

## 组蛋白去乙酰化酶抑制剂的合成及其体外抗肿瘤研究

陈善龙<sup>1</sup>, 谭娟<sup>2\*</sup>

1. 海南省人民医院 药学部, 海南 海口 570311

2. 武汉市第三医院 药学部, 湖北 武汉 430060

**摘要:** **目的** 设计并合成组蛋白去乙酰化酶抑制剂(HDACi), 并对其组蛋白去乙酰化酶(HDACs)抑制活性和体外抗肿瘤活性进行研究。**方法** 以 *N*-Boc-对苯二胺和辛二酸酐为起始原料, 反应制得 7-(*N*-Boc-氨基)苯胺甲酰基庚酸, 再通过胺醛缩合反应合成 HDACi; 并采用 HDACs 试剂盒和 CCK-8 试剂盒测试所合成目标化合物抑制 HDACs 的活性和抗肿瘤活性。**结果** 合成了 26 个新化合物, 其结构均经过核磁共振氢谱和质谱进行了确证。初步的生物活性测试结果表明, 所合成的目标化合物对 HDACs 的抑制活性均强于阳性药物伏立诺他, 并对 MCF-7、PC-3、HepG2、MGC-803 和 KB 5 种肿瘤细胞有不同程度的抑制活性, 其中希夫碱含有吸电子基的化合物对 HDACs 的抑制活性以及抗肿瘤活性强于其他衍生物。尤其是 4-氰基化合物 **11c** 对 HDACs 展现出了最强的抑制活性, 是阳性药伏立诺他的 58 倍; 同时, 化合物 **11c** 对肿瘤细胞 MCF-7、PC3、MGC-803 和 HepG2 展现出了最强的抗肿瘤活性, 其抗胃癌 MGC-803 甚至是阳性药物伏立诺他的 7.2 倍。**结论** 希夫碱是一类重要的抗肿瘤药效团, 能够提高 HDACi 的抗肿瘤活性, 为今后发展新型、高效的 HDACi 提供了新的思路。

**关键词:** 组蛋白去乙酰化酶抑制剂; 希夫碱; 伏立诺他; 蛋白去乙酰化酶抑制活性; 抗肿瘤活性

中图分类号: R914.2; R966 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2017)06-0967-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2017.06.002

## Synthesis of histone deacetylases inhibitors and their antitumor activities *in vitro*

CHEN Shan-long<sup>1</sup>, TAN Juan<sup>2</sup>

1. Department of Pharmacy, Hainan General Hospital, Haikou 570311, China

2. Department of Pharmacy, Wuhan Third Hospital, Wuhan 430060, China

**Abstract: Objective** To design and synthesize hydroxamic acid histone deacetylase inhibitors(HDACi), and to investigate their HDAC inhibitory activities and anti-tumor activities *in vitro*. **Methods** *N*-(4-aminophenyl)-1,1-dimethylethyl ester and caprylic anhydride were used as starting materials to synthesize 8-((4-((tert-butoxycarbonyl)amino)phenyl)amino)-8-oxooctanoic acid. Then a series of HDACi were designed and synthesized by aldimine condensation. HDAC inhibitory activities of target compounds were evaluated by HDACs reagent kit, and their anti-tumor activities also were evaluated by CCK-8 assay. **Results** Twenty-six novel HDACi were synthesized and the structures were confirmed by <sup>1</sup>H-NMR and MS spectra. The preliminary biological results showed that these target compounds displayed potent against HDACs and significant anti-tumor activities on MCF-7, PC-3, HepG2, MGC-803, and KB cancer cells. And the inhibitors, which bore electron withdrawing group in schiff base unit, had more potent anti-HDACs and anti-tumor than other derivatives. Specifically, 4-cyano compound **11c** exhibited most potent anti-HDACs, which was 58-fold more potent than vorinostat. Moreover, compound **11c** showed the greatest potency against MCF-7, PC3, MGC-803, and HepG2, and which showed 7.2-fold more potent than vorinostat, against MGC-803. **Conclusion** Schiff base unit is a kind of important anti-tumor pharmacophore, which can enhance the anti-tumor activity of HDACi, and offer new mentality to develop novel and high-efficiency HDACi in the future.

**Key words:** HDACi; HDACs; schiff base; vorinostat; HDAC inhibitory activities; antitumor activity

组蛋白乙酰化转移酶(HATs)和组蛋白去乙酰化酶(HDACs)通过对组蛋白 *N*-端赖氨酸的  $\epsilon$ -氨基

乙酰化和去乙酰化来调节组蛋白的乙酰化水平, 从而调控染色质的结构和基因转录<sup>[1]</sup>。在正常生理的

收稿日期: 2017-01-18

作者简介: 陈善龙(1975—), 男, 主要从事新药开发、新制剂开发和评价工作。

\*通信作者 谭娟(1980—), 女, 主要从事新药开发、临床药理学和药理学研究工作。Tel: (027)65399485 E-mail: 0521114@163.com

情况下, HATs 和 HDACs 处于动态平衡状态, 而当细胞中 HDACs 过量表达后将使原有基因在转录过程中的乙酰化平衡状态被打破, 使得基因转录调控异常, 进而使细胞恶变, 导致肿瘤的发生<sup>[2]</sup>。在多种肿瘤细胞中均能检测到高浓度的 HDACs<sup>[3-4]</sup>。组蛋白去乙酰化酶抑制剂 (HDACi) 能够抑制肿瘤细胞内 HDACs 活性, 使肿瘤细胞内组蛋白的乙酰化程度增加, 重新活化受抑制的抑癌基因, 并诱导肿瘤细胞分化、促进细胞凋亡<sup>[5]</sup>。因此, HDACi 也成为国内外抗肿瘤药物研究领域的一个热点。事实上, 自 2006 年第 1 个 HDAC 抑制剂伏立诺他被 FDA 批准上市后<sup>[6]</sup>, 已经有数百种 HDACi 被报道<sup>[7-9]</sup>, 其中数十种 HDACi 进入了临床试验。从结构上看这些 HDACi 可以分为表面识别区 (CAP)、连接区 (Linker) 和锌离子结合区 (ZBG) 3 部分, 见图 1。当 HDACi 伏立诺他与 HDACs 作用后, 其表面识别区位于 HDACs 催化口袋的入口处, 然而由于该区域的空间比较大, 而 HDACi 表面识别区仅占据了小部分面积<sup>[10]</sup>, 因此将 HDACi 表面识别区拼接另

一抗肿瘤活性基团能够增强 HDACi 与 HDACs 的相互作用, 提高其抗癌活性。

本文拟通过胺醛缩合反应将具有良好抗肿瘤活性的希夫碱拼接到 HDACi 构建成一个单一的分子, 以期得到抗肿瘤活性更强的新型、高效 HDAC 抑制剂。同时, 为了进一步研究这类含有希夫碱单元的 HDACi 的构效关系, 合成了具有不同取代基的衍生物 4~15, 并对 HDACs 的抑制活性和体外抗肿瘤活性进行研究, 为今后发展新型、高效的 HDACi 提供了新的思路。目标化合物的合成路线见图 2。

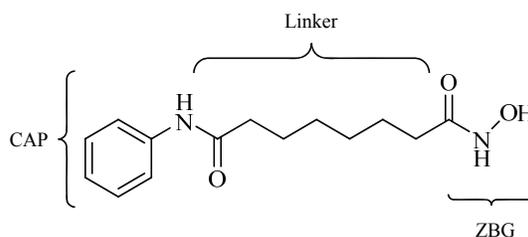


图 1 伏立诺他的化学结构

Fig. 1 Chemical structure of vorinostat

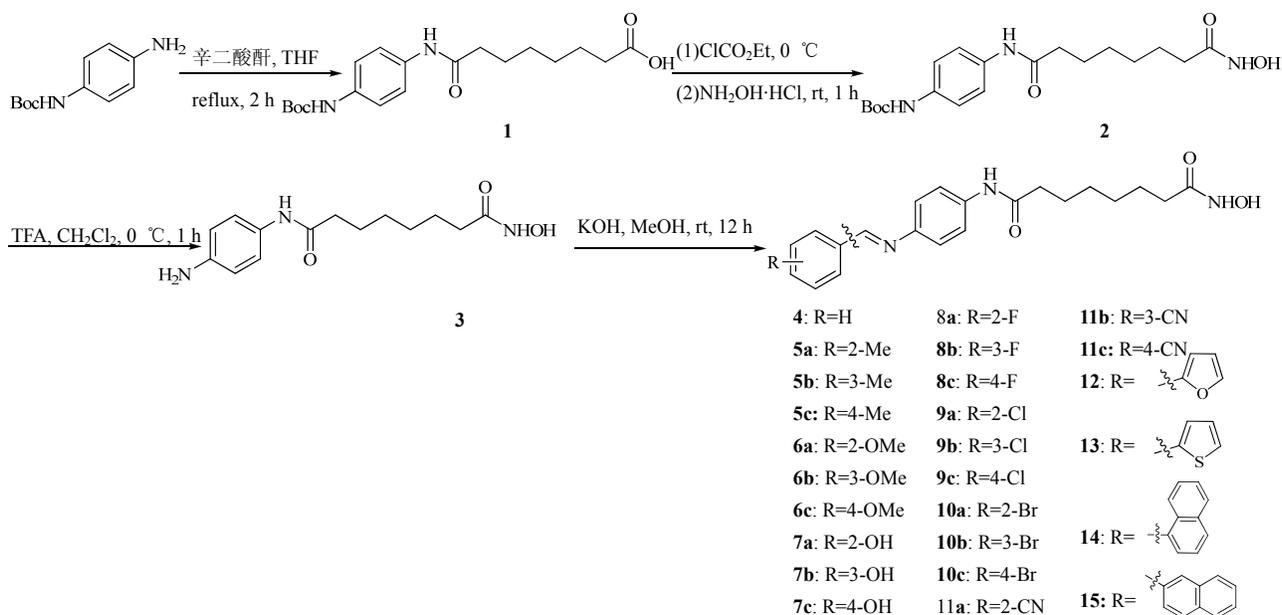


图 2 目标化合物的合成路线

Fig. 2 Synthetic route of target compounds

## 1 仪器与试剂

### 1.1 仪器

Bruker AM-400 Hz 型核磁共振仪; 傅里叶红外光谱仪 (美国 Neaspec 公司); DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器 (河南巩义市予华仪器有限责任公

司); FA1104N 型电子天平 (上海民桥精密科学仪器有限公司); XR4 显微熔点测定仪 (上海光学仪器厂); BB16/BB5060 仪器 CO<sub>2</sub> 培养箱 (上海力创科学仪器有限公司); CKX31 型倒置显微镜 (日本奥林巴斯公司); ELx800 通用酶标仪 (美国 BioTek

公司)。

## 1.2 试剂

*N*-Boc-对苯二胺(质量分数≥99%,北京伊诺凯科技有限公司,产品批号AK-57046);辛二酸酐(质量分数≥95%,北京伊诺凯科技有限公司,产品批号A13963);芳醛(质量分数≥95%,阿拉丁);伏立诺他(质量分数≥98%,百灵威科技有限公司,产品批号SML0061);氢氧化钾(质量分数≥95%,阿拉丁,产品批号P112285);HDACs试剂盒(BPS Bioscience公司);CCK-8试剂盒(上海博谷生物科技有限公司);DMEM、MEM培养基、胎牛血清(Hyclone公司);二甲基亚砒等其他试剂均为分析纯;MCF-7、PC-3、HepG2、MGC-803和KB细胞株购自上海细胞典藏中心,本实验室冻存使用。

## 2 方法与结果

### 2.1 合成部分

**2.1.1** 7-(4-*N*-Boc-氨基)苯胺甲酰基庚酸(1)的合成 氩气保护下,将辛二酸酐(1.608 g, 10.3 mmol)溶于无水四氢呋喃中(35 mL),加入*N*-Boc-对苯二胺(2.124 g, 9.8 mmol)后,在室温下反应2 h,减压蒸馏除去有机溶剂得到粗产物,二氯甲烷-甲醇(50:1~30:1)洗脱,硅胶柱色谱分离得到白色固体,产率89.5%,mp 116~118 °C。<sup>1</sup>H-NMR(400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 12.21 (s, COOH, 1H), 9.52 (s, 1H), 7.43 (d, *J*=8.0 Hz, 2H), 7.11 (d, *J*=8.0 Hz, 2H), 2.39~2.24 (m, 4H), 1.58~1.47 (m, 13H), 1.37~1.32 (m, 4H)。

**2.1.2** *N*-羟基-*N'*-(4-Boc-氨基)苯基辛二酰胺(2)的合成 氩气保护下,0 °C下将化合物1(437 mg, 1.2 mmol)溶解到THF(20 mL)中,冰浴下加入氯甲酸乙酯(195 mg, 1.8 mmol)和KOH(101 mg, 1.8 mmol),继续搅拌10 min后,向反应液中加入8 mL新制备的羟胺溶液,缓慢升至室温后继续反应3 h,减压蒸馏除去溶剂得到粗产物,二氯甲烷-甲醇(30:1~9:1)洗脱,硅胶柱色谱分离得到白色固体。产率74.6%,mp 147~150 °C。<sup>1</sup>H-NMR(400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 9.36 (s, 1H), 7.41 (d, *J*=8.4 Hz, 2H), 7.15 (d, *J*=8.0 Hz, 2H), 2.33 (t, *J*=6.4 Hz, 2H), 2.25 (t, *J*=6.4 Hz, 2H), 1.59~1.46 (m, 13H), 1.36~1.31 (m, 4H)。

羟胺溶液的制备:将盐酸羟胺(847 mg, 12.2 mmol)和KOH(684 mg, 12.2 mmol)加入到甲醇(10 mL)中,升温至40 °C反应20 min后,析出大

量的沉淀,将反应液冷却至室温,滤除沉淀,所得滤液即为新制备的羟胺溶液。

**2.1.3** *N*-羟基-*N'*-(4-氨基)苯基辛二酰胺(3)的合成 将化合物2(370 mg, 1.4 mmol)溶于CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>中(20 mL),0 °C下加入5 mL TFA,继续反应1 h后,用饱和NaHCO<sub>3</sub>水溶液(25 mL)洗涤,无水硫酸钠干燥,减压脱溶剂得到粗产物,二氯甲烷-甲醇(60:1)洗脱,硅胶柱色谱分离得到白色固体,产率90.5%,mp 166~168 °C。<sup>1</sup>H-NMR(400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 12.4 (s, COOH, 1H), 9.32 (s, NH, 1H), 7.45 (d, *J*=8.0 Hz, 2H), 6.98 (d, *J*=8.4 Hz, 2H), 5.06 (s, 2H), 2.39~2.32 (m, 2H), 2.24 (t, *J*=6.8 Hz, 2H), 1.67 (t, *J*=6.4 Hz, 2H), 1.60 (t, *J*=6.8 Hz, 2H), 1.37~1.32 (m, 4H)。

**2.1.4** *N*-羟基-*N'*-亚氨基苯基辛二酰胺(4~15)的合成 氩气保护下,将芳醛(1.1 mmol)和化合物3(291 mg, 1.1 mmol)溶于无水MeOH中(25 mL),加入KOH(123 mg, 2.2 mmol)后,在室温下反应24 h,用2 mol/L稀盐酸调节反应pH值至6,析出沉淀,滤过,滤饼真空干燥即得到目标化合物,其氢谱数据见表1,理化和质谱数据见表2。

### 2.2 HDACs抑制活性

使用HDACs试剂盒测试目标化合物对HDACs的抑制活性,以伏立诺他为阳性对照药。按照试剂盒操作说明书在测试板中每孔加入牛血清白蛋白、HDAC荧光底物、HDACs酶和不同浓度的待测物。将测试板在37 °C下反应30 min后,每孔再加入HDAC Developer,并继续在37 °C下放置15 min,使用酶标仪在359 nm和440 nm波长测定每孔的荧光值,然后对各药物浓度数值对各浓度下的荧光值作线性回归得剂量-效应方程,依此计算出各化合物的IC<sub>50</sub>值,见表3。

$$Y = F_b + (F_t - F_b) / (1 + 10^{(lgIC_{50} - X) \times \text{HillSlope}})$$

其中,*Y*为荧光值,*F<sub>t</sub>*和*F<sub>b</sub>*分别为最大和最小荧光值,*X*为lg[化合物浓度]。

### 2.3 抗肿瘤活性

选取乳腺癌MCF-7、前列腺癌PC-3、肝癌HepG2、胃癌MGC-803和口腔表皮样癌KB细胞为测试细胞株,正常人胃黏膜上皮细胞株GES-1为对照细胞株。以伏立诺他为阳性对照药,采用CCK-8试剂盒对目标化合物进行抗肿瘤活性评价。取对数生长期的测试细胞株悬浮于含10%胎牛血清的培养基中,铺至96孔培养板中。待细胞完全贴壁后,弃

表1 目标化合物的氢谱数据  
Table 1  $^1\text{H-NMR}$  data of target compounds

化合物	$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ ) $\delta$
4	9.31 (s, 1H), 8.52 (s, 1H), 7.62 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 7.34 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 7.27~7.22 (m, 1H), 7.20 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 7.18 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 2.35 (t, $J=7.2$ Hz, 2H), 2.29 (t, $J=7.2$ Hz, 2H), 1.67 (t, $J=6.8$ Hz, 2H), 1.59 (t, $J=7.2$ Hz, 2H), 1.37~1.32 (m, 4H)
5a	9.37 (s, 1H), 8.51 (s, 1H), 7.68 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 7.25 (t, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.23 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 7.12~7.03 (m, 2H), 6.71~6.64 (m, 1H), 2.34 (t, $J=6.8$ Hz, 2H), 2.27 (t, $J=6.8$ Hz, 2H), 2.19 (s, 3H), 1.69 (t, $J=6.4$ Hz, 2H), 1.61 (t, $J=7.2$ Hz, 2H), 1.39~1.35 (m, 4H)
5b	9.32 (s, 1H), 8.54 (s, 1H), 7.62 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 7.24 (t, $J=8.4$ Hz, 1H), 7.21 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 7.07 (t, $J=8.0$ Hz, 1H), 6.99 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 6.72~6.65 (m, 1H), 2.33 (t, $J=6.8$ Hz, 2H), 2.28~2.21 (m, 2H), 2.17 (s, 3H), 1.67 (t, $J=6.8$ Hz, 2H), 1.57 (t, $J=6.8$ Hz, 2H), 1.36~1.29 (m, 4H)
5c	9.34 (s, 1H), 8.51 (s, 1H), 7.59 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 7.25 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 7.18 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 6.94 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 2.31 (t, $J=6.4$ Hz, 2H), 2.27 (t, $J=6.4$ Hz, 2H), 2.16 (s, 3H), 1.61 (t, $J=6.8$ Hz, 2H), 1.58~1.52 (m, 2H), 1.37~1.31 (m, 4H)
6a	8.53 (s, 1H), 7.71 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 7.25 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 7.20 (t, $J=8.4$ Hz, 1H), 7.01~6.92 (m, 2H), 6.67~6.58 (m, 1H), 3.78 (s, 3H), 2.31 (t, $J=6.4$ Hz, 2H), 2.28 (t, $J=6.4$ Hz, 2H), 1.62 (t, $J=6.4$ Hz, 2H), 1.57 (t, $J=6.8$ Hz, 2H), 1.37~1.31 (m, 4H)
6b	9.37 (s, 1H), 8.52 (s, 1H), 7.68 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 7.27 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 7.22 (t, $J=8.0$ Hz, 1H), 6.77 (t, $J=8.0$ Hz, 1H), 6.69 (s, 1H), 6.67~6.62 (m, 1H), 3.81 (s, 3H), 2.32 (t, $J=6.4$ Hz, 2H), 2.26 (t, $J=6.8$ Hz, 2H), 1.61 (t, $J=7.2$ Hz, 2H), 1.59 (t, $J=6.4$ Hz, 2H), 1.37~1.29 (m, 4H)
6c	8.54 (s, 1H), 7.63 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 7.28 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 7.12 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 6.85 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 3.78 (s, 3H), 2.33 (t, $J=6.8$ Hz, 2H), 2.29 (t, $J=7.2$ Hz, 2H), 1.63 (t, $J=6.4$ Hz, 2H), 1.57 (t, $J=6.8$ Hz, 2H), 1.39~1.33 (m, 4H)
7a	8.51 (s, 1H), 7.74 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 7.25 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 7.21 (t, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.01 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 6.91 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 6.64 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 2.32 (t, $J=6.8$ Hz, 2H), 2.26 (t, $J=6.8$ Hz, 2H), 1.63 (t, $J=7.2$ Hz, 2H), 1.58 (t, $J=6.4$ Hz, 2H), 1.39~1.32 (m, 4H)
7b	9.28 (s, 1H), 8.54 (s, 1H), 7.72 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 7.23 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 7.18 (t, $J=8.4$ Hz, 1H), 7.15~7.06 (m, 2H), 6.65 (t, $J=8.0$ Hz, 1H), 2.31 (t, $J=7.2$ Hz, 2H), 2.23 (t, $J=6.4$ Hz, 2H), 1.62 (t, $J=7.2$ Hz, 2H), 1.57 (t, $J=6.8$ Hz, 2H), 1.38~1.31 (m, 4H)
7c	8.52 (s, 1H), 7.67 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 7.24 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 7.17 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 6.89 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 2.32 (t, $J=7.2$ Hz, 2H), 2.24 (t, $J=6.8$ Hz, 2H), 1.61 (t, $J=6.8$ Hz, 2H), 1.58 (t, $J=6.4$ Hz, 2H), 1.37~1.31 (m, 4H)
8a	9.28 (s, 1H), 8.55 (s, 1H), 7.69 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 7.23 (t, $J=8.4$ Hz, 1H), 7.17 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 7.11~6.92 (m, 2H), 6.86~6.79 (m, 1H), 2.31 (t, $J=6.8$ Hz, 2H), 2.24 (t, $J=6.4$ Hz, 2H), 1.67 (t, $J=6.8$ Hz, 2H), 1.59 (t, $J=6.8$ Hz, 2H), 1.35~1.28 (m, 4H)
8b	9.34 (s, 1H), 8.52 (s, 1H), 7.70 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 7.29 (t, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.19 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 7.11 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.02 (t, $J=8.4$ Hz, 1H), 6.93 (t, $J=8.0$ Hz, 1H), 2.34 (t, $J=6.8$ Hz, 2H), 2.21 (t, $J=6.4$ Hz, 2H), 1.65 (t, $J=7.2$ Hz, 2H), 1.58 (t, $J=6.4$ Hz, 2H), 1.37~1.31 (m, 4H)
8c	9.27 (s, 1H), 8.54 (s, 1H), 7.74 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 7.25 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 7.20 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 7.06 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 2.34 (t, $J=7.2$ Hz, 2H), 2.23 (t, $J=6.8$ Hz, 2H), 1.64 (t, $J=6.4$ Hz, 2H), 1.57 (t, $J=6.8$ Hz, 2H), 1.39~1.32 (m, 4H)

续表 1

化合物	$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ ) $\delta$
9a	8.53 (s, 1H), 7.68 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 7.32 (t, $J=8.4$ Hz, 1H), 7.18 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 7.09~6.88 (m, 2H), 6.83~6.75 (m, 1H), 2.33 (t, $J=6.4$ Hz, 2H), 2.24 (t, $J=6.8$ Hz, 2H), 1.67~1.61 (m, 2H), 1.59~1.52 (m, 2H), 1.36~1.28 (m, 4H)
9b	8.51 (s, 1H), 7.65 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 7.27~7.19 (m, 1H), 7.17 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 7.08 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.01 (t, $J=8.4$ Hz, 1H), 6.89 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 2.35 (t, $J=6.4$ Hz, 2H), 2.24 (t, $J=6.4$ Hz, 2H), 1.67 (t, $J=7.2$ Hz, 2H), 1.55 (t, $J=6.4$ Hz, 2H), 1.38~1.32 (m, 4H)
9c	8.55 (s, 1H), 7.72 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 7.30 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 7.23 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 7.12 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 2.35 (t, $J=6.8$ Hz, 2H), 2.23 (t, $J=6.4$ Hz, 2H), 1.66 (t, $J=6.8$ Hz, 2H), 1.57~1.49 (m, 2H), 1.37~1.27 (m, 4H)
10a	8.54 (s, 1H), 7.68 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 7.41 (t, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.35~7.29 (m, 1H), 7.26 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 7.21~7.11 (m, 2H), 2.34 (t, $J=6.4$ Hz, 2H), 2.23 (t, $J=7.2$ Hz, 2H), 1.68~1.59 (m, 2H), 1.57 (t, $J=6.4$ Hz, 2H), 1.37~1.30 (m, 4H)
10b	9.37 (s, 1H), 8.56 (s, 1H), 7.74 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 7.43 (t, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.28 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 7.25~7.16 (m, 2H), 7.04~6.97 (m, 1H), 2.33 (t, $J=7.2$ Hz, 2H), 2.22 (t, $J=6.8$ Hz, 2H), 1.66 (t, $J=7.2$ Hz, 2H), 1.59 (t, $J=7.4$ Hz, 2H), 1.37~1.31 (m, 4H)
10c	8.51 (s, 1H), 7.69 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 7.47 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 7.22 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 7.10 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 2.34 (t, $J=6.8$ Hz, 2H), 2.21 (t, $J=6.8$ Hz, 2H), 1.67 (t, $J=6.4$ Hz, 2H), 1.59 (t, $J=6.8$ Hz, 2H), 1.38~1.28 (m, 4H)
11a	8.54 (s, 1H), 7.68 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 7.57 (d, $J=8.0$ Hz, 3H), 7.27 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 6.91 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 2.34 (t, $J=6.8$ Hz, 2H), 2.23 (t, $J=6.4$ Hz, 2H), 1.68 (t, $J=7.6$ Hz, 2H), 1.57 (t, $J=6.4$ Hz, 2H), 1.37~1.28 (m, 4H)
11b	9.42 (s, 1H), 8.51 (s, 1H), 7.71 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 7.54 (t, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.42~7.31 (m, 2H), 7.26 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 6.96 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 2.35 (t, $J=6.8$ Hz, 2H), 2.24 (t, $J=6.8$ Hz, 2H), 1.67 (t, $J=7.2$ Hz, 2H), 1.59 (t, $J=6.4$ Hz, 2H), 1.37~1.30 (m, 4H)
11c	8.53 (s, 1H), 7.63 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 7.50 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 7.34 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 7.25 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 2.34~2.29 (m, 2H), 2.22 (t, $J=6.8$ Hz, 2H), 1.67 (t, $J=6.4$ Hz, 2H), 1.57 (t, $J=6.4$ Hz, 2H), 1.35~1.27 (m, 4H)
12	9.28 (s, 1H), 8.54 (s, 1H), 7.63 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 7.61 (t, $J=2.0$ Hz, 1H), 7.57 (d, $J=3.6$ Hz, 2H), 7.51 (d, $J=2.0$ Hz, 1H), 7.19 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 2.31 (t, $J=6.4$ Hz, 2H), 2.23 (t, $J=6.8$ Hz, 2H), 1.66 (t, $J=7.2$ Hz, 2H), 1.55 (t, $J=6.8$ Hz, 2H), 1.35~1.24 (m, 4H)
13	9.25 (s, 1H), 8.55 (s, 1H), 7.67 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 7.39 (d, $J=5.6$ Hz, 1H), 7.33~7.25 (m, 2H), 7.17 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 7.05 (d, $J=3.6$ Hz, 1H), 2.32 (t, $J=6.8$ Hz, 2H), 2.21 (t, $J=6.4$ Hz, 2H), 1.67 (t, $J=7.6$ Hz, 2H), 1.59 (t, $J=6.8$ Hz, 2H), 1.37~1.31 (m, 4H)
14	8.52 (s, 1H), 7.92 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.80 (d, $J=7.6$ Hz, 1H), 7.73 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 7.63 (d, $J=8.8$ Hz, 1H), 7.56~7.50 (m, 3H), 7.47 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.26 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 2.34 (t, $J=6.8$ Hz, 2H), 2.21 (t, $J=6.8$ Hz, 2H), 1.68 (t, $J=7.6$ Hz, 2H), 1.57 (t, $J=6.8$ Hz, 2H), 1.37~1.26 (m, 4H)
15	9.41 (s, 1H), 8.51 (s, 1H), 7.80~7.73 (m, 3H), 7.75 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 7.70 (s, 1H), 7.51~7.46 (m, 2H), 7.35 (d, $J=8.8$ Hz, 1H), 7.22 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 2.32 (t, $J=6.4$ Hz, 2H), 2.20 (t, $J=6.4$ Hz, 2H), 1.65 (t, $J=7.2$ Hz, 2H), 1.57~7.46 (m, 2H), 1.37~1.26 (m, 4H)

表 2 目标化合物的理化和质谱数据

Table 2 Physical contents and MS of target compounds

化合物	R	产率/%	mp/°C	性状	IR(C=N, C=O)/cm <sup>-1</sup>	ESI m/z
4	H	80.4	172~175	淡黄色固体	1 675、1 661、1 643	367.1
5a	2-Me	76.9	186~188	淡黄色固体	1 679、1 674、1 641	381.4
5b	3-Me	78.2	174~176	淡黄色固体	1 682、1 667、1 645	381.4
5c	4-Me	79.5	179~181	淡黄色固体	1 679、1 673、1 636	381.4
6a	2-OMe	74.4	184~187	淡黄色固体	1 673、1 665、1 638	397.4
6b	3-OMe	73.7	175~178	淡黄色固体	1 672、1 669、1 625	397.4
6c	4-OMe	76.8	180~183	淡黄色固体	1 684、1 675、1 628	397.4
7a	2-OH	68.5	165~167	淡黄色固体	1 677、1 668、1 639	383.4
7b	3-OH	71.9	169~172	淡黄色固体	1 672、1 665、1 640	383.4
7c	4-OH	69.6	176~179	淡黄色固体	1 684、1 679、1 632	383.4
8a	2-F	75.3	192~194	黄色固体	1 675、1 666、1 639	385.2
8b	3-F	69.1	197~199	黄色固体	1 681、1 669、1 631	385.2
8c	4-F	71.2	185~187	黄色固体	1 676、1 662、1 635	385.2
9a	2-Cl	68.4	201~204	淡黄色固体	1 682、1 670、1 642	401.9
9b	3-Cl	70.7	215~217	淡黄色固体	1 673、1 667、1 641	401.9
9c	4-Cl	69.5	194~196	淡黄色固体	1 686、1 671、1 637	401.9
10a	2-Br	74.3	209~211	淡黄色固体	1 675、1 664、1 629	446.3
10b	3-Br	70.8	217~220	淡黄色固体	1 673、1 669、1 625	446.3
10c	4-Br	72.4	203~205	淡黄色固体	1 683、1 668、1 637	446.3
11a	2-CN	71.3	214~216	淡黄色固体	1 678、1 672、1 633	392.5
11b	3-CN	69.7	209~202	淡黄色固体	1 683、1 669、1 627	392.5
11c	4-CN	71.5	191~194	淡黄色固体	1 674、1 672、1 626	392.5
12	2-呋喃基	82.6	176~178	黄色固体	1 671、1 669、1 620	357.4
13	2-噻吩基	81.1	195~198	黄色固体	1 680、1 667、1 621	373.5
14	1-萘基	72.4	216~218	淡黄色固体	1 681、1 679、1 629	417.5
15	2-萘基	69.8	225~227	淡黄色固体	1 684、1 675、1 627	417.5

表 3 体外 HDACs 抑制活性 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )Table 3 *In vitro* inhibition of HDACs ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

化合物	IC <sub>50</sub> /(μmol·L <sup>-1</sup> )	化合物	IC <sub>50</sub> /(μmol·L <sup>-1</sup> )
4	0.157±0.041	9b	0.055±0.007
5a	0.399±0.022	9c	0.033±0.004
5b	0.384±0.026	10a	0.045±0.012
5c	0.239±0.018	10b	0.076±0.018
6a	0.531±0.039	10c	0.029±0.006
6b	0.469±0.045	11a	0.024±0.005
6c	0.287±0.014	11b	0.022±0.005
7a	0.075±0.008	11c	0.019±0.008
7b	0.062±0.011	12	0.038±0.011
7c	0.054±0.017	13	0.034±0.009
8a	0.039±0.009	14	0.763±0.084
8b	0.031±0.003	15	0.595±0.037
8c	0.019±0.002	伏立诺他	1.120±0.260
9a	0.047±0.015		

去原培养液, 加入 10 μL 的含有测试药物的培养液培养 48 h, 弃去原培养液, 每孔加入 10 μL CCK-8 溶液, 在培养箱中继续孵育 4 h, 用酶标仪在 490 nm 波长测定每孔的吸光度 ( $A$ ) 值, 按公式计算各组对癌细胞的抑制率。然后以各药物浓度对数值对各浓度下的抑制率作线性回归得剂量 - 效应方程, 依此计算出各化合物的 IC<sub>50</sub> 值, 见表 4。

$$\text{抑制率} = (A_{\text{对照}} - A_{\text{实验}}) / A_{\text{对照}}$$

### 3 讨论

#### 3.1 合成部分

羧酸化合物 **1** 是通过 *N*-Boc-对苯二胺与辛二酸酐反应制得, 而直接将二者混合反应并不会进行。此外, 辛二酸酐在与 *N*-Boc-对苯二胺反应时, 既可生成单酰胺类化合物, 又能生成双酰胺类副产物, 在合成单酰胺类化合物 **1** 时只得到了中等的产率, 但仍然是以单酰胺类产物为主。同时, 为了减少副

表 4 目标化合物的抗肿瘤活性 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
 Table 4 Anti-tumor activity of target compounds ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

化合物	IC <sub>50</sub> /( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )				
	MCF-7 细胞	PC-3 细胞	HepG2 细胞	MGC-803 细胞	KB 细胞
4	3.94±0.25	1.72±0.36	5.78±0.64	1.41±0.16	3.18±0.48
5a	4.85±0.46	2.87±0.32	7.26±0.82	2.12±0.32	5.62±0.61
5b	4.17±0.52	2.03±0.15	6.41±0.66	1.85±0.21	4.97±0.57
5c	3.68±0.29	1.84±0.27	4.55±0.52	1.63±0.27	4.25±0.52
6a	4.52±0.37	2.58±0.34	4.92±0.57	1.98±0.32	5.53±0.64
6b	3.26±0.24	1.77±0.28	6.94±0.63	1.46±0.21	4.76±0.49
6c	3.18±0.33	1.45±0.19	5.58±0.59	1.17±0.16	3.51±0.43
7a	2.84±0.18	1.68±0.15	4.39±0.55	1.32±0.14	4.48±0.56
7b	2.32±0.25	1.42±0.22	8.76±0.96	0.95±0.06	3.09±0.41
7c	2.57±0.21	1.27±0.24	6.52±0.74	0.74±0.17	1.96±0.28
8a	2.69±0.19	1.34±0.12	5.47±0.62	0.99±0.12	2.54±0.34
8b	2.45±0.42	1.17±0.13	5.31±0.64	0.85±0.09	2.23±0.36
8c	1.93±0.14	0.93±0.08	3.67±0.45	0.46±0.07	1.87±0.23
9a	3.26±0.37	1.44±0.26	3.28±0.41	1.63±0.24	3.64±0.47
9b	2.67±0.28	1.09±0.15	3.07±0.48	1.29±0.22	2.97±0.38
9c	2.21±0.29	0.86±0.09	3.69±0.39	0.94±0.16	2.15±0.31
10a	1.58±0.13	1.79±0.35	4.11±0.51	1.35±0.27	4.52±0.54
10b	1.12±0.11	1.51±0.14	3.57±0.47	1.02±0.24	5.49±0.68
10c	1.08±0.17	1.08±0.21	3.26±0.43	0.87±0.05	4.17±0.57
11a	2.46±0.22	1.48±0.13	2.91±0.35	0.95±0.13	1.78±0.22
11b	1.83±0.21	1.13±0.16	4.65±0.66	0.57±0.08	1.55±0.36
11c	1.25±0.09	0.82±0.10	4.21±0.59	0.34±0.04	1.19±0.28
12	2.77±0.35	1.35±0.37	10.04±1.72	1.16±0.26	2.93±0.35
13	1.69±0.19	1.67±0.28	8.52±1.15	1.45±0.31	2.04±0.21
14	5.94±0.53	2.48±0.41	12.73±1.85	1.93±0.29	3.56±0.44
15	4.52±0.38	1.95±0.38	11.45±1.47	2.37±0.37	4.82±0.57
伏立诺他	4.18±0.54	1.84±0.22	6.67±0.58	2.48±0.39	3.72±0.49

产物的形成,在合成氨基类化合物 **3** 时,采用氨基保护的原料进行反应,再通过脱去氨基的保护基团即可得到化合物 **3**,这样提高了中间体 **3** 的产率。目标产物是由胺醛缩合反应制得,其亚胺键对水和空气敏感,容易被水解和氧化。因此,在反应时应该使得反应液在无水无氧环境进行,以提高产率。

### 3.2 HDACs 抑制活性

所合成的 26 个目标化合物对 HDACs 均有较强的抑制活性,并强于先导化合物伏立诺他。这是由于在 HDACs 的口袋中,目标化合物的表面识别区较伏立诺他表面识别区苯环在活性口袋的入口处占

据了更多的空间,增强了伏立诺他与 HDACs 的相互作用,因此目标化合物较伏立诺他展现出了更强的 HDACs 抑制活性。但是,目标化合物的表面识别区苯环上取代基类型和位置对酶的抑制活性均有较大影响。

在伏立诺他苯环上引入苯亚胺(化合物 **4**)后 HDACs 的抑制活性提高了 7 倍,进一步在化合物 **4** 苯亚胺上引入给电子基 Me、OMe、OH(化合物 **5**、**6**、**7**)后反而降低了酶抑制活性,而引入吸电子基卤素 F、Cl、Br(化合物 **8**、**9**、**10**)和氰基(化合物 **11**)后显著地提高了酶抑制活性,其中氰基化合

物 **11** 对 HDACs 展现出了最强的抑制活性, 是阳性药物的 46 倍以上; 然而, 给电子基和吸电子基在苯亚胺上均以对位取代活性较佳。进一步将苯亚胺用杂环亚胺 (化合物 **12**、**13**) 或用体积更大的萘亚胺取代 (化合物 **14**、**15**) 后也保留了较强的 HDACs 抑制活性, 但仍然低于氰基化合物 **11**。

### 3.3 抗肿瘤活性

体外抗肿瘤的测试结果表明, 目标化合物对 MCF-7、PC-3、HepG2、MGC-803 和 KB 细胞 5 种肿瘤细胞均有较强的抑制作用, 其  $IC_{50}$  值均小于  $13.0 \mu\text{mol/L}$ , 特别是对胃癌 MGC-803 细胞展现出了更强的抑制活性, 大部分化合物对 MGC-803 的抑制活性强于阳性药物伏立诺他。在酶抑制活性中, 目标化合物表面识别区含有吸电子基取代的化合物强于给电子基化合物, 氰基类化合物 **11** 强于杂环亚胺类化合物 **12**、**13** 和萘亚胺类化合物 **14**、**15**; 同样的, 目标化合物在抗肿瘤活性中也有着类似的趋势, 其中吸电子基 4-氰基化合物 **12c** 对 MCF-7、PC3、MGC-803 和 HepG2 展现出了最强的抗肿瘤活性, 其抗胃癌 MGC-803 甚至是阳性药物伏立诺他的 7.2 倍。希夫碱引入到 HDACi 上能够提高母体药物伏立诺他的抗肿瘤活性, 这为今后发展新型、高效的 HDACi 提供了新的思路。

#### 参考文献

- [1] Armeanu S, Pathil A, Venturelli S, *et al.* Apoptosis on hepatoma cells but not on primary hepatocytes by histone deacetylase inhibitors valproate and ITF2357 [J]. *J Hepatol*, 2005, 42(2): 210-217.
- [2] Smith B C, Denu J M. Chemical mechanisms of histone lysine and arginine modifications [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1789(1): 45-57.
- [3] Roche J, Bertrand P. Inside HDACs with more selective HDAC inhibitors [J]. *Eur J Med Chem*, 2016, 121: 451-483.
- [4] 姚毅武, 姚和权, 蒋 晟, 等. 组蛋白去乙酰化酶抑制剂抗肿瘤临床研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2013, 22(3): 294-299.
- [5] Lai M J, Huang H L, Pan S L, *et al.* Synthesis and biological evaluation of 1-arylsulfonyl-5-(*N*-hydroxyacrylamide) indoles as potent histone deacetylase inhibitors with antitumor activity *in vivo* [J]. *J Med Chem*, 2012, 55(8): 3777-3791.
- [6] Marks P A. Discovery and development of SAHA as an anticancer agent [J]. *Oncogene*, 2007, 26(9): 1351-1356.
- [7] Ko K S, Steffey M E, Brandvold K R, *et al.* Development of a chimeric c-Src kinase and HDAC inhibitor [J]. *ACS Med Chem Lett*, 2013, 4(8): 779-783.
- [8] Luckhurst C A, Breccia P, Stott A J, *et al.* Potent, selective, and CNS-penetrant tetrasubstituted cyclopropane class IIa histone deacetylase (HDAC) inhibitors [J]. *ACS Med Chem Lett*, 2015, 7(1): 34-39.
- [9] Giannini G, Vesci L, Battistuzzi G, *et al.* ST7612AA1, a thioacetate- $\omega$ ( $\gamma$ -lactam carboxamide) derivative selected from a novel generation of oral HDAC inhibitors [J]. *J Med Chem*, 2014, 57(20): 8358-8377.
- [10] 谭玉梅, 黄文渊, 余聂芳. 组蛋白去乙酰化酶抑制剂研究进展 [J]. 药学学报, 2009, 44(10): 1072-1108.