

新型组蛋白去乙酰化酶抑制剂的合成及抗肿瘤活性研究

程永浩¹, 郭彦伸¹, 韩海珠¹, 王楠¹, 张国宏², 郭宗儒¹, 吴松^{1*}

(1. 中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 北京 100050; 2. 北京医药集团, 北京 100021)

摘要: 为寻找新型组蛋白去乙酰化酶抑制剂, 设计合成了酰胺类、脲类和酰肼类全新结构类型的 12 个目标化合物, 并测定了体外 HDAC 酶抑制活性。目标化合物的结构经 ¹H MNR、元素分析及 MS 分析确证。体外 HDAC 酶抑制活性评价结果表明, 化合物 **Ia** 的抑酶活性较好, 值得进一步研究, 化合物 **Ia**、**Ib**、**IIa**~**IIIi** 具有一定的抑酶活性。

关键词: 组蛋白去乙酰化酶; 合成; 抗肿瘤活性

中图分类号: R916

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2010) 06-0735-07

Synthesis and activity of some new histone deacetylases inhibitors

CHENG Yong-hao¹, GUO Yan-shen¹, HAN Hai-zhu¹, WANG Nan¹, ZHANG Guo-hong²,
GUO Zong-ru¹, WU Song^{1*}

(1. Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050, China;

2. Beijing Pharmaceutical Group Co., Ltd., Beijing 100021, China)

Abstract: To explore novel histone deacetylase (HDAC) inhibitors with anti-tumor activity, twelve target compounds were synthesized, and their structures were confirmed by ¹H NMR, MS and elemental analyses. Evaluation results *in vitro* showed that compound **Ia** exhibited potent inhibition against HDAC and is worth for further investigation. And compounds **Ia**, **Ib**, **IIa**–**IIIi** possessed moderate HDAC inhibitory activity.

Key words: histone deacetylase; synthesis; anti-tumor activity

恶性肿瘤是严重危害人类健康的重大疾病, 据美国国立卫生研究院 (National Institutes of Health, NIH) 2007 年的数据显示, 心血管疾病、恶性肿瘤和脑血管疾病是导致人类死亡的前三位致命性疾病。传统的细胞毒抗癌药物因为缺乏作用靶标的选择性, 在杀伤肿瘤细胞的同时, 也会对骨髓、消化道、肝、肾等某些正常组织和细胞带来损害, 产生较为严重的毒副作用, 极大地制约了临床效果的发挥。随着分子医学和分子生物学的发展, 抗癌药物的研究已从传统的、非特异的细胞毒药物向作用于多信号传导分子、多环节的选择性靶向抗癌药物发展^[1, 2]。

组蛋白去乙酰化酶 (histone deacetylases,

HDAC)^[3-6] 是一种依赖锌离子的金属蛋白酶, 研究发现, 组蛋白的乙酰化与去乙酰化的调控与肿瘤发病机制密切相关。组蛋白去乙酰化酶抑制剂可以抑制细胞内 HDAC 的活性, 使细胞内组蛋白的乙酰化程度增加, 提高 *p21*、*p53* 等基因的表达, 进而抑制肿瘤细胞的增殖, 诱导其分化、凋亡。目前有大量的 HDAC 抑制剂研究报道, 分为 6 种结构类型: ① 羟肟酸 (hydroxamic acid) 类, 如曲古抑菌素 (TSA)、oxamflatin、suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA); ② 包含环氧酮结构的环四肽类, 如 trapoxin A 和 trapoxin B; ③ 不含环氧酮结构的环肽类, 如 depsipeptide (FK228, 原名 FR901228); ④ 苯甲酰胺 (benzamides) 类, 如 MS-275; ⑤ 短链和芳香脂肪酸类, 如丁酸钠、苯丁酸钠; ⑥ 杂环化合物类, 如 depudecin。其中 SAHA (Vorinostat) 已经上市, FK228、MS-275 已进入 II 期临床试验。但现有的 HDACIs 存在生物

收稿日期: 2010-01-20.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30472091).

*通讯作者 Tel: 86-10-83163542, Fax: 86-10-63017757,

E-mail: ws@imm.ac.cn

利用度低、代谢快、选择性低等缺点。因此, 研究开发结构新颖、选择性高的 HDAC 抑制剂, 具有重要的临床意义。

目前, 异羟肟酸类 HDAC 抑制剂 Trichostatin A 和 SAHA 与组蛋白去乙酰化酶同源蛋白 (HDLP) 的复合物晶体结构 (1c3r 和 1c3s)^[7] 已经得到, 该同源蛋白的结合位点附近的氨基酸残基是高度保守的, 这就为进行基于结构设计结构全新的 HDAC 抑制剂奠定了基础。本研究从 Trichostatin A 与 HDLP 的晶体复合物结构出发, 整合组合化学的策略和计算机虚拟筛选技术, 设计出酰胺、脲和酰肼 3 种结构新颖的 12 个目标化合物^[8] (图 1), 合成路线见合成路线图 1~

3。

以联苯磺酰氯 (**1**) 为原料, 与对苯二胺在三乙胺的催化下缩合得到中间体 **2**, **2** 与 (1-chlorocarbonyl-2-phenyl-ethyl)-carbamic acid *tert*-butyl ester 缩合生成酰胺类目标化合物 **Ia**。

以苯甲酰氯 (**3**) 为原料, 与对苯二胺在三乙胺的催化下缩合得中间体 **4**, **4** 与 4-甲基-苯基异氰酸酯反应生成脲类目标化合物 **IIa**; 以 6-羟基-2-萘甲酸 (**5**) 为原料用硫酸二甲酯甲基化, 然后用二氯亚砷酰化得中间体 **7**, 对苯二胺 (**8**) 与 4-甲基-苯基异氰酸酯反应生成中间体 **9**, **7** 与 **9** 在三乙胺作用下缩合得脲类目标化合物 **IIb**。

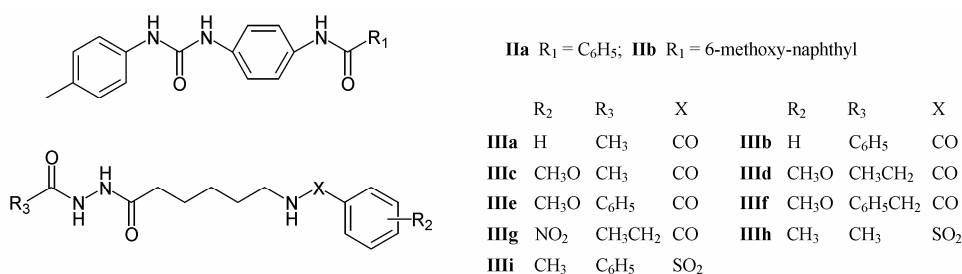
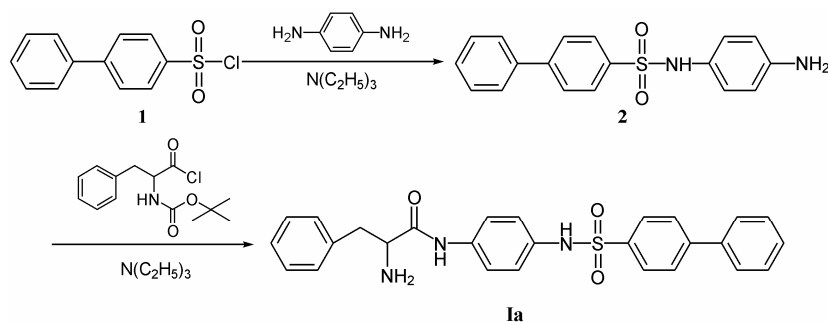
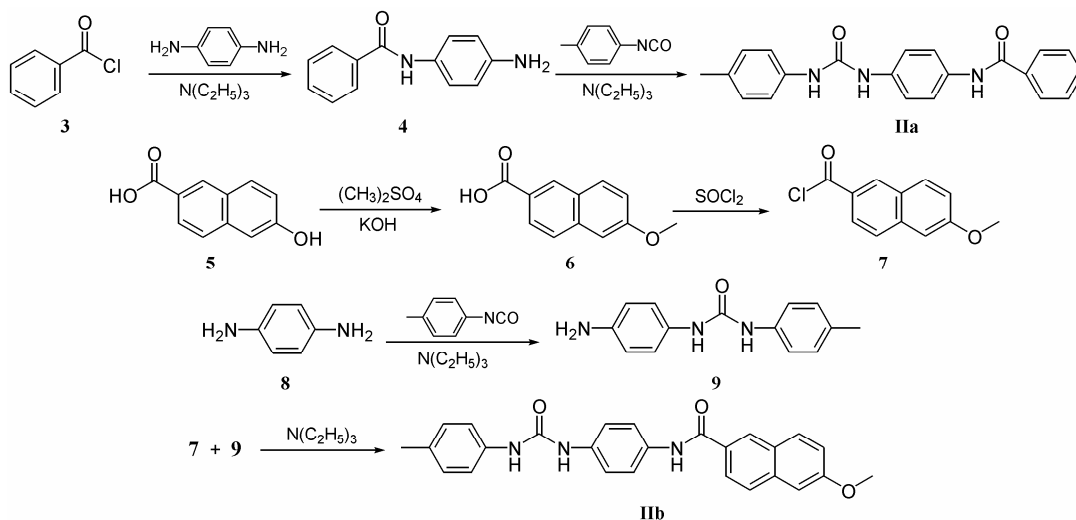


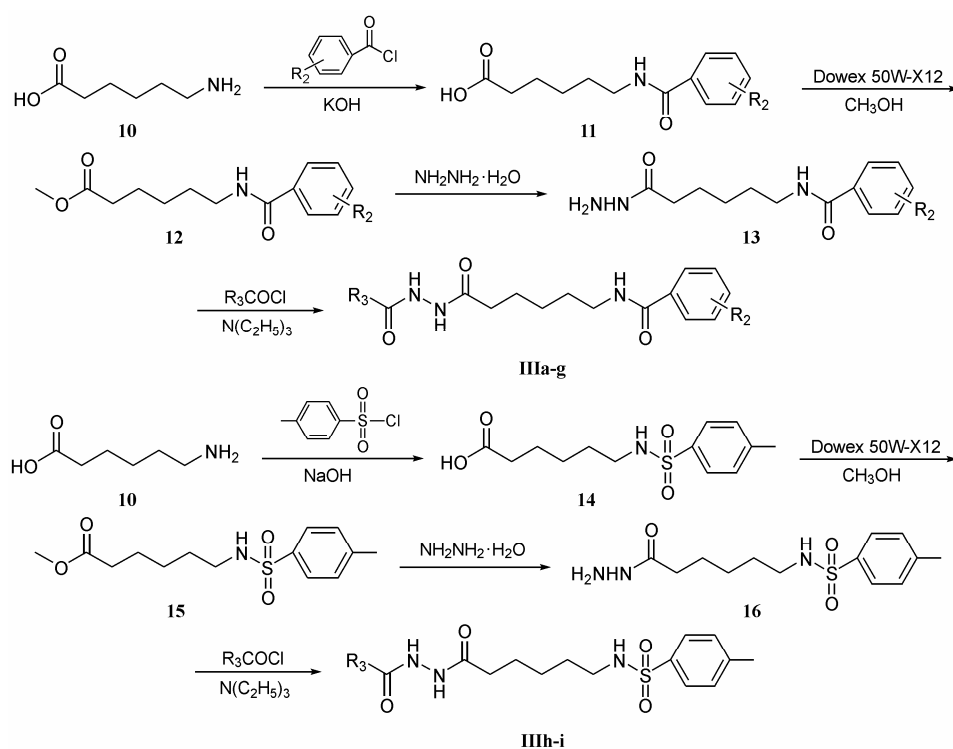
Figure 1 Structures of target compounds



Scheme 1 Synthetic route of Ia



Scheme 2 Synthetic route of IIa-IIb



Scheme 3 Synthetic route of IIIh-IIIi

以 6-氨基己酸 (10) 为原料, 与取代的苯甲酰氯或对甲苯磺酰氯缩合, 然后用甲醇酯化, 再用水合肼腈解, 最后与取代的酰氯缩合生成酰肼类目标化合物 IIIa~IIIi (合成路线 3)。

对合成的 12 个目标化合物进行体外 HDAC 活性筛选, 结果显示, 目标化合物均具有一定的 HDAC 酶的抑制活性, 酰胺类化合物具有较好的生物活性, 脲类、酰肼类化合物次之。

结果与讨论

1 结果

目标化合物的理化常数、波谱数据和生物活性数据见表 1~3。

2 讨论

2.1 N-酰化缩合试剂的选择 在目标化合物 IIIa~IIIi 合成中, 关于 N-酰化缩合反应, 文献[9]以辛二酸为原料, 使用价格昂贵的 BOP-Cl 为缩合试剂, 成本

Table 1 Physical properties, experimental data and elemental analyses of target compounds

Compd.	Formula	Yield/%	mp/°C	Elemental analyses (% , calcd.)		
				C	H	N
Ia	C ₂₇ H ₂₅ N ₃ O ₃ S	75.1	146~147	69.06 (68.77)	5.18 (5.34)	9.21 (8.91)
IIa	C ₂₁ H ₁₉ N ₃ O ₂	59.3	123~124	73.29 (73.03)	5.23 (5.54)	12.39 (12.17)
IIb	C ₂₆ H ₂₃ N ₃ O ₃	60.6	173~174	73.21 (73.39)	5.67 (5.45)	9.64 (9.88)
IIIa	C ₁₅ H ₂₁ N ₃ O ₃	53.3	150~152	61.89 (61.84)	7.45 (7.27)	14.65 (14.42)
IIIb	C ₂₀ H ₂₃ N ₃ O ₃	66.4	163~164	67.68 (67.97)	6.79 (6.56)	12.11 (11.89)
IIIc	C ₁₆ H ₂₃ N ₃ O ₄	55.6	155~156	59.68 (59.80)	7.02 (7.21)	12.86 (13.08)
IIId	C ₁₇ H ₂₅ N ₃ O ₄	61.0	176~177	60.63 (60.88)	7.76 (7.51)	12.79 (12.53)
IIIe	C ₂₁ H ₂₅ N ₃ O ₄	42.0	133~134	66.02 (65.78)	6.29 (6.57)	11.17 (10.96)
IIIf	C ₂₂ H ₂₇ N ₃ O ₄	58.5	170~172	66.75 (66.48)	7.07 (6.85)	10.26 (10.57)
IIIg	C ₁₆ H ₂₂ N ₄ O ₅	54.0	183~184	55.06 (54.85)	6.17 (6.33)	16.24 (15.99)
IIIh	C ₁₅ H ₂₃ N ₃ O ₄ S	57.8	189~190	52.95 (52.77)	6.57 (6.79)	12.06 (12.31)
IIIi	C ₂₀ H ₂₅ N ₃ O ₄ S	48.7	148~149	59.79 (59.53)	5.96 (6.25)	10.59 (10.41)

Table 2 Spectral data of target compounds

Compd.	$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ	MS (m/z) [M] ⁺
Ia	2.92–2.97 (m, 2H), 3.48–3.51 (m, 1H), 7.01–7.84 (m, 18H), 9.70 (br s, 1H)	471
IIa	2.23 (s, 3H), 7.06–7.95 (m, 13H), 8.51 (s, 1H), 8.56 (s, 1H); 10.14 (s, 1H)	345
IIb	2.34 (s, 3H), 3.91 (s, 3H), 7.06–8.60 (m, 14H), 8.49 (s, 1H), 8.52 (s, 1H), 10.33 (s, 1H)	425
IIIa	1.27–1.35 (m, 2H), 1.46–1.58 (m, 4H), 1.84 (s, 3H), 2.08–2.12 (t, 2H, $J = 6.0$ Hz), 3.19–3.26 (m, 2H), 7.41–7.83 (m, 5H), 8.40–8.43 (t, $J = 4.5$ Hz, 1H), 9.63 (s, 1H), 9.68 (s, 1H)	291
IIIb	1.33–1.41 (m, 2H), 1.50–1.64 (m, 4H), 2.48–2.49 (t, 2H, $J = 1.5$ Hz), 3.22–3.29 (m, 2H), 7.41–7.87 (m, 10H), 8.42–8.45 (t, $J = 4.5$ Hz, 1H), 9.83 (s, 1H), 10.27 (s, 1H)	353
IIIc	1.26–1.33 (m, 2H), 1.44–1.55 (m, 4H), 1.82 (s, 3H), 2.07–2.12 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz), 3.17–3.23 (m, 2H), 3.79 (s, 3H), 6.95–7.81 (m, 4H), 8.26–8.28 (t, $J = 3.0$ Hz, 1H), 9.63 (s, 1H), 9.67 (s, 1H)	321
IIId	0.97–1.02 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H), 1.26–1.31 (m, 2H), 1.47–1.55 (m, 4H), 2.06–2.13 (m, 4H), 3.17–3.24 (m, 2H), 3.78 (s, 3H), 6.95–7.81 (m, 4H), 8.26 (s, 1H), 9.62 (s, 2H)	335
IIIe	1.35–1.37 (m, 2H), 1.50–1.61 (m, 4H), 2.16–2.21 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 3.20–3.26 (m, 2H), 3.79 (s, 3H), 6.95–7.87 (m, 9H), 8.26–8.30 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H), 9.82 (s, 1H), 10.27 (s, 1H)	383
IIIf	1.26–1.33 (m, 2H), 1.44–1.55 (m, 4H), 2.07–2.12 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 3.17–3.23 (m, 2H), 3.44 (s, 3H), 3.78 (s, 3H), 6.95–7.81 (m, 9H), 8.24–8.28 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H), 9.73 (s, 1H), 9.99 (s, 1H)	397
IIIg	0.97–1.02 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H), 1.26–1.31 (m, 2H), 1.47–1.55 (m, 4H), 2.08–2.12 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H), 3.17–3.24 (m, 2H), 7.41–7.83 (m, 4H), 8.40–8.43 (t, $J = 4.5$ Hz, 1H), 9.64 (s, 1H), 9.67 (s, 1H)	350
IIIh	1.14–1.24 (m, 2H), 1.29–1.45 (m, 4H), 1.81 (s, 3H), 2.00–2.05 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 2.37 (s, 3H), 2.62–2.69 (m, 2H), 7.36–7.39 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 7.41–7.47 (t, $J = 9.0$ Hz, 1H), 7.64–7.67 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 9.61 (s, 1H), 9.66 (s, 1H)	341
IIIi	1.22–1.30 (m, 2H), 1.32–1.49 (m, 4H), 2.09–2.14 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 2.37 (s, 3H), 2.65–2.71 (m, 2H), 7.37–7.40 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 7.45–7.50 (m, 3H), 7.54–7.56 (t, $J = 3.0$ Hz, 1H), 7.64–7.68 (d, $J = 6.0$ Hz, 2H), 7.84–7.86 (d, $J = 6.0$ Hz, 2H), 9.80 (s, 1H), 10.25 (s, 1H)	403

Table 3 Bioactivities of target compounds

Compd.	Inhibition ratio towards HDAC <i>in vitro</i> / %		
	0.1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
Ia	8.56	24.27	41.15
IIa	4.60	17.35	29.18
IIb	3.80	11.43	18.54
IIIa	6.50	15.16	27.51
IIIb	4.13	12.40	14.67
IIIc	3.21	13.54	14.21
IIId	2.48	11.43	13.17
IIIe	1.52	9.27	11.89
IIIf	3.35	9.86	10.56
IIIg	3.60	8.20	13.54
IIIh	4.73	8.96	16.32
IIIi	3.78	10.7	15.40
SAHA	5.23	42.29	77.08

较高; 而文献[10]缩合反应条件苛刻、温度高、收率低。作者参考以上文献的方法, 改进合成路线, 以 6-氨基己酸为原料, 以三乙胺为缩合试剂, 反应条件温和, 收率提高, 本方法原料易得, 副反应少, 易于纯化, 操作简便。

2.2 酯化条件的选择 化合物 **11**、**14** 进行甲酯化反应时, 常用强酸作催化剂, 但该方法反应温度高、副产物多。参考文献[9]的方法, 使用 Dowex 50W-X12 强酸型树脂作催化剂, 反应条件温和, 副产物少, 收率高, 反应液减压蒸去溶剂后即可直接进行下一步反应。

2.3 生物活性结果分析 对合成的 12 个目标化合物进行体外抑 HDAC 酶活性试验, 实验结果如表 3 所示, 0.1、1 和 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 3 个剂量下体外抑酶活性研究结果表明: 目标化合物均具有一定的 HDAC 酶抑制活性, 其中酰胺类化合物 **Ia** 的活性较好, 脲类、酰胺类化合物 **IIa**、**IIb**、**IIIa**~**IIIi** 活性普遍比较低。

从目标化合物与 HDLP 对接结果 (图 2) 可以看出, 酰胺类化合物 **Ia** 中的羰基氧和 α 位的氨基氮原子与锌离子形成双齿配位, 同时羰基氧也和 Tyr297 形成氢键, α 位的氨基氮原子上的氢分别与 His131 和 His132 形成氢键, 保留了模板化合物 (Trichostatin A) 与 HDLP 所形成的氢键; 脲类化合物 **IIa** 中的羰基氧原子和锌离子形成络合, 同时氧原子和 Tyr297 形成氢键; 脲中氮原子上的氢分别和 His131、His132 形成氢键, 模板化合物 (Trichostatin A) 所形成的氢键都得到部分保留。酰胺类化合物 **IIIa** 中的一个羰基氧原子和一个酰胺氮原子与锌离子形成络合, 其中一个羰基氧原子和 Tyr297 形成氢键, 酰胺中一个氮原子上的氢能够和 His132 形成氢键, 模板化合物的氢键作用得到部分保留。因而预测目标化合物应具有 HDAC 酶抑制活性, 其中酰胺类化合物生物活性应该比较好, 脲类和酰胺类化合物因为部分保留了氢键, 生物活性较低。这与目标化合物体外抑酶活性试验结果一致。虽然酰胺类化合物 **Ia** 活性比较好, 但其结构需要进一步优化, 如间隔区链长的调整, 尾端

的“帽形区”需要增加空间位阻。而脲类、酰胺类化合物结构由于与锌离子络合区仅仅保留了部分氢键, 体外抑酶活性试验也证实抑酶活性较低, 故在进一步结构优化时, 该类结构就不予考虑。以上研究结果, 为进一步设计合成新型活性更高的 HDAC 抑制剂提供参考, 具有一定指导意义。

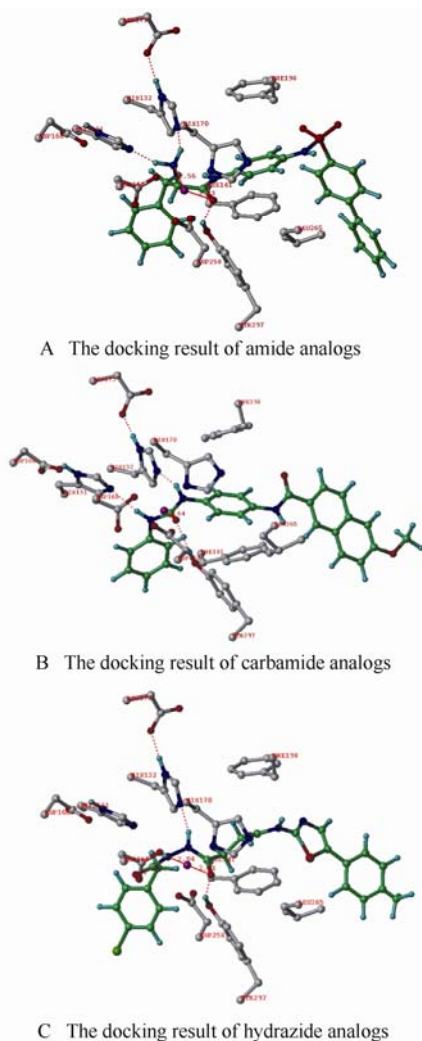


Figure 2 The docking result of the designed molecule

实验部分

熔点用 YRT-3 型熔点仪 (温度未校正); 元素分析用 Carlo-Erba1106 型元素分析仪测定; ^1H NMR 用 Varavin Mercury-300 型核磁共振仪测定 (以 TMS 为内标, $\text{DMSO}-d_6$ 为溶剂); 质谱由 VG ZAB-2F 型质谱仪测定; 反应用溶剂均作无水处理, 氯化亚砷干燥后重蒸, 其余试剂均为分析纯市售品。

1 化学合成部分

1.1 N^1 -(4-氨基苯基)-1-联苯氨磺酰 (2) 的合成 在 250 mL 三口瓶中, 加入 2.16 g (20 mmol) 对苯二胺、

2.02 g (20 mmol) 三乙胺及无水四氢呋喃 50 mL, 搅拌, 冰水浴下滴加 5.05 g (20 mmol) 联苯磺酰氯的 50 mL 无水四氢呋喃溶液, 滴毕, 室温反应 1 h, 减压蒸去溶剂, 倒入 100 mL 水中, 乙酸乙酯萃取, 再用饱和碳酸氢钠溶液、饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 减压蒸去溶剂, 得 4.54 g 白色固体 (2), 产率 70%。mp 156~158 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.2 N^1 -4-[(联苯磺酰基)氨基]苯基-2-氨基-3-苯基-丙酰胺 (Ia) 的合成 在 100 mL 三口瓶中, 加入 3.24 g (20 mmol) 化合物 2、2.02 g (20 mmol) 三乙胺及 30 mL 氯仿, 搅拌, 冰水浴下滴加 5.68 g (20 mmol) N -叔丁氧羰基苯丙氨酰氯 ((1-chlorocarbonyl-2-phenylethyl)-carbamic acid *tert*-butyl ester) 的 30 mL 氯仿溶液, 滴毕, 室温反应 4 h。TLC 检测反应完毕, 减压蒸去溶剂, 加入 25 mL 盐酸及 30 mL 乙酸乙酯溶液, 冰水浴下, 反应 30 min, 用 5% 氢氧化钠溶液调 pH 为碱性, 乙酸乙酯萃取, 饱和食盐水洗涤, 无水硫酸镁干燥, 减压蒸去溶剂, 得 7.07 g 白色固体 (Ia)。

1.3 N -(4-氨基苯基)-苯甲酰胺 (4) 的合成 在 250 mL 三口瓶中, 加入 2.16 g (20 mmol) 对苯二胺、2.02 g (20 mmol) 三乙胺及 50 mL 无水二氯甲烷, 搅拌, 冰浴下滴加 2.81 g (20 mmol) 苯甲酰氯的 50 mL 无水二氯甲烷溶液, 滴毕, 室温反应 1 h, 倒入 200 mL 水中, 搅拌, 分出二氯甲烷层, 再用饱和碳酸氢钠溶液、饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 减压蒸去溶剂, 得 4.54 g 白色固体 (4), 产率 84%。mp 129~131 $^{\circ}\text{C}$ (文献值^[10]129~130 $^{\circ}\text{C}$)。

1.4 N^1 -4-[(4-甲苯氨基羰基)氨基]苯基苯甲酰胺 (IIa) 的合成 在 100 mL 三口瓶中, 加入 1.06 g (5 mmol) 化合物 4 及 30 mL 无水氯仿, 搅拌, 冰水浴下滴加 0.67 g (5 mmol) 4-甲基-苯基异氰酸酯的 30 mL 无水氯仿溶液, 滴毕, 室温反应 4 h。TLC 检测反应完毕, 倒入 50 mL 水中, 分出氯仿层, 饱和食盐水洗涤, 无水硫酸镁干燥, 减压蒸去溶剂, 得 1.02 g 白色固体 (IIa)。

1.5 6-甲氧基-2-萘甲酸 (6) 的合成 在 100 mL 三口瓶中, 加入 0.19 g (1 mmol) 6-羟基-2-萘甲酸及 50 mL (2 mol·L⁻¹) 氢氧化钾溶液, 搅拌溶解, 冰浴下滴加 0.32 g (1 mmol) 硫酸二甲酯溶液, 滴毕, 室温反应 1 h。加热回流 2 h。TLC 检测反应完毕, 浓盐酸调 pH 至 2, 析出白色固体, 过滤水洗, 干燥, 得 0.12 g 白色固体 (6), 收率 60%, mp 206~207 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.6 6-甲氧基-2-萘甲酰氯 (7) 的合成 在 250 mL

三口瓶中, 加入 2.02 g (10 mmol) 化合物 **6** 及 30 mL 苯, 加热至 50 °C, 缓慢滴加 20 mL 二氯亚砷, 滴毕反应 3 h, TLC 检测反应完毕, 减压蒸去溶剂, 得 2.10 g 白色固体 (**7**), 收率 95%, mp 84~85 °C (文献值^[11] 83~84 °C)。

1.7 N-(4-氨基苯基)-N'-(4-甲基苯基) 脲 (9**) 的合成** 在 250 mL 三口瓶中, 加入 1.08 g (10 mmol) 对苯二胺、50 mL 二氯甲烷, 搅拌 10 min, 冰盐浴下缓慢滴加 1.33 g (10 mmol) 4-甲基-苯基异氰酸酯的二氯甲烷溶液 50 mL, 反应 1 h。TLC 检测反应完毕, 反应液减压浓缩, 柱色谱分离得 1.95 g 粉色固体 (**9**), 收率 81%, mp 127~129 °C

1.8 N²-4-[(4-甲基氨基羰基)氨基]苯基-6-甲氧基-2-萘甲酰胺 (IIb**) 的合成** 在 100 mL 三口瓶中, 加入 2.41 g (10 mmol) 化合物 **9**、1.01 g (10 mmol) 三乙胺及 20 mL 无水四氢呋喃, 搅拌, 冰浴下滴加 2.21 g (10 mmol) 化合物 **7** 的 40 mL 无水四氢呋喃溶液, 滴毕, 室温反应 1 h。TLC 检测反应完毕, 减压浓缩反应液析出固体, 乙醇重结晶, 得 1.02 g 白色固体 (**IIb**)。

1.9 6-苯甲酰基氨基-己酸 (11**) 的合成** 在 100 mL 三口瓶中, 加入 5.25 g (40 mmol) 6-氨基己酸及 50 mL (2 mol·L⁻¹) 氢氧化钠溶液, 搅拌溶解, 冰浴下滴加 5.62 g (40 mmol) 苯甲酰氯的 10 mL 四氢呋喃溶液, 滴毕, 室温反应 10 h。TLC 检测反应完毕, 倒入 100 mL 水中, 浓盐酸调 pH 至 2.5, 析出白色固体, 过滤水洗, 干燥, 得 8.94 g 白色固体 (**11**), 收率 95%, mp 80~81 °C (文献值^[9] 80~82 °C)。

1.10 6-苯甲酰基氨基-己酸甲酯 (12**) 的合成** 在 100 mL 三口瓶中, 加入 4.71 g (20 mmol) 化合物 **11**、0.63 g Dowex50W-X12 型强酸型树脂及 30 mL 甲醇, 加热回流 12 h, TLC 检测反应完毕, 抽滤, 滤液减压蒸去溶剂, 得 4.53 g 无色黏稠液体 (**12**), 收率 91%, 直接用于下步反应。

1.11 6-苯甲酰基氨基己酰肼 (13**) 的合成** 在 100 mL 三口瓶中, 加入 2.49 g (10 mmol) 化合物 **12**、1.88 g (80%) 水合肼及 30 mL 乙醇, 加热回流 4 h, 有白色固体析出, TLC 检测反应完毕, 抽滤, 固体用乙醇重结晶, 得 2.10 g 白色固体 (**13**), 收率 84%, mp 50~52 °C。

1.12 6-[(苯甲酰基)氨基]己酰基-2-乙酰肼 (IIIa**) 的合成** 在 100 mL 三口瓶中, 加入 1.25 g (5 mmol) 化合物 **13**、0.51 g (5 mmol) 三乙胺及 20 mL 无水甲苯, 搅拌, 冰浴下滴加 0.39 g (5 mmol) 乙酰氯的 10

mL 无水甲苯溶液, 滴毕, 室温反应 4 h。TLC 检测反应完毕, 倒入 100 mL 冰水中, 析出固体, 过滤, 水洗, 乙醇重结晶, 得 0.77 g 白色固体 (**IIIa**)。

IIIb~IIIg 的合成 参照 **IIIa** 的合成方法, 理化参数及实验数据见表 1。

1.13 6-[(4-甲基苯基)磺酰基]氨基己酸 (14**) 的合成** 在 100 mL 三口瓶中, 加入 5.25 g (40 mmol) 6-氨基己酸及 50 mL (2 mol·L⁻¹) 氢氧化钠溶液, 搅拌溶解, 冰浴下滴加 7.63 g (40 mmol) 对甲基苯磺酰氯的 10 mL 四氢呋喃溶液, 滴毕, 室温反应 10 h。TLC 检测反应完毕, 倒入 500 mL 水中, 浓盐酸调 pH 至 2.5, 析出白色固体, 过滤, 水洗, 干燥, 得 10.32 g 淡黄色固体 (**14**)。收率 90%, mp 107~108 °C (文献值^[12] 106~108 °C)。

1.14 6-[(4-甲基苯基)磺酰基]氨基己酸甲酯 (15**) 的合成** 在 100 mL 三口瓶中, 加入 5.70 g (20 mmol) 化合物 **14**、0.63 g Dowex50W-X12 型强酸型树脂及 30 mL 甲醇, 加热回流 12 h, TLC 检测反应完毕, 抽滤, 滤液减压蒸去溶剂, 得 5.82 g 白色固体 (**15**), 收率 97%, mp 43~44 °C (文献值^[13] 45 °C)。

1.15 6-[(4-甲基苯基)磺酰基]氨基己酰肼 (16**) 的合成** 在 100 mL 三口瓶中, 加入 3.0 g (10 mmol) 化合物 **15**、1.88 g (80%) 水合肼及 20 mL 乙醇, 加热回流 6 h, TLC 检测反应完毕, 冷却至室温, 有淡黄色固体析出, 过滤, 用乙醇重结晶, 得 2.0 g 白色固体 (**16**), 收率 67%, mp 65~66 °C。

1.16 6-[(苯磺酰基)氨基]己酰基-2-乙酰肼 (IIIh**) 的合成** 在 50 mL 三口瓶中, 加入 1.50 g (5 mmol) 化合物 **15**、0.51 g (5 mmol) 三乙胺及 10 mL 无水甲苯, 搅拌, 冰浴下滴加 0.39 g (5 mmol) 乙酰氯的 10 mL 无水甲苯溶液, 滴毕, 室温反应 6 h。TLC 检测反应完毕, 倒入 100 mL 冰水中, 析出固体, 过滤, 水洗, 乙醇重结晶, 得 0.38 g 淡黄色固体 (**IIIh**)。

IIIi 的合成 参照 **IIIh** 的合成方法, 理化参数及实验数据见表 1。

2 药理实验部分

2.1 HDAC 的制备 取小鼠肝脏, 剪碎, 加磷酸盐缓冲液 (PBS) 在 100 目筛网上研磨过滤, 得到的细胞悬液离心后用磷酸盐缓冲液清洗 2 次, 细胞沉淀, 加等体积的磷酸盐缓冲液, 振荡混匀, 冻融法裂解细胞, 离心 (4 °C, 12 000 r·min⁻¹, 10 min), 吸取上清液, 加入甘油至终体积为 30%, 蛋白浓度为 5 mg·mL⁻¹, -20 °C 保存。

2.2 酶活性测定 在 PBS 为缓冲液的 50 μL 反应

体系中, 加入反应成分的终浓度分别为: MAL $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 酶粗制剂 50%, Triton 0.1%, 待测样品 $0.1\sim 10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。SAHA $0.1\sim 10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 为阳性对照。加入样品后于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴中反应 24 h。反应均作 4 个重复。以 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SAHA 阳性对照的荧光抑制率为 100%, PBS 为阴性对照的抑制率为 0, 计算样品不同浓度的抑制率。目标化合物的 HDAC 酶抑制活性结果见表 3。

References

- [1] Chen XG, Zhang Y. Recent advance in the study of novel anti-tumor targets and drugs [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2009, 44: 264–269.
- [2] Li J, Li YT, Li XM. Advances on molecular targeted anti-tumor drugs [J]. *Lett Biotechnol*, 2009, 20: 411–416.
- [3] 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.
- [4] Bi GF, Jiang GS. The molecular mechanism of HDAC inhibitors in anticancer effects [J]. *Cell Mol Immunol*, 2006, 3: 285–290.
- [5] Glaser KB. HDAC inhibitors: clinical update and mechanism-based potential [J]. *Biochem Pharmacol*, 2007, 74: 659–671.
- [6] Bortugno OA, Santoro F, Minucci S. Histone deacetylase inhibitors as a new weapon in the arsenal of differentiation therapies of cancer [J]. *Cancer Lett*, 2009, 280: 134–144.
- [7] Monneret C. Histone deacetylase inhibitors [J]. *Eur J Med Chem*, 2005, 40: 1–13.
- [8] Cheng YH, Guo YS, Wang N, et al. Structure based virtual screening of HDAC inhibitors [J]. *Comput Appl Chem*, 2007, 24: 281–284.
- [9] Jung M, Brosch G, Kolle D. Amide analogues of Trichostatin A as inhibitors of histone deacetylase and inducers of terminal cell differentiation [J]. *J Med Chem*, 1999, 42: 4669–4679.
- [10] Weller H, Grellmann KH. On the photochemical synthesis of *N, N'*-dimethylindolo[2, 3-*c*]carbazole and the mechanism of its formation from *N, N'*-dimethyl-1-*N, N'*-diphenyl-1, 4-henylenediamine [J]. *J Am Chem Soc*, 1983, 105: 6268–6273.
- [11] Ananthakrishnanadar P, Varghesedharumaraj G. Kinetics reaction of substituted naphthoyl chlorides with aniline [J]. *Indian J Chem Sect B*, 1983, 22: 506–507.
- [12] Marvel CS, Moyer WW. Some derivatives of ϵ -caprolactam [J]. *J Org Chem*, 1957, 22: 1065–1067.
- [13] Schmidtchen FP. Synthese makrotricyclischer amine [J]. *Chem Ber*, 1980, 113: 864–874.