

## 基于反式- $\beta$ -芳基烯丙酰四氢异喹啉母核的HDAC抑制剂: 设计、合成及其抗肿瘤活性研究

高鑫<sup>1</sup>, 韩维维<sup>1</sup>, 田诗意<sup>1</sup>, 方方<sup>1,2,3\*</sup>, 马晓东<sup>1,2,3</sup>, 柴化怡<sup>1</sup>, 韩京晶<sup>1</sup>

(1. 安徽中医药大学药学院, 安徽 合肥 230012; 2. 安徽省中医药科学院药物化学研究所, 安徽 合肥 230012;  
3. 中药研究与开发安徽省重点实验室, 安徽 合肥 230012)

**摘要:** 本研究基于前期获得的抗肿瘤反式- $\beta$ -芳基烯丙酰四氢异喹啉骨架, 设计合成了18个HDAC抑制剂(histone deacetylases inhibitors, HDACis), 并对其抗肿瘤活性评价。体外抑酶活性测试结果表明, 化合物**13d**~**13f**、**13m**~**13o**呈现出优异的HDAC1抑制活性, IC<sub>50</sub>在个位数纳摩尔或亚纳摩尔级。体外抗增殖实验结果表明, **13o**表现出显著的抗增殖活性(A549, IC<sub>50</sub> = 0.89  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; HCT116, IC<sub>50</sub> = 0.49  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 优于阳性对照 vorinostat (SAHA); 此外, 对HDAC1抑制活性最强的**13e** (IC<sub>50</sub> = 3.8 nmol·L<sup>-1</sup>)亦呈现出优良的抗增殖活性(A549, IC<sub>50</sub> = 1.74  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; HCT116, IC<sub>50</sub> = 2.43  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。Western blot实验表明, 化合物**13e**可剂量依赖性地上调A549细胞内组蛋白H3和 $\alpha$ -tubulin的乙酰化水平。这些结果表明, 化合物**13e**和**13o**具有进一步研究价值。

**关键词:** HDAC抑制剂; 四氢异喹啉; 反式- $\beta$ -芳基烯丙酰基; 抗肿瘤

中图分类号: R914 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)02-0413-10

## Structurally novel HDAC inhibitors based on the *trans*- $\beta$ -arylacryl tetrahydroisoquinoline scaffold: the design, synthesis, and anti-cancer activity

GAO Xin<sup>1</sup>, HAN Wei-wei<sup>1</sup>, TIAN Shi-yi<sup>1</sup>, FANG Fang<sup>1,2,3\*</sup>, MA Xiao-dong<sup>1,2,3</sup>,  
CHAI Hua-yi<sup>1</sup>, HAN Jing-jing<sup>1</sup>

(1. College of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China; 2. Department of Medicinal Chemistry, Anhui Academy of Chinese Medicine, Hefei 230012, China; 3. Anhui Province Key Laboratory of Research & Development of Chinese Medicine, Hefei 230012, China)

**Abstract:** In this study, a series of 18 histone deacetylases inhibitors (HDACis), derived from our in-house anti-cancer *trans*- $\beta$ -arylacryl 1, 2, 3, 4-tetrahydroisoquinoline-based scaffold, were designed, synthesized, and antitumor evaluated. HDAC1 inhibitory activity assay showed that compounds **13d-13f** and **13m-13o** demonstrated attractive enzymatic activity with IC<sub>50</sub> at single-digit nanomolar or subnanomolar level. In addition, **13o** exerted superior anti-proliferative activity (A549, IC<sub>50</sub> = 0.89  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; HCT116, IC<sub>50</sub> = 0.49  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) to that of vorinostat (SAHA). Besides, **13e**, with the most potent HDAC1 enzymatic activity (IC<sub>50</sub> = 3.8 nmol·L<sup>-1</sup>), also displayed attractive cellular activity (A549, IC<sub>50</sub> = 1.74  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; HCT116, IC<sub>50</sub> = 2.43  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ). The Western blot analysis illustrated that **13e** treatment increased the acetylation of H3 and  $\alpha$ -tubulin in a dose-dependent manner in A549 cells. In summary, **13e** and **13o** deserve further functional investigation.

**Key words:** HDAC inhibitor; tetrahydroisoquinoline; *trans*- $\beta$ -arylacryl; anti-cancer

收稿日期: 2022-09-29; 修回日期: 2022-11-03.

基金项目: 安徽省高等学校自然科学研究重点项目资助 (KJ2019A1004).

\*通讯作者 Tel: 15056913802, E-mail: ffahtcm@126.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-1083

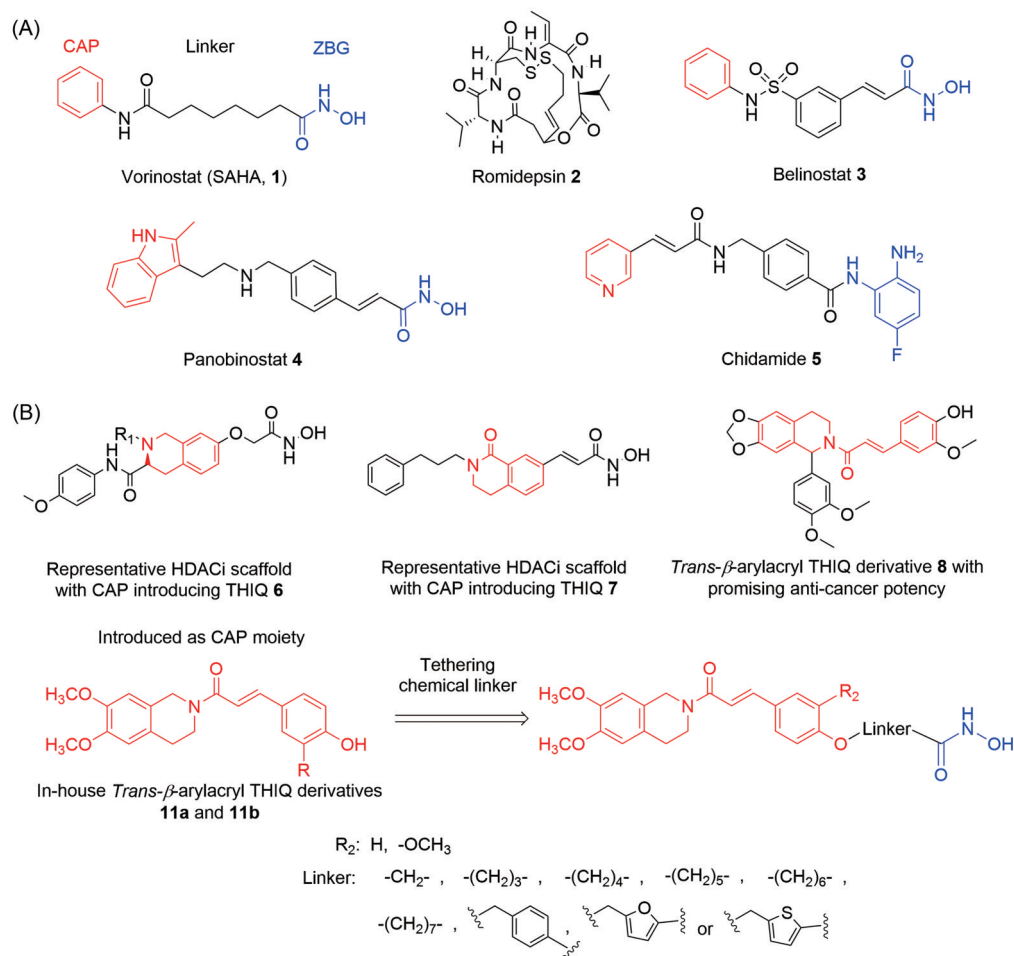
表观遗传失调与多种疾病的发生和发展密切相关<sup>[1-3]</sup>。组蛋白乙酰化/去乙酰化作为最常见的表观遗传学调控方式,在基因的翻译后修饰中起着关键作用,其动态平衡由组蛋白乙酰化转移酶 (histone acetyltransferases, HATs) 和组蛋白去乙酰化酶 (histone deacetylases, HDACs) 共同调节<sup>[4,5]</sup>。在人类恶性肿瘤中,HDAC 过度激活,组蛋白去乙酰化作用显著增强,促进组蛋白和非组蛋白的 *N* 末端赖氨酸残基脱乙酰化,继而使 DNA 与组蛋白致密结合,导致抑癌基因转录沉默<sup>[6,7]</sup>。由于其过度表达与癌症的发生发展密切相关,HDAC 被认为是临床上重要的抗癌靶标之一<sup>[8]</sup>。迄今为止,已有 5 种 HDAC 抑制剂 (histone deacetylases inhibitors, HDACis) 获批上市,用于治疗皮肤 T 细胞淋巴瘤、外周 T 细胞淋巴瘤和多发性骨髓瘤,即 vorinostat (SAHA, **1**)、romidepsin (**2**)、belinostat (**3**)、panobinostat (**4**) 和 chidamide (**5**) (图 1A)<sup>[9-12]</sup>,这充分证明了 HDAC 作为抗癌靶标的应用价值。尽管所公开的 HDACis 结构多样,但它们通常包括 3 个结构单元:与催化口袋内部 Zn<sup>2+</sup> 螯合的 Zn<sup>2+</sup> 结合基团 (ZBG)、与催

化口袋表面残基相互作用的表面识别基团 (CAP),以及连接 CAP 与 ZBG 并占据催化通道的 Linker<sup>[13-15]</sup>。

1,2,3,4-四氢异喹啉 (1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline, THIQ) 是一类重要的含氮杂环类化合物,广泛存在于多种天然产物和合成活性分子中,具有广泛的药理学作用,如抗癌、抗抑郁、抗血栓、抗炎、抗病毒等<sup>[16-18]</sup>,目前已经成为药物设计所常用的优势片段之一<sup>[19,20]</sup>。近年来,研究人员发现了许多具有潜在抗肿瘤活性的以 THIQ 为 CAP 的 HDACis,如化合物 **6** 和 **7** (图 1B)<sup>[21,22]</sup>。

反式- $\beta$ -芳基丙烯酸类化合物,如肉桂酸、对羟基肉桂酸、阿魏酸等,在诱导肿瘤细胞凋亡、分化和抑制肿瘤细胞迁移等方面具有应用价值,被广泛用于药物分子设计<sup>[23-25]</sup>。近年来,药物学家们设计合成了许多具有潜在抗癌活性的含芳基烯丙酰基的 THIQ 衍生物,如化合物 **8** (图 1B)<sup>[26]</sup>。

本研究基于课题组化合物库中两种具有体外抗肿瘤活性的反式- $\beta$ -芳基烯丙酰基 THIQ 衍生物 **11a** (A549, IC<sub>50</sub> = 6.42  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; HCT116, IC<sub>50</sub> = 5.56  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 和 **11b** (A549, IC<sub>50</sub> = 11.38  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; HCT116, IC<sub>50</sub> =



**Figure 1** (A) The approved histone deacetylases inhibitors (HDACis); (B) The design rationale of *trans*- $\beta$ -arylacrylyl tetrahydroisoquinoline (THIQ)-based HDACis

7.49  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 依据 HDACis 的结构特征, 采用骨架迁移策略, 将 **11a** 和 **11b** 通过不同 Linker 与异羟肟酸 ZBG 共价连接, 设计合成了 18 个新型 HDACis (图 1B)。在测定抑酶活性的基础上, 选择代表性化合物评价其体外抗肿瘤效果, 并开展初步的作用机制研究, 以期能够获得具有进一步研究价值的新型 HDACis。

## 结果与讨论

### 1 化合物的合成

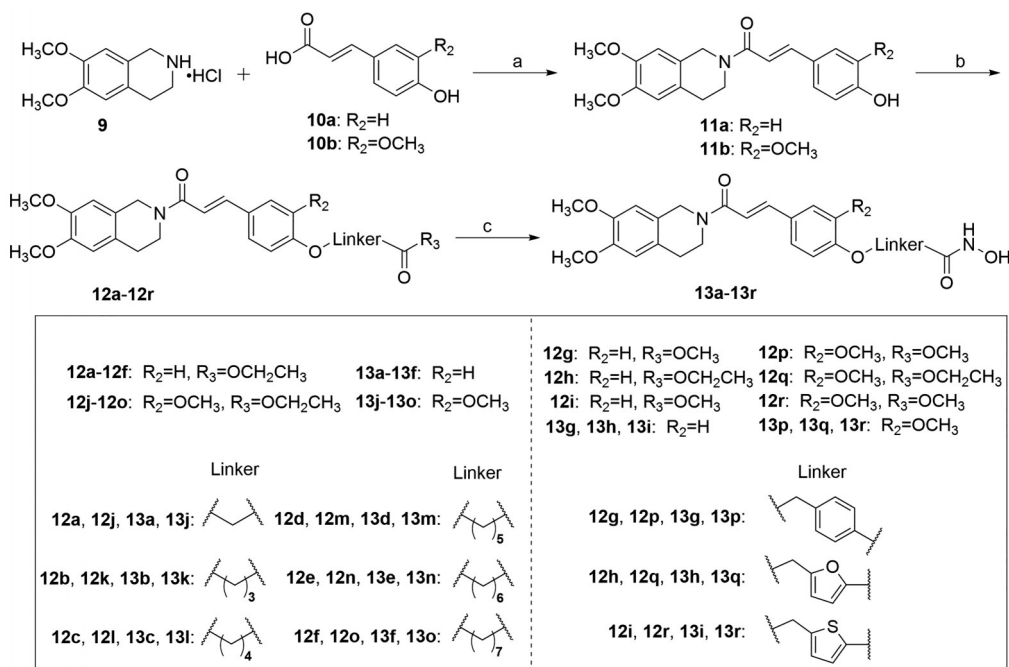
目标化合物 **13a**~**13r** 的合成路线如路线 1 所示。以 6,7-二甲氧基-1,2,3,4-四氢异喹啉盐酸盐 (**9**) 为原料, 与对羟基肉桂酸 (**10a**) 或阿魏酸 (**10b**) 缩合得到相应的反式- $\beta$ -芳基烯丙酰四氢异喹啉衍生物 (中间体 **11a** 或 **11b**), 进一步与卤代脂肪酸酯或卤甲基取代的芳酸酯进行 *O*-烷基化反应得到中间体 **12a**~**12r**, 最后经羟胺解得到目标化合物 **13a**~**13r**。目标化合物结构均经  $^1\text{H NMR}$ 、 $^{13}\text{C NMR}$  和 ESI-HR-MS 确证。

### 2 活性评价

**2.1 体外 HDAC1 抑酶活性实验** 在 11 个  $\text{Zn}^{2+}$  依赖性 HDAC 亚型中, HDAC1 被抑制可产生显著的抗增殖活性<sup>[27,28]</sup>。以上市药物 SAHA 为阳性对照, 测试目标化合物对 HDAC1 的抑酶效果。结果如表 1 所示, 化合物 **13e**~**13f**, **13m**~**13o** 对 HDAC1 表现出良好的抑制活性,  $\text{IC}_{50}$  在个数纳摩尔或亚纳摩尔水平。其中, **13e**、

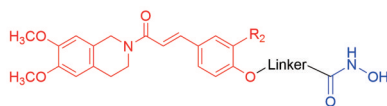
**13f**、**13n** 的  $\text{IC}_{50}$  值分别为 3.8、5.9、11  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 优于阳性对照 SAHA ( $\text{IC}_{50} = 13 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。初步构效关系显示, 连接链的结构与链长对化合物的抑酶活性具有重要影响。与亚甲(杂)芳基作为连接链的化合物 (**13g**~**13i**, **13p**~**13r**) 相比, 以饱和脂肪碳链为连接链的化合物 (**13c**~**13f**, **13m**~**13o**) 对 HDAC1 抑制活性更强。其中, 含六碳饱和脂肪链的化合物 **13e** 和 **13n** 的抑酶活性最佳, 连接链的延长或缩短均会导致活性下降, 这可能与 HDAC1 细长的催化通道有关, 碳链过长或过短都将不能很好的与活性位点底部的  $\text{Zn}^{2+}$  螯合, 从而使活性减弱。此外, 在苯丙烯酰片段的苯环上引入甲氧基会导致化合物的抑酶活性降低 (**13m** vs **13d**; **13n** vs **13e**; **13o** vs **13f**)。

**2.2 体外抗增殖活性实验** 以 SAHA 为阳性对照, 选取对 HDAC1 具有良好抑制活性的化合物 **13d**~**13f**、**13n**、**13o** ( $\text{IC}_{50} < 30 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 采用四甲基偶氮唑盐法 (MTT 比色法) 测试它们对人非小细胞肺癌 A549 细胞和人结肠癌 HCT116 细胞的体外抗肿瘤活性。结果如表 2 所示, 目标化合物对所测试肿瘤细胞均呈现出良好的增殖抑制作用,  $\text{IC}_{50}$  值在个数微摩尔或亚微摩尔级。其中, 化合物 **13o** 对两种肿瘤细胞的增殖抑制作用最强, 其  $\text{IC}_{50}$  值分别为 0.89、0.49  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 优于阳性对照 SAHA。对 HDAC1 抑制活性最强的化合物 **13e** 亦呈现出优良的抗增殖活性, 其  $\text{IC}_{50}$  值分别为 1.74、2.43  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。



Reagents and conditions: (a) EDCI, HOBT, TEA, DCM, rt; (b) Bromide-substituted alkyl carboxylic ester or halomethyl substituted aryl carboxylic ester,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , KI, DMF, 110  $^\circ\text{C}$ ; (c) Hydroxylamine hydrochloride, KOH, MeOH, 0  $^\circ\text{C}$  to rt.

**Scheme 1** Synthetic route of target compounds **13a**~**13r**

**Table 1** The histone deacetylases 1 (HDAC1) inhibitory activity of target compounds. SAHA: Vorinostat

Compd.	R <sub>2</sub>	Linker	HDAC1 IC <sub>50</sub> /nmol·L <sup>-1</sup>	Compd.	R <sub>2</sub>	Linker	HDAC1 IC <sub>50</sub> /nmol·L <sup>-1</sup>
13a	H	CH <sub>2</sub>	958	13j	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub>	>5 000
13b	H	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub>	937	13k	OCH <sub>3</sub>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub>	916
13c	H	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	112	13l	OCH <sub>3</sub>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	552
13d	H	(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub>	26	13m	OCH <sub>3</sub>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub>	82
13e	H	(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub>	3.8	13n	OCH <sub>3</sub>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub>	11
13f	H	(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub>	5.9	13o	OCH <sub>3</sub>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub>	21
13g	H		173	13p	OCH <sub>3</sub>		272
13h	H		2 651	13q	OCH <sub>3</sub>		>5 000
13i	H		507	13r	OCH <sub>3</sub>		295
SAHA			13				

**Table 2** The anti-proliferative activity of some target compounds

Compd.	A549		HCT116	
	IC <sub>50</sub> /μmol·L <sup>-1</sup>	IC <sub>50</sub> /μmol·L <sup>-1</sup>	IC <sub>50</sub> /μmol·L <sup>-1</sup>	IC <sub>50</sub> /μmol·L <sup>-1</sup>
13d	3.73 ± 0.16	1.18 ± 0.11		
13e	1.74 ± 0.10	2.43 ± 0.16		
13f	2.95 ± 0.3	3.46 ± 0.23		
13n	2.26 ± 0.18	1.23 ± 0.08		
13o	0.89 ± 0.07	0.49 ± 0.03		
11a	6.42 ± 0.51	5.56 ± 0.38		
11b	11.38 ± 1.05	7.49 ± 0.42		
SAHA	1.33 ± 0.09	0.77 ± 0.06		

**2.3 体外 HDAC6 抑酶活性实验** HDAC1 和 HDAC6 的抑制活性的差异反映了 HDAC 亚型选择性<sup>[29,30]</sup>。为了初步评价目标化合物的 HDAC 亚型选择性, 选取以饱和脂肪碳链作为连接链的化合物 **13e**、**13n**、**13o**, 以及亚甲基(杂)芳基作为连接链的化合物 **13p**、**13q**, 测试它们对 HDAC6 的抑制活性。结果如表 3 所示, 饱和脂肪碳链作为连接链的化合物 **13e**、**13n**、**13o** 对 HDAC1/HDAC6 均呈现出显著的抑制活性 (HDAC1, IC<sub>50</sub> < 21 nmol·L<sup>-1</sup>; HDAC6, IC<sub>50</sub> < 14 nmol·L<sup>-1</sup>), 与 SAHA 相当或略优。亚甲基(杂)芳基作为连接链的化合物 **13p**、**13q** 对 HDAC6 呈现出选择性抑制作用, 与已报道的 HDAC6 选择性抑制剂结构特征一致<sup>[31-35]</sup>。

**2.4 体外 HDAC8 和 HDAC11 抑酶活性实验** 为进一步验证目标化合物的亚型选择性, 以 HDAC8、HDAC11 分别作为 Class I HDACs、Class IV HDACs 的代表, 补

**Table 3** HDAC6 inhibitory activity of some target compounds

Compd.	HDAC6		Compd.	HDAC6	
	IC <sub>50</sub> /nmol·L <sup>-1</sup>	IC <sub>50</sub> /nmol·L <sup>-1</sup>		IC <sub>50</sub> /nmol·L <sup>-1</sup>	IC <sub>50</sub> /nmol·L <sup>-1</sup>
13e	7.4		13p	9.2	
13n	9.3		13q	278	
13o	14		SAHA	13	

充测试了代表性化合物 **13e**、**13o** 及 **13p** 对此两种 HDAC 亚型的抑制活性。结果如表 4 所示, 化合物 **13e** 对 HDAC1/HDAC6/HDAC8/HDAC11 的抑制活性均强于 SAHA, 表明其与 SAHA 同属于 HDAC 泛抑制剂。化合物 **13p** 对 HDAC1/HDAC8/HDAC11 无抑制活性或活性较弱, 但对 HDAC6 呈现出显著的抑制活性 (IC<sub>50</sub> = 9.2 nmol·L<sup>-1</sup>), 提示该化合物可能为 HDAC6 选择性抑制剂, 这为进一步基于 **13p** 设计新型选择性 HDACis 提供了基础。

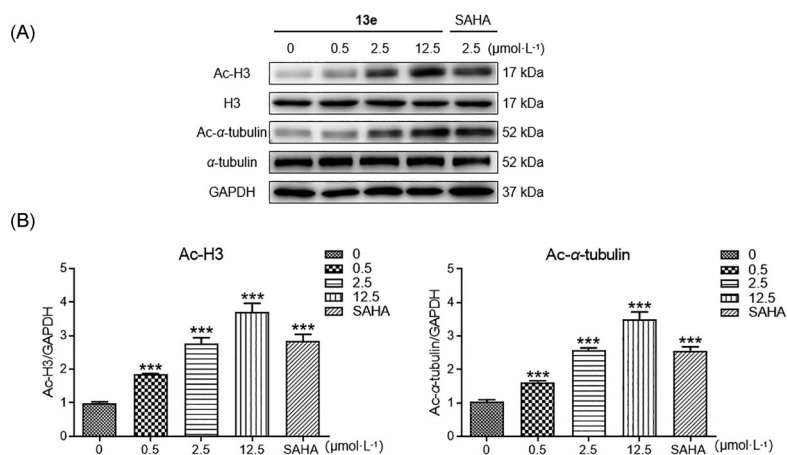
**Table 4** HDAC1/HDAC6/HDAC8/HDAC11 inhibitory activity of some target compounds

Compd.	HDAC1	HDAC6	HDAC8	HDAC11
	IC <sub>50</sub> /nmol·L <sup>-1</sup>	IC <sub>50</sub> /nmol·L <sup>-1</sup>	IC <sub>50</sub> /nmol·L <sup>-1</sup>	IC <sub>50</sub> /nmol·L <sup>-1</sup>
13e	3.8	7.4	72	979
13o	21	14	298	1 150
13p	272	9.2	>5 000	4 695
SAHA	13	13	161	>5 000

**2.5 Western blot 实验** 进一步选择化合物 **13e**, 通过 Western blot 实验考察了其对 A549 细胞中 HDAC 的底物组蛋白 H3 和 α-微管蛋白 (α-tubulin) 乙酰化水平表达的影响。结果如图 2A、B 所示, 在低至 0.5 μmol·L<sup>-1</sup> 的浓度下, **13e** 即可显著上调 H3 和 α-tubulin 的乙酰化水平, 且具剂量依赖性。化合物对 H3 和 α-tubulin 的乙酰化水平的影响, 反映出其在细胞内作用于 HDAC 靶点。

### 3 分子对接实验

基于已报道的配体/HDAC1 (PDB ID: 5ICN) 共晶结构<sup>[36]</sup>定义结合位点, 将目标化合物分别与其进行分子对接, 以深入讨论该系列化合物构效关系。对接结果表明, 以烷基链为连接链的 **13b**~**13f** 显示出类似的结合模式, 均能够较好地占据受体蛋白的活性口袋: 它



**Figure 2** (A) Western blot analysis of Ac-H3 and Ac- $\alpha$ -tubulin after treatment of A549 cells with **13e** and SAHA; (B) The results of Western blot analysis were displayed as folds of GAPDH with the bar chart indicating the quantification of the grayness of the bands. (\*\*\*)  $P < 0.001$  vs  $0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )

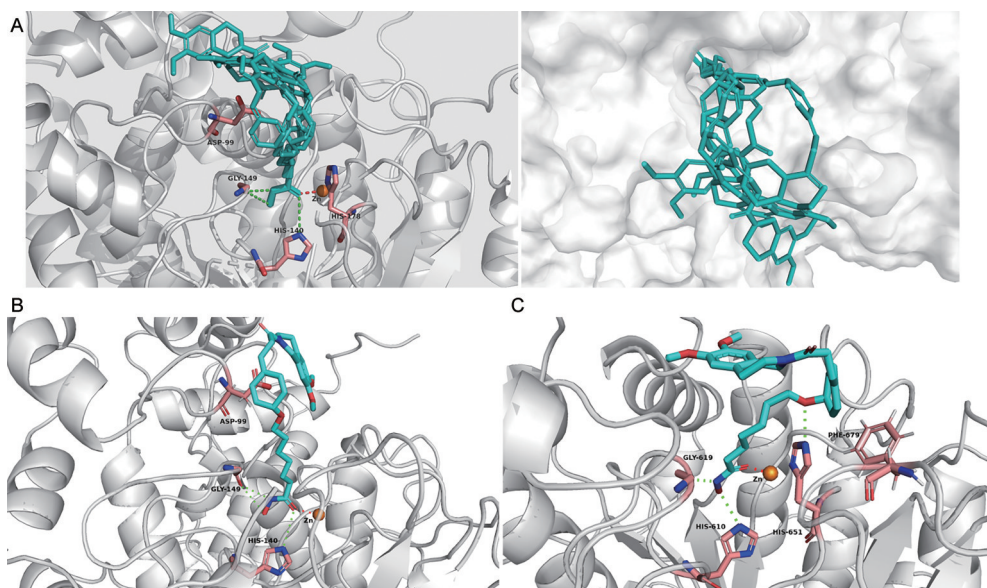
们通过单齿配位, 螯合活性口袋底部的  $\text{Zn}^{2+}$  辅因子; 以氢键与受体蛋白极性区的氨基酸残基 His140、GLY149 产生相互作用; 此外, 通过  $\pi$ -烷基作用与受体蛋白表面结合 (图 3A)。其中, 化合物 **13e** 与 HDAC1 的亲合性最强 (图 3B), 连接链的延长或缩短 (**13b**~**13d**、**13f**) 均会导致与受体蛋白的亲合力下降, 其原因可能是 **13e** 的连接链长度更适于分子末端的异羟肟酸螯合  $\text{Zn}^{2+}$  辅因子, 而碳链过长或过短则不利于化合物与  $\text{Zn}^{2+}$  形成配位, 致使活性减弱, 这与 HDAC1 抑酶实验结果相一致。在本研究所采用的分子对接条件下, 连接链含苯基或杂芳基的化合物 **13g**~**13i** 均未得到结合构象。

为进一步揭示化合物与靶蛋白的可能结合模式, 选取配体/HDAC6 (PDB ID: 5EDU) 共晶结构<sup>[37]</sup>作为受

体蛋白, 将化合物 **13e** 进行进一步分子对接研究。对接结果表明, **13e** 的六碳饱和脂肪链连接链可顺利进入靶蛋白的催化通道, CAP 单元可与 HDAC6 的疏水蛋白表面形成良好的堆积作用; **13e** 中羟肟酸基团亦可与 HDAC6 蛋白活性口袋底部的  $\text{Zn}^{2+}$  螯合, 并与 His610、Gly619 形成氢键相互作用, 且其 Linker 中 O 原子可与 His651 形成氢键相互作用 (图 3C)。分子模拟对接结果显示, 化合物 **13e** 与 HDAC6 亦能较好结合, 与其对两种亚型均有显著抑制活性的抑酶实验结果相吻合。

#### 4 小结

本研究基于前期获得的抗肿瘤反式- $\beta$ -芳基烯丙酰 THIQ 骨架, 设计合成了 18 个新型 HDACis, 并对其抗肿瘤活性评价。体外抑酶活性测试结果表明, 化



**Figure 3** (A) Superposition of the docking position of **13b**–**13f** in the HDAC1 active site; (B) Docking of **13e** into HDAC1 active site; (C) Docking of **13e** into HDAC6 active site (H-bond, green; coordination, red)

合物 **13d**~**13f**、**13m**~**13o** 呈现出优异的 HDAC1 抑制活性,  $IC_{50}$  在个位数纳摩尔或亚纳摩尔级。体外抗增殖实验结果表明, **13o** 表现出显著的抗增殖活性, 优于阳性对照 SAHA; 此外, 对 HDAC1 抑制活性最强的 **13e** 亦呈现出优良的抗增殖活性。Western blot 实验表明, 化合物 **13e** 可剂量依赖性地上调 A549 细胞内组蛋白 H3 和  $\alpha$ -tubulin 的乙酰化水平。总之, 化合物 **13e** 和 **13o** 具有进一步研究价值, 这为今后研究和开发高效、低毒和良好选择性的 HDACis 奠定基础。

## 实验部分

核磁共振波谱仪为 Bruker 400 MHz (瑞士 Bruker 公司); 高分辨质谱为 AB SCIEX x500r (美国 SCIEX 公司); 熔点仪为 WRS-1B 数字熔点仪 (未校正, 上海仪电物理光学仪器有限公司); 实验所售试剂均为市售化学纯或分析纯产品, 反应溶剂经过干燥处理, 其余未经纯化直接使用。

### 1 化合物合成

**1.1 中间体 11a~11b 的合成** 将原料 **10a**~**10b** (8.0 mmol)、1-乙基-(3-二甲氨基丙基)碳酰二胺盐酸盐 (EDCI, 9.6 mmol)、1-羟基苯并三唑 (HOBt, 9.6 mmol) 和 40 mL 二氯甲烷依次加入 100 mL 圆底烧瓶中, 室温搅拌 0.5 h, 然后加入 6,7-二甲氧基-1,2,3,4-四氢异喹啉盐酸盐 (**9**, 8.0 mmol)、三乙胺 (24.0 mmol), 搅拌反应过夜。TLC 监测反应完全, 反应液依次用饱和  $NaHCO_3$  溶液、水、饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压浓缩, 硅胶柱色谱纯化 [ $V$ (石油醚): $V$ (乙酸乙酯) = 2:1], 得白色固体, 产率 79%~83%。

**1.2 中间体 12a~12r 的合成** 将中间体 **11a**~**11b** (1.1 mmol)、 $K_2CO_3$  (2.7 mmol) 和 DMF (15 mL) 依次加入 100 mL 三口烧瓶中, 110 °C 下搅拌反应 0.5 h 后, 加入溴乙酸乙酯 (1.4 mmol) 和碘化钾 (0.1 mmol), 110 °C 搅拌过夜。TLC 监测反应完全, 过滤, 向滤液中倾入水, 二氯甲烷萃取, 合并有机相, 有机相采用饱和食盐水洗涤、无水硫酸钠干燥、抽滤, 滤液减压浓缩, 硅胶柱色谱纯化 [ $V$ (石油醚): $V$ (乙酸乙酯) = 2:1], 得黄色油状物, 产率 42%~61%。

**1.3 化合物 13a~13r 的合成** 羟胺甲醇溶液的制备: 在冰浴条件下, 将 KOH (2.00 g, 35.7 mmol) 的甲醇溶液 (5 mL) 逐滴加入到  $NH_2OH \cdot HCl$  (1.65 g, 23.8 mmol) 的甲醇溶液 (8.5 mL) 中, 搅拌 0.5 h 后, 过滤, 所得滤液即为羟胺甲醇溶液。将中间体 **12a**~**12r** (0.4 mmol) 和新鲜羟胺溶液 (3.5 mL) 加入到 50 mL 圆底烧瓶中, 室温搅拌 4 h。TLC 监测反应完全, 反应液减压浓缩, 用 5% 盐酸调节 pH 值至 7~8, 析出固体, 抽滤, 滤饼用少量水

洗涤, 收集滤饼, 硅胶柱色谱纯化 [ $V$ (二氯甲烷): $V$ (甲醇) = 50:1], 产率 37%~64%。

**13a** 淡红色固体, 产率 46%, mp 153.1~155.0 °C。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz,  $DMSO-d_6$ ):  $\delta$  10.97 (s, 1H), 9.03 (s, 1H), 7.70 (d,  $J$  = 7.8 Hz, 2H), 7.51~7.46 (m, 1H), 7.24~7.14 (m, 1H), 6.99 (d,  $J$  = 7.1 Hz, 2H), 6.82 (s, 1H), 6.76 (s, 1H), 4.53 (s, 2H), 3.87 (s, 2H), 3.76 (s, 3H), 3.72 (s, 3H), 3.63 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 2H), 2.80~2.65 (m, 2H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz,  $DMSO-d_6$ ):  $\delta$  165.06, 164.06, 158.92, 147.41, 141.20, 141.11, 129.60, 128.46, 126.16, 125.44, 116.16, 114.91, 111.94, 110.07, 65.87, 55.55, 55.52, 43.96, 42.90, 28.79; ESI-HR-MS:  $m/z$   $C_{22}H_{24}N_2O_6$  [M+H]<sup>+</sup> 计算值 413.171 2, 测量值 413.170 0。

**13b** 白色固体, 产率 55%, mp 162.3~164.3 °C。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz,  $DMSO-d_6$ ):  $\delta$  10.43 (s, 1H), 8.72 (s, 1H), 7.68 (d,  $J$  = 7.5 Hz, 2H), 7.48 (d,  $J$  = 15.2 Hz, 1H), 7.18 (d,  $J$  = 15.2 Hz, 1H), 6.96 (d,  $J$  = 7.9 Hz, 2H), 6.82 (s, 1H), 6.76 (s, 1H), 4.81 (s, 1H), 4.63 (s, 1H), 4.00 (t,  $J$  = 5.8 Hz, 2H), 3.72 (s, 6H), 3.32 (m, 2H), 2.79~2.67 (m, 2H), 2.13 (t,  $J$  = 7.0 Hz, 2H), 1.97~1.92 (m, 2H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz,  $DMSO-d_6$ ):  $\delta$  169.06, 165.57, 160.21, 147.86, 147.79, 141.82, 130.16, 128.27, 126.92, 125.72, 115.16, 112.43, 110.53, 105.74, 67.45, 56.01, 55.48, 44.42, 43.32, 29.24, 29.15, 25.22; ESI-HR-MS:  $m/z$   $C_{24}H_{28}N_2O_6$  [M+H]<sup>+</sup> 计算值 441.202 5, 测量值 441.201 4。

**13c** 红色固体, 产率 64%, mp 168.6~170.3 °C。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz,  $DMSO-d_6$ ):  $\delta$  10.38 (s, 1H), 8.70 (s, 1H), 7.68 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 2H), 7.48 (d,  $J$  = 15.3 Hz, 1H), 7.18 (d,  $J$  = 15.3 Hz, 1H), 6.96 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 2H), 6.82 (s, 1H), 6.76 (s, 1H), 4.81 (s, 1H), 4.64 (s, 1H), 4.01 (t,  $J$  = 5.9 Hz, 2H), 3.94~3.84 (m, 2H), 3.73 (s, 6H), 2.81~2.72 (m, 2H), 2.03 (t,  $J$  = 7.0 Hz, 2H), 1.71~1.63 (m, 4H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz,  $DMSO-d_6$ ):  $\delta$  169.41, 165.45, 160.12, 147.81, 147.75, 141.90, 129.97, 128.15, 126.58, 125.86, 116.09, 115.10, 112.30, 110.42, 67.65, 55.93, 55.84, 44.41, 43.33, 32.35, 29.26, 28.58, 22.23; ESI-HR-MS:  $m/z$   $C_{25}H_{30}N_2O_6$  [M+H]<sup>+</sup> 计算值 455.218 2, 测量值 455.207 4。

**13d** 红色固体, 产率 51%, mp 176.9~179.1 °C。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz,  $DMSO-d_6$ ):  $\delta$  10.35 (s, 1H), 8.67 (s, 1H), 7.68 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 2H), 7.48 (d,  $J$  = 15.2 Hz, 1H), 7.18 (d,  $J$  = 15.2 Hz, 1H), 6.96 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 2H), 6.82 (s, 1H), 6.76 (s, 1H), 4.81 (s, 1H), 4.63 (s, 1H), 4.00 (t,  $J$  = 6.4 Hz, 2H), 3.73 (s, 6H), 3.34 (s, 2H), 2.80~2.67 (m, 2H), 1.98 (t,  $J$  = 7.3 Hz, 2H), 1.74~1.70 (m, 2H), 1.58~

1.53 (m, 2H), 1.41~1.38 (m, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  169.48, 165.56, 160.33, 147.82, 147.72, 141.89, 130.19, 128.13, 126.58, 125.87, 116.07, 115.07, 112.30, 110.42, 67.94, 55.93, 55.82, 44.41, 43.34, 32.68, 29.26, 28.85, 25.63, 25.38; ESI-HR-MS:  $m/z$   $\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_6$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  计算值 469.233 8, 测量值 469.232 1。

**13e** 淡红色固体, 产率 40%, mp 185.2~186.7 °C。 $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  10.44 (s, 1H), 8.71 (s, 1H), 7.67 (d,  $J = 7.9$  Hz, 2H), 7.47 (d,  $J = 15.2$  Hz, 1H), 7.17 (d,  $J = 15.2$  Hz, 1H), 6.95 (d,  $J = 8.1$  Hz, 2H), 6.81 (s, 1H), 6.75 (s, 1H), 4.81 (s, 1H), 4.63 (s, 1H), 3.99 (t,  $J = 6.2$  Hz, 2H), 3.87 (d,  $J = 6.9$  Hz, 2H), 3.72 (s, 6H), 2.81~2.70 (m, 2H), 1.97 (t,  $J = 7.1$  Hz, 2H), 1.72~1.68 (m, 2H), 1.53~1.49 (m, 2H), 1.40~1.36 (m, 2H), 1.31~1.26 (m, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  169.59, 165.51, 160.35, 148.30, 147.85, 141.92, 130.27, 128.11, 127.68, 125.84, 120.71, 115.09, 112.30, 110.65, 67.98, 55.94, 55.83, 44.38, 43.26, 32.67, 30.43, 28.99, 28.81, 25.71, 25.55; ESI-HR-MS:  $m/z$   $\text{C}_{27}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_6$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  计算值 483.249 5, 测量值 483.247 5。

**13f** 红色固体, 产率 51%, mp 190.9~192.6 °C。 $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  8.39 (s, 1H), 7.68 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H), 7.48 (d,  $J = 15.3$  Hz, 1H), 7.18 (d,  $J = 15.3$  Hz, 1H), 6.96 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H), 6.82 (s, 1H), 6.76 (s, 1H), 4.81 (s, 1H), 4.64 (s, 1H), 4.00 (t,  $J = 6.5$  Hz, 2H), 3.88 (t,  $J = 6.8$  Hz, 2H), 3.73 (s, 6H), 2.81~2.66 (m, 2H), 1.95 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2H), 1.79~1.63 (m, 2H), 1.58~1.45 (m, 2H), 1.43~1.36 (m, 2H), 1.35~1.29 (m, 2H), 1.28~1.22 (m, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  169.58, 165.52, 160.36, 147.85, 147.78, 141.88, 130.19, 128.11, 126.85, 125.87, 116.06, 115.08, 112.31, 110.42, 68.01, 55.94, 44.40, 43.37, 32.70, 29.24, 29.06, 28.99, 28.95, 25.87, 25.53; ESI-HR-MS:  $m/z$   $\text{C}_{28}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_6$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  计算值 497.265 1, 测量值 497.266 0。

**13g** 白色固体, 产率 54%, mp 159.0~160.8 °C。 $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  7.94 (d,  $J = 8.1$  Hz, 2H), 7.70 (d,  $J = 8.1$  Hz, 2H), 7.52 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H), 7.46 (s, 1H), 7.23~7.16 (m, 1H), 7.06 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H), 6.81 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 6.76 (s, 1H), 5.23 (s, 2H), 4.81 (s, 1H), 4.63 (s, 1H), 3.90 (s, 2H), 3.73 (s, 6H), 2.80~2.72 (m, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  164.41, 159.76, 147.81, 147.75, 141.77, 140.47, 132.73, 130.32, 130.20, 128.63, 128.59, 127.87, 127.60, 126.80, 125.85, 116.45, 115.53, 112.30, 110.43, 69.13, 55.95, 46.78, 44.43, 29.26; ESI-HR-MS:  $m/z$   $\text{C}_{28}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_6$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  计算

值 489.202 5, 测量值 489.200 5。

**13h** 白色固体, 产率 38%, mp 115.1~116.4 °C。 $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  11.21 (s, 1H), 9.12 (s, 1H), 7.71 (d,  $J = 7.8$  Hz, 2H), 7.64 (d,  $J = 8.6$  Hz, 1H), 7.49 (d,  $J = 16.0$  Hz, 1H), 7.21 (d,  $J = 16.0$  Hz, 1H), 7.09 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H), 7.04 (d,  $J = 9.0$  Hz, 1H), 6.83 (d,  $J = 7.7$  Hz, 1H), 6.74 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H), 6.62~6.40 (m, 1H), 5.16 (s, 2H), 4.81 (s, 1H), 4.63 (s, 1H), 3.76 (s, 3H), 3.72 (s, 3H), 3.67~3.57 (m, 2H), 2.79~2.67 (m, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  165.06, 158.87, 156.14, 151.80, 147.41, 146.47, 141.18, 129.71, 128.40, 126.17, 125.44, 116.19, 114.97, 113.53, 112.14, 111.93, 110.05, 61.61, 55.54, 55.51, 43.95, 42.90, 28.78; ESI-HR-MS:  $m/z$   $\text{C}_{26}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_7$   $[\text{M}-\text{H}]^-$  计算值 477.166 2, 测量值 477.165 1。

**13i** 淡红色固体, 产率 42%, mp 148.5~150.2 °C。 $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  11.27 (s, 1H), 9.17 (s, 1H), 7.71 (d,  $J = 7.5$  Hz, 1H), 7.51 (d,  $J = 6.3$  Hz, 2H), 7.42~7.32 (m, 1H), 7.19 (d,  $J = 15.0$  Hz, 1H), 7.08~7.04 (m, 1H), 7.00 (s, 1H), 6.80 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 6.76 (s, 1H), 5.38 (d,  $J = 8.9$  Hz, 2H), 4.81 (s, 1H), 4.63 (s, 1H), 3.72 (s, 6H), 3.68~3.54 (m, 2H), 2.80~2.67 (m, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  165.18, 161.94, 153.33, 147.85, 147.45, 141.21, 132.41, 132.40, 129.82, 129.70, 129.12, 129.06, 127.82, 126.73, 120.30, 115.18, 111.91, 110.16, 64.46, 55.57, 55.52, 42.74, 40.98, 29.01; ESI-HR-MS:  $m/z$   $\text{C}_{26}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}$   $[\text{M}-\text{H}]^-$  计算值 493.143 4, 测量值 493.144 0。

**13j** 白色固体, 产率 56%, mp 123.9~125.8 °C。 $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  10.77 (s, 1H), 9.01 (s, 1H), 7.48 (d,  $J = 15.3$  Hz, 1H), 7.41 (s, 1H), 7.23 (d,  $J = 9.7$  Hz, 1H), 7.19 (d,  $J = 15.3$  Hz, 1H), 6.94 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H), 6.82 (d,  $J = 10.6$  Hz, 1H), 6.77 (s, 1H), 4.82 (s, 1H), 4.65 (s, 1H), 4.47 (s, 2H), 3.86 (s, 3H), 3.74 (s, 3H), 3.73 (s, 3H), 3.31 (s, 2H), 2.84~2.70 (m, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  165.57, 165.40, 164.58, 160.02, 149.66, 149.18, 147.90, 147.76, 142.22, 129.47, 126.59, 125.73, 122.54, 117.13, 113.87, 112.32, 111.31, 110.31, 66.92, 56.19, 55.93, 44.44, 43.20, 29.31; ESI-HR-MS:  $m/z$   $\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_7$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  计算值 443.181 8, 测量值 443.182 5。

**13k** 白色固体, 产率 42%, mp 132.4~133.7 °C。 $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  10.43 (s, 1H), 8.71 (s, 1H), 7.48 (d,  $J = 15.3$  Hz, 1H), 7.39 (s, 1H), 7.23 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H), 7.17 (d,  $J = 15.3$  Hz, 1H), 6.97 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H), 6.82 (s, 1H), 6.77 (s, 1H), 4.82 (s, 1H), 4.64 (s, 1H),

3.99 (t,  $J = 6.3$  Hz, 2H), 3.85 (s, 3H), 3.74 (s, 3H), 3.73 (s, 3H), 3.31~3.27 (m, 2H), 2.82~2.72 (m, 2H), 2.15 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2H), 1.97~1.93 (m, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  169.12, 165.61, 149.99, 149.60, 147.87, 142.35, 142.29, 128.62, 126.60, 125.86, 122.76, 116.26, 113.25, 112.38, 111.35, 110.50, 68.04, 56.30, 55.98, 55.38, 44.46, 43.32, 29.34, 29.18, 25.28; ESI-HR-MS:  $m/z$   $\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_7$  [M+H] $^+$ 计算值471.212 3, 测量值471.211 9。

**13l** 红色固体, 产率40%, mp 136.9~138.5 °C。 $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  10.40 (s, 1H), 8.71 (s, 1H), 7.51 (d,  $J = 14.5$  Hz, 1H), 7.45 (s, 1H), 7.39 (d,  $J = 5.4$  Hz, 1H), 7.22 (d,  $J = 7.4$  Hz, 1H), 7.00 (d,  $J = 14.5$  Hz, 1H), 6.82 (s, 1H), 6.77 (s, 1H), 4.82 (s, 1H), 4.64 (s, 1H), 4.01~3.97 (m, 2H), 3.84 (s, 3H), 3.73 (s, 6H), 3.34 (s, 2H), 2.82~2.72 (m, 2H), 2.03 (t,  $J = 6.9$  Hz, 2H), 1.67 (dd,  $J = 12.9, 6.3$  Hz, 4H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  169.35, 165.53, 150.07, 149.54, 147.76, 147.68, 142.45, 128.41, 126.54, 125.77, 122.83, 116.09, 112.94, 112.28, 111.13, 110.40, 68.21, 56.24, 55.96, 55.93, 44.43, 43.29, 32.38, 29.32, 28.64, 22.31; ESI-HR-MS:  $m/z$   $\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_7$  [M+H] $^+$ 计算值485.228 8, 测量值485.223 2。

**13m** 红色固体, 产率46%, mp 143.8~145.1 °C。 $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  10.36 (s, 1H), 8.68 (s, 1H), 7.51 (d,  $J = 14.8$  Hz, 1H), 7.46 (s, 1H), 7.34 (d,  $J = 10.6$  Hz, 1H), 7.22 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H), 6.99 (d,  $J = 14.8$  Hz, 1H), 6.80 (s, 1H), 6.77 (s, 1H), 4.82 (s, 1H), 4.64 (s, 1H), 4.01~3.96 (m, 2H), 3.86~3.81 (m, 3H), 3.79~3.73 (m, 6H), 3.31~3.28 (m, 2H), 2.75~2.66 (m, 2H), 1.98 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2H), 1.74~1.69 (m, 2H), 1.59~1.54 (m, 2H), 1.41~1.36 (m, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  169.49, 165.61, 150.13, 150.04, 149.48, 147.78, 142.41, 128.37, 126.52, 125.82, 122.84, 116.51, 116.04, 112.98, 112.31, 111.17, 68.56, 56.21, 55.94, 55.91, 44.43, 43.33, 32.69, 29.49, 28.93, 25.64, 25.37; ESI-HR-MS:  $m/z$   $\text{C}_{27}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_7$  [M+H] $^+$ 计算值499.244 4, 测量值499.243 2。

**13n** 淡红色固体, 产率37%, mp 150.6~152.1 °C。 $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  10.34 (s, 1H), 8.67 (s, 1H), 7.50 (d,  $J = 13.8$  Hz, 1H), 7.45 (s, 1H), 7.36 (d,  $J = 5.0$  Hz, 1H), 7.22 (d,  $J = 7.6$  Hz, 1H), 6.98 (d,  $J = 13.8$  Hz, 1H), 6.82 (s, 1H), 6.76 (s, 1H), 4.82 (s, 1H), 4.63 (s, 1H), 4.00~3.96 (m, 2H), 3.81 (s, 3H), 3.76 (s, 3H), 3.73 (s, 3H), 3.31 (s, 2H), 2.73~2.62 (m, 2H), 1.95 (t,  $J = 6.7$  Hz, 2H), 1.73~1.68 (m, 2H), 1.53~1.49 (m, 2H), 1.40~1.37

(m, 2H), 1.30 (s, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  169.57, 165.43, 149.50, 149.45, 148.15, 146.76, 141.77, 129.31, 128.24, 127.80, 122.70, 121.73, 120.75, 112.72, 111.94, 110.50, 68.53, 56.28, 56.01, 55.95, 43.29, 43.27, 32.68, 29.50, 29.01, 28.79, 25.71, 25.55; ESI-HR-MS:  $m/z$   $\text{C}_{28}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_7$  [M+Na] $^+$ 计算值535.240 2, 测量值535.239 7。

**13o** 红色固体, 产率57%, mp 157.5~158.9 °C。 $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  10.34 (s, 1H), 8.66 (s, 1H), 7.50 (d,  $J = 12.8$  Hz, 1H), 7.45 (s, 1H), 7.36 (d,  $J = 6.7$  Hz, 1H), 7.21 (d,  $J = 6.3$  Hz, 1H), 6.99 (d,  $J = 12.8$  Hz, 1H), 6.82 (s, 1H), 6.76 (s, 1H), 4.82 (s, 1H), 4.63 (s, 1H), 4.01~3.97 (m, 2H), 3.87 (s, 3H), 3.76 (s, 3H), 3.73 (s, 3H), 3.68 (s, 2H), 2.78~2.66 (m, 2H), 1.94 (t,  $J = 6.8$  Hz, 2H), 1.70 (s, 2H), 1.57 (s, 2H), 1.51~1.47 (m, 2H), 1.40 (s, 4H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  169.19, 165.15, 149.13, 149.09, 147.86, 147.55, 142.05, 135.36, 127.84, 127.49, 120.30, 115.98, 112.48, 111.29, 110.57, 110.21, 68.15, 55.93, 55.51, 55.46, 42.88, 82.84, 32.26, 28.76, 28.65, 28.56, 28.50, 25.44, 25.11; ESI-HR-MS:  $m/z$   $\text{C}_{29}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_7$  [M+H] $^+$ 计算值527.275 7, 测量值527.274 1。

**13p** 白色固体, 产率55%, mp 129.7~130.8 °C。 $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  11.28 (s, 1H), 9.14 (s, 1H), 7.78 (d,  $J = 7.4$  Hz, 2H), 7.51 (d,  $J = 7.3$  Hz, 2H), 7.48~7.44 (m, 1H), 7.42 (s, 1H), 7.22 (d,  $J = 9.0$  Hz, 1H), 7.07~7.00 (m, 1H), 6.90 (d,  $J = 9.0$  Hz, 1H), 6.82 (s, 1H), 6.76 (s, 1H), 5.19 (s, 2H), 4.82 (s, 1H), 4.64 (s, 1H), 3.86 (s, 3H), 3.73 (s, 6H), 3.50~3.46 (m, 2H), 2.81~2.67 (m, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  165.50, 164.15, 149.67, 149.39, 147.82, 147.73, 142.27, 140.43, 132.72, 128.93, 127.98, 127.52, 126.53, 125.76, 122.58, 116.39, 113.67, 112.27, 112.20, 110.40, 69.68, 56.18, 56.06, 55.82, 44.29, 43.17, 29.25; ESI-HR-MS:  $m/z$   $\text{C}_{29}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_7$  [M+H] $^+$ 计算值519.213 1, 测量值519.211 9。

**13q** 白色固体, 产率58%, mp 101.4~103.0 °C。 $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  11.26 (s, 1H), 9.14 (s, 1H), 7.51 (d,  $J = 16.2$  Hz, 1H), 7.40 (d,  $J = 3.4$  Hz, 1H), 7.36 (s, 1H), 7.24 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 7.14 (d,  $J = 16.2$  Hz, 1H), 7.07 (s, 1H), 6.78 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H), 6.72 (s, 1H), 6.60~6.44 (m, 1H), 5.11 (s, 2H), 4.83 (s, 1H), 4.64 (s, 1H), 3.83 (s, 3H), 3.76 (s, 3H), 3.73 (s, 3H), 3.66~3.62 (m, 2H), 2.81~2.67 (m, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  169.56, 164.49, 156.11, 153.32, 151.82, 149.20, 147.86, 146.45, 141.70, 135.38, 128.74, 128.39,

122.71, 120.99, 120.19, 113.56, 112.42, 112.33, 110.60, 110.25, 62.10, 55.94, 55.60, 55.54, 44.42, 43.41, 29.01; ESI-HR-MS:  $m/z$   $C_{27}H_{28}N_2O_8$  [M+H]<sup>+</sup> 计算值 509.192 4, 测量值 509.193 5。

**13r** 淡白色固体, 产率 48%, mp 111.9~113.4 °C。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  11.27 (s, 1H), 9.15 (s, 1H), 7.63 (s, 1H), 7.53~7.49 (m, 1H), 7.46 (s, 1H), 7.41 (d,  $J$  = 6.3 Hz, 1H), 7.24 (d,  $J$  = 4.6 Hz, 1H), 7.21~7.18 (m, 1H), 7.11 (s, 1H), 6.81 (d,  $J$  = 7.0 Hz, 1H), 6.76 (s, 1H), 5.33 (s, 2H), 4.82 (s, 1H), 4.64 (s, 1H), 3.85 (s, 3H), 3.73 (s, 6H), 3.66~3.54 (m, 2H), 2.81~2.67 (m, 2H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  172.36, 172.23, 159.01, 157.80, 155.50, 155.48, 155.38, 142.81, 134.13, 133.57, 131.65, 129.64, 128.42, 128.08, 127.27, 125.50, 123.19, 122.61, 122.48, 119.26, 63.07, 52.98, 52.95, 52.92, 44.65, 44.41, 16.96; ESI-HR-MS:  $m/z$   $C_{27}H_{28}N_2O_7S$  [M+H]<sup>+</sup> 计算值 525.169 5, 测量值 525.167 4。

## 2 化合物生物活性测试

### 2.1 体外 HDAC1/HDAC6/HDAC8/HDAC11 抑酶活性实验

HDAC 抑酶活性实验采用基于荧光信号的检测方法测定。配制化合物的 DMSO 溶液、酶缓冲液、含有底物和胰蛋白酶的混合溶液。实验中阳性对照化合物 SAHA 测试终浓度为 3  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  起始, 3 倍稀释, 10 个浓度。其余待测化合物测试终浓度为 5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  起始, 5 倍稀释, 7 个浓度, 均单孔测试。将待测化合物的 DMSO 溶液和酶缓冲液分别加入到 384 孔板中, 1 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 60 s, 振荡混匀后室温孵育 15 min。而后加入含有底物和胰蛋白酶的混合溶液, 起始反应。将反应板 1 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 1 min, 使用 Synergy 连续读取荧光信号, 并计算抑制率。最后通过分析软件 GraphPad Prism 9 计算  $\text{IC}_{50}$  值。

**2.2 体外抗增殖活性实验** 以 SAHA 为阳性对照, 采用 MTT 法评价目标化合物在体外对 A549、HCT116 细胞的增殖抑制作用。将对数生长期的细胞以  $1\times 10^5$  细胞/孔接种于 96 孔板, 置于 37 °C、5%  $\text{CO}_2$  条件下培养, 直至细胞 90% 融合后, 用无血清培养基孵育 2 h 使细胞同步化。随后, 弃去上清, 分别加入含有各化合物 (浓度为: 0.03、0.1、0.3、1、3、10、30  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 的培养基孵育 72 h, 孵育结束前 4 h, 每孔加入 20  $\mu\text{L}$  MTT 溶液 (5  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )。孵育结束后, 将 96 孔板以  $1.5\times 10^3$   $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 3 min, 弃去各孔上清液, 每孔加入 150  $\mu\text{L}$  DMSO, 细胞振荡仪上振荡 10 min, 待结晶物充分溶解后用酶标仪测定  $\text{OD}_{570}$ , 计算抑制率, 并通过 Graphpad Prism 9 计算  $\text{IC}_{50}$  值。

**2.3 Western blot 实验** 将对数生长期的 A549 细胞消

化后, 吹打成单细胞悬液, 每孔  $4\times 10^5$  个细胞接种于 12 孔板, 于给药各孔中分别加入不同浓度的化合物 **13e** 和 SAHA 溶液, 设置空白对照孔。孵育 72 h 后, 以 PBS 洗涤细胞, RIPA 裂解液裂解, 离心, 收集上清液即为蛋白提取液。使用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定样品蛋白浓度。通过 15% SDS-PAGE 胶分离蛋白, 湿法将蛋白转移至 PVDF 膜, 分别与一抗 anti-Ac-H3、anti-H3、anti-Ac- $\alpha$ -tubulin、anti- $\alpha$ -tubulin、anti-GAPDH 以及二抗羊抗兔 IgG-HRP 孵育, 将配好的 ECL 显色液加到 PVDF 膜进行曝光成像。

**2.4 分子对接研究** 作图软件使用 Pymol, 分子对接使用 Discovery Studio (version 2.5; Accelrys, San Diego, CA, USA, 2019)。使用蛋白质晶体结构为 HDAC1 (PDB ID: 5ICN)、HDAC6 (PDB ID: 5EDU)。对接实验步骤如下: 将小分子导入软件, 并对其结构优化, 得到预处理的小分子配体。去除蛋白分子内部小分子配体和溶剂分子, 对蛋白加氢, 附 CHARMM 力场, 得到预处理的分子对接受体。应用 Discovery Studio 2019 软件中的 CDOCKER 模块将小分子配体与蛋白受体进行对接, 综合打分函数和相互作用模式选取对接构象。

**作者贡献:** 高鑫负责完成相关实验研究, 并完成论文撰写等工作; 方方负责选题、实验设计和指导、稿件修改及稿件定稿等工作; 马晓东协助指导化学实验、稿件修改等工作; 韩维维和田诗意协助化合物的合成及结构鉴定工作; 柴化怡和韩京晶协助活性测定实验。

**利益冲突:** 作者声明本文不存在任何利益冲突。

## References

- [1] Maemoto Y, Shimizu Y, Katoh R, et al. Naturally occurring small molecule compounds that target histone deacetylases and their potential applications in cancer therapy [J]. *J Antibiot*, 2021, 74: 667-676.
- [2] Duan YC, Zhang SJ, Shi XJ, et al. Research progress of dual inhibitors targeting crosstalk between histone epigenetic modulators for cancer therapy [J]. *Eur J Med Chem*, 2021, 222: 113588.
- [3] Zhang Y, Rong DQ, Li BB, et al. Targeting epigenetic regulators with covalent small-molecule inhibitors [J]. *J Med Chem*, 2021, 64: 7900-7925.
- [4] Zhang SW, Gong CJ, Su MB, et al. Synthesis and *in vitro* and *in vivo* biological evaluation of tissue-specific bisthiazole histone deacetylase (HDAC) inhibitors [J]. *J Med Chem*, 2020, 63: 804-815.
- [5] He XR, Hui Z, Xu L, et al. Medicinal chemistry updates of novel HDACs inhibitors (2020 to present) [J]. *Eur J Med Chem*, 2022, 227: 113946.
- [6] Ediriweera MK, Tennekoon KH, Samarakoon SR. Emerging role

- of histone deacetylase inhibitors as anti-breast-cancer agents [J]. Drug Discov Today, 2019, 24: 685-702.
- [7] Leonhardt M, Sellmer A, Krämer OH, et al. Design and biological evaluation of tetrahydro- $\beta$ -carboline derivatives as highly potent histone deacetylase 6 (HDAC6) inhibitors [J]. Eur J Med Chem, 2018, 152: 329-357.
- [8] Chen X, Zhao S, Li HM, et al. Design, synthesis and biological evaluation of novel isoindolinone derivatives as potent histone deacetylase inhibitors [J]. Eur J Med Chem, 2019, 168: 110-122.
- [9] Wawruszak A, Borkiewicz L, Okon E, et al. Vorinostat (SAHA) and breast cancer: an overview [J]. Cancers, 2021, 13: 4700.
- [10] Pojani E, Barlocco D. Romidepsin (FK228), a histone deacetylase inhibitor and its analogues in cancer chemotherapy [J]. Curr Med Chem, 2021, 28: 1290-1303.
- [11] He JS, Chen QX, Gu HY, et al. Therapeutic effects of the novel subtype-selective histone deacetylase inhibitor chidamide on myeloma-associated bone disease [J]. Haematologica, 2018, 103: 1369-1379.
- [12] Banerjee S, Adhikari N, Amin SA, et al. Histone deacetylase 8 (HDAC8) and its inhibitors with selectivity to other isoforms: an overview [J]. Eur J Med Chem, 2019, 164: 214-240.
- [13] Su M, Gong XY, Liu F. An update on the emerging approaches for histone deacetylase (HDAC) inhibitor drug discovery and future perspectives [J]. Expert Opin Drug Dis, 2021, 16: 745-761.
- [14] To TCS, Chan AHY, Ganesan A, et al. Thirty years of HDAC inhibitors: 2020 insight and hindsight [J]. J Med Chem, 2022, 63: 12460-12484.
- [15] Zhang L, Zhang J, Jiang QX, et al. Zinc binding groups for histone deacetylase inhibitors [J]. J Enzym Inhib Med Chem, 2018, 33: 714-721.
- [16] Cullen DR, Gallagher A, Duncan CL, et al. Synthesis and evaluation of tetrahydroisoquinoline derivatives against *Trypanosoma brucei* rhodesiense [J]. Eur J Med Chem, 2021, 226: 113861.
- [17] Zhang R, Li H, Zhang XL, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of tetrahydroisoquinolines derivatives as novel, selective PDE4 inhibitors for scintipsoriasis treatment [J]. Eur J Med Chem, 2021, 221: 113004.
- [18] Li YS, Liu XY, Zhao DS, et al. Tetrahydroquinoline and tetrahydroisoquinoline derivatives as potential selective PDE4B inhibitors [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2018, 28: 3271-3275.
- [19] Li YS, Zhao DS, Liu XY, et al. Synthesis and biological evaluation of 2, 5-disubstituted furan derivatives as P-glycoprotein inhibitors for doxorubicin resistance in MCF-7/ADR cell [J]. Eur J Med Chem, 2018, 151: 546-556.
- [20] Capilla AS, Soucek R, Geau L, et al. Substituted tetrahydroisoquinolines: synthesis, characterization, antitumor activity and other biological properties [J]. Eur J Med Chem, 2018, 145: 51-63.
- [21] Chen DQ, Shen AJ, Fang GH, et al. Tetrahydroisoquinolines as novel histone deacetylase inhibitors for treatment of cancer [J]. Acta Pharm Sin B, 2016, 6: 93-99.
- [22] Zhu P, Ye W, Li J, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of novel tetrahydroisoquinoline derivatives as potential antitumor candidate [J]. Chem Biol Drug Des, 2017, 89: 443-455.
- [23] Feng LS, Chen JB, Su WQ, et al. Cinnamic acid hybrids as anticancer agents: a mini-review [J]. Arch Pharm, 2022, 355: 2200052.
- [24] Ruwizhi N, Aderibigbe BA. Cinnamic acid derivatives and their biological efficacy [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21: 5712-5746.
- [25] Li D, Rui YX, Guo SD, et al. Ferulic acid: a review of its pharmacology, pharmacokinetics and derivatives [J]. Life Sci, 2021, 284: 119921.
- [26] Zhou N, Yan Y, Liu C, et al. Discovery of a tetrahydroisoquinoline-based HDAC inhibitor with improved plasma stability [J]. Bioorg Med Chem, 2017, 25: 4614-4619.
- [27] Jiang BE, Hu JX, Liu H, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of indole-based hydroxamic acid derivatives as histone deacetylase inhibitors [J]. Eur J Med Chem, 2022, 227: 113893.
- [28] Zhang ZX, Zhang QW, Zhang H, et al. Discovery of quinazolinyln-containing benzamides derivatives as novel HDAC1 inhibitors with *in vitro* and *in vivo* antitumor activities [J]. Bioorg Chem, 2021, 117: 105407.
- [29] Roche J, Bertrand P. Inside HDACs with more selective HDAC inhibitors [J]. Eur J Med Chem, 2016, 121: 451-483.
- [30] Traore MDM, Zeick V, Simoes-Pires CA, et al. Hydroxyl ketone-based histone deacetylase inhibitors to gain insight into class I HDAC selectivity *versus* that of HDAC6 [J]. ACS Omega, 2017, 2: 1550-1562.
- [31] Zhang XH, Qin-Ma, Wu HP, et al. A review of progress in histone deacetylase 6 inhibitors research: structural specificity and functional diversity [J]. J Med Chem, 2021, 64: 1362-1391.
- [32] Wang XX, Wan RZ, Liu ZP. Recent advances in the discovery of potent and selective HDAC6 inhibitors [J]. Eur J Med Chem, 2018, 143: 1406-1418.
- [33] Shen SD, Hadley M, Ustinova K, et al. Discovery of a new isoxazole-3-hydroxamate-based histone deacetylase 6 inhibitor SS-208 with antitumor activity in syngeneic melanoma mouse models [J]. J Med Chem, 2019, 62: 8557-8577.
- [34] Zhang Y, Ying JB, Hong JJ, et al. How does chirality determine the selective inhibition of histone deacetylase 6? A lesson from trichostatin enantiomers based on molecular dynamics [J]. ACS Chem Neurosci, 2019, 10: 2467-2480.
- [35] Vogerl K, Ong N, Johanna S, et al. Synthesis and biological investigation of phenothiazine-based benzhydroxamic acids as selective histone deacetylase 6 inhibitors [J]. J Med Chem, 2019, 62: 1138-1166.
- [36] Watson PJ, Millard CJ, Riley AM, et al. Insights into the activation mechanism of class I HDAC complexes by inositol phosphates [J]. Nat Commun, 2016, 7: 11262.
- [37] Miake Y, Keusch JJ, Jeremy J, et al. Structural insights into HDAC6 tubulin deacetylation and its selective inhibition [J]. Nat Chem Biol, 2016, 12: 748-754.