

以二酮酸酯作为锌离子结合基团的组蛋白去乙酰化酶抑制剂的 设计、合成及生物活性研究

陆 慧¹, 苏 红¹, 杨 波², 尤启冬^{1*}

(1. 中国药科大学药学院药物化学教研室, 江苏 南京 210009; 2. 浙江大学药学院药理学系, 浙江 杭州 310058)

摘要: 组蛋白去乙酰化酶 (histone deacetylases, HDACs) 抑制剂可以在转录水平上调控基因表达, 导致肿瘤细胞生长停滞, 诱导肿瘤细胞分化和凋亡。目前应用最为广泛的羟肟酸结构可以与活性口袋底部锌离子螯合从而竞争性地抑制 HDACs 的去乙酰化作用, 但是羟肟酸结构存在代谢不稳定和选择性差的缺点难以成药。本文以二酮酸酯结构作为潜在的锌离子结合基团对羟肟酸进行替代, 共合成了 8 个目标化合物, 并对其 HDACs 抑制活性和对多种肿瘤细胞株的抗增殖活性进行了研究。其中化合物 CPUYS707 对人髓系白血病细胞株 U937 的抗增殖活性 GI_{50} 达到 $0.31 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 优于阳性对照药物 SAHA 和 MS-275。

关键词: 组蛋白去乙酰化酶抑制剂; 锌离子结合基团; 二酮酸酯

中图分类号: R916 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870 (2011) 03-0293-06

Design, synthesis, and biological activities of histone deacetylase inhibitors with diketo ester as zinc binding group

LU Hui¹, SU Hong¹, YANG Bo², YOU Qi-dong^{1*}

(1. Department of Medicinal Chemistry, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China;

2. Department of Pharmacology, School of Pharmaceutical Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract: Histone deacetylases (HDACs) inhibition causes hyperacetylation of histones leading to growth arrest, differentiation and apoptosis of tumor cells, representing a new strategy in cancer therapy. Many of previously reported HDACs inhibitors are hydroxamic acid derivatives, which could chelate the zinc ion in the active site in a bidentate fashion. However, hydroxamic acids occasionally have produced problems such as poor pharmacokinetics, severe toxicity and low selectivity. Herein we describe the identification of a new series of non-hydroxamate HDACs inhibitors bearing diketo ester moieties as zinc binding group. HDACs inhibition assay and antiproliferation assays *in vitro* against multiple cancer cell lines were used for evaluation. These compounds displayed low antiproliferative activity against solid tumor cells, while good antiproliferative activity against human leukemic monocyte lymphoma cell line U937. Compound CPUYS707 is the best with GI_{50} value of $0.31 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ against U937 cells, which is more potent than SAHA and MS-275. HDACs inhibition activity of these compounds is lower than that expected, further evaluation is needed.

Key words: histone deacetylase inhibitors; zinc-binding group; diketo ester

收稿日期: 2010-08-31.

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项 (2008ZX09401-001, 2009ZX09501-003); 江苏省自然科学基金资助项目 (BK2007171).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-25-83271351, E-mail: youqidong@gmail.com

基因有序的转录调控是细胞维持正常功能的前提, 如果基因转录调控功能紊乱, 细胞可能发生癌变。核心组蛋白的乙酰化水平与基因转录调控密切相关, 它通过组蛋白去乙酰化酶 (histone deacetylases, HDACs) 和组蛋白乙酰转移酶 (histone acetyltransferases, HAT) 的动力学平衡进行调节。HDACs 催化组蛋白 N-端赖氨酸残基去乙酰化, 使组蛋白带正电荷, 与带负电荷的 DNA 紧密结合, 染色体结构聚集, 转录因子不能接近目标 DNA, 转录抑制^[1]。HAT 和 HDACs 动力学平衡的打破会对部分基因的转录产生影响, 成为产生某种癌症或抑制某些癌症的直接诱因, 越来越多的证据证明组蛋白乙酰化的失衡与癌症发生之间存在着密切的联系^[2-5]。

HDACs 的去乙酰化作用依赖于活性口袋底部的锌离子, HDACs 抑制剂通过与锌离子螯合竞争性的对 HDACs 的催化活性进行抑制, 从而抑制肿瘤细胞生长, 诱导肿瘤细胞分化和凋亡^[6, 7]。HDACs 抑制剂已成为抗肿瘤药物研究的热点。

HDACs 抑制剂的设计、合成已有较多的报道^[8, 9], 其中研究最为广泛的为氧肟酸类化合物, 这类化合物利用氧肟酸的羰基和羟基氧原子与 HDACs 活性口袋底部的锌离子发生二齿螯合^[10], 代表化合物有 Trichostatin A、伏林司他 (Vorinostat, SAHA) 等 (图 1), 伏林司他已于 2006 年被 FDA 批准上市治疗皮肤 T 细胞淋巴瘤 (CTCL)。尽管氧肟酸作为锌离子结合基团被广泛应用, 但它自身存在一些药代动力学的问题, 例如容易糖苷化、硫酸盐化和水解等, 导致此类化合物的体内半衰期较短^[11, 12], 同时由于其与金属离子结合能力强, 导致此类化合物对体内金属酶缺乏选择性, 产生某些副作用。

1999 年, Suzuki 等^[13, 14]提出邻苯甲酰胺基苯胺类化合物作为新型 HDACs 抑制剂, 其中恩替司他 (Entinostat, MS-275, 图 1) 对 HDACs 的抑制活性为 $4.8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 对多种肿瘤细胞, 如乳腺癌、结肠癌、白血病、肺癌、卵巢癌和胰腺癌等, 具有抗增殖活性, 同时对实体瘤和淋巴瘤具有显著的口服抗癌活性。

鉴于氧肟酸结构的局限性, 作者期望找到一种温和的锌离子结合基团来代替氧肟酸, 合成具有全新结构的 HDACs 抑制剂。

二酮酸结构 (图 2) 作为功能基团在抗 HIV 整合酶抑制剂中被广泛应用, 它通过两个酮羰基氧原子与 HIV 整合酶活性位点的镁离子螯合发挥作用^[15, 16]。由于锌离子和镁离子均为二价金属离子, 推测二酮

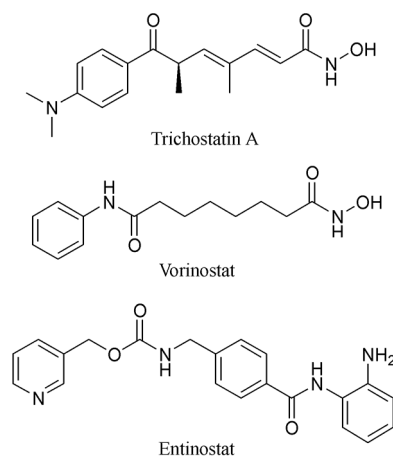


Figure 1 Typical structures of HDAC inhibitors

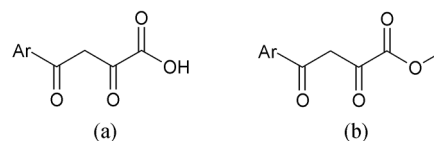


Figure 2 (a) Diketo acid, functional moiety of HIV integrase inhibitors; (b) Diketo ester, potential zinc binding group

酸酯结构对锌离子也应具有一定的螯合能力。本课题组前期工作发现了新型氧肟酸类 HDACs 抑制剂 (图 3), 其对 HDACs 的抑制活性 IC_{50} 为 $0.041\sim 4.328 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[17], 在此类化合物的骨架结构基础上采取药效团叠合的方法设计了一系列新型的 HDACs 抑制剂 (图 4), 将二酮酸酯取代氧肟酸作为锌离子结合基团, 利用叔胺 N 原子引出两个疏水片段作为 HDACs 蛋白表面结合基团, 其中一个疏水片段固定为疏水芳环联苯, 对另一疏水片段 R 进行变换, 一方面考察不同体积和电负性的 R 基团以寻找活性较好的化合物, 另一方面对二酮酸酯作为锌离子结合基团的可能性进行探索。

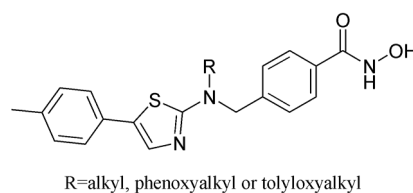


Figure 3 Novel N-hydroxybenzamide-based HDAC inhibitors with IC_{50} under $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

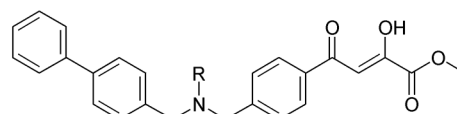
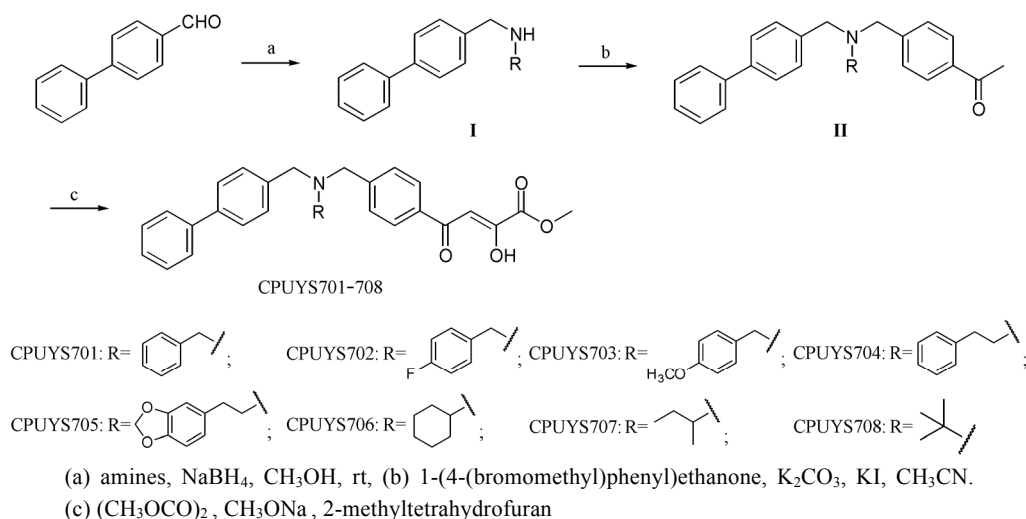


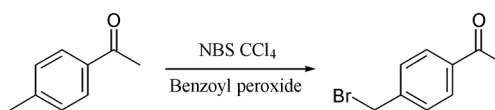
Figure 4 Structure of HDAC inhibitors with diketo ester

二酮酸酯类化合物的合成是以联苯甲醛为起始原料, 与不同的伯胺进行还原氨化反应得到仲胺中间体 (I), 然后与对溴甲基苯乙酮在碱性条件下反应, 所得的叔胺中间体 (II) 在强碱催化下与草酸二甲酯发生克莱森缩合反应即可得到目标产物 (合成路线 1)。此系列化合物均以烯醇异构体的形式存在, 在 ^1H NMR 中, 化学位移 7.00 左右出现烯醇的烯氢单峰, 而不存在 1, 3-二酮的 CH_2 峰, 目标产物



Scheme 1 General synthetic route of target compounds

CPUYS701~CPUYS708 的图谱数据见表 1、2。烯醇式被认为是二酮酸类化合物与 HIV 整合酶作用时的活性构象^[18]。中间体对溴甲基苯乙酮由对甲基苯乙酮与 NBS 在 CCl_4 中发生溴代反应制备 (合成路线 2)。



Scheme 2 Synthetic route of *p*-bromoacetophenones

Table 1 Spectral data of CPUYS701–CPUYS708

| Compd. | IR (KBr)/ cm^{-1} | MS (m/z) | ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) (J in Hz) |
|----------|---|--|---|
| CPUYS701 | 3 063, 3 027, 2 945, 2 919, 2 800, 2 709, 2 354, 1 749, 1 607, 1 487 | 492 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 490 $[\text{M}-\text{H}]^-$ | 3.57 (s, 4H, 2 CH_2), 3.64 (s, 2H, CH_2), 3.86 (s, 3H, OCH_3), 7.12 (s, 1H, vinyl-H), 7.32–7.50 (m, 10H, Ar-H), 7.62–7.67 (m, 6H, Ar-H), 8.07 (d, 2H, $J = 8.4$, Ar-H), 11.97 (s, 1H, vinyl-OH) |
| CPUYS702 | 3 050, 3 028, 2 953, 2 923, 2 813, 2 713, 1 358, 1 749, 1 507 | 510 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 508 $[\text{M}-\text{H}]^-$ | 3.49 (s, 2H, CH_2), 3.52 (s, 2H, CH_2), 3.57 (s, 2H, CH_2), 3.82 (s, 3H, OCH_3), 6.94 (d, 2H, $J = 8.4$, Ar-H), 6.98 (s, 1H, vinyl-H), 7.19–7.38 (m, 7H, Ar-H), 7.50–7.62 (m, 6H, Ar-H), 7.90 (d, 2H, $J = 8.4$, Ar-H), 15.25 (s, 1H, vinyl-OH) |
| CPUYS703 | 3 050, 3 029, 2 953, 2 927, 2 801, 2 585, 2 353, 2 332, 1 733, 1 608 | 522 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 544 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 520 $[\text{M}-\text{H}]^-$ | 3.09 (s, 2H, CH_2), 3.54 (s, 2H, CH_2), 3.58 (s, 2H, CH_2), 3.72 (s, 3H, OCH_3), 3.87 (s, 3H, OCH_3), 6.81 (d, 2H, $J = 8.4$, Ar-H), 7.00 (s, 1H, vinyl-H), 7.18 (s, 1H, Ar-H), 7.25 (d, 2H, $J = 7.8$, Ar-H), 7.33–7.39 (m, 4H, Ar-H), 7.47–7.51 (m, 6H, Ar-H), 7.89 (d, 2H, $J = 8.1$, Ar-H), 15.2 (s, 1H, vinyl-OH) |
| CPUYS704 | 3 085, 3 054, 3 019, 2 945, 2 918, 2 809, 2 350, 1 749, 1 606, 1 487 | 506 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 504 $[\text{M}-\text{H}]^-$ | 2.76 (m, 2H, CH_2), 2.87 (m, 2H, CH_2), 3.65 (s, 4H, 2 CH_2), 3.88 (s, 3H, OCH_3), 7.00 (s, 1H, vinyl-H), 7.02 (d, 2H, $J = 9.3$, Ar-H), 7.17 (m, 2H, Ar-H), 7.30–7.37 (m, 7H, Ar-H), 7.45–7.53 (m, 5H, Ar-H), 7.76 (d, 2H, Ar-H), 15.3 (s, 1H, vinyl-OH) |
| CPUYS705 | 3 200, 2 932, 1 609, 1 488 | 550 $[\text{M}+\text{H}]^+$ | 2.72 (m, 4H, CH_2CH_2), 3.78 (s, 4H, 2 CH_2), 3.94 (s, 3H, OCH_3), 5.90 (s, 2H, OCH_2O), 6.58 (d, 2H, $J = 8.1$, Ar-H), 6.69 (s, 1H, vinyl-H), 6.70 (d, 2H, $J = 7.5$, Ar-H), 7.25 (s, 1H, Ar-H), 7.26–7.46 (m, 6H, Ar-H), 7.52–7.77 (m, 3H, Ar-H), 8.01 (d, 2H, $J = 7.5$, Ar-H) |
| CPUYS706 | 3 063, 3 027, 2 945, 2 919, 2 800, 2 709, 2 354, 1 749, 1 607, 1 487 | 484 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 482 $[\text{M}-\text{H}]^-$ | 1.14 (m, 2H, CH_2), 1.41 (m, 2H, CH_2), 1.65 (m, 2H, CH_2), 1.82 (m, 2H, CH_2), 1.96 (m, 2H, CH_2), 2.52 (m, 1H, CH), 3.60 (s, 2H, CH_2), 3.63 (s, 2H, CH_2), 4.00 (s, 3H, OCH_3), 6.98 (s, 1H, vinyl-H), 7.17–7.50 (m, 11H, Ar-H), 7.84 (s, 2H, Ar-H) |
| CPUYS707 | 3 033, 2 954, 2 919, 2 796, 2 357, 1 735, 1 647, 1 487 | 456 $[\text{M}-\text{H}]^-$ | 0.79 (s, 3H, CH_3), 0.81 (s, 3H, CH_3), 1.79 (m, 1H, CH), 2.10 (d, 2H, CH_2), 3.48 (s, 4H, 2 CH_2), 3.82 (s, 3H, OCH_3), 6.98 (s, 1H, vinyl-H), 7.20–7.50 (m, 13H, Ar-H), 7.86 (d, 2H, $J = 7.5$, Ar-H) |
| CPUYS708 | 3 457, 3 116, 3 028, 2 949, 2 914, 2 683, 2 560, 2 350, 1 740, 1 610, 1 487 | 458 $[\text{M}+\text{H}]^+$ | 1.65 (s, 9H, 3 CH_3), 3.78 (s, 2H, CH_2), 3.79 (s, 2H, CH_2), 3.92 (s, 3H, OCH_3), 7.00 (s, 1H, vinyl-H), 7.28 (d, 2H, $J = 8.4$, Ar-H), 7.36–7.48 (m, 7H, Ar-H), 7.53 (d, 2H, $J = 6.9$, Ar-H), 7.85 (d, 2H, $J = 8.1$, Ar-H), 9.32 (s, 1H, vinyl-OH) |

Table 2 Elemental analysis data of CPUYS701-CPUYS708

| Compd. | Chemical Formula | Elemental analysis/% | | |
|----------|---|----------------------|----------------|----------------|
| | | Calcd. (Found) | | |
| | | C | H | N |
| CPUYS701 | C ₃₂ H ₂₉ NO ₄ | 78.19 (78.26) | 5.95 (6.40) | 2.85 (2.92) |
| CPUYS702 | C ₃₂ H ₂₈ FNO ₄ ·1/5H ₂ O | 74.77 (74.82) | 5.58 (5.94) | 2.72 (2.75) |
| CPUYS703 | C ₃₃ H ₃₁ NO ₅ | 75.99 (75.81) | 5.99 (6.48) | 2.69 (2.71) |
| CPUYS704 | C ₃₃ H ₃₁ NO ₄ | 78.39 (78.27) | 6.18 (6.67) | 2.77 (2.67) |
| CPUYS705 | C ₃₄ H ₃₁ NO ₆ | 74.30 (74.13) | 5.69 (5.47) | 2.55 (2.51) |
| CPUYS706 | C ₃₁ H ₃₃ NO ₄ ·5/4H ₂ O | 73.57 (73.88) | 7.07 (6.57) | 2.77 (2.62) |
| CPUYS707 | C ₂₉ H ₃₁ NO ₄ ·1/2H ₂ O | 76.12 (74.46) | 6.83 (7.33) | 3.06 (3.01) |
| CPUYS708 | C ₂₉ H ₃₁ NO ₄ ·2H ₂ O | 76.12 (70.65) | 6.83 (7.3) | 3.06 (2.78) |

结果与讨论

1 体外抗增殖活性评价

CPUYS701~CPUYS708 对人类实体瘤细胞株 PC3、HCT-116、A549、HEPG2 以及人髓系白血病细胞株 U937 的抗增殖活性见表 3。此系列化合物对人实体瘤细胞株的抑制活性普遍较弱, 只有 CPUYS704 和 CPUYS708 对 PC3 (人前列腺癌细胞株) 表现出一定的增殖抑制作用, IC₅₀ 分别为 32.10 和 37.20 μmol·L⁻¹。相比之下, 此系列化合物对人髓系白血病细胞株 U937 的抗增殖活性较好, 化合物 CPUYS701、CPUYS702、CPUYS706 和 CPUYS708 的 IC₅₀ 达到 μmol·L⁻¹ 级, 与 MS-275 活性相当, 化合物 CPUYS707 的 IC₅₀ 为 0.31 μmol·L⁻¹, 与 SAHA 活性相当并且优于 MS-275 的抗增殖活性。

本系列化合物对人髓系白血病细胞株 U937 的抗增殖活性显示: CPUYS701 中 R 基团为无取代的苯基, 其对 U937 的抗增殖活性为 5.15 μmol·L⁻¹; 在苯基苯环对位引入氟取代 (CPUYS702) 化合物活性略有提高, 可能是由于 F 原子的引入增加脂溶性有利于细胞活性提高; 在苯基苯环对位引入供电子的甲氧基取代 (CPUYS703) 活性显著下降; 当苯基与中心 N 原子的距离多出一个亚甲基 (CPUYS704, CPUYS 705) 活性显著下降; 将苯基改变为脂肪环或脂肪链时对活性影响不大, 其中, 环己基的引入可使活性略有提高, 仲丁基的引入可使活性明显提高, 叔丁基的引入可能是立体位阻过大而造成活性降低。综上所述, 可以认为 R 基团主要通过疏水作用与 HDACs 的蛋白表

面结合, 其立体因素对活性影响较大, 适当的立体体积可增加其与 HDACs 疏水蛋白表面的结合面积, 使活性提高, 但立体体积过大将会导致活性显著下降。

相比多种实体瘤细胞株, 本系列化合物对人髓系白血病细胞株表现出显著的选择性。总体来说, 目前研究的 HDACs 抑制剂对血液系统恶性肿瘤普遍表现出良好的活性, 但对实体瘤的抑制作用并不确定。HDACs 抑制剂通过影响基因转录发挥抗肿瘤作用, 实体瘤细胞增殖水平低于血液系统恶性肿瘤, 可能是导致 HDACs 抑制剂活性差异的主要原因之一, 但其具体的作用机制差异目前仍不明确^[19, 20]。

Table 3 Antiproliferation activity of CPUYS701-CPUYS708 against various cancer cells. ^aNot determined

| Compd. | GI ₅₀ /μmol·L ⁻¹ | | | | |
|----------|--|---------|---------|---------|-------|
| | PC3 | HCT116 | A549 | HEPG2 | U937 |
| CPUYS701 | 59.88 | >101.83 | 69.86 | >101.83 | 5.15 |
| CPUYS702 | >98.23 | >98.23 | >98.23 | >98.23 | 2.16 |
| CPUYS703 | >95.97 | >95.97 | >95.70 | >95.97 | 47.85 |
| CPUYS704 | 32.10 | >99.01 | 83.07 | >99.01 | 20.02 |
| CPUYS705 | >91.07 | >91.07 | >91.08 | >91.07 | 13.48 |
| CPUYS706 | >103.52 | >103.52 | >103.52 | >103.52 | 3.69 |
| CPUYS707 | 82.19 | >109.41 | 93.28 | >109.41 | 0.31 |
| CPUYS708 | 37.20 | 110.20 | 85.95 | >109.41 | 6.39 |
| MS-275 | ND ^a | ND | ND | ND | 1.09 |
| SAHA | >166.67 | 0.57 | 8.30 | 12.20 | 0.35 |

2 HDACs 抑制活性评价

CPUYS701~CPUYS707 对 HDACs 的抑制活性见表 4, 此类化合物的活性低于 SAHA 一个数量级以上, 并且低于本课题组前期合成的同骨架氧脲酸类化合物, 二酮酸酯与锌离子的螯合作用较弱可能是导致 HDACs 抑制活性降低的主要原因, 但考虑到此类化合物对 U937 细胞株表现出良好的抗增殖作用, 进一步的 HDACs 抑制活性测试还需继续。

Table 4 HDACs inhibitory activity of CPUYS701-CPUYS707

| Compd. | HDACs IC ₅₀ /μmol·L ⁻¹ |
|----------|---|
| CPUYS701 | >2.037 |
| CPUYS702 | >1.965 |
| CPUYS703 | >1.919 |
| CPUYS704 | >1.980 |
| CPUYS705 | >1.821 |
| CPUYS706 | >2.070 |
| CPUYS707 | >2.188 |
| SAHA | 0.053 |

小结

二酮酸结构可与二价金属螯合, 在抗 HIV 整合酶抑制剂中被广泛引用。本文采用药效团叠合的方法, 在前期合成的氧肟酸类化合物骨架基础上, 将二酮酸酯结构取代氧肟酸结构, 设计合成了 8 个未见文献报道的化合物, 结构经 ^1H NMR、MS、IR 和元素分析确证。此类化合物在体外抗增殖实验中, 相比实体瘤 (PC3、HCT-116、A549 和 HEPG2) 对人髓系白血病细胞株 U937 表现出明显的选择性, 其中化合物 CPUYS707 对 U937 的抑制活性与阳性对照药物 SAHA 相当, 并且优于阳性对照药物 MS-275, 化合物 CPUYS701、CPUYS702、CPUYS706 和 CPUYS708 对 U937 的抑制活性与 MS-275 相当。HDACs 的抑制活性结果显示此类化合物与 SAHA 和同骨架氧肟酸类化合物相比活性降低, 可能是二酮酸酯与锌离子的螯合作用较弱导致了酶抑制活性的下降, 二酮酸酯与锌离子的螯合作用还需要进一步的数据验证。

实验部分

熔点用 Thomas Hoover 熔点仪测定, 温度未校正; IR 谱用 Nicolet Impact 410 型傅立叶变换红外光谱仪测定, KBr 压片; ^1H NMR 谱用 Bruker Avance 300 型核磁共振仪测定, TMS 为内标; 质谱以岛津 GCMS-QP2010 型质谱仪 (EI) 或 Mariner 质谱仪 (ESI) 测定。试剂均为市售化学纯或分析纯产品, 除特别说明外, 不经处理直接使用。

1 化学合成 (以 CPUYS701 的合成例)

1.1 *N*-苄基-[1, 1'-联苯基]-4-甲胺 (I a) 将 4-联苯甲醛 (1.82 g, 0.01 mol) 和苄胺 (1.09 mL, 0.01 mol) 溶解在甲醇 (15 mL) 中, 回流 3 h 后冷却至室温, 分 3 批缓慢加入 NaBH_4 (0.38 g, 0.01 mol), 继续室温搅拌 30 min, 停止反应。蒸干溶剂, 加水 15 mL, 用 20 mL 乙酸乙酯萃取水层 2 次后, 向合并的有机层中加入 HCl 将产物制成盐酸盐, 抽滤, 滤饼用乙酸乙酯洗涤。将滤饼转移到烧杯中, 加入 $2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH 制成游离碱, 搅拌至固体溶解, 用 20 mL 乙酸乙酯萃取水层 2 次, 合并有机层, 饱和盐水洗涤后无水 Na_2SO_4 干燥。旋干溶剂得产物纯品 2.26 g, 收率 82.9%, 产物为油状物, MS (EI) m/z 273 $[\text{M}]^+$ 。

1.2 对溴甲基苯乙酮 将对甲基苯乙酮 (26 mL, 0.2 mol) 的 CCl_4 (150 mL) 溶液中加入 NBS (35.6 g, 0.2 mol) 和过氧化苯甲酸 (催化量), 加热回流 8 h 后冷却至室温, 过滤, 滤液旋干, 将残留物蒸馏, 收集馏

分得产品 21.9 g, 产率 51.3%, mp $36\sim 38\text{ }^\circ\text{C}$, [文献值 $38.5\sim 40\text{ }^\circ\text{C}^{[21]}$]。

1.3 4-[[苄基(联苯-4-甲基)氨基]甲基]苯乙酮 (II a) 将对溴甲基苯乙酮 (1.58 g, 7.4 mmol) 滴加入中间体 (Ia) (2.02 g, 7.4 mmol)、 K_2CO_3 (2.04 g, 14.8 mmol) 和 KI (催化量) 的乙腈溶液中, 反应液在 $35\text{ }^\circ\text{C}$ 搅拌 8 h 后冷却至室温。抽滤, 滤液浓缩, 柱色谱纯化得产物 2.0 g, 收率 66.7%, 产物为油状物; MS (EI) m/z 405 $[\text{M}]^+$ 。

1.4 4-(4-[[苄基(联苯-4-甲基)氨基]甲基]苯基)-2, 4-二羧基丁酸甲酯 (CPUYS701) 向草酸二甲酯 (0.35 g, 3 mmol) 的 2-甲基四氢呋喃 (5 mL) 溶液中加入新鲜制备的 $3 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{NaOCH}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 溶液 (1.0 mL, 3.3 mmol), 搅拌 5 min 后, 缓慢滴入中间体 (II a) 的 2-甲基四氢呋喃 (5 mL) 溶液, 室温搅拌 12 h。用 $3 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCl 将反应液 pH 调节至 7 后, 倾入 20 mL 水中, 用 20 mL 乙酸乙酯萃取 2 次后合并有机层, 饱和盐水溶液洗涤, 无水 Na_2SO_4 干燥, 粗品利用乙酸乙酯/石油醚体系进行硅胶柱色谱纯化, 得到目标产物 CPUYS701 0.43 g, 收率为 43.5%, 产品为油状物。

2 生物活性测定

2.1 体外抗增殖活性评价 共选用 5 种肿瘤细胞, 分别为 HCT116、A549、PC3、HEPG2 和 U937。将细胞接种于 96 孔的平板中 (每孔约有 4 000 个细胞), 24 h 后, 将不同浓度的化合物加入至细胞中, 48 h 后, 各小孔中分别加入 20 μL MTT 的 PBS 溶液 (浓度为 $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), 于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 4 h, 除去 MTT, 每个小孔中分别加入 100 μL DMSO (含量为 100%), 于 570 nm 下检测 (采用 Thermo Multiskan Spectrum)。

2.2 HDACs 抑制活性评价 首先用适量 DMSO 配制化合物的原液, 然后按梯度稀释化合物, 每个化合物有 5 个不同浓度用于检测。试验在 96 孔的白色聚苯乙烯微孔板上进行: 将含有 HDACs 的 HeLa 核提取物与 Fluor de lys 底物以及不同浓度的待检测化合物混合, 在 $25\text{ }^\circ\text{C}$ 孵化 20 min 后, 加入 Fluor de lys 显色剂, 使用荧光检测器于 $360\sim 460 \text{ nm}$ 检测微孔板内各个小孔的荧光强度, 各个浓度的化合物重复 3 遍。

References

- [1] Bolden JE, Peart MJ, Johnstone RW. Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors [J]. Nat Rev Drug Discov, 2006, 5: 769-784.
- [2] Minucci S, Pelicci PG. Histone deacetylase inhibitors and the

- promise of epigenetic (and more) treatments for cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6: 38–51.
- [3] Ma P, Schultz RM. Histone deacetylase 1 (HDAC1) regulates histone acetylation, development, and gene expression in preimplantation mouse embryos [J]. *Dev Biol*, 2008, 319: 110–120.
- [4] Verdin E, Dequiedt F, Kasler HG. Class II histone deacetylases: versatile regulators [J]. *Trends Genet*, 2003, 19: 286–293.
- [5] Witt O, Deubzer HE, Milde T, et al. HDAC family: What are the cancer relevant targets? [J]. *Cancer Lett*, 2009, 277: 8–21.
- [6] Xu WS, Parmigiani RB, Marks PA. Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action [J]. *Oncogene*, 2007, 26: 5541–5552.
- [7] Dubois F, Caby S, Oger F, et al. Histone deacetylase inhibitors induce apoptosis, histone hyperacetylation and up-regulation of gene transcription in *Schistosoma mansoni* [J]. *Mol Biochem Parasitol*, 2009, 168: 7–15.
- [8] Paris M, Porcelloni M, Binaschi M, et al. Histone deacetylase inhibitors: from bench to clinic [J]. *J Med Chem*, 2008, 51: 1505–1529.
- [9] Bertrand P. Inside HDAC with HDAC inhibitors [J]. *Eur J Med Chem*, 2010, 45: 2095–2116.
- [10] Finnin MS, Donigian JR, Cohen A, et al. Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors [J]. *Nature*, 1999, 401: 188–193.
- [11] Attenni B, Ontoria JM, Cruz JC, et al. Histone deacetylase inhibitors with a primary amide zinc binding group display antitumor activity in xenograft model [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2009, 19: 3081–3084.
- [12] Mulder GJ, Meerman JH. Sulfation and glucuronidation as competing pathways in the metabolism of hydroxamic acids: the role of N, O-sulfonation in chemical carcinogenesis of aromatic amines [J]. *Environ Health Perspect*, 1983, 49: 27–32.
- [13] Suzuki T, Ando T, Tsuchiya K, et al. Synthesis and histone deacetylase inhibitory activity of new benzamide derivatives [J]. *J Med Chem*, 1999, 42: 3001–3003.
- [14] Hess-Stumpp H, Bracker TU, Henderson D, et al. MS-275, a potent orally available inhibitor of histone deacetylases – the development of an anticancer agent [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007, 39: 1388–1405.
- [15] Grobler JA, Stillmock K, Hu B, et al. Diketo acid inhibitor mechanism and HIV-1 integrase: implications for metal binding in the active site of phosphotransferase enzymes [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99: 6661–6666.
- [16] Marchand C, Johnson AA, Karki RG, et al. Metal-dependent inhibition of HIV-1 integrase by beta-diketo acids and resistance of the soluble double-mutant (F185K/C280S) [J]. *Mol Pharmacol*, 2003, 64: 600–609.
- [17] Su H, Yu L, Nebbioso A, et al. Novel *N*-hydroxybenzamide-based HDAC inhibitors with branched CAP group [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2009, 19: 6284–6288.
- [18] Zeng LF, Jiang XH, Sanchez T, et al. Novel dimeric aryldiketo containing inhibitors of HIV-1 integrase: effects of the phenyl substituent and the linker orientation [J]. *Bioorg Med Chem*, 2008, 16: 7777–7787.
- [19] Graham JS, Kaye SB, Brown R. The promises and pitfalls of epigenetic therapies in solid tumours [J]. *Eur J Cancer*, 2009, 45: 1129–1136.
- [20] Mercurio C, Minucci S, Pelicci PG. Histone deacetylases and epigenetic therapies of hematological malignancies [J]. *Pharmacol Res*, 2010, 62: 18–34.
- [21] Podgorsek A, Stavber S, Zupan M, et al. Environmentally benign electrophilic and radical bromination ‘on water’: H₂O₂-HBr system versus *N*-bromosuccinimide [J]. *Tetrahedron*, 2009, 65: 4429–4439.