

左氧氟沙星与噻二唑类组蛋白去乙酰化酶抑制剂缀合物的合成和抗肿瘤活性

李 慧, 韩 潇, 李德武*

(长江职业学院, 湖北 武汉 430074)

摘要: 以喹诺酮类药物左氧氟沙星为原料, 对其进行结构改造, 在左氧氟沙星 C-3 位羧基上引入噻二唑类组蛋白去乙酰化酶抑制剂 (histone deacetylase inhibitor, HDACi) 单元, 合成了 18 个新化合物, 其结构均经过 ^1H NMR、 ^{13}C NMR 和 HR-MS 进行确证。采用了组蛋白去乙酰化酶 (HDACs) 试剂盒和 CCK8 试剂盒测试了目标缀合物的 HDACs 抑制活性和体外抗肿瘤活性。初步的生物活性测试结果表明, 所合成的左氧氟沙星-HDACi 缀合物均展现出了较强的 HDACs 抑制活性, 其中脲酸类缀合物对 HDACs 的抑制活性强于羧酸类和苯甲酰胺类缀合物, 尤其是缀合物 **5d** 对 HDAC1 ($\text{IC}_{50}=0.031\pm 0.011 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和 HDAC6 ($\text{IC}_{50}=0.019\pm 0.006 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的抑制活性最强, 强于阳性药物伏立诺他 (SAHA); 通过分子对接研究发现, 缀合物 **5d** 除了脲酸基团与 HDACs 活性口袋底部的氨基酸残基和锌离子相互作用外, 其噻二唑基团在 HDAC6 中还能与氨基酸残基 F679 形成氢键; 在体外抗肿瘤活性中, 这些缀合物对 SW620、MGC-803、PC-3、NCIH460、MCF-7 和 HepG2 6 种肿瘤细胞均有较强的抑制作用, 其中缀合物 **5d** 对肿瘤细胞 MGC-803 ($\text{IC}_{50}=0.7\pm 0.05 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、NCIH460 ($\text{IC}_{50}=2.3\pm 0.421 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、MCF-7 ($\text{IC}_{50}=1.6\pm 0.56 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和 HepG2 ($\text{IC}_{50}=3.9\pm 0.26 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 抑制活性是阳性药物 SAHA 的 3.1 倍以上。此外, 缀合物对正常的胃黏膜上皮细胞 GES-1 基本没有毒性, 而 SAHA 却表现出了一定的毒性。

关键词: 喹诺酮类药物; 组蛋白去乙酰化酶抑制剂; 缀合物; 抗肿瘤活性

中图分类号: R916

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 04-0582-10

Synthesis and anti-tumor activity of levofloxacin-thiadiazole histone deacetylase inhibitor conjugates

LI Hui, HAN Xiao, LI De-wu*

(Changjiang Polytechnic, Wuhan 430074, China)

Abstract: Eighteen novel levofloxacin-thiadiazole HDACi conjugates were designed and synthesized from levofloxacin. The chemical structures of all conjugates were confirmed by ^1H NMR, ^{13}C NMR and HR-MS spectra. The inhibitory activities of new conjugates were evaluated in an assay with a HDACs reagent kit, and their anti-tumor activities were tested in CCK-8 assay. The results showed that these new conjugates displayed potent inhibitory activity against HDACs, and the hydroxamate conjugates exhibited more potent activity than carboxylic acid and benzamide derivatives. Specifically, conjugate **5d** exhibited the most potent anti-HDAC1 ($\text{IC}_{50}=0.031\pm 0.011 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) and HDAC6 ($\text{IC}_{50}=0.019\pm 0.006 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) activities, which was more potent than SAHA. Molecular docking studies suggest that the hydroxamate group of conjugate **5d** was deeply inserted into the active site to interact with the residues in coordination with the zinc ion. Additionally,

收稿日期: 2016-11-28; 修回日期: 2017-01-24.

基金项目: 湖北技能型人才培养研究中心项目 (2016JA005).

*通讯作者 Tel: 15926364320, E-mail: ldw08397@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2016-1134

the thiazole group of conjugate **5d** also engaged in hydrogen bonding with F679 in HDAC6, which had been linked to the selectivity of the HDAC isoforms. Moreover, these conjugates displayed significant antiproliferative effects on SW620, MGC-803, PC-3, NCIH460, MCF-7 and HepG2 cells, in particular, conjugate **5d** showed the greatest potency against MGC-803 ($IC_{50}=0.7\pm 0.05 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), NCIH460 ($IC_{50}=2.3\pm 0.421 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), MCF-7 ($IC_{50}=1.6\pm 0.56 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) and HepG2 ($IC_{50}=3.9\pm 0.26 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), which was >3-fold more potent than SAHA. Additionally, all conjugates were nontoxic to health GES-1 cells, while SAHA showed some toxicity.

Key words: quinolone; histone deacetylase inhibitor; conjugate; anti-tumor activity

喹诺酮类药物 (quinolones, QNs) 是一类人工合成的具有 1,4-二氢-4-氧代喹啉-3-羧酸结构的化合物, 经过几十年的发展已成为临床上广泛使用的广谱、高效、低毒的一线抗菌药^[1]。近年来研究发现, 喹诺酮类药物除了具有抗菌活性外, 还具有抗病毒^[2]、抗贫血^[3]、抗微生物^[4]、抗肿瘤^[5,6]等多种药理活性。尤其是喹诺酮类药物的杀菌机制与现有依托泊苷、多柔比星等抗肿瘤药物杀死癌细胞的作用机制相似, 都是通过抑制拓扑异构酶 II 介导的 DNA 解旋反应来干扰 DNA 复制并导致细胞死亡^[7], 这使得喹诺酮类药物有望成为一类新型的抗肿瘤药物。事实上, 在转化喹诺酮类抗菌剂到抗肿瘤药物上已经做了大量的探索性研究^[8-11], 目前已设计合成了数百个具有抗肿瘤活性的喹诺酮类衍生物, 但遗憾的是这些化合物由于自身抗肿瘤作用弱、毒性高、生物利用度差等缺点限制了其进一步开发。因此, 寻找新的修饰方法对喹诺酮类药物进行改造, 以期得到抗肿瘤活性更强、毒性更低的衍生物具有重要的研究意义。

研究表明, 肿瘤的发生、发展与基因水平病变有着密切关系。组蛋白乙酰化转移酶 (histone acetyltransferases, HATs) 和组蛋白去乙酰化酶 (histone deacetylases, HDACs) 是调控基因转录与表达的两个关键酶家族^[12]。在癌细胞中 HDACs 过量表达使得原有基因在转录、表达中的组蛋白过度去乙酰化, 增强了组蛋白与 DNA 的结合能力, 促使核小体结构变紧, 使得一些调控细胞周期和影响细胞增殖的分子无法与 DNA 结合, 阻止基因转录, 最终导致肿瘤的发生^[13], 尤其是 HDAC1、HDAC2 和 HDAC6 这 3 种亚型在多

种肿瘤细胞中均过表达^[14-16]。组蛋白去乙酰化酶抑制剂 (histone deacetylase inhibitor, HDACi) 能够抑制肿瘤细胞内 HDACs 活性, 增加肿瘤细胞内组蛋白 N-末端赖氨酸残基的乙酰化程度, 重新活化受抑制的抑癌基因, 诱导肿瘤细胞生长阻滞、分化、凋亡^[17]。因此, HDACs 是近年来抗肿瘤研究的一个新兴靶点, HDACi 也成为国内外抗肿瘤药物研究热点。自 FDA 批准的第一个 HDACs 抑制剂伏立诺他 (SAHA) 用于治疗外周 T 细胞淋巴瘤后^[18], 已报道了数百种 HDACi, 例如将 SAHA 的苯环用 1,3,4-噻二唑修饰后, 所得化合物 (**1A**, 图 1) 仍保留了较强的 HDACs 抑制活性^[19,20]。目前报道的 HDACi 的结构大致可以分为四部分 (图 1): 表面识别区 (CAP)、连接基团 (CU)、疏水连接区 (HS) 和锌离子结合区 (ZBG)。当 HDACi 与 HDACs 相互作用后, 表面识别区位于酶催化口袋的入口处, 由于该区域的空间面积比较大, 而 HDACi 表面识别区仅占据了小部分面积^[21], 因此将 HDACi 表面识别区拼接另一抗肿瘤药物不仅有利于增强 HDACi 与酶的结合, 提高其抗癌活性, 而且构建的新化合物还可能具有双靶向性。因此, 本文拟将 HDACi 拼接到喹诺酮类药物左氧氟沙星 (化合物 **1B**, 图 1) 上来构建左氧氟沙星-HDACi 缀合物, 以期得到新型、高效、低毒的左氧氟沙星衍生物。

已有喹诺酮类药物的结构改造发现, 喹诺酮类药物 C-3 位羧基用杂环取代能够提高其抗肿瘤活性^[22,23]。因此, 本研究拟将噻二唑类 HDACi 引入到喹诺酮类药物左氧氟沙星的 C-3 位构建含有噻二唑杂环连接的左氧氟沙星-HDACi 缀合物 (合成路线 1,

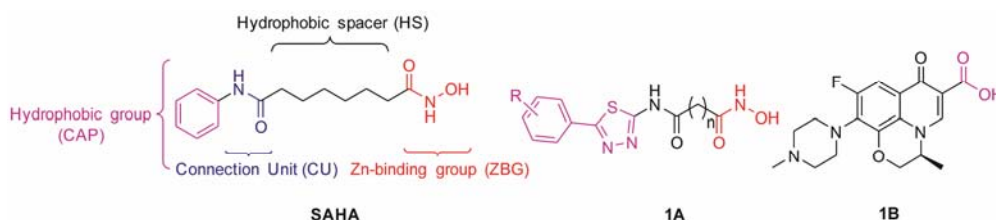
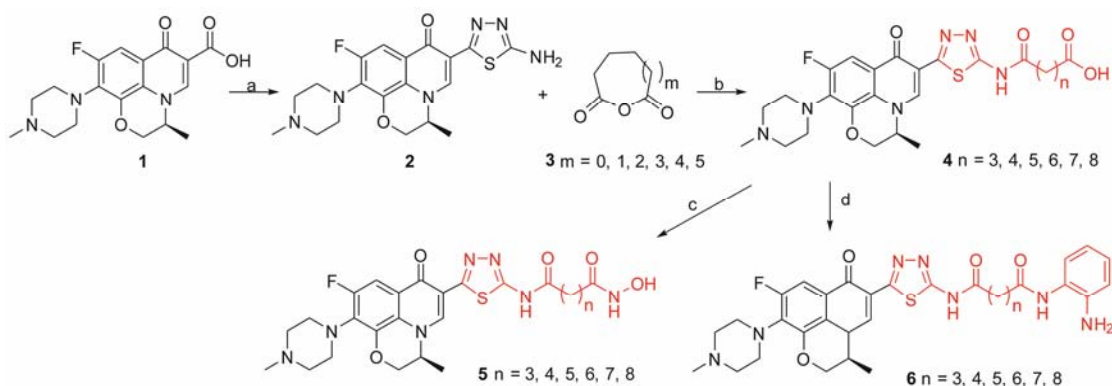


Figure 1 The structures of SAHA, thiazidazole HDACi and levofloxacin



Scheme 1 Synthetic route of levofloxacin-HDACi conjugates 4–6. Reagents and conditions: (a) Aminothiourea, polyphosphoric acid, 120 °C, 24 h; (b) THF, rt, 2 h; (c) ClCO_2Et , Et_3N , THF, 0 °C, 15 min and then $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$, KOH, MeOH, rt, 1 h; (d) (i) $(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{N}$, BOP reagent, dry DMF, 0.5 h, rt; (ii) *o*-Phenylenediamine, dry DMF, rt, 12 h

化合物 5); 同时, 为了进一步研究缀合物的构效关系, 也合成了羧酸类(缀合物 4) 和苯甲酰胺类缀合物(化合物 6)。测试了所合成的目标缀合物对 HDACs 的抑制活性和体外抗肿瘤活性。结果表明, 目标缀合物均呈现了较强的 HDACs 抑制活性和体外抗肿瘤活性, 其中脲酸类缀合物对 HDACs 的抑制活性强于羧酸和苯甲酰胺类衍生物, 尤其是脲酸缀合物 5d 对 HDAC1 和 HDAC6 的抑制活性强于阳性药物 SAHA, 并对 SW620、MGC-803、PC-3、NCIH460、MCF-7 和 HepG2 6 种肿瘤细胞抑制活性最强。

目标缀合物 4~6 的合成过程见合成路线 1。以左氧氟沙星为原料, 用多聚磷酸为脱水剂经一锅法合成 2-氨基-1,3,4-噁二唑左氧氟沙星 2, 接着与相应的酸酐 3 反应制得羧酸系列左氧氟沙星-HDACi 缀合物 4, 再用羟胺将缀合物 4 的羧基转化成异羟肟酸得到了相应的目标缀合物 5; 另一方面, 将羧酸缀合物 4 直接与邻苯二胺反应制得苯甲酰胺类目标缀合物 6。所合成的 18 个目标缀合物均未见文献报道。

结果与讨论

1 合成部分

目标缀合物的结构经 ^1H NMR、 ^{13}C NMR 和 HR-MS 分析确证。其收率、理化常数及波谱数据见表 1、2。

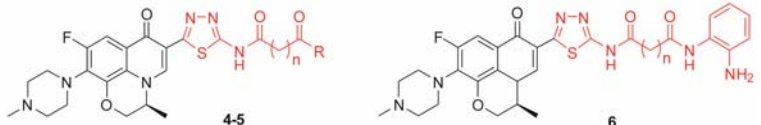
2 HDACs 抑制活性

目标缀合物对 HDACs 的抑制作用见表 3, 可以发现, 所合成的 18 个左氧氟沙星-HDACi 缀合物对 HDAC1、HDAC2 和 HDAC6 均有较强的抑制活性, 这些结果说明目标缀合物对组蛋白去乙酰化酶有较强的靶向性。从目标缀合物的结构上看, 缀合物是将左氧氟沙星取代了 SAHA 的苯环, 而在 HDACs 的酶活性口袋中 SAHA 的苯环仅占据了活性口袋入口

处的较小空间, 用左氧氟沙星取代苯环后增加了化合物与酶的相互作用。因此, 缀合物显示出了较强的 HDACs 抑制活性。但是, 缀合物 HDACi 单元的疏水连接链长度对 HDACs 的抑制活性有显著的影响。其中连接链为 6 个亚甲基 ($n=6$) 对 HDACs 抑制活性最佳, 缩短 ($n=3、4、5$) 或延长 ($n=7、8$) 链长均减弱对 HDACs 的抑制活性。例如在羧酸系列缀合物 4 中, 缀合物 4d ($n=6$) 对 HDACs 的抑制活性强于缀合物 4a ($n=3$)、4b ($n=4$)、4c ($n=5$)、4e ($n=7$) 和 4f ($n=8$), 同时这个趋势在脲酸系列和苯甲酰胺系列也存在。此外, 目标缀合物中锌离子结合基团(羧酸、脲酸、苯甲酰胺)对 HDACs 的抑制活性也有较大的影响, 其中脲酸系列缀合物 5 对 HDAC1、HDAC2 和 HDAC6 的抑制活性明显地强于相应的羧酸系列缀合物 4 和苯甲酰胺系列缀合物 6。尤其是脲酸缀合物 5d 在所有化合物中对 HDAC1、HDAC2 和 HDAC6 呈现出了最强的抑制活性, 其 IC_{50} 分别为 0.031、0.041、0.019 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 其对 HDAC1 和 HDAC6 的抑制活性略强于阳性药物 SAHA。

3 分子对接

在 HDACs 抑制实验中, 目标缀合物选择对 HDAC1 和 HDAC6 抑制活性最强的缀合物 5d 进行分子对接, 并将最佳对接构象分子用 Pymol 进行绘图, 其对接结果如图 2 所示。在 HDAC1 和 HDAC6 的口袋中, 缀合物 5d 表面识别区左氧氟沙星单元均位于活性口袋的入口处(图 2A, B), 较 SAHA 表面识别区苯环在活性口袋的入口处占据了更多的空间, 因此引入左氧氟沙星增强了 SAHA 与 HDAC1 和 HDAC6 的相互作用。同时, 缀合物 5d 的脂肪链与酶活性口袋的疏水通道壁有较强的疏水作用(图 2A, B), 并且脲酸基团能够与酶活性口袋底部的氨基酸残基以及

Table 1 Physical constants and HR-MS of synthesized compounds 4–6


Compd.	R	<i>n</i>	Yield/%	mp/°C	Physical property	HR-MS (ESI) <i>m/z</i>		
						Calcd.	Found.	Found.
4a	OH	3	69.8	199–202	Pale yellow solid	C ₂₄ H ₂₆ FN ₆ O ₅ S	[M-H] ⁻ : 529.567 4	529.567 1
4b	OH	4	73.5	206–208	Pale yellow solid	C ₂₅ H ₂₈ FN ₆ O ₅ S	[M-H] ⁻ : 543.594 4	543.593 9
4c	OH	5	74.2	211–214	Pale yellow solid	C ₂₆ H ₃₀ FN ₆ O ₅ S	[M-H] ⁻ : 557.621 4	557.621 0
4d	OH	6	68.8	219–222	Pale yellow solid	C ₂₇ H ₃₂ FN ₆ O ₅ S	[M-H] ⁻ : 571.648 4	571.647 8
4e	OH	7	71.4	227–229	Pale yellow solid	C ₂₈ H ₃₄ FN ₆ O ₅ S	[M-H] ⁻ : 585.675 4	585.675 1
4f	OH	8	73.7	234–236	Pale yellow solid	C ₂₉ H ₃₆ FN ₆ O ₅ S	[M-H] ⁻ : 599.702 4	599.701 7
5a	NHOH	3	70.5	211–213	Pale yellow solid	C ₂₄ H ₂₇ FN ₇ O ₅ S	[M-H] ⁻ : 544.582 4	544.582 1
5b	NHOH	4	68.9	216–219	Pale yellow solid	C ₂₅ H ₂₉ FN ₇ O ₅ S	[M-H] ⁻ : 558.609 4	558.608 8
5c	NHOH	5	73.4	225–227	Pale yellow solid	C ₂₆ H ₃₁ FN ₇ O ₅ S	[M-H] ⁻ : 572.636 4	572.635 8
5d	NHOH	6	68.6	231–233	Pale yellow solid	C ₂₇ H ₃₃ FN ₇ O ₅ S	[M-H] ⁻ : 586.663 4	586.662 7
5e	NHOH	7	70.2	239–242	Pale yellow solid	C ₂₈ H ₃₅ FN ₇ O ₅ S	[M-H] ⁻ : 600.690 4	600.690 2
5f	NHOH	8	69.6	245–248	Pale yellow solid	C ₂₉ H ₃₇ FN ₇ O ₅ S	[M-H] ⁻ : 614.717 4	614.717 1
6a	–	3	71.9	204–207	Pale yellow solid	C ₃₀ H ₃₄ FN ₈ O ₄ S	[M+H] ⁺ : 621.712 4	621.712 9
6b	–	4	69.5	208–211	Pale yellow solid	C ₃₁ H ₃₆ FN ₈ O ₄ S	[M+H] ⁺ : 635.739 4	635.739 7
6c	–	5	70.2	223–225	Pale yellow solid	C ₃₂ H ₃₈ FN ₈ O ₄ S	[M+H] ⁺ : 649.766 4	649.766 9
6d	–	6	68.7	236–239	Pale yellow solid	C ₃₃ H ₄₀ FN ₈ O ₄ S	[M+H] ⁺ : 663.793 4	663.794 1
6e	–	7	72.1	241–244	Pale yellow solid	C ₃₄ H ₄₂ FN ₈ O ₄ S	[M+H] ⁺ : 677.820 4	677.821 1
6f	–	8	68.5	248–251	Pale yellow solid	C ₃₅ H ₄₄ FN ₈ O ₄ S	[M+H] ⁺ : 691.847 4	691.847 9

Table 2 The NMR data of target compounds 4–6

Compd.	¹ H NMR (400 MHz, Acetone- <i>d</i> ₆)	¹³ C NMR (100 MHz, Acetone- <i>d</i> ₆)
4a	8.87 (s, 1H), 7.88 (d, <i>J</i> = 13.2 Hz, 1H), 4.58–4.69 (m, 3H), 3.25–3.37 (m, 4H), 2.56–2.64 (m, 4H), 2.41 (t, <i>J</i> = 7.2 Hz, 2H), 2.32 (s, 3H), 2.29 (t, <i>J</i> = 7.2 Hz, 2H), 1.65 (d, <i>J</i> = 7.2 Hz, 3H), 1.57–1.63 (m, 2H).	172.5 (d, ⁴ <i>J</i> _{C-F} = 2.0), 171.4, 169.5, 160.5, 157.4, 155.2 (d, ¹ <i>J</i> _{C-F} = 254.1), 143.4, 140.8 (d, ³ <i>J</i> _{C-F} = 6.1), 132.3 (d, ² <i>J</i> _{C-F} = 14.4), 124.6 (d, ⁴ <i>J</i> _{C-F} = 1.6), 122.8 (d, ³ <i>J</i> _{C-F} = 8.2), 107.5, 106.9 (d, ² <i>J</i> _{C-F} = 24.2), 68.4, 54.7, 54.3, 50.6 (d, ⁴ <i>J</i> _{C-F} = 4.1), 46.5, 36.9, 33.6, 21.8, 18.3.
4b	8.86 (s, 1H), 7.87 (d, <i>J</i> = 13.6 Hz, 1H), 4.55–4.67 (m, 3H), 3.24–3.36 (m, 4H), 2.57–2.66 (m, 4H), 2.45 (t, <i>J</i> = 6.8 Hz, 2H), 2.34 (s, 3H), 2.28 (t, <i>J</i> = 7.2 Hz, 2H), 1.67 (d, <i>J</i> = 7.2 Hz, 3H), 1.56–1.61 (m, 2H), 1.33–1.37 (m, 2H).	172.3 (d, ⁴ <i>J</i> _{C-F} = 2.4), 171.2, 168.9, 160.2, 157.1, 155.3 (d, ¹ <i>J</i> _{C-F} = 254.7), 143.1, 140.6 (d, ³ <i>J</i> _{C-F} = 6.4), 132.1 (d, ² <i>J</i> _{C-F} = 14.0), 124.5 (d, ⁴ <i>J</i> _{C-F} = 1.8), 122.9 (d, ³ <i>J</i> _{C-F} = 8.1), 107.7, 106.8 (d, ² <i>J</i> _{C-F} = 24.0), 68.1, 54.6, 54.5, 50.4 (d, ⁴ <i>J</i> _{C-F} = 4.2), 46.3, 37.2, 34.3, 26.7, 25.2, 18.3.
4c	8.84 (s, 1H), 7.87 (d, <i>J</i> = 13.2 Hz, 1H), 4.53–4.65 (m, 3H), 3.23–3.37 (m, 4H), 2.54–2.64 (m, 4H), 2.43 (t, <i>J</i> = 6.8 Hz, 2H), 2.33 (s, 3H), 2.28 (t, <i>J</i> = 6.8 Hz, 2H), 1.64–1.69 (m, 5H), 1.57–1.62 (m, 2H), 1.35–1.41 (m, 2H).	172.5 (d, ⁴ <i>J</i> _{C-F} = 2.1), 171.8, 169.4, 161.4, 157.7, 155.5 (d, ¹ <i>J</i> _{C-F} = 254.3), 143.5, 140.5 (d, ³ <i>J</i> _{C-F} = 6.1), 132.6 (d, ² <i>J</i> _{C-F} = 14.2), 124.7 (d, ⁴ <i>J</i> _{C-F} = 1.7), 122.6 (d, ³ <i>J</i> _{C-F} = 8.5), 107.8, 106.4 (d, ² <i>J</i> _{C-F} = 24.5), 68.5, 54.7, 54.4, 50.6 (d, ⁴ <i>J</i> _{C-F} = 4.1), 46.4, 37.7, 34.6, 31.5, 26.5, 25.2, 18.4.
4d	8.86 (s, 1H), 7.88 (d, <i>J</i> = 13.2 Hz, 1H), 4.53–4.67 (m, 3H), 3.21–3.36 (m, 4H), 2.52–2.63 (m, 4H), 2.45 (t, <i>J</i> = 6.8 Hz, 2H), 2.34 (s, 3H), 2.27 (t, <i>J</i> = 6.4 Hz, 2H), 1.70–1.66 (m, 2H), 1.65 (d, <i>J</i> = 7.2 Hz, 3H), 1.62–1.57 (m, 2H), 1.31–1.37 (m, 4H).	172.8 (d, ⁴ <i>J</i> _{C-F} = 2.1), 171.5, 169.4, 160.8, 157.8, 155.5 (d, ¹ <i>J</i> _{C-F} = 254.8), 143.5, 140.7 (d, ³ <i>J</i> _{C-F} = 6.2), 132.4 (d, ² <i>J</i> _{C-F} = 14.2), 124.8 (d, ⁴ <i>J</i> _{C-F} = 1.5), 122.7 (d, ³ <i>J</i> _{C-F} = 8.4), 107.9, 106.6 (d, ² <i>J</i> _{C-F} = 24.2), 68.4, 54.7, 54.3, 50.5 (d, ⁴ <i>J</i> _{C-F} = 4.4), 46.4, 37.7, 34.8, 31.7, 30.6, 29.8, 26.5, 18.1.
4e	8.88 (s, 1H), 7.86 (d, <i>J</i> = 13.6 Hz, 1H), 4.52–4.65 (m, 3H), 3.22–3.37 (m, 4H), 2.54–2.65 (m, 4H), 2.45 (m, 3H), 2.37 (s, 3H), 2.28 (m, 3H), 1.71 (t, <i>J</i> = 7.6 Hz, 2H), 1.68 (d, <i>J</i> = 6.8 Hz, 3H), 1.61 (t, <i>J</i> = 6.8 Hz, 2H), 1.30–1.39 (m, 4H).	172.8 (d, ⁴ <i>J</i> _{C-F} = 2.1), 171.8, 169.2, 160.3, 157.5, 155.2 (d, ¹ <i>J</i> _{C-F} = 254.2), 143.4, 140.7 (d, ³ <i>J</i> _{C-F} = 6.5), 132.5 (d, ² <i>J</i> _{C-F} = 14.4), 124.8 (d, ⁴ <i>J</i> _{C-F} = 1.5), 122.7 (d, ³ <i>J</i> _{C-F} = 8.0), 107.5, 106.9 (d, ² <i>J</i> _{C-F} = 24.4), 68.4, 54.7, 54.5, 50.6 (d, ⁴ <i>J</i> _{C-F} = 4.5), 46.4, 37.6, 34.4, 31.8, 31.5, 29.7, 28.4, 26.8, 18.5.
4f	8.87 (s, 1H), 7.88 (d, <i>J</i> = 13.2 Hz, 1H), 4.51–4.67 (m, 3H), 3.23–3.36 (m, 4H), 2.52–2.67 (m, 4H), 2.44 (m, 3H), 2.35 (s, 3H), 2.29 (m, 3H), 1.72 (t, <i>J</i> = 7.2 Hz, 2H), 1.67 (d, <i>J</i> = 6.4 Hz, 3H), 1.59–1.64 (m, 2H), 1.57 (t, <i>J</i> = 6.4 Hz, 2H), 1.31–1.38 (m, 4H).	172.8 (d, ⁴ <i>J</i> _{C-F} = 2.6), 171.4, 169.3, 160.5, 158.7, 155.5 (d, ¹ <i>J</i> _{C-F} = 255.2), 143.2, 140.8 (d, ³ <i>J</i> _{C-F} = 6.0), 132.5 (d, ² <i>J</i> _{C-F} = 14.4), 124.8 (d, ⁴ <i>J</i> _{C-F} = 1.7), 123.4 (d, ³ <i>J</i> _{C-F} = 8.6), 107.9, 106.7 (d, ² <i>J</i> _{C-F} = 24.3), 68.3, 54.8, 54.7, 50.6 (d, ⁴ <i>J</i> _{C-F} = 4.0), 46.5, 37.4, 34.7, 31.4, 30.7, 30.5, 29.6, 27.4, 26.3, 18.4.
5a	9.47 (s, 1H), 8.89 (s, 1H), 7.89 (d, <i>J</i> = 13.2 Hz, 1H), 4.53–4.67 (m, 3H), 3.22–3.34 (m, 4H), 2.53–2.64 (m, 4H), 2.51 (t, <i>J</i> = 7.2 Hz, 2H), 2.33 (s, 3H), 1.96 (t, <i>J</i> = 6.8 Hz, 2H), 1.68 (d, <i>J</i> = 6.8 Hz, 3H), 1.59–1.66 (m, 2H).	174.5, 173.2 (d, ⁴ <i>J</i> _{C-F} = 2.7), 171.3, 161.1, 156.8, 155.4 (d, ¹ <i>J</i> _{C-F} = 255.5), 143.6, 140.1 (d, ³ <i>J</i> _{C-F} = 6.6), 124.6 (d, ² <i>J</i> _{C-F} = 1.6), 123.1 (d, ³ <i>J</i> _{C-F} = 8.3), 131.4 (d, ² <i>J</i> _{C-F} = 14.0), 109.2, 105.2 (d, ² <i>J</i> _{C-F} = 24.1), 68.1, 54.7, 54.6, 50.7 (d, ⁴ <i>J</i> _{C-F} = 4.2), 46.6, 37.2, 33.7, 23.4, 18.2.

Compd.	¹ H NMR (400 MHz, Acetone- <i>d</i> ₆)	¹³ C NMR (100 MHz, Acetone- <i>d</i> ₆)
5b	9.51 (s, 1H), 8.87 (s, 1H), 7.89 (d, <i>J</i> = 13.2 Hz, 1H), 4.51–4.66 (m, 3H), 3.23–3.36 (m, 4H), 2.55–2.65 (m, 4H), 2.49–2.55 (m, 2H), 2.36 (s, 3H), 1.97 (t, <i>J</i> = 6.8 Hz, 2H), 1.67 (d, <i>J</i> = 7.2 Hz, 3H), 1.61–1.65 (m, 2H), 1.22–1.28 (m, 2H).	174.5, 173.2 (d, ⁴ <i>J</i> _{C-F} = 2.7), 171.3, 161.1, 156.8, 155.4 (d, ¹ <i>J</i> _{C-F} = 255.5), 143.6, 140.1 (d, ³ <i>J</i> _{C-F} = 6.6), 131.4 (d, ² <i>J</i> _{C-F} = 14.0), 124.6 (d, ⁴ <i>J</i> _{C-F} = 1.6), 123.1 (d, ³ <i>J</i> _{C-F} = 8.3), 109.2, 105.2 (d, ² <i>J</i> _{C-F} = 24.1), 68.1, 54.7, 54.6, 50.7 (d, ⁴ <i>J</i> _{C-F} = 4.2), 46.6, 37.2, 31.4, 26.4, 22.4, 18.2.
5c	9.48 (s, 1H), 8.86 (s, 1H), 7.87 (d, <i>J</i> = 13.2 Hz, 1H), 4.54–4.67 (m, 3H), 3.25–3.37 (m, 4H), 2.54–2.67 (m, 4H), 2.52 (t, <i>J</i> = 6.8 Hz, 2H), 2.35 (s, 3H), 1.96 (t, <i>J</i> = 7.2 Hz, 2H), 1.62–1.69 (m, 5H), 1.47–1.56 (m, 2H), 1.25–1.31 (m, 2H).	174.5, 173.8 (d, ⁴ <i>J</i> _{C-F} = 2.7), 171.8, 161.4, 156.2, 155.2 (d, ¹ <i>J</i> _{C-F} = 255.8), 143.3, 140.3 (d, ³ <i>J</i> _{C-F} = 6.5), 131.1 (d, ² <i>J</i> _{C-F} = 14.6), 124.7 (d, ⁴ <i>J</i> _{C-F} = 1.8), 123.4 (d, ³ <i>J</i> _{C-F} = 8.0), 109.7, 105.4 (d, ² <i>J</i> _{C-F} = 24.6), 68.2, 54.8, 54.6, 50.5 (d, ⁴ <i>J</i> _{C-F} = 4.0), 46.4, 37.5, 34.2, 26.8, 26.1, 25.3, 18.4.
5d	8.87 (s, 1H), 7.86 (d, <i>J</i> = 12.8 Hz, 1H), 4.55–4.68 (m, 3H), 3.24–3.36 (m, 4H), 2.55–2.66 (m, 4H), 2.46–2.53 (m, 2H), 2.36 (s, 3H), 1.98 (t, <i>J</i> = 6.8 Hz, 2H), 1.68 (d, <i>J</i> = 7.2 Hz, 3H), 1.63–1.67 (m, 2H), 1.46–1.54 (m, 2H), 1.22–1.34 (m, 4H).	174.2, 173.4 (d, ⁴ <i>J</i> _{C-F} = 2.2), 172.2, 161.3, 156.5, 155.6 (d, ¹ <i>J</i> _{C-F} = 255.4), 143.5, 140.2 (d, ³ <i>J</i> _{C-F} = 6.6), 131.3 (d, ² <i>J</i> _{C-F} = 14.4), 124.8 (d, ⁴ <i>J</i> _{C-F} = 1.6), 123.6 (d, ³ <i>J</i> _{C-F} = 8.4), 109.5, 105.6 (d, ² <i>J</i> _{C-F} = 24.5), 68.3, 54.7, 54.5, 50.6 (d, ⁴ <i>J</i> _{C-F} = 4.2), 46.4, 37.4, 33.2, 29.4, 27.1, 26.8, 23.6, 18.2.
5e	8.89 (s, 1H), 7.88 (d, <i>J</i> = 13.2 Hz, 1H), 4.54–4.65 (m, 3H), 3.24–3.37 (m, 4H), 2.53–2.65 (m, 4H), 2.48–2.52 (m, 3H), 2.37 (s, 3H), 1.89–1.99 (m, 3H), 1.61–1.69 (m, 5H), 1.57 (t, <i>J</i> = 6.4 Hz, 2H), 1.21–1.32 (m, 4H).	174.5, 173.2 (d, ⁴ <i>J</i> _{C-F} = 2.0), 172.1, 161.6, 156.2, 155.2 (d, ¹ <i>J</i> _{C-F} = 255.8), 143.8, 140.5 (d, ³ <i>J</i> _{C-F} = 6.1), 131.4 (d, ² <i>J</i> _{C-F} = 14.2), 124.7 (d, ⁴ <i>J</i> _{C-F} = 1.8), 123.7 (d, ³ <i>J</i> _{C-F} = 8.2), 109.6, 105.8 (d, ² <i>J</i> _{C-F} = 24.2), 68.4, 54.6, 54.4, 50.5 (d, ⁴ <i>J</i> _{C-F} = 4.0), 46.6, 37.7, 34.2, 30.6, 29.3, 28.7, 26.5, 22.9, 18.5.
5f	8.89 (s, 1H), 7.86 (d, <i>J</i> = 13.6 Hz, 1H), 4.53–4.65 (m, 3H), 3.24–3.38 (m, 4H), 2.55–2.66 (m, 4H), 2.46–2.54 (m, 3H), 2.37 (s, 3H), 1.86–1.97 (m, 3H), 1.68 (d, <i>J</i> = 7.6 Hz, 3H), 1.59–1.66 (m, 2H), 1.53–1.61 (m, 2H), 1.42–1.51 (m, 2H), 1.20–1.31 (m, 4H).	174.7, 173.6 (d, ⁴ <i>J</i> _{C-F} = 2.5), 172.3, 161.2, 156.4, 155.3 (d, ¹ <i>J</i> _{C-F} = 255.5), 143.5, 140.6 (d, ³ <i>J</i> _{C-F} = 6.5), 131.3 (d, ² <i>J</i> _{C-F} = 14.4), 124.8 (d, ⁴ <i>J</i> _{C-F} = 1.6), 123.8 (d, ³ <i>J</i> _{C-F} = 8.4), 109.7, 105.7 (d, ² <i>J</i> _{C-F} = 24.4), 68.3, 54.7, 54.6, 50.6 (d, ⁴ <i>J</i> _{C-F} = 4.4), 46.4, 37.27, 33.7, 30.2, 29.7, 28.4, 26.4, 26.1, 25.3, 18.2.
6a	8.87 (s, 1H), 7.86 (d, <i>J</i> = 13.6 Hz, 1H), 7.41 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H), 7.26 (t, <i>J</i> = 8.0 Hz, 1H), 6.96 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 1H), 6.65–6.73 (m, 1H), 4.55–4.66 (m, 3H), 3.25–3.37 (m, 4H), 2.56–2.68 (m, 4H), 2.49 (t, <i>J</i> = 6.8 Hz, 2H), 2.34 (s, 3H), 2.04 (t, <i>J</i> = 6.4 Hz, 2H), 1.67 (d, <i>J</i> = 6.8 Hz, 3H), 1.61–1.66 (m, 2H).	173.5 (d, ⁴ <i>J</i> _{C-F} = 2.3), 171.5, 168.9, 161.6, 156.7, 155.2 (d, ¹ <i>J</i> _{C-F} = 255.1), 143.1, 141.8, 140.5 (d, ³ <i>J</i> _{C-F} = 6.8), 131.3 (d, ² <i>J</i> _{C-F} = 14.4), 125.2, 124.7 (d, ⁴ <i>J</i> _{C-F} = 1.6), 123.5 (d, ³ <i>J</i> _{C-F} = 8.5), 122.9, 122.4, 119.0, 116.5, 109.8, 105.6 (d, ² <i>J</i> _{C-F} = 24.4), 68.3, 54.7, 54.6, 50.6 (d, ⁴ <i>J</i> _{C-F} = 4.1), 46.5, 37.6, 31.3, 26.7, 18.4.
6b	8.88 (s, 1H), 7.88 (d, <i>J</i> = 13.2 Hz, 1H), 7.44 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 1H), 7.25 (t, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H), 6.91–7.05 (m, 1H), 6.71 (t, <i>J</i> = 8.0 Hz, 1H), 4.53–4.67 (m, 3H), 3.22–3.37 (m, 4H), 2.53–2.67 (m, 4H), 2.51 (t, <i>J</i> = 6.8 Hz, 2H), 2.35 (s, 3H), 2.02 (t, <i>J</i> = 6.4 Hz, 2H), 1.68 (d, <i>J</i> = 7.2 Hz, 3H), 1.61–1.66 (m, 2H), 1.22–1.28 (m, 2H).	173.6 (d, ⁴ <i>J</i> _{C-F} = 2.4), 172.2, 169.7, 161.4, 156.5, 155.2 (d, ¹ <i>J</i> _{C-F} = 255.7), 143.4, 141.2, 140.4 (d, ³ <i>J</i> _{C-F} = 6.7), 131.2 (d, ² <i>J</i> _{C-F} = 14.2), 125.5, 124.8 (d, ⁴ <i>J</i> _{C-F} = 1.7), 123.3 (d, ³ <i>J</i> _{C-F} = 8.6), 122.8, 122.6, 119.4, 116.6, 109.5, 105.6 (d, ² <i>J</i> _{C-F} = 24.5), 68.4, 54.8, 54.6, 50.5 (d, ⁴ <i>J</i> _{C-F} = 4.3), 46.4, 37.2, 33.8, 26.7, 26.1, 18.2.
6c	8.88 (s, 1H), 7.87 (d, <i>J</i> = 13.2 Hz, 1H), 7.43 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 1H), 7.26 (t, <i>J</i> = 8.0 Hz, 1H), 6.93–7.01 (m, 1H), 6.69 (t, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H), 4.54–4.67 (m, 3H), 3.22–3.37 (m, 4H), 2.54–2.65 (m, 4H), 2.52 (t, <i>J</i> = 6.8 Hz, 2H), 2.33 (s, 3H), 2.01 (t, <i>J</i> = 7.6 Hz, 2H), 1.62–1.67 (m, 5H), 1.47–1.56 (m, 2H), 1.27–1.34 (m, 2H).	173.7 (d, ⁴ <i>J</i> _{C-F} = 2.4), 172.5, 169.2, 160.8, 156.6, 155.4 (d, ¹ <i>J</i> _{C-F} = 255.2), 143.1, 141.7, 140.1 (d, ³ <i>J</i> _{C-F} = 6.6), 131.3 (d, ² <i>J</i> _{C-F} = 14.5), 125.6, 124.9 (d, ⁴ <i>J</i> _{C-F} = 1.6), 123.6 (d, ³ <i>J</i> _{C-F} = 8.4), 122.9, 122.3, 119.7, 116.9, 109.7, 105.8 (d, ² <i>J</i> _{C-F} = 24.6), 68.3, 54.7, 54.6, 50.5 (d, ⁴ <i>J</i> _{C-F} = 4.1), 46.4, 37.6, 34.2, 30.1, 29.4, 26.8, 18.2.
6d	8.87 (s, 1H), 7.88 (d, <i>J</i> = 13.2 Hz, 1H), 7.45 (d, <i>J</i> = 7.6 Hz, 1H), 7.24 (t, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H), 6.95–7.03 (m, 1H), 6.72 (t, <i>J</i> = 8.0 Hz, 1H), 4.53–4.65 (m, 3H), 3.22–3.36 (m, 4H), 2.56–2.67 (m, 4H), 2.43–2.55 (m, 2H), 2.34 (s, 3H), 2.01 (t, <i>J</i> = 6.4 Hz, 2H), 1.67 (d, <i>J</i> = 6.8 Hz, 3H), 1.60–1.66 (m, 2H), 1.47–1.55 (m, 2H), 1.24–1.35 (m, 4H).	173.2 (d, ⁴ <i>J</i> _{C-F} = 2.2), 171.5, 168.6, 161.6, 156.3, 155.8 (d, ¹ <i>J</i> _{C-F} = 255.7), 143.4, 141.4, 140.5 (d, ³ <i>J</i> _{C-F} = 6.8), 131.4 (d, ² <i>J</i> _{C-F} = 14.2), 125.3, 124.9 (d, ⁴ <i>J</i> _{C-F} = 1.7), 123.5 (d, ³ <i>J</i> _{C-F} = 8.1), 122.7, 122.2, 119.4, 116.5, 109.7, 105.8 (d, ² <i>J</i> _{C-F} = 24.2), 68.2, 54.7, 54.5, 50.4 (d, ⁴ <i>J</i> _{C-F} = 4.0), 46.5, 37.7, 33.6, 30.4, 29.7, 27.3, 25.8, 18.4.
6e	8.89 (s, 1H), 7.86 (d, <i>J</i> = 13.2 Hz, 1H), 7.42 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H), 7.24 (t, <i>J</i> = 8.0 Hz, 1H), 6.96–7.04 (m, 1H), 6.65–6.74 (t, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H), 4.53–4.66 (m, 3H), 3.23–3.67 (m, 4H), 2.54–2.67 (m, 4H), 2.46–2.52 (m, 3H), 2.35 (s, 3H), 1.94–2.02 (m, 3H), 1.61–1.69 (m, 5H), 1.56 (t, <i>J</i> = 6.8 Hz, 2H), 1.23–1.36 (m, 4H).	173.6 (d, ⁴ <i>J</i> _{C-F} = 2.4), 172.7, 169.3, 161.8, 156.3, 155.5 (d, ¹ <i>J</i> _{C-F} = 255.2), 143.4, 141.4, 140.6 (d, ³ <i>J</i> _{C-F} = 6.6), 131.7 (d, ² <i>J</i> _{C-F} = 14.4), 125.4, 124.6 (d, ⁴ <i>J</i> _{C-F} = 1.9), 123.6 (d, ³ <i>J</i> _{C-F} = 8.4), 122.8, 122.4, 119.6, 116.3, 109.3, 105.9 (d, ² <i>J</i> _{C-F} = 24.1), 68.2, 54.6, 54.5, 50.4 (d, ⁴ <i>J</i> _{C-F} = 4.3), 46.5, 37.6, 34.2, 30.2, 29.7, 27.6, 26.4, 25.5, 18.3.
6f	8.89 (s, 1H), 7.89 (d, <i>J</i> = 13.2 Hz, 1H), 7.42 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H), 7.25 (t, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H), 6.94–7.03 (m, 1H), 6.71 (t, <i>J</i> = 8.0 Hz, 1H), 4.52–4.67 (m, 3H), 3.24–3.38 (m, 4H), 2.55–2.68 (m, 4H), 2.33 (s, 3H), 1.67 (d, <i>J</i> = 7.2 Hz, 3H), 2.44–2.56 (m, 3H), 1.93–2.02 (m, 3H), 1.62–1.67 (m, 2H), 1.55–1.60 (m, 2H), 1.44–1.53 (m, 2H), 1.26–1.35 (m, 4H).	173.2 (d, ⁴ <i>J</i> _{C-F} = 2.1), 172.6, 169.5, 161.4, 156.7, 155.4 (d, ¹ <i>J</i> _{C-F} = 254.8), 143.6, 141.5, 140.8 (d, ³ <i>J</i> _{C-F} = 6.7), 131.4 (d, ² <i>J</i> _{C-F} = 14.2), 125.4, 124.2 (d, ⁴ <i>J</i> _{C-F} = 1.7), 123.7 (d, ³ <i>J</i> _{C-F} = 8.1), 122.6, 122.1, 119.3, 116.5, 109.8, 105.3 (d, ² <i>J</i> _{C-F} = 24.2), 68.3, 54.7, 54.6, 50.7 (d, ⁴ <i>J</i> _{C-F} = 4.2), 46.4, 37.6, 34.1, 30.5, 29.8, 27.8, 27.3, 26.4, 25.8, 18.4.

Zn²⁺相互作用。但是, 脞酸基团与 HDAC1 和 HDAC6 活性口袋底部的氨基酸残基和锌离子的作用方式却不相同。在 HDAC1 中, 脞酸基团是与 H178 和 Y303 两个氨基酸残基相互作用形成了 3 个氢键, 并且脞酸基团的羰基 (3.3Å) 和羟基 (1.9Å) 能够与氨基酸残基 D176 (2.0Å, 2.9Å)、H178 (2.3Å)、D264 (3.0Å) 一起与 Zn²⁺形成六配位 (图 2C); 而在 HDAC6 中, 缀合物

5d 的脞酸基团与氨基酸残基 Y782 相互作用形成了两个氢键, 同时脞酸基团的羰基氧 (3.2Å) 和羟基氧 (2.5Å) 能够与氨基酸残基 D649 (2.1Å)、H651 (1.9Å)、D742 (2.7Å) 一起与 Zn²⁺形成五配位 (图 2D)。此外, 缀合物 **5d** 左氧氟沙星骨架的羰基和连接基团噻二唑的氮原子在 HDAC6 中能够分别与氨基酸残基 Y782 和 F679 形成氢键 (图 2D)。

Table 3 *In vitro* inhibition of HDAC1, HDAC2 and HDAC6. $n=3$, $\bar{x} \pm s$

Compd.	IC ₅₀ /μmol·L ⁻¹			Selectivity ratio	
	HDAC1	HDAC2	HDAC6	HDAC6/1	HDAC6/2
4a	6.2 ± 0.31	14.3 ± 1.16	5.8 ± 0.47	1.1	2.4
4b	2.8 ± 0.26	11.6 ± 0.93	2.3 ± 0.15	1.2	5.0
4c	1.7 ± 0.35	7.8 ± 0.85	1.8 ± 0.23	0.9	4.3
4d	1.4 ± 0.23	5.2 ± 0.47	1.1 ± 0.09	1.3	1.7
4e	2.2 ± 0.77	7.4 ± 0.82	1.5 ± 0.17	1.5	4.9
4f	4.3 ± 0.56	8.9 ± 0.69	3.6 ± 0.24	1.2	2.5
5a	0.142 ± 0.053	0.145 ± 0.036	0.115 ± 0.048	1.2	1.3
5b	0.103 ± 0.076	0.127 ± 0.047	0.079 ± 0.025	1.3	1.6
5c	0.065 ± 0.019	0.055 ± 0.013	0.040 ± 0.016	1.6	1.4
5d	0.031 ± 0.011	0.041 ± 0.018	0.019 ± 0.006	1.6	2.2
5e	0.078 ± 0.025	0.062 ± 0.034	0.058 ± 0.032	1.3	1.1
5f	0.096 ± 0.027	0.105 ± 0.074	0.063 ± 0.028	1.5	1.7
6a	0.203 ± 0.068	0.164 ± 0.053	0.147 ± 0.049	1.4	1.1
6b	0.152 ± 0.053	0.132 ± 0.067	0.103 ± 0.056	1.5	1.3
6c	0.076 ± 0.026	0.071 ± 0.035	0.065 ± 0.025	1.2	1.1
6d	0.054 ± 0.017	0.057 ± 0.024	0.046 ± 0.015	1.2	1.2
6e	0.084 ± 0.022	0.068 ± 0.027	0.072 ± 0.029	1.1	0.9
6f	0.113 ± 0.048	0.096 ± 0.031	0.088 ± 0.023	1.3	1.1
SAHA	0.044 ± 0.006	0.012 ± 0.005	0.036 ± 0.004	1.2	0.3

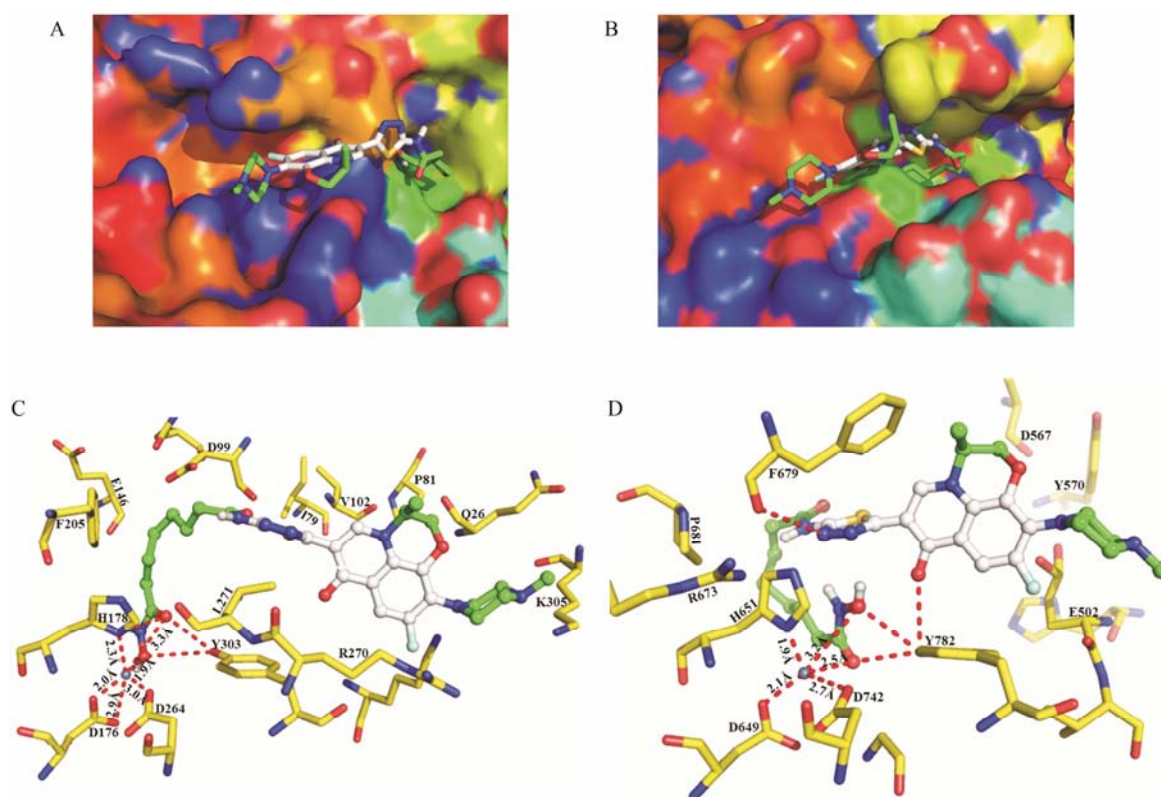


Figure 2 The predicted binding modes of compound **5d**-HDAC1 and HDAC6. (A) Molecular surface of the HDAC1 binding pocket with docked compound **5d**. (B) Molecular surface of the HDAC6 binding pocket with docked compound **5d**. (C) Docking poses of HDAC1-**5d**, which can form hydrogen bonds with residues H178, Y303, and which can coordinate the zinc ion with residues D176, H178, D264. (D) Docking poses of HDAC6-**5d**, which can form hydrogen bonds with residues F679, Y782, and which can coordinate the zinc ion with residues D649, H651, D742. Distances are given in Å

4 抗增殖活性测试

体外抗肿瘤测试结果 (表 4) 表明, 18 个目标左氧氟沙星-HDACi 缀合物对 SW620、MGC-803、PC-3、NCIH460、MCF-7 和 HepG2 这 6 种肿瘤细胞有较强的抑制作用, 其 IC_{50} 值均小于 $17.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。由于在左氧氟沙星引入了具有抗肿瘤活性的 HDAC 抑制剂 SAHA, 使得左氧氟沙星缀合物不仅能够通过抑制拓扑异构酶 II 来发挥抗肿瘤活性, 还能够通过抑制 HDACs 来发挥抗肿瘤活性, 具有双重抗肿瘤作用, 因此合成的缀合物抗肿瘤活性显著地强于先导化合物左氧氟沙星 ($IC_{50} > 67 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。同时, 这些缀合物对胃癌 MGC-803 细胞呈现出了更强的抑制活性, 如缀合物 **5b**~**5e**、**6c**~**6e** 对 MGC-803 的抑制活性强于阳性药物 SAHA, 其中缀合物 **5c**、**5d** 和 **6d** 抑制 MGC-803 的 IC_{50} 达到了 $10^{-7} \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 水平。在 HDACs 抑制活性中, 脲酸系列缀合物 (化合物 **5**) 的 HDACs 抑制活性强于羧酸类 (化合物 **4**) 和苯甲酰胺类缀合物 (化合物 **6**)。同样的, 在抗肿瘤活性中, 脲酸的缀合物 **5** 抗癌活性也强于相应的羧酸类缀合物 **4** 和苯甲酰胺类缀合物 **6**。特别是对 HDACs 有最强抑制活性的脲酸缀合物 **5d** 对 6 种肿瘤细胞也展现出了最强的抑制活性, 其对 MGC-803、NCIH460、MCF-7 和 HepG2 抑制活性是阳性药物 SAHA 的 3.1 倍以上。

但是, 与先导化合物左氧氟沙星相比, 引入 SAHA 后能明显地提高左氧氟沙星的抗肿瘤活性, 而与 SAHA 相比, 这些缀合物并没有显著地提高抗肿瘤活性。在拓扑异构酶 II 抑制活性中 (图 3), 发现这些缀合物对 TopII 仅展现出了中等的抑制活性, 因此目标缀合物通过抑制 TopII 途径来提高 SAHA 的抗肿瘤活性效果并不显著。这些结果也说明了目标缀合物的抗肿瘤活性主要源于抑制 HDACs。

从表 4 抗肿瘤活性中发现, 目标缀合物对胃癌 MGC-803 细胞有较强的抑制活性, 为了进一步评价目标缀合物的毒性, 用正常的胃黏膜上皮细胞 GES-1 作为测试细胞株来检测缀合物的毒性。从表 4 中可以发现, 总的来说这类缀合物基本没有毒性 ($IC_{50} > 81 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 而阳性药物 SAHA ($IC_{50} = 5.8 \pm 0.48 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 却展现出了一定的毒性。

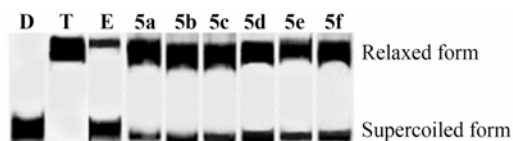


Figure 3 Human DNA Topo II inhibitory activity of conjugates **5a**–**5f** at the concentration of $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Lane D: pBR322 DNA only; Lane T: pBR322 DNA + Topo II; Lane E: pBR322 DNA + Topo II + Etoposide; Lane 4-9: pBR322 DNA + Topo II + each of compounds **5a**–**5f**

Table 4 Whole cell antiproliferative activity of target compounds. $n=3$, $\bar{x} \pm s$

Compd.	$IC_{50}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$						
	SW620	MGC-803	PC3	NCIH460	MCF-7	HepG2	GES-1
4a	13.6 ± 1.25	8.8 ± 0.73	15.3 ± 1.55	11.2 ± 2.12	11.7 ± 1.43	15.7 ± 1.74	>100
4b	10.1 ± 0.99	6.6 ± 0.47	12.7 ± 1.36	10.5 ± 1.41	9.8 ± 1.05	14.2 ± 1.55	>100
4c	8.9 ± 0.82	5.3 ± 0.36	9.6 ± 0.52	8.7 ± 1.26	8.2 ± 0.92	11.8 ± 1.31	>100
4d	6.4 ± 0.63	3.2 ± 0.23	7.2 ± 0.87	6.4 ± 0.75	6.5 ± 0.58	8.4 ± 0.86	>100
4e	9.5 ± 0.15	5.9 ± 0.44	11.5 ± 1.24	2.8 ± 0.61	9.3 ± 0.47	10.7 ± 1.19	86.7 ± 7.53
4f	12.7 ± 1.43	7.6 ± 0.81	13.9 ± 1.41	5.1 ± 0.39	10.1 ± 1.15	12.5 ± 1.52	81.5 ± 5.68
5a	11.5 ± 1.16	5.4 ± 0.73	9.6 ± 1.09	8.7 ± 1.36	6.2 ± 0.97	6.9 ± 0.85	>100
5b	8.2 ± 0.73	2.3 ± 0.47	7.5 ± 0.52	5.2 ± 1.45	3.5 ± 0.34	5.5 ± 0.66	>100
5c	6.4 ± 0.54	0.8 ± 0.45	3.7 ± 0.48	3.6 ± 0.78	1.7 ± 0.32	3.2 ± 0.43	>100
5d	3.1 ± 0.15	0.6 ± 0.05	1.5 ± 0.24	1.3 ± 0.42	0.8 ± 0.16	1.9 ± 0.26	>100
5e	7.6 ± 0.41	1.1 ± 0.23	2.4 ± 0.25	4.2 ± 0.65	2.9 ± 0.27	7.3 ± 0.49	>100
5f	9.3 ± 0.76	3.2 ± 0.18	5.3 ± 0.38	6.9 ± 0.71	5.3 ± 0.45	9.1 ± 1.14	>100
6a	11.6 ± 1.16	6.8 ± 0.52	13.3 ± 1.41	15.9 ± 1.17	9.2 ± 0.97	11.5 ± 1.56	91.1 ± 8.62
6b	9.5 ± 0.73	4.2 ± 0.31	11.6 ± 1.27	11.5 ± 1.26	6.5 ± 0.34	9.2 ± 0.87	>100
6c	6.2 ± 0.54	1.2 ± 0.36	9.8 ± 0.82	10.3 ± 0.85	4.7 ± 0.32	8.7 ± 0.62	>100
6d	5.3 ± 0.15	0.8 ± 0.27	6.2 ± 0.19	7.4 ± 0.62	1.6 ± 0.56	5.4 ± 0.46	>100
6e	8.6 ± 0.41	2.7 ± 0.45	7.1 ± 0.14	8.3 ± 0.74	2.9 ± 0.28	8.1 ± 0.73	>100
6f	11.5 ± 0.76	3.4 ± 0.42	12.4 ± 1.65	8.7 ± 0.92	5.3 ± 0.46	10.8 ± 1.17	94.7 ± 8.96
SAHA	3.2 ± 0.29	2.9 ± 0.33	1.7 ± 0.16	4.1 ± 0.37	4.4 ± 0.42	6.4 ± 0.53	5.8 ± 0.48
Levofloxacin	69.3 ± 5.89	72.5 ± 6.32	85.3 ± 7.39	>100	67.4 ± 6.51	71.8 ± 5.93	>100

5 拓扑异构酶 II 抑制活性

对体外 HDACs 抑制活性和抗肿瘤活性较好的 **5a~5f**, 采用超螺旋 pBR322 质粒 DNA 解螺旋电泳实验测试了目标化合物在 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下对拓扑异构酶 II (TopII) 的抑制活性, 以依托泊苷 (etoposide) 为阳性对照药。结果显示 (图 3), 化合物 **5a~5f** 表现出了中等的 TopII 抑制活性, 其中化合物 **5d** 对 TopII 的抑制活性强于 **5a~5c** 和 **5e~5f**, 但是低于阳性药物依托泊苷。

6 小结

通过将具有优秀抗肿瘤活性的噻二唑组蛋白去乙酰化酶抑制剂引入到左氧氟沙星中, 合成了 18 个左氧氟沙星-HDACi 缀合物。经过测试这些目标缀合物对 HDACs 的抑制活性发现, 其对 HDAC1、HDAC2 和 HDAC6 均有较强的抑制活性, 其中链长为 6 个亚甲基 ($n=6$)、锌离子结合基团为脞酸的缀合物 **5d** 展现出了最强的 HDACs 抑制活性, 其对 HDAC1 和 HDAC6 的抑制活性略强于阳性药物 SAHA。分子对接研究表明, 左氧氟沙星与 HDACi 的连接基团噻二唑对缀合物 HDAC6 选择性起着重要作用。体外抗肿瘤活性实验发现, 目标缀合物对 SW620、MGC-803、PC-3、NCIH460、MCF-7 和 HepG2 这 6 种肿瘤细胞均有较强的抑制活性, 特别是对胃癌 MGC-803 细胞有更强的抑制活性和选择性, 其中缀合物 **5d** 对 MGC-803 的抑制活性最强, 分别是先导化合物左氧氟沙星和 SAHA 的 90 和 4.8 倍; 此外, 缀合物 **5d** 对正常的胃黏膜细胞 GES-1 没有毒性, 对拓扑异构酶 II 也有抑制作用。这些结果说明将 HDACi 拼接到喹诺酮类药物上能够提高其抗肿瘤活性, 这为今后发展新型、高效、低毒的喹诺酮类抗肿瘤药物提供了新的思路。

实验部分

BrukerAM-400 Hz 型核磁共振仪 (德国 Bruker 公司); X-5 显微熔点测定仪 (上海越众设备有限公司); FA1104 电子天平 (上海上平仪器有限公司); B11-3 温度数显恒温磁力搅拌器 (上海司乐仪器有限公司); Q Exactive 高分辨质谱仪 (美国 Coring 公司); 37°C CO_2 培养箱 (美国 Thermo 公司); CKX31 型倒置显微镜 (奥林巴斯公司); ELx800 通用酶标仪 (美国 BioTek 公司)。

左氧氟沙星、伏立诺他 (vorinostat, SAHA)、多聚磷酸、氨基硫脲、BOP 试剂、邻苯二胺、盐酸羟

胺等试剂均购自百灵威科技有限公司 (质量分数 $\geq 95\%$); 实验所用的其他试剂购自国药集团化学试剂有限公司 (质量分数 $\geq 95\%$); DMEM、MEM 培养基、胎牛血清购自 Hyclone 公司; SW620、MGC-803、PC-3、NCIH460、MCF-7 和 HepG2 细胞株购自武汉大学细胞典藏中心。

1 化学合成

1.1 2-氨基-1,3,4-噻二唑左氧氟沙星 (2) 的合成 将左氧氟沙星 **1** (4.155 g, 11.5 mmol)、氨基硫脲 (1.048 g, 11.5 mmol) 和多聚磷酸 (20 mL) 混合后将反应液加热至 120°C , 反应 24 h, 将反应液冷却到室温后倒入 100 mL 的冰浴中, 用乙酸乙酯 (3×30 mL) 萃取, 有机层用无水 Na_2SO_4 干燥, 减压脱除溶剂得到粗产物, 经柱色谱纯化 (石油醚-乙酸乙酯=1:1) 得到了 2-氨基-1,3,4-噻二唑左氧氟沙星 **2**。黄色固体, 产率: 77%, mp $175\sim 177^\circ\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, Acetone- d_6) δ : 8.86 (s, 1H), 7.86 (d, $J=13.2$ Hz, 1H), 4.66~4.52 (m, 3H), 3.37~3.24 (m, 4H), 2.64~2.55 (m, 4H), 2.34 (s, 3H), 1.65 (d, $J=7.2$ Hz, 3H)。

1.2 羧酸类左氧氟沙星-HDACi 缀合物 (4) 的合成 氩气保护下, 将戊 (己、庚、辛、壬、癸) 二酸酐 **3** (2.4 mmol) 溶于无水 THF 中 (30 mL), 加入 2-氨基-1,3,4-噻二唑左氧氟沙星 **2** (1.083 g, 2.6 mmol) 后, 在室温下继续反应 2 h, 减压脱除溶剂得到粗产物, 经柱色谱纯化 (二氯甲烷-甲醇=10:1) 得到相应的羧酸类缀合物 **4**。

1.3 脞酸类左氧氟沙星-HDACi 缀合物 (5) 的合成 氩气保护下, 将羧酸化合物 **4** (1.2 mmol)、氯甲酸乙酯 (206 mg, 1.9 mmol)、三乙胺 (131 mg, 1.3 mmol) 溶解到 10 mL THF 中, 0°C 下搅拌 15 min 后向反应液中加入 10 mL 新制备的羟胺溶液, 将反应液缓慢升至室温后继续反应 2 h, 减压除去溶剂得到粗产物, 经柱色谱纯化 (二氯甲烷-甲醇=25:1~9:1) 得到了异脞酸化合物 **5**。羟胺溶液的制备: 将盐酸羟胺 (333 mg, 4.8 mmol) 和氢氧化钾 (269 mg, 4.8 mmol) 加入到甲醇 (10 mL) 中, 升温至 40°C 反应 15 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。

1.4 苯甲酰胺类左氧氟沙星-HDACi 缀合物 (6) 的合成 氩气保护下, 将羧酸缀合物 **4** (0.6 mmol)、苯并三氮唑-1-基氧基三 (二甲基氨基) 磷鎓六氟磷酸盐 (BOP 试剂, 575 mg, 1.3 mmol) 和三乙胺 (394 mg, 3.9 mmol) 溶解到无水 DMF (15 mL) 中, 室温反应

30 min 后, 加入邻苯二胺 (76 mg, 0.7 mmol), 继续反应 12 h, 向反应液中加入 20 mL 蒸馏水, 用乙酸乙酯 (3×35 mL) 萃取, 有机层用无水 Na₂SO₄ 干燥, 脱除溶剂, 经柱色谱纯化 (二氯甲烷-甲醇=25:1~9:1) 得到苯甲酰胺类缀合物 6。

2 HDACs 抑制活性实验

使用 HDAC 试剂盒测试左氧氟沙星-HDACi 缀合物对 HDAC1、HDAC2、HDAC6 的抑制活性, 以 SAHA 为阳性对照。按照 HDAC 试剂盒操作说明书在测试板中每孔加入 BSA、HDAC 荧光底物、HDAC 酶 (HDAC1、HDAC2、HDAC6) 和不同浓度的待测物, 其浓度梯度分别为: 1×10^{-10} 、 1×10^{-9} 、 1×10^{-8} 、 1×10^{-7} 、 1×10^{-6} 、 1×10^{-5} mol·L⁻¹。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 和 440 nm 波长测定每孔的荧光值, 分析实验结果, 并计算出 IC₅₀, 以此判断合成的分子探针对组蛋白去乙酰酶的靶向性。

3 分子对接

HDAC1 晶体结构 (PDB code: 4BKX) 由 Protein Data Bank 下载, HDAC6 的晶体结构目前还未解析出来, 按照参考文献以 HDAC8 晶体结构 (PDB code: 1T69) 为模板对 HDAC6 进行同源建模^[24–26]。通过 ChemBio 3D ultra 14.0 和 Autodock4.2D 中的 Ligand 模块进行小分子结构的预处理。对接软件使用 Autodock4.2D, 利用晶体结构中的配体定义口袋盒子, 对接盒子边长设置为 30 Å, 使用半经验自由能进行评价, 拉马克遗传算法循环 100 次, 其余参数保持默认。

4 抗增殖活性实验

选取结肠癌 SW620、胃癌 MGC-803、前列腺癌 PC-3、大细胞肺癌 NCIH460、乳腺癌 MCF-7 和肝癌 HepG2 细胞为测试细胞株, 正常的胃黏膜上皮细胞 GES-1 为对照细胞。以 SAHA 为阳性对照药, 采用 CCK-8 试剂盒对左氧氟沙星-HDACi 缀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, 弃去原培养液, 加入 10 μL 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 (OD) 值, 分析实验结果, 并计算出 IC₅₀。

5 拓扑异构酶 II 抑制活性实验

按 TopII 试剂盒的说明书, 将 5×complete buffer

液 (5 μL)、TopII (8 U)、pBR322 质粒 (0.25 μg) 和测试化合物 (0.2 μL, 50 μmol·L⁻¹) 用蒸馏水定容到 20 μL, 在 37 °C 下放置 20 min 后, 在反应液中继续加入 5% SDS (2 μL) 和蛋白酶 K 溶液 (2 μL, 1 mg·mL⁻¹)。将反应液在 37 °C 下继续反应 30 min, 加入 10×loading buffer 液 (2 μL) 后在 70 °C 水浴中反应 2 min, 加入 CIA (20 μL, 苯酚-氯仿-异戊醇=25:24:1), 振荡后离心, 取上清液上样, 90 V 电压进行电泳 2 h。取出凝胶后置于 UV 成像系统中成像。

References

- [1] Jiang XL, Cui YB, Cao SH. Progress in research on quinolone antibacterials [J]. Chin J Antibiot (中国抗生素杂志), 2011, 36: 255–263.
- [2] Khan IA, Siddiqui S, Rehmani S, et al. Fluoroquinolones inhibit HCV by targeting its helicase [J]. Antivir Ther, 2012, 17: 467–476.
- [3] Murray JK, Balan C, Allgeier AM, et al. Dipeptidyl-quinolone derivatives inhibit hypoxia inducible factor-1α prolyl hydroxylases-1, -2, and -3 with altered selectivity [J]. J Comb Chem, 2010, 12: 676–686.
- [4] Patel D, Kumari P, Patel N. Synthesis and biological evaluation of some thiazolidinones as antimicrobial agents [J]. Eur J Med Chem, 2012, 48: 354–362.
- [5] Li T, Gao LZ, Xie YS, et al. Synthesis and anti-proliferative activity of fluoroquinolone C-3 fused heterocyclic α,β-unsaturated ketones derived from ciprofloxacin [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2015, 50: 569–573.
- [6] Gao LZ, Xie YS, Yan Q, et al. Synthesis and anti-proliferative activity of fluoroquinolone (rhodamine unsaturated ketone) amide derivatives [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2015, 50: 1008–1012.
- [7] Katsarou ME, Efthimiadou EK, Psomas G, et al. Novel copper (II) complex of N-propyl-norfloxacin and 1,10-phenanthroline with enhanced antileukemic and DNA nuclease activities [J]. J Med Chem, 2008, 51: 470–478.
- [8] Hu GQ, Hou LL, Wang GQ, et al. Design, synthesis and antitumor activity of fluoroquinolone C-3 heterocycles: bis-oxadiazole methylsulfide derivatives derived from ciprofloxacin [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2012, 47: 1017–1022.
- [9] Wang FH, Wang K, Shen JH, et al. Design, synthesis and antiproliferative activity of 3-hydroxy-4-quinolone [J]. J China Pharm Univ (中国药科大学学报), 2014, 45: 286–292.
- [10] Shang HJ, Yan Q, Wu SM, et al. Synthesis and antitumor activity of novel oxadiazole derivatives of enrofloxacin [J].

- J Shenyang Pharm Univ (沈阳药科大学学报), 2015, 32: 604–608.
- [11] Gao Z, Tao L, Xie YS, et al. Design, synthesis, antibacterial and anti-cell proliferation activities of [1,2,4]triazino[3,4-h][1,8]naphthyridine-8-one-7-carboxylic acid derivatives [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2015, 50: 332–336.
- [12] Smith BC, Denu JM. Chemical mechanisms of histone lysine and arginine modifications [J]. Biochim Biophys Acta, 2009, 1789: 45–57.
- [13] Lai MJ, Huang HL, Pan SL, 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: 3777–3791.
- [14] Wagner FF, Olson DE, Gale JP, et al. Potent and selective inhibition of histone deacetylase 6 (HDAC6) does not require a surface-binding motif [J]. J Med Chem, 2013, 56: 1772–1776.
- [15] Lee HY, Tsai AC, Chen MC, et al. Azaindolylsulfonamides, with a more selective inhibitory effect on histone deacetylase 6 activity, exhibit antitumor activity in colorectal cancer HCT116 cells [J]. J Med Chem, 2014, 57: 4009–4022.
- [16] Tang C, Li CH, Zhang SL, et al. Novel bioactive hybrid compound dual targeting estrogen receptor and histone deacetylase for the treatment of breast cancer [J]. J Med Chem, 2015, 58: 4550–4572.
- [17] Yao YW, Yao HQ, Jiang S, et al. Progress in clinical study of histone deacetylases inhibitors as anticancer agents [J]. Chin J New Drugs (中国新药杂志), 2013, 22: 294–299.
- [18] Marks PA. Discovery and development of SAHA as an anticancer agent [J]. Oncogene, 2007, 26: 1351–1356.
- [19] Guan P, Sun F, Hou X, et al. Design, synthesis and preliminary bioactivity studies of 1,3,4-thiadiazole hydroxamic acid derivatives as novel histone deacetylase inhibitors [J]. Bioorg Med Chem, 2012, 20: 3865–3872.
- [20] Guan P, Hou X, Wang L, et al. Improved antiproliferative activity of 1,3,4-thiadiazole-containing histone deacetylase (HDAC) inhibitors by introduction of the heteroaromatic surface recognition motif [J]. Bioorg Med Chem, 2014, 22: 5766–5775.
- [21] Tan YM, Huang WY, Yu NF. Structure-activity relationships of histone deacetylase inhibitors [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2009, 44: 1072–1083.
- [22] Xie SQ, Chen YS, Wang GQ, et al. Part IV. Synthesis and antitumor evaluation of *s*-triazolothiadiazines and pyrazolo *s*-triazoles derived from ciproxacin [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2012, 47: 66–71.
- [23] Gao LZ, Xie YS, Li T, et al. Synthesis, antitumor activity and SAR of C-3 oxadiazole sulfanylacetylhydrazone-substituted fluoroquinolone analogues [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2014, 49: 1694–1698.
- [24] Itoh Y, Suzuki T, Miyata N. Isoform-selective histone deacetylase inhibitors [J]. Curr Pharm Des, 2008, 14: 529–544.
- [25] No author. Activities at the universal protein resource (UniProt) [J]. Nucleic Acids Res, 2014, 42: D191–D198.
- [26] Senger J, Melesina J, Marek M, et al. Synthesis and biological investigation of oxazole hydroxamates as highly selective histone deacetylase 6 (HDAC6) inhibitors [J]. J Med Chem, 2016, 59: 1545–1555.