

N-取代苯甲酰胺类衍生物的合成与抗肿瘤活性

冯娟¹, 解鹏¹, 翁志洁¹, 闫征², 王楠², 李建其^{1*}

(1. 上海医药工业研究院, 上海 200040; 2. 中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 北京 100050)

摘要: 为寻找新型具有抗肿瘤活性的组蛋白去乙酰化酶 (HDACs) 抑制剂, 合成了 HDACs 抑制剂 MS-275, 并以其为先导结构设计合成了 11 个 N-取代苯甲酰胺类目标化合物, 测定体外抗肿瘤及抑酶活性。MS-275 及目标化合物的结构经 ¹H NMR 及 HR-MS 分析确证。体外抑 HDAC 活性研究表明, 化合物 **9d** 的抑酶活性与阳性对照药 MS-275 相当, 值得进一步深入研究; 化合物 **5c**、**5d** 和 **9c** 表现出明显量效关系, 具有一定抑酶活性。在对各细胞株的体外抗增殖作用研究中, 发现除 **9e** 外, 其他 10 个化合物显示了对 Hut 78 的不同抑制活性, 并表现出对 Hut 78 细胞株具有一定的选择性。

关键词: 组蛋白去乙酰化酶; N-取代苯甲酰胺类化合物; 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 (2009) 06-0603-06

Synthesis and anti-tumor activities of N-substituted benzamide derivatives

FENG Juan¹, XIE Peng¹, WENG Zhi-jie¹, YAN Zheng², WANG Nan², LI Jian-qi^{1*}

(1. Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 200040, China;

2. Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: To explore novel histone deacetylase (HDACs) inhibitors with anti-tumor activity, MS-275, a HDACs inhibitor, was prepared and used as a lead compound to design new N-substituted benzamide derivatives. MS-275 and eleven target compounds were obtained, and their structures were confirmed by ¹H NMR and HR-MS individually. The results showed that the activity of compound **9d** was equal to MS-275 in HDACs inhibition tests *in vitro* and worthy of further investigation. Compound **5c**, **5d** and **9c** displayed obvious dose-effect relationship, which possessed moderate HDACs inhibitory activities. Ten compounds except **9e** had selective inhibitory activities on Hut78.

Key words: histone deacetylase; N-substituted benzamide derivative; synthesis; anti-tumor activity

恶性肿瘤和心血管疾病目前是导致病人死亡的重要原因, 占据疾病的前两位, 是医学上的两大难关。化学治疗是治疗恶性肿瘤的主要手段之一。传统的细胞毒化疗药物因缺乏肿瘤细胞特异性, 在杀死肿瘤细胞的同时, 对正常组织和器官有严重的毒副作用。因此抗肿瘤药物正向针对机制的多环节作用的新型抗肿瘤药物发展。

组蛋白去乙酰化酶 (HDACs) 的活性与癌症的发生有关, 当 HDACs 过度表达并被转录因子募集, 就会导致特定基因不正常的抑制, 从而导致肿瘤或

其他疾病。初步研究表明, 人类可以安全地通过抑制 HDACs 的活性来调节组蛋白乙酰化水平, 从而治疗癌症、风湿、疟疾等疾病^[1-4]。目前, HDACs 已成为肿瘤化疗药物研发领域最新、最热门的靶标。现有 HDACs 抑制剂按其结构的不同可分为四类, 其中对羟肟酸类 HDACs 抑制剂的研究较为成熟。羟肟酸类 HDACs 抑制剂与组蛋白去乙酰化酶同源酶 (HDLP) 的晶体复合物已得到, 从而确定了该类化合物与酶的结合方式, 为 HDACs 抑制剂的研究奠定了基础, 目前已有一个该类新药 SAHA (又称为 Vorinostat, Zolinza) 上市。处于临床 II 期研究的苯酰胺类 HDACs 抑制剂 MS-275 (图 1), 由于可选择性地作用于 HDACs 的 HDAC1 亚型, 具有较低的体内毒性, 因此苯酰胺

收稿日期: 2008-12-22.

*通讯作者 Tel: 86-21-55514600-288, Fax: 86-21-65312830,

E-mail: lijq@sipi.com.cn

类药物是目前该领域的研究热点及重要方向。现有的苯酰胺类 HDACs 抑制剂大都包含如下活性部分。

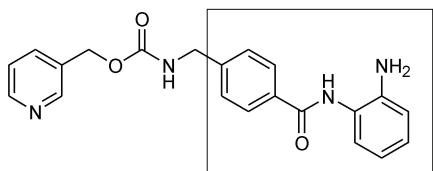


Figure 1 Structure and activity part of MS-275

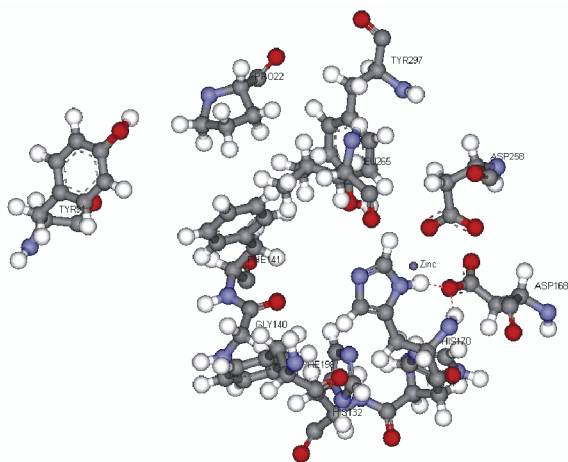


Figure 2 Active cavity of HDLP

目前, 苯酰胺类 HDACs 抑制剂与酶的晶体复合物未见文献报道, 关于苯酰胺类 HDACs 抑制剂与酶的结合方式亦众说纷纭^[5, 6]。本研究使用 Accelrys Discovery Studio 2.1 对 SAHA 与 HDLP 的晶体复合物 (PDB: 1c3s) 进行处理, 模拟得到 HDLP 的活性空腔 (图 2)。通过对图 2 的分析, 发现 HDLP 活性空腔由锌离子及众多氨基酸残基组成, 化合物可能通过与锌离子或残基形成氢键与酶结合, 从而对酶产生抑制作用。本研究根据模拟得到的 HDLP 活性空腔, 参考 MS-275 的结构信息, 采用一些可能与锌离子或残基形成氢键的基团如 2-吡啶、3-吡啶、2-氨基-3-吡啶、2-氨基-4-吡啶、苄氧基、2-氨基苄基代替 MS-275 中的 2-氨基苯基, 又用 3,4,5-三甲氧基苯乙基替代 3-吡啶甲氧基以增大与 HDLP 表面识别区的结合力, 设计合成了 11 个新化合物 (化合物结构见表 1), 合成路线见合成路线 1、2。化合物的结构经 ¹H NMR 及 HR-MS 确证, 各化合物的理化常数见表 2, 波谱数据见表 3。

以 3-吡啶甲醇为原料, 与对氨基苯甲酸的氢氧化钠水溶液用 *N,N'*-羰基二咪唑 (简称 CDI) 缩合得中间体 **3**, **3** 与相应的氨基取代物用 *O*-(1*H*-苯并三唑-1-基)-*N,N',N'*-四甲基异脲六氟化磷 (HBTU) 缩

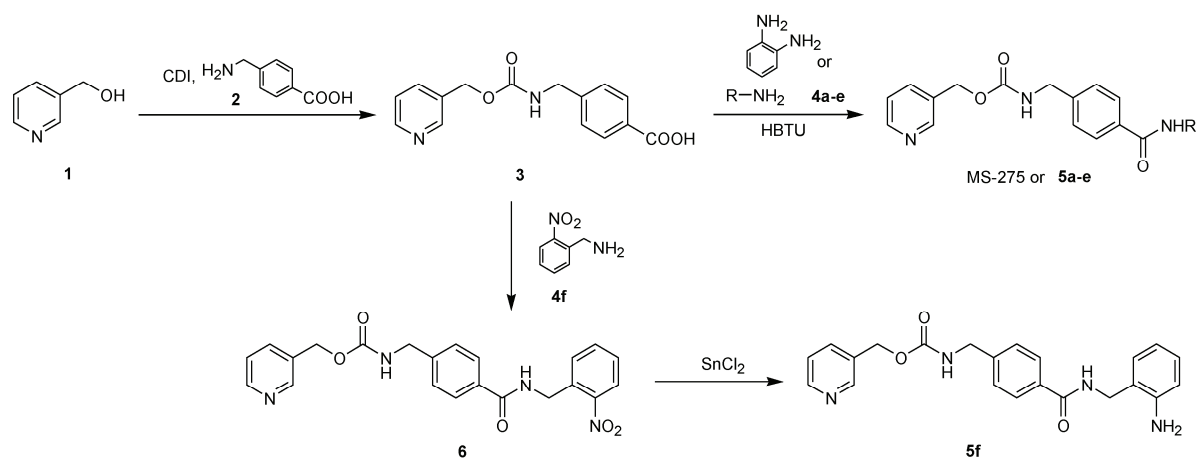
合生成目标化合物 MS-275 及 **5a–5e**。**3** 依次经缩合、二水合氯化亚锡还原得目标化合物 **5f**。

以 3, 4, 5-三甲氧基肉桂酸为原料依次用氯化亚砷、HBTU 两步缩合生成目标化合物 **9a–9e**。

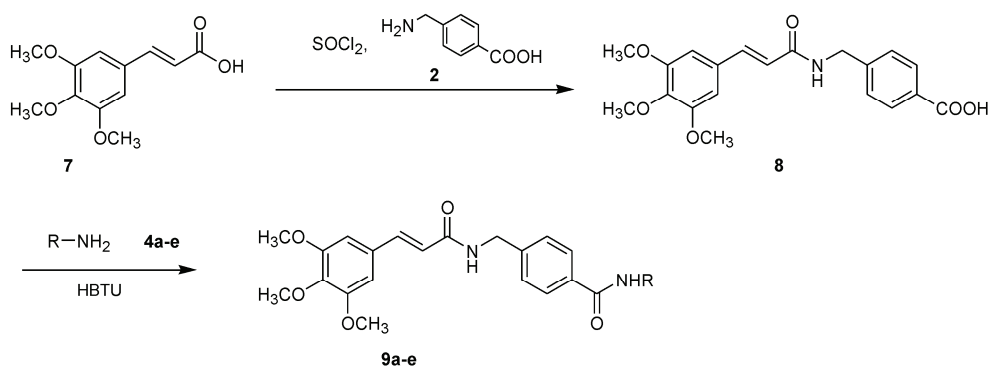
对所合成的 11 个化合物进行了体外抑 HDACs 活性及肿瘤细胞株的体外抗增殖试验, 药理结果见表 4。化合物 **9d** 的抑酶活性与阳性对照药 MS-275 相当, 值得进一步深入研究; 化合物 **5c**、**5d** 和 **9c** 表现出明显量效关系, 具有一定抑酶活性。除 **9e** 外, 其他 10 个化合物显示了对 Hut 78 的不同抑制活性, 并表现出对 Hut 78 细胞株具有一定的选择性。

Table 1 Structures of target compounds

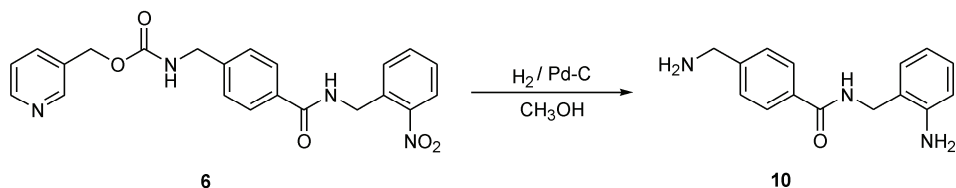
Compd.	R'	X	R
MS-275		–CH ₂ O–	
5a		–CH ₂ O–	
5b		–CH ₂ O–	
5c		–CH ₂ O–	
5d		–CH ₂ O–	
5e		–CH ₂ O–	
5f		–CH ₂ O–	
9a			
9b			
9c			
9d			
9e			



Scheme 1 Synthetic route of MS-275 and 5a-5f



Scheme 2 Synthetic route of 9a-9e



Scheme 3 Catalytic hydrogenation of compound 6

结果与讨论

1 实验结果

目标化合物的理化常数、波谱数据和活性数据见表 2、表 3 和表 4。

2 结果讨论

2.1 *N*-酰化缩合试剂的选择 在 MS-275、5a-5e 和 9a-9e 的合成中, 参考文献[6]的方法, 使用 CDI 为缩合试剂, 发现其缩合活性较差, 大部分原料未反应; 以 HBTU 为缩合试剂, 可使操作简便, 收率明显提高且稳定性好; 如采用价格较贵的 2-(7-偶氮苯并三氮唑)-*N*, *N*', *N*'-甲基脒六氟磷酸酯 (HATU) 为缩合试剂, 产率与使用 HBTU 相比未见明显提高。

Table 2 Physical properties and experimental data of target compounds

Compd.	Char.	mp/°C	Yield/%
MS-275	Yellow solid	158-160	70.1
5a	White solid	126-128	63.9
5b	White solid	173-176	73.3
5c	Yellow solid	175-176	57.4
5d	Yellow solid	104-106	54.7
5e	Stramineous solid	125-127	81.3
5f	Stramineous solid	117-119	57.7
9a	White solid	143-146	64.5
9b	Yellow solid	165-167	56.3
9c	Yellow solid	130-132	44.3
9d	White solid	191-194	46.1
9e	White solid	155-156	79.2

Table 3 Spectral data of target compounds

Compd.	^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ	HR-MS
5a	4.29 (d, 2H, $J = 6.0$ Hz), 5.11 (s, 2H), 7.16 (m, 1H), 7.37 (m, 1H), 7.40 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz), 7.78–7.90 (m, 3H), 7.99 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz), 8.18 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz), 8.38 (m, 1H), 8.54 (d, 1H, $J = 2.4$ Hz), 8.60 (br, 1H), 10.6 (s, 1H)	[M+Na] $^+$ 385.128 17 [2M+Na] $^+$ 747.266 38
5b	4.27 (d, 2H, $J = 6.4$ Hz), 5.08 (s, 2H), 7.37 (m, 1H), 7.38 (m, 1H), 7.41 (d, 2H, $J = 7.6$ Hz), 7.78 (d, 1H, $J = 7.6$ Hz), 7.91 (m, 1H), 7.94 (d, 2H, $J = 7.6$ Hz), 8.18 (m, 1H), 8.31 (m, 1H), 8.54 (m, 1H), 8.60 (s, 1H), 8.92 (d, 1H, $J = 2.4$ Hz), 10.3 (s, 1H)	[M+Na] $^+$ 385.133 46 [2M+Na] $^+$ 747.270 77
5c	4.28 (d, 2H, $J = 6.4$ Hz), 5.10 (s, 2H), 5.70 (s, 2H), 6.62 (m, 1H), 7.36–7.39 (m, 4H), 7.55 (d, 1H, $J = 7.6$ Hz), 7.79–7.93 (m, 4H), 8.53 (m, 1H), 8.58 (br, 1H), 9.54 (br, 1H)	[M+H] $^+$ 378.157 15 [2M+Na] $^+$ 777.288 00
5d	4.27 (d, 2H, $J = 6.0$ Hz), 5.07 (s, 2H), 5.11 (s, 2H), 7.38–7.46 (m, 3H), 7.79–7.81 (m, 2H), 7.91 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz), 8.15 (m, 1H), 8.30 (m, 1H), 8.55 (m, 2H), 8.94 (s, 1H), 9.65 (s, 1H)	[M+H] $^+$ 378.156 93 [2M+Na] $^+$ 777.286 24
5e	4.29 (d, 2H, $J = 6.0$ Hz), 4.93 (s, 2H), 5.12 (s, 2H), 7.35–7.38 (m, 5H), 7.40 (m, 1H), 7.42 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz), 7.72 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz), 8.18 (m, 1H), 8.31 (m, 1H), 8.58 (br, 1H), 8.60 (s, 1H), 11.70 (br, 1H)	[M+H] $^+$ 392.160 87
5f	4.26 (d, 2H, $J = 6.4$ Hz), 4.32 (d, 2H, $J = 5.6$ Hz), 5.09 (s, 2H), 5.10 (s, 2H), 6.51 (m, 1H), 6.62 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz), 6.95 (m, 1H), 7.03 (s, 1H, $J = 8.0$ Hz), 7.33 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz), 7.40 (m, 1H), 7.77 (m, 1H), 7.83 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz), 7.86 (m, 1H), 8.53 (m, 1H), 8.59 (s, 1H), 8.81 (br, 1H)	[M+Na] $^+$ 413.158 68 [2M+Na] $^+$ 803.326 72
9a	3.70 (s, 3H), 3.82 (s, 6H), 4.48 (d, 2H, $J = 6.0$ Hz), 6.66 (d, 1H, $J = 15.6$ Hz), 6.91 (s, 2H), 7.18 (m, 1H), 7.43 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz), 7.86 (m, 1H), 8.00 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz), 8.16 (m, 1H), 8.38 (m, 1H), 8.58 (m, 1H), 9.42 (m, 1H), 10.69 (s, 1H)	[M+H] $^+$ 448.187 20 [2M+H] $^+$ 895.365 93
9b	3.70 (s, 3H), 3.82 (s, 6H), 4.49 (s, 2H, $J = 6.0$ Hz), 6.65 (d, 1H, $J = 15.6$ Hz), 6.90 (s, 2H), 7.39–7.47 (m, 3H), 7.66 (m, 1H), 7.94 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz), 8.42 (m, 2H), 8.59 (s, 1H), 9.10 (br, 1H), 10.62 (br, 1H)	[M+Na] $^+$ 448.189 15 [2M+Na] $^+$ 917.351 59
9c	3.70 (s, 3H), 3.83 (s, 6H), 4.48 (d, 2H, $J = 5.6$ Hz), 5.87 (s, 2H), 6.64 (m, 1H), 6.68 (d, 1H, $J = 15.6$ Hz), 6.92 (s, 2H), 7.42 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz), 7.43 (d, 1H, $J = 15.6$ Hz), 7.60 (d, 1H, $J = 7.2$ Hz), 7.87 (d, 1H, $J = 4.8$ Hz), 7.96 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz), 8.60 (t, 1H, $J = 6.0$ Hz), 9.62 (s, 1H)	[M+Na] $^+$ 485.182 75 [2M+Na] $^+$ 947.373 44
9d	3.70 (s, 3H), 3.82 (s, 6H), 4.47 (d, 2H, $J = 6.0$ Hz), 5.12 (s, 2H), 6.67 (d, 1H, $J = 15.6$ Hz), 6.90 (s, 2H), 7.42 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz), 7.43 (d, 1H, $J = 15.6$ Hz), 7.45 (d, 1H, $J = 5.6$ Hz), 7.80 (d, 1H, $J = 5.6$ Hz), 7.94 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz), 8.10 (s, 1H), 8.69 (m, 1H), 9.66 (s, 1H)	[M+H] $^+$ 463.200 62
9e	3.70 (s, 3H), 3.82 (s, 6H), 4.44 (d, 2H, $J = 6.0$ Hz), 5.12 (s, 2H), 6.67 (d, 1H, $J = 15.6$ Hz), 6.91 (s, 2H), 7.35–7.38 (m, 5H), 7.42 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz), 7.47 (m, 1H), 7.72 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz), 8.58 (br, 1H), 11.70 (s, 1H)	[M+H] $^+$ 499.184 21

Table 4 Anti-tumor activities of target compounds

Compd.	Inhibition ratio towards HDACs <i>in vitro</i> (mean $\pm$ SD, %) $n = 4$		IC ₅₀ of tumor cells <i>in vitro</i> (IC ₅₀ , $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)		
	Dose ($10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	Dose ($100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	K562	A549	Hut 78
MS-275	45.588 $\pm$ 1.343	66.300 $\pm$ 2.905	3.20	24.42	0.15
5a	−0.124 $\pm$ 0.688	0.080 $\pm$ 0.306	>100	>100	76.21
5b	0.170 $\pm$ 0.912	0.481 $\pm$ 0.238	>100	>100	38.76
5c	1.644 $\pm$ 0.544	12.033 $\pm$ 1.851	>100	>100	4.21
5d	9.422 $\pm$ 0.172	37.240 $\pm$ 1.099	>100	>100	0.40
5e	−0.598 $\pm$ 0.484	0.529 $\pm$ 0.222	>100	>100	6.87
5f	0.479 $\pm$ 0.763	0.293 $\pm$ 0.433	>100	>100	12.50
9a	0.148 $\pm$ 0.202	3.772 $\pm$ 0.619	>100	>100	68.55
9b	2.554 $\pm$ 0.964	1.983 $\pm$ 0.676	>100	>100	60.94
9c	3.894 $\pm$ 1.292	20.670 $\pm$ 6.069	>100	>100	17.07
9d	32.472 $\pm$ 0.665	69.945 $\pm$ 1.667	>100	>100	1.86
9e	1.356 $\pm$ 0.524	4.128 $\pm$ 0.335	>100	>100	>100

2.2 还原试剂的选择 由化合物 **6** 还原至 **5f** 过程中, 使用 $\text{H}_2/\text{Pd-C}$ 还原, 反应得到淡黄色固体, 经 MS-ESI 检测显示为两个峰: 256.1 [M+] $^+$ 和 511.1 [2M+] $^+$, 推测可能发生合成路线 3 的反应, 生成副产物 **10**, 其相对分子质量为 255 (合成路线图 3)。

以 Fe/AcOH 还原, 虽得到产品 **5f**, 但产物被包含在黏稠反应液中难以提取, 操作性差。

以 SnCl_2 为还原剂, 反应后用二氯甲烷萃取可方便得到产品 **5f**。

2.3 生物活性结果分析 对所合成的 11 个化合物进行体外抑 HDACs 活性及肿瘤细胞株的体外抗增殖试验, 药理结果如表 4 所示。 $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 两个剂量下体外抑酶活性研究结果表明: 化合物 **9d** 与阳性对照药 MS-275 相当; **5c**、**5d** 和 **9c** 表现出明显量效关系, 具有一定抑酶活性。在对各细胞株的体外增殖抑制作用研究中, 发现除 **9e** 外, 其他 10 个化合物保留了对 Hut 78 的抑制活性, 而对 A549 和 K562 两个细胞株丧失活性, 表现出对 Hut 78 细胞株具有

一定选择性。

初步生物活性试验表明,如图3所示两个基团有可能为组蛋白去乙酰化酶抑制剂的新活性部分,且R为Group A时化合物的抑酶及抑瘤活性较R为Group B时优,如化合物**5d**、**9d**活性强于结构对应的**5c**与**9c**;R'为较大位阻基团时,有助于提高化合物的抑酶活性,如3,4,5-三甲氧基苯基取代的化合物**9d**与**9c**抑酶活性较相应的化合物**5d**、**5c**强。研究结果为丰富所模拟的 HDLP 活性空腔结构以设计合成活性更高的新化合物提供参考。

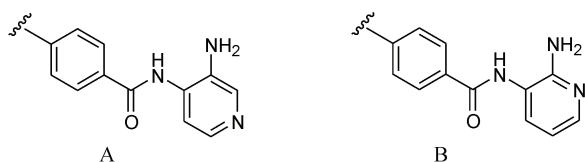


Figure 3 Possible activity part towards HDAC

实验部分

熔点用 SGW X-4 显微熔点仪测定; ^1H NMR 用 Varian INOVA-400 型核磁共振仪测定(溶剂 $\text{DMSO}-d_6$, TMS 为内标);质谱由 Finnign-MAT212 型质谱仪测定;高分辨质谱由 Agilent 6210 TOF 型质谱仪测定。荧光酶标检测用 96 孔板(黑色)由美国 Costar 公司生产。荧光酶标仪型号: SPECTRA MAX 美国 Molecular Devices 公司生产。反应溶剂均作无水处理后重蒸备用,试剂除氯化亚砷经干燥重蒸外,其余均为分析纯,未经处理,直接使用。

1 化学合成部分

1.1 4-[*N*-(吡啶-3-甲氧酰基)氨基]苯甲酸(3)的合成^[5] 将 CDI (1.62 g, 10 mmol) 溶于 10 mL 无水四氢呋喃中,冰浴控制温度在 $0\sim 10\text{ }^\circ\text{C}$ 。在 10 min 内分 3 次加入 3-吡啶甲醇 (**1**) (1.09 g, 10 mmol) 和 10 mL 无水四氢呋喃的混合液,保持 $0\sim 10\text{ }^\circ\text{C}$ 继续反应 1 h,反应液变澄清。在 $0\sim 10\text{ }^\circ\text{C}$ 下将上述混合液滴加到对氨基苯甲酸 (**2**) (1.51 g, 10 mmol) 和氢氧化钠的水溶液 (10 mL, $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 中,室温继续搅拌 4 h,停止反应。 $5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸调节 pH 至 5 左右,反应液变澄清。减压蒸出溶剂约 15 mL,大量固体析出,过滤、真空干燥得白色固体 (**3**) 2.47 g,收率 86.2%。

1.2 *N*-(2-氨基苄基)-4-[*N*-(吡啶-3-甲氧酰基)氨基]苯甲酰胺 (MS-275) 的合成 将化合物 **3** (0.286 g, 1 mmol)、邻苯二胺 (0.130 g, 1.2 mmol)、HBTU (0.379 g, 1.0 mmol) 依次加入 10 mL 二氯甲烷中,保持冰浴冷却,滴加三乙胺 (0.404 g, 4 mmol) 后恢复到室温

继续搅拌 4 h。反应液析出大量固体,过滤,真空干燥,得白色固体 (MS-275) 0.264 g,收率 70.1%。 ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 4.28 (d, 2H, $J = 6.0\text{ Hz}$), 4.84 (s, 2H), 5.10 (s, 2H), 6.59 (t, 1H, $J = 5.6\text{ Hz}$), 6.78 (d, 1H, $J = 8.0\text{ Hz}$), 6.97 (t, 1H, $J = 7.6\text{ Hz}$), 7.17 (d, 1H, $J = 7.6\text{ Hz}$), 7.36~7.42 (m, 3H), 7.77~7.94 (m, 4H), 8.53 (d, 1H, $J = 4.0\text{ Hz}$), 8.59 (s, 1H), 9.57 (s, 1H); MS-ESI: $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 398.9, $[2\text{M}+\text{Na}]^+$ 775.1。

1.3 *N*-(2-吡啶基)-4-[*N*-(吡啶-3-甲氧酰基)氨基]苯甲酰胺 (5a) 的合成 将化合物 **3** (0.286 g, 1 mmol)、2-氨基吡啶 (**4a**) (0.113 g, 1.2 mmol)、HBTU (0.379 g, 1.0 mmol) 依次加入 2 mL *N,N*-二甲基甲酰胺 (DMF) 中,保持冰浴冷却,滴加三乙胺 (0.404 g, 4 mmol) 后恢复到室温继续搅拌 4 h。将反应液倒入 50 mL 冰水中,浓盐酸调节 pH 至 8 左右,加入二氯甲烷 50 mL,搅拌 15 min。静置、分液,浓缩有机相,剩余物经乙酸乙酯重结晶得产物 **5a**。

N-取代-4-[*N*-(吡啶-3-甲氧酰基)氨基]苯甲酰胺衍生物 (**5b**–**5e**) 的合成参照 **5a** 的合成方法,物理性质和实验数据见表 2。

1.4 *N*-(2-氨基苄基)-4-[*N*-(吡啶-3-甲氧酰基)氨基]苯甲酰胺 (5f) 的合成 邻硝基苄胺 (**4f**) 合成方法参照文献[7]。

将 (**3**) (0.286 g, 1 mmol)、邻硝基苄胺 (0.182 g, 1.2 mmol)、HBTU (0.379 g, 1 mmol) 依次加入 2 mL DMF 中,保持冰浴冷却,滴加三乙胺 (0.404 g, 4 mmol) 后恢复到室温继续搅拌 4 h。将反应液倒入 50 mL 冰水中,盐酸调节 pH 至 $7\sim 9$ 左右,加入二氯甲烷 50 mL,搅拌 15 min。静置、分液,浓缩有机相,剩余物经乙酸乙酯重结晶得黄色固体。将该黄色固体溶于甲醇中,加入二水合氯化亚锡 (0.678 g, 3 mmol),回流 2 h,浓缩除去甲醇,剩余物倒入冰水中,饱和碳酸钾水溶液调 pH 至 9,二氯甲烷萃取,无水硫酸镁干燥过夜。蒸除溶剂,剩余物用乙酸乙酯重结晶,得淡黄色固体 **5f**,收率 57.7%。

1.5 4-[*N*-(3,4,5-三甲氧基肉桂酰基)氨基]苯甲酸 (8) 的合成 将 3,4,5-三甲氧基肉桂酸 (**7**) (2.38 g, 10 mmol)、氯化亚砷 (4.72 g, 40 mmol) 溶于 10 mL 二氯甲烷中,加热回流 4 h,减压蒸出溶剂及未反应的氯化亚砷,将所得物溶于 10 mL 四氢呋喃中,并在冰浴下滴加至对氨基苯甲酸 (1.51 g, 10 mmol) 和氢氧化钠 (10 mL, $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的混合液中,滴加完毕后继续室温搅拌 5 h。停止反应, $5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸调节 pH 至 4.5 左右,析出大量固体。过滤,干燥得白色固体

(8) 3.39 g, 收率 91.2%。

1.6 N-取代-4-[(3,4,5-三甲氧基肉桂酰基)氨基]苯甲酰胺衍生物 (9a–9e) 的合成 将 (8) (0.371 g, 1 mmol)、取代的胺 (4a–4f) (1.2 mmol)、HBTU (0.379 g, 1 mmol) 依次加入 2 mL DMF 中, 保持冰浴冷却滴加三乙胺 (0.404 g, 4 mmol), 再于室温继续搅拌 4 h。将反应液倒入 50 mL 冰水中, 盐酸调节 pH 至 7~9 左右, 二氯甲烷萃取, 无水硫酸镁干燥。过滤, 浓缩有机相, 剩余物经乙酸乙酯重结晶得产物 9a–9e。物理性质和实验数据见表 2。

2 药理实验部分

2.1 化合物的组蛋白去乙酰化酶体外抑制活性测定 组蛋白去乙酰化酶与小分子荧光底物 MAL 反应, 使底物 MAL 脱掉乙酰基变成 ML。通过萃取得到未参加反应的底物 MAL, 检测其荧光值来计算酶的活性和化合物抑制酶的活性。

组蛋白去乙酰化酶是将大鼠肝脏匀浆后提取所得。将待测化合物用 200 μL DMSO 溶解, 用 PBS 将待测化合物母液稀释至工作液浓度, 待测化合物的终浓度分别为 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。将组蛋白去乙酰化酶、MAL 荧光底物和待测化合物混合, 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴反应 16 h。乙酸乙酯抽提反应液, 减压除去乙酸乙酯, 向剩余物中加入 110 μL 40% 的甲醇, 混合均匀, 取 50 μL /孔加入 96 孔板中。325/390 nm 荧光检测。

反应中未加组蛋白去乙酰化酶的阴性对照为 100% 抑制, 仅含组蛋白去乙酰化酶而无任何抑制剂对照为本底 (0% 抑制)。

$$\text{待测品抑制率} = (\text{检测荧光值} - \text{本底}) / (\text{阴性对照荧光值} - \text{本底}) \times 100\%$$

结果中的抑制率和标准差, 为每组剂量中的每个平行孔的抑制百分率的平均数和标准差。

2.2 化合物的肿瘤细胞体外抑制活性测定 样品对肿瘤细胞株的细胞毒性通过 MTT 法测得。具体步骤参考文献[8]。

致谢: 体外肿瘤细胞抑制活性由上海医药工业研究院刘全海研究员课题组测试。核磁、质谱分析由上海医药工业研究院分析组完成。

References

- [1] Lin HS, Hu CY, Chan HY, et al. Anti-rheumatic activities of histone deacetylase (HDAC) inhibitors *in vivo* in collagen-induced arthritis in rodents [J]. *Br J Pharmacol*, 2007, 150: 862–872.
- [2] Mukherjee P, Pradhan A, Shah F, et al. Structural insights into the plasmodium falciparum histone deacetylase 1 (PfHDAC-1): a novel target for the development of antimalarial therapy [J]. *Bioorg Med Chem*, 2008, 16: 5254–5265.
- [3] Simonini MV, Camargo LM, Dong E, et al. The benzamide MS-275 is a potent, long-lasting brain region-selective inhibitor of histone deacetylases [J]. *PNAS*, 2006, 103: 1587–1592.
- [4] Ouaisi M, Ouaisi A. Histone deacetylase enzymes as potential drug targets in cancer and parasitic diseases [J]. *J Biomed Biotechnol*, 2006, 2: 13474.
- [5] Li BY. Synthesis and Analysis of a New Class of Histone Deacetylase Inhibitors with Anticancer Bioactivity [D]. Chongqing: Chongqing University, 2003.
- [6] Moradei OM, Mallais TC, Frechette S, et al. Novel amino-phenyl benzamide-type histone deacetylase inhibitors with enhanced potency and selectivity [J]. *J Med Chem*, 2007, 50: 5543–5546.
- [7] Saulnier MG, Zimmermann K, Struzynski CP, et al. Microwave-assisted synthesis of primary amine HX salts from halides and 7M ammonia in methanol [J]. *Tetrahedron Lett*, 2004, 45: 397–399.
- [8] Zhang JT. Modern Experimental Methods in Pharmacology (现代药理实验方法) [M]. Beijing: Peking Union Medical College and Beijing Medical University Press, 1998: 818.