO, 2020250123 [P]. 2020-12-17.
- [122] Miranda TB, Miranda M, Frankel A, et al. PRMT7 is a member of the protein arginine methyltransferase family with a distinct substrate specificity [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279: 22902-22907.
- [123] Lee JH, Cook JR, Yang ZH, et al. PRMT7, a new protein arginine methyltransferase that synthesizes symmetric dimethylarginine [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280: 3656-3664.
- [124] Smith E, Zhou W, Shindiapina P, et al. Recent advances in targeting protein arginine methyltransferase enzymes in cancer therapy [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2018, 22: 527-545.
- [125] Yao R, Jiang H, Ma Y, et al. PRMT7 induces epithelial-to-mesenchymal transition and promotes metastasis in breast cancer [J]. *Cancer Res*, 2014, 74: 5656-5667.
- [126] Szewczyk MM, Ishikawa Y, Organ S, et al. Pharmacological inhibition of PRMT7 links arginine monomethylation to the cellular stress response [J]. *Nat Commun*, 2020, 11: 2396.
- [127] Cook JR, Lee JH, Yang ZH, et al. FBXO11/PRMT9, a new protein arginine methyltransferase, symmetrically dimethylates arginine residues [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 342: 472-481.
- [128] Hadjikyriacou A, Yang Y, Espejo A, et al. Unique features of human protein arginine methyltransferase 9 (PRMT9) and its substrate RNA splicing factor SF3B2 [J]. *J Biol Chem*, 2015, 290: 16723-16743.
- [129] Yang Y, Hadjikyriacou A, Xia Z, et al. PRMT9 is a type II methyltransferase that methylates the splicing factor SAP145 [J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 6428.
- [130] Lei Y, Han P, Tian D. Protein arginine methyltransferases and hepatocellular carcinoma: a review [J]. *Transl Oncol*, 2021, 14: 101194.
- [131] Jiang H, Zhou Z, Jin S, et al. PRMT9 promotes hepatocellular carcinoma invasion and metastasis via activating PI3K/Akt/GSK-3 $\beta$ /Snail signaling [J]. *Cancer Sci*, 2018, 109: 1414-1427.
- [132] Dong H, He X, Zhang L, et al. Targeting PRMT9 suppresses acute myeloid leukemia maintenance [J]. *Blood*, 2021, 138: 358.
- [133] Harada N, Takagi T, Nakano Y, et al. Protein arginine methyltransferase 10 is required for androgen-dependent proliferation of LNCaP prostate cancer cells [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2015, 79: 1430-1437.
- [134] Bai X, Sui C, Liu F, et al. The protein arginine methyltransferase PRMT9 attenuates MAVS activation through arginine methylation [J]. *Nat Commun*, 2022, 13: 5016.
- [135] Feoli A, Iannelli G, Cipriano A, et al. Identification of a protein arginine methyltransferase 7 (PRMT7)/protein arginine methyltransferase 9 (PRMT9) inhibitor [J]. *J Med Chem*, 2023, 66: 13665-13683.
- [136] Kouzarides T. Histone methylation in transcriptional control [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2002, 12: 198-209.
- [137] Baumbusch LO, Thorstensen T, Krauss V, et al. The *Arabidopsis thaliana* genome contains at least 29 active genes encoding SET domain proteins that can be assigned to four evolutionarily conserved classes [J]. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29: 4319-4333.
- [138] Allis CD, Berger SL, Cote J, et al. New nomenclature for chromatin-modifying enzymes [J]. *Cell*, 2007, 131: 633-636.
- [139] Kouzarides T. Chromatin modifications and their function [J]. *Cell*, 2007, 128: 693-705.
- [140] Zhang Z, Pugh BF. High-resolution genome-wide mapping of the primary structure of chromatin [J]. *Cell*, 2011, 144: 175-186.
- [141] Barski A, Cuddapah S, Cui K, et al. High-resolution profiling of histone methylations in the human genome [J]. *Cell*, 2007, 129: 823-837.
- [142] Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications [J]. *Cell Res*, 2011, 21: 381-395.
- [143] Tachibana M, Sugimoto K, Nozaki M, et al. G9a histone methyltransferase plays a dominant role in euchromatic histone H3 lysine 9 methylation and is essential for early embryogenesis [J].

- Genes Dev, 2002, 16: 1779-1791.
- [144] 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: 815-826.
- [145] 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: 9636-9641.
- [146] 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: e2037.
- [147] Imai K, Togami H, Okamoto T. Involvement of histone H3 lysine 9 (H3K9) methyltransferase G9a in the maintenance of HIV-1 latency and its reactivation by BIX01294 [J]. J Biol Chem, 2010, 285: 16538-16545.
- [148] Maze I, Covington HE, Dietz DM, et al. Essential role of the histone methyltransferase G9a in cocaine-induced plasticity [J]. Science, 2010, 327: 213-216.
- [149] Antignano F, Burrows K, Hughes MR, et al. Methyltransferase G9A regulates T cell differentiation during murine intestinal inflammation [J]. J Clin Invest, 2014, 124: 1945-1955.
- [150] Devkota K, Lohse B, Liu Q, et al. Analogues of the natural product sinefungin as inhibitors of EHMT1 and EHMT2 [J]. ACS Med Chem Lett, 2014, 5: 293-297.
- [151] Avdic V, Zhang P, Lanouette S, et al. Structural and biochemical insights into MLL1 core complex assembly [J]. Structure, 2011, 19: 101-108.
- [152] Kohlmann A, Schoch C, Dugas M, et al. New insights into *MLL* gene rearranged acute leukemias using gene expression profiling: shared pathways, lineage commitment, and partner genes [J]. Leukemia, 2005, 19: 953-964.
- [153] Dou Y, Milne TA, Ruthenburg AJ, et al. Regulation of MLL1 H3K4 methyltransferase activity by its core components [J]. Nat Struct Mol Biol, 2006, 13: 713-719.
- [154] Chern TR, Liu L, Petrunak E, et al. Discovery of potent small-molecule inhibitors of MLL methyltransferase [J]. ACS Med Chem Lett, 2020, 11: 1348-1352.
- [155] DeAlmeida SF, Grosso AR, Koch F, et al. Splicing enhances recruitment of methyltransferase HYPB/Setd2 and methylation of histone H3 Lys36 [J]. Nat Struct Mol Biol, 2011, 18: 977-983.
- [156] Newbold RF, Mokbel K. Evidence for a tumour suppressor function of SETD2 in human breast cancer: a new hypothesis [J]. Anticancer Res, 2010, 30: 3309-3311.
- [157] Hu M, Sun XJ, Zhang YL, et al. Histone H3 lysine 36 methyltransferase Hypb/Setd2 is required for embryonic vascular remodeling [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107: 2956-2961.
- [158] Gossage L, Murtaza M, Slatter AF, et al. Clinical and pathological impact of *VHL*, *PBRM1*, *BAP1*, *SETD2*, *KDM6A*, and *JARID1c* in clear cell renal cell carcinoma [J]. Genes Chromosomes Cancer, 2014, 53: 38-51.
- [159] Duns G, Van Den Berg E, Van Duivenbode I, et al. Histone methyltransferase gene *SETD2* is a novel tumor suppressor gene in clear cell renal cell carcinoma [J]. Cancer Res, 2010, 70: 4287-4291.
- [160] Hao C, Wang L, Peng S, et al. Gene mutations in primary tumors and corresponding patient-derived xenografts derived from non-small cell lung cancer [J]. Cancer Lett, 2015, 357: 179-185.
- [161] Zheng W, Ibáñez G, Wu H, et al. Sinefungin derivatives as inhibitors and structure probes of protein lysine methyltransferase SETD2 [J]. J Am Chem Soc, 2012, 134: 18004-18014.
- [162] Gottlieb PD, Pierce SA, Sims RJ, et al. *Bop* encodes a muscle-restricted protein containing MYND and SET domains and is essential for cardiac differentiation and morphogenesis [J]. Nat Genet, 2002, 31: 25-32.
- [163] Hamamoto R, Silva FP, Tsuge M, et al. Enhanced SMYD3 expression is essential for the growth of breast cancer cells [J]. Cancer Sci, 2006, 97: 113-118.
- [164] Zheng Q, Zhang W, Rao GW. Protein lysine methyltransferase SMYD2: a promising small molecule target for cancer therapy [J]. J Med Chem, 2022, 65: 10119-10132.
- [165] Luo M, Cai X, Wang K, et al. Adenosine analogs as methyltransferase inhibitors for treating cancer: WO, 2018053313 [P]. 2018-03-22.
- [166] Van Aller GS, Graves AP, Elkins PA, et al. Structure-based design of a novel SMYD3 inhibitor that bridges the SAM- and MEKK2-binding pockets [J]. Structure, 2016, 24: 774-781.
- [167] Cao R, Wang L, Wang H, et al. Role of histone H3 lysine 27 methylation in polycomb-group silencing [J]. Science, 2002, 298: 1039-1043.
- [168] Joshi P, Carrington EA, Wang L, et al. Dominant alleles identify SET domain residues required for histone methyltransferase of polycomb repressive complex 2 [J]. J Biol Chem, 2008, 283: 27757-27766.
- [169] Müller J, Hart CM, Francis NJ, et al. Histone methyltransferase activity of a *Drosophila* polycomb group repressor complex [J]. Cell, 2002, 111: 197-208.
- [170] Margueron R, Reinberg D. The polycomb complex PRC2 and its mark in life [J]. Nature, 2011, 469: 343-349.
- [171] Margueron R, Li G, Sarma K, et al. Ezh1 and Ezh2 maintain repressive chromatin through different mechanisms [J]. Mol Cell, 2008, 32: 503-518.
- [172] Cao R, Zhang Y. SUZ12 is required for both the histone methyltransferase activity and the silencing function of the EED-EZH2 complex [J]. Mol Cell, 2004, 15: 57-67.
- [173] Ketel CS, Andersen EF, Vargas ML, et al. Subunit contributions to histone methyltransferase activities of fly and worm polycomb group complexes [J]. Mol Cell Biol, 2005, 25: 6857-6868.
- [174] Pasini D, Hansen KH, Christensen J, et al. Coordinated regula-

- tion of transcriptional repression by the RBP2 H3K4 demethylase and polycomb-repressive complex 2 [J]. *Genes Dev*, 2008, 22: 1345-1355.
- [175] Morin RD, Johnson NA, Severson TM, et al. Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin [J]. *Nat Genet*, 2010, 42: 181-185.
- [176] Bracken AP. *EZH2* is downstream of the pRB-E2F pathway, essential for proliferation and amplified in cancer [J]. *EMBO J*, 2003, 22: 5323-5335.
- [177] Simon JA, Lange CA. Roles of the EZH2 histone methyltransferase in cancer epigenetics [J]. *Mutat Res Rev Mutat Res*, 2008, 647: 21-29.
- [178] Neff T, Sinha AU, Kluk MJ, et al. Polycomb repressive complex 2 is required for MLL-AF9 leukemia [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109: 5028-5033.
- [179] Shi J, Wang E, Zuber J, et al. The polycomb complex PRC2 supports aberrant self-renewal in a mouse model of MLL-AF9; *Nras*<sup>G12D</sup> acute myeloid leukemia [J]. *Oncogene*, 2013, 32: 930-938.
- [180] Xu B, On DM, Ma A, et al. Selective inhibition of EZH2 and EZH1 enzymatic activity by a small molecule suppresses *MLL*-rearranged leukemia [J]. *Blood*, 2015, 125: 346-357.
- [181] Kung PP, Huang B, Zehnder L, et al. SAH derived potent and selective EZH2 inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2015, 25: 1532-1537.
- [182] Feng Q, Wang H, Ng HH, et al. Methylation of H3-lysine 79 is mediated by a new family of HMTases without a SET domain [J]. *Curr Biol*, 2002, 12: 1052-1058.
- [183] Min J, Feng Q, Li Z, et al. Structure of the catalytic domain of human DOT1L, a non-SET domain nucleosomal histone methyltransferase [J]. *Cell*, 2003, 112: 711-723.
- [184] Frederiks F, Tzouros M, Oudgenoeg G, et al. Nonprocessive methylation by Dot1 leads to functional redundancy of histone H3K79 methylation states [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2008, 15: 550-557.
- [185] Nguyen AT, He J, Taranova O, et al. Essential role of DOT1L in maintaining normal adult hematopoiesis [J]. *Cell Res*, 2011, 21: 1370-1373.
- [186] Nguyen AT, Zhang Y. The diverse functions of Dot1 and H3K79 methylation [J]. *Genes Dev*, 2011, 25: 1345-1358.
- [187] Nguyen AT, Xiao B, Nepl RL, et al. DOT1L regulates dystrophin expression and is critical for cardiac function [J]. *Genes Dev*, 2011, 25: 263-274.
- [188] Nguyen AT, Taranova O, He J, et al. DOT1L, the H3K79 methyltransferase, is required for MLL-AF9-mediated leukemogenesis [J]. *Blood*, 2011, 117: 6912-6922.
- [189] Mueller D, Bach C, Zeisig D, et al. A role for the MLL fusion partner ENL in transcriptional elongation and chromatin modification [J]. *Blood*, 2007, 110: 4445-4454.
- [190] Bitoun E, Oliver PL, Davies KE. The mixed-lineage leukemia fusion partner AF4 stimulates RNA polymerase II transcriptional elongation and mediates coordinated chromatin remodeling [J]. *Hum Mol Genet*, 2007, 16: 92-106.
- [191] Yokoyama A, Lin M, Naresh A, et al. A higher-order complex containing AF4 and ENL family proteins with P-TEFb facilitates oncogenic and physiologic MLL-dependent transcription [J]. *Cancer Cell*, 2010, 17: 198-212.
- [192] Biswas D, Milne TA, Basrur V, et al. Function of leukemogenic mixed lineage leukemia 1 (MLL) fusion proteins through distinct partner protein complexes [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108: 15751-15756.
- [193] Yao Y, Chen P, Diao J, et al. Selective inhibitors of histone methyltransferase DOT1L: design, synthesis, and crystallographic studies [J]. *J Am Chem Soc*, 2011, 133: 16746-16749.
- [194] Yu W, Smil D, Li F, et al. Bromo-deaza-SAH: a potent and selective DOT1L inhibitor [J]. *Bioorg Med Chem*, 2013, 21: 1787-1794.
- [195] Spurr SS, Bayle ED, Yu W, et al. New small molecule inhibitors of histone methyl transferase DOT1L with a nitrile as a non-traditional replacement for heavy halogen atoms [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2016, 26: 4518-4522.
- [196] Anglin JL, Deng L, Yao Y, et al. Synthesis and structure-activity relationship investigation of adenosine-containing inhibitors of histone methyltransferase DOT1L [J]. *J Med Chem*, 2012, 55: 8066-8074.
- [197] Basavapathruni A, Jin L, Daigle SR, et al. Conformational adaptation drives potent, selective and durable inhibition of the human protein methyltransferase DOT1L [J]. *Chem Biol Drug Des*, 2012, 80: 971-980.
- [198] Deng L, Zhang L, Yao Y, et al. Synthesis, activity and metabolic stability of non-ribose containing inhibitors of histone methyltransferase DOT1L [J]. *MedChemComm*, 2013, 4: 822-826.
- [199] Daigle SR, Olhava EJ, Therkelsen CA, et al. Selective killing of mixed lineage leukemia cells by a potent small-molecule DOT1L inhibitor [J]. *Cancer Cell*, 2011, 20: 53-65.
- [200] Yu W, Chory EJ, Wernimont AK, et al. Catalytic site remodelling of the DOT1L methyltransferase by selective inhibitors [J]. *Nat Commun*, 2012, 3: 1288.
- [201] Yi JS, Federation AJ, Qi J, et al. Structure-guided DOT1L probe optimization by label-free ligand displacement [J]. *ACS Chem Biol*, 2015, 10: 667-674.
- [202] Daigle SR, Olhava EJ, Therkelsen CA, et al. Potent inhibition of DOT1L as treatment of MLL-fusion leukemia [J]. *Blood*, 2013, 122: 1017-1025.
- [203] National Cancer Institute (NCI). A phase 1b/2 study of pinometostat in combination with standard induction chemotherapy in newly diagnosed acute myeloid leukemia with MLL rearrangement [DB/OL]. 2023 [2024-02-04]. <https://www.clinicaltrials.gov/study/NCT03724084>.

- [204] National Cancer Institute (NCI). A phase Ib/II study of the histone methyltransferase inhibitor pinometostat in combination with azacitidine in patients with 11q23-rearranged acute myeloid leukemia [DB/OL]. 2023 [2024-02-04]. <https://www.clinicaltrials.gov/study/NCT03701295>.
- [205] Liu T, Xie W, Li C, et al. Preparation of 5'-deoxy-5'-amino-5'-C-methyl adenosine derivatives and their activity against DOT1L [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2017, 27: 4960-4963.
- [206] Shen J, Li J, Chen Y, et al. 2'-C-Methyl-substituted nucleoside compound and preparing method and application thereof: CN, 109748943 [P]. 2019-05-14.
- [207] Li J, Li A. Purine compound containing bicyclic group, and preparation method thereof: CN, 110092804 [P]. 2019-08-06.
- [208] Li J, Li A. Pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidine compound containing spiro group and preparation method thereof: CN, 109928998 [P]. 2019-06-25.
- [209] Patel TC, Caulfield TR. Inhibitors of DOT1L: WO, 2022271540 [P]. 2022-12-29.
- [210] Zhai X, Lei H, Tan Z, et al. Purine derivative and preparation method and application thereof: CN, 113024620 [P]. 2021-06-25.
- [211] Barbieri I, Kouzarides T. Role of RNA modifications in cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2020, 20: 303-322.
- [212] Boriack-Sjodin PA, Ribich S, Copeland RA. RNA-Modifying proteins as anticancer drug targets [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2018, 17: 435-453.
- [213] Dégut C, Ponchon L, Folly-Klan M, et al. The m<sup>1</sup>A<sub>58</sub> modification in eubacterial tRNA: an overview of tRNA recognition and mechanism of catalysis by TrmI [J]. *Biophys Chem*, 2016, 210: 27-34.
- [214] Tomikawa C. 7-Methylguanosine modifications in transfer RNA (tRNA) [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19: 4080.
- [215] Bohnsack KE, Höbartner C, Bohnsack MT. Eukaryotic 5-methylcytosine (m<sup>5</sup>C) RNA methyltransferases: mechanisms, cellular functions, and links to disease [J]. *Genes*, 2019, 10: 102.
- [216] Wang X, Feng J, Xue Y, et al. Structural basis of N<sup>6</sup>-adenosine methylation by the METTL3-METTL14 complex [J]. *Nature*, 2016, 534: 575-578.
- [217] Sabnis RW. Novel METTL3 modulators for treating acute myeloid leukemia (AML) [J]. *ACS Med Chem Lett*, 2021, 12: 1061-1062.
- [218] Xu P, Ge R. Roles and drug development of METTL3 (methyltransferase-like 3) in anti-tumor therapy [J]. *Eur J Med Chem*, 2022, 230: 114118.
- [219] Barbieri I, Tzelepis K, Pandolfini L, et al. Promoter-bound METTL3 maintains myeloid leukaemia by m<sup>6</sup>A-dependent translation control [J]. *Nature*, 2017, 552: 126-131.
- [220] Vu LP, Pickering BF, Cheng Y, et al. The N<sup>6</sup>-methyladenosine (m<sup>6</sup>A)-forming enzyme METTL3 controls myeloid differentiation of normal hematopoietic and leukemia cells [J]. *Nat Med*, 2017, 23: 1369-1376.
- [221] Ramalingam H, Kashyap S, Cobo-Stark P, et al. A methionine-Mettl3-N<sup>6</sup>-methyladenosine axis promotes polycystic kidney disease [J]. *Cell Metab*, 2021, 33: 1234-1247.e7.
- [222] Bedi RK, Huang D, Eberle SA, et al. Small-molecule inhibitors of METTL3, the major human epitranscriptomic writer [J]. *ChemMedChem*, 2020, 15: 744-748.
- [223] Wang JN, Wang F, Ke J, et al. Inhibition of METTL3 attenuates renal injury and inflammation by alleviating TAB3 m<sup>6</sup>A modifications via IGF2BP2-dependent mechanisms [J]. *Sci Transl Med*, 2022, 14: eabk2709.
- [224] Tasker AS, Daniels MH, Duncan KW, et al. METTL3 modulators: WO, 2021079196 [P]. 2021-04-29.
- [225] Daniels MH, Wynn TA, Sparling BA, et al. METTL3 modulators: WO, 2022081739 [P]. 2022-04-21.
- [226] Hardick DJ, Blackaby WP, Thomas EJ, et al. Compounds inhibitors of METTL3: WO, 2022074391 [P]. 2022-04-14.
- [227] Lyko F. The DNA methyltransferase family: a versatile toolkit for epigenetic regulation [J]. *Nat Rev Genet*, 2018, 19: 81-92.
- [228] Goll MG, Kirpekar F, Maggert KA, et al. Methylation of tRNA<sup>asp</sup> by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2 [J]. *Science*, 2006, 311: 395-398.
- [229] Schaefer M, Pollex T, Hanna K, et al. RNA methylation by Dnmt2 protects transfer RNAs against stress-induced cleavage [J]. *Genes Dev*, 2010, 24: 1590-1595.
- [230] Tuorto F, Liebers R, Musch T, et al. RNA cytosine methylation by Dnmt2 and NSun2 promotes tRNA stability and protein synthesis [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2012, 19: 900-905.
- [231] Towns WL, Begley TJ. Transfer RNA methyltransferases and their corresponding modifications in budding yeast and humans: activities, predications, and potential roles in human health [J]. *DNA Cell Biol*, 2012, 31: 434-454.
- [232] Schwickert M, Fischer TR, Zimmermann RA, et al. Discovery of inhibitors of DNA methyltransferase 2, an epitranscriptomic modulator and potential target for cancer treatment [J]. *J Med Chem*, 2022, 65: 9750-9788.
- [233] Schwickert M, Zimmermann RA, Habeck T, et al. Covalent S-adenosylhomocysteine-based DNA methyltransferase 2 inhibitors with a new type of aryl warhead [J]. *ACS Med Chem Lett*, 2023, 14: 777-787.
- [234] Armstrong S, Qi J. DOT1L degraders and uses thereof: WO, 2020146561 [P]. 2020-07-16.
- [235] Qi J, Armstrong S, Park PM. DOT1L degrader and uses thereof: WO, 2020006157 [P]. 2020-01-02.
- [236] Qi J, Sigua LH. Small molecules for DOT1L degradation and uses thereof: WO, 2023069348 [P]. 2023-04-27.
- [237] Xie Y, Yin W, Zhang Y, et al. Design and development of an oral remdesivir derivative VV116 against SARS-CoV-2 [J]. *Cell Res*, 2021, 31: 1212-1214.