

喹啉类 HDAC8 选择性抑制剂的设计、合成及抗肿瘤活性研究

周易¹, 邵文晴¹, 杨新颖², 侯旭奔^{2*}, 方浩^{2*}

(1. 山东第一医科大学附属省立医院药学部, 山东 济南 250021; 2. 山东大学药学院, 天然产物化学生物学教育部重点实验室, 山东 济南 250012)

摘要: 作为I亚族组蛋白去乙酰化酶 (histone deacetylase, HDAC) 成员, HDAC8 是重要的抗肿瘤靶点。本研究基于课题组前期构建的HDAC8药效团模型, 以喹啉作为母核, 设计并合成了13个目标化合物, 其中SDFZ-E2和SDFZ-E3具有较好的HDAC8抑制活性和亚型选择性; 在细胞实验中, SDFZ-E2和SDFZ-E3表现出优于HDAC8选择性抑制剂PCI-34051的抗肿瘤细胞增殖活性; 还通过分子对接和分子动力学模拟研究了SDFZ-E2与HDAC8的结合模式。该项工作是以喹啉为母核发展HDAC8选择性抑制剂的一次探索, 相关活性化合物可以作为先导化合物进行进一步的结构改造。

关键词: 喹啉衍生物; 组蛋白去乙酰化酶8抑制剂; 抗肿瘤活性; 药效团

中图分类号: R914 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)04-0979-08

Design, synthesis and anti-tumor activity evaluation of quinoline derivatives as histone deacetylase 8 inhibitors

ZHOU Yi¹, SHAO Wen-qing¹, YANG Xin-ying², HOU Xu-ben^{2*}, FANG Hao^{2*}

(1. Department of Pharmacy, Shandong Provincial Hospital Affiliated to Shandong First Medical University, Ji'nan 250021, China; 2. Key Laboratory of Chemical Biology (Ministry of Education), School of Pharmaceutical Science, Cheeloo College of Medicine, Shandong University, Ji'nan 250012, China)

Abstract: As a member of class I histone deacetylase (HDACs), HDAC8 is an important anticancer drug target. Based on our previously developed pharmacophore model for the HDAC8 inhibitor, we designed and synthesized 13 quinoline acid derivatives as new HDAC8 inhibitors. Among them, the compound SDFZ-E2 and SDFZ-E3 exhibited good HDAC8 inhibitory activities and isoform selectivity. In cell experiments, the target compounds SDFZ-E2 and SDFZ-E3 showed better antiproliferation activities than the known HDAC8 selective inhibitor PCI-34051. In addition, the proposed binding mode of SDFZ-E2 was investigated using molecular docking and molecular dynamics simulation. This work is a new attempt to develop HDAC8 selective inhibitor using quinoline as the scaffold, and the active compounds could serve as lead compounds for further structural optimization.

Key words: quinoline derivative; histone deacetylase 8 inhibitor; anti-tumor activity; pharmacophore model

组蛋白去乙酰化酶 (histone deacetylase, HDAC) 是一种具有催化N-乙酰化赖氨酸脱乙酰基功能的酶, 在表观遗传修饰中发挥重要作用^[1]。目前, 人体内已

发现18种HDACs, 根据辅因子依赖性可分为两个家族: 锌离子依赖的HDACs (HDAC1~11) 和NAD⁺依赖的Sirtuin家族 (SIRT1~7)。根据序列相似性, 锌离子依赖的HDACs可以分为I (HDAC1~3和HDAC8)、II (HDAC4~7和HDAC9~10)、IV (HDAC11) 三个亚族^[2,3]。

作为I亚族HDACs成员, HDAC8由377个氨基酸 (42 kDa) 构成, 广泛分布于细胞核与细胞质中^[4]。除了

收稿日期: 2023-06-28; 修回日期: 2023-11-28.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81874288, 82204198).

*通讯作者 Tel: 86-531-88381168,

E-mail: haofangcn@sdu.edu.cn; hxb@sdu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-0523

组蛋白外, HDAC8可以催化多种非组蛋白的底物去乙酰化, 例如染色体结构维持蛋白3 (structural maintenance of chromosomes protein 3, SMC3)、雌激素相关受体 α (estrogen related receptor alpha, ERR α)、p53等^[5-7], 因此参与了多种生命活动和信号转导。目前研究已经证实, HDAC8的异常表达与恶性肿瘤等多种疾病密切相关^[8-10]。近年来, 随着对HDAC8蛋白结构及生理功能研究的深入, HDAC8已成为重要的抗肿瘤药物靶标。目前已上市的非选择性HDAC抑制剂伏立诺他 (vorinostat, SAHA)、贝利司他 (belinostat, PXD-101)、帕比司他 (panobinostat, LBH-589) 均对HDAC8具有较好的抑制活性, 但普遍缺乏选择性, 对其他HDAC亚型同样具有抑制作用^[11] (图1)。近年来, HDAC8选择性抑制剂的研究成为抗肿瘤药物研发领域的重要方向, 部分HDAC8选择性抑制剂如PCI-34051 (图1) 等被发现, 为HDAC8抑制剂的研究打下基础^[12]。

在前期工作中, 本课题组^[13]以HDAC8-抑制剂晶体结构复合物为训练集, 通过引入自定义的锌离子螯合基团 (zinc binding group, ZBG) 元素, 构建了基于ZBG的HDAC8抑制剂药效团模型, 其主要特征是酶表面识别基团与锌离子螯合基团呈L型, 并以此为基础发现了HDAC8选择性抑制剂H8-A5 (图1), 这为设计HDAC8抑制剂提供了理论基础。此外, 在课题组的前期研究

中, 以喹啉为母核设计并合成了多个系列HDACs抑制剂, 部分化合物表现出了较好的HDACs抑制活性和抗肿瘤细胞增殖活性^[14,15]。本研究以喹啉为母核, 通过在4位引入不同的取代基作为酶表面识别区, 设计一系列新型喹啉类HDAC8抑制剂, 代表性结构能够很好的匹配前期发展的HDAC8抑制剂药效团模型 (图2)。本研究共合成了13个目标化合物, 并通过核磁共振氢谱 (hydrogen nuclear magnetic resonance spectroscopy, ¹H NMR)、核磁共振碳谱 (carbon nuclear magnetic resonance spectroscopy, ¹³C NMR) 以及高分辨质谱 (high resolution mass spectroscopy, HRMS) 确证其化学结构。生物活性测试发现, 部分化合物具有较好的HDAC8抑制活性和亚型选择性, 并且对多个肿瘤细胞表现出了抗增殖活性。该项工作是以喹啉为母核发展HDAC8选择性抑制剂的一次探索, 相关活性化合物可以作为先导化合物进行进一步的结构改造。

结果与讨论

1 化学合成

如路线1所示, 以苯胺为起始原料, 与丁炔二酸甲酯发生亲核加成反应后, 在多聚磷酸存在条件下成环得到中间体 $\mathbf{3}$ 。随后通过威廉姆森反应, 在4位酚羟基引入不同的侧链, 然后在碱性条件下脱除甲酯, 最后经

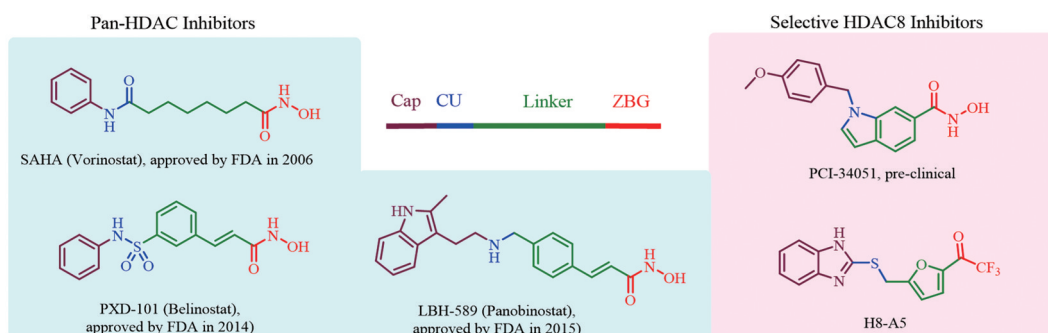


Figure 1 The chemical structures of pan-histone deacetylase (pan-HDAC) inhibitors and HDAC8 selective inhibitors. FDA: Federal Drug Administration

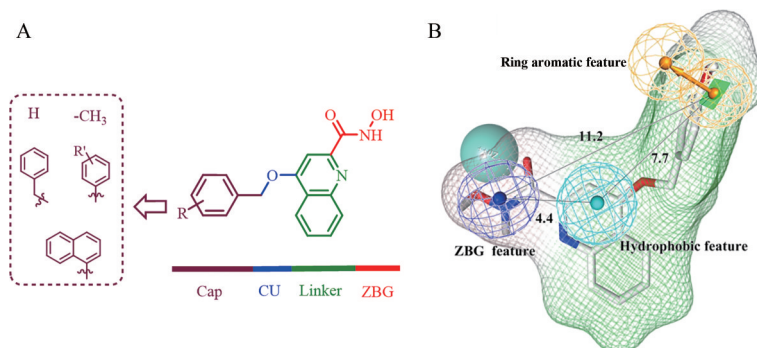


Figure 2 The design strategies of HDAC8 inhibitors. A: The design of target compounds; B: Superposition of the designed compound and the pharmacophore model of the HDAC8 inhibitor. CU: Connection unit; ZBG: Zinc binding group

缩合反应引入异羟肟酸获得目标化合物 SDFZ-E1~SDFZ-E13 (表 1)。

2 生物活性测试

首先, 应用重组的人 HDAC8 蛋白对 13 个目标化合物进行了 HDAC8 抑酶活性测试, 选取已上市的 HDAC 泛抑制剂 SAHA 和 HDAC8 选择性抑制剂 PCI-34051 作为阳性对照。相关结果总结于表 2, 其中 SDFZ-E2、SDFZ-E3、SDFZ-E12 均表现出了微摩尔级的半数抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration, IC_{50}), 特别是 SDFZ-E2 的 HDAC8 抑制活性 ($IC_{50} = 2.49 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 优于阳性对照药 SAHA ($IC_{50} = 6.39 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 但是与 PCI-34051 ($IC_{50} = 0.051 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 相比仍有差距。

随后, 对目标化合物 SDFZ-E2、SDFZ-E3 和 SDFZ-E12 进行了 HDAC 亚型选择性测试, 选取已上市的 HDAC 泛抑制剂 SAHA 作为阳性对照, 结果总结于表 3。目标化合物对 HDAC1、HDAC2 和 HDAC6 均表现出较差的抑制活性。其中, 目标化合物 SDFZ-E2 的 HDAC8 抑制活性较 SAHA 强 2.6 倍, 而 HDAC1、HDAC2 和 HDAC6 活性远弱于 SAHA, 表明该目标化合物对 HDAC8 具有较好的亚型选择性, 符合设计目标。

根据以上结果, 目标化合物对 HDAC8 具有较好的抑制活性和亚型选择性, 进一步选取了三种高表达 HDAC8 的肿瘤细胞 [人神经胶质瘤细胞 SK-N-BE(2)、人弥漫性大 B 细胞淋巴瘤细胞 SU-DHL-2 和人急性 T 淋巴细胞白血病细胞 Jurkat], 采用 CCK-8 法进行了抗细胞增殖实验^[16,17]。结果见表 4, SDFZ-E2、SDFZ-E3、SDFZ-E12 在 SK-N-B(2) 和 SU-DHL-2 细胞中均表现出了微摩尔级的抗增殖活性, SDFZ-E2、SDFZ-E3 在 Jurkat 细胞中, 也表现出了微摩尔级别的 IC_{50} 。与 HDAC8 选

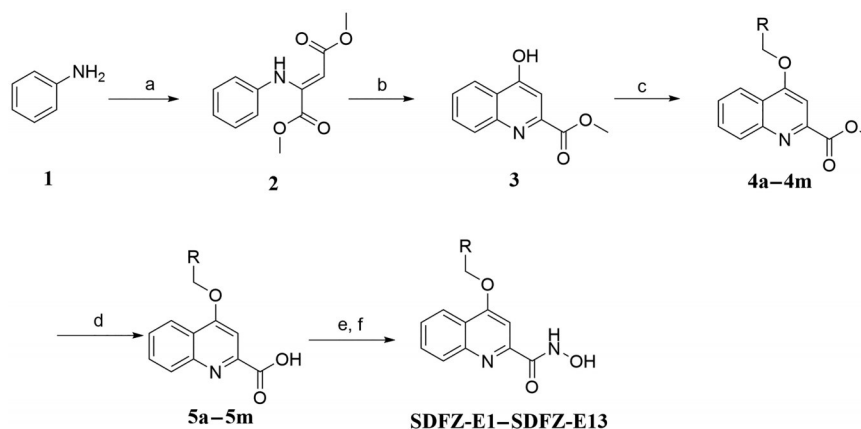
择性抑制剂 PCI-34051 相比, SDFZ-E2、SDFZ-E3 在三种测试的细胞中均优于 PCI-34051, 尤其在 SU-DHL-2 细胞中, SDFZ-E3 ($IC_{50} = 3.72 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和 SDFZ-E2 ($IC_{50} = 11.25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的抗增殖活性优于 PCI-34051 ($IC_{50} = 21.12 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。

3 目标化合物与 HDAC8 的结合模式研究

为了进一步探究目标化合物和 HDAC8 的结合模式, 选取代表性化合物 SDFZ-E2 和 HDAC8 (PDB ID: 5FCW) 晶体结构, 应用 Schrodinger 软件进行了分子对接和分子动力学模拟, 研究了 SDFZ-E2 与 HDAC8 的相互作用。

分子对接的结果表明, SDFZ-E2 结构中的异羟肟酸部分深入了 HDAC8 催化口袋并与锌离子螯合, 喹啉环母核占据了疏水的催化口袋 (图 3)。特别是, 喹啉 4 位的取代基作为酶表面识别基团, 与 HDAC8 表面由参与催化反应的 Tyr306 形成的特异性口袋结合 (图 3)。该口袋位于 L1 Loop 和 L6 Loop 区之间, 为 HDAC8 所特有, 而在其他 HDAC 亚型中由于 L1 Loop 和 L6 Loop 结合紧密, 参与催化反应的 Tyr306 不外露。上述研究有助于理解 SDFZ-E2 具有较好的 HDAC8 选择性的结构基础。

进一步对 SDFZ-E2 和 HDAC8 的分子对接复合物进行了 10 ns 的分子动力学 (molecular dynamics, MD) 模拟研究。如图 4A 所示, 蛋白-小分子复合物在 4 ns 的 MD 后基本稳定, 而 SDFZ-E2 在 10 ns 的 MD 模拟过程中始终占据 HDAC8 特异口袋, 表明分子对接所预测的结合模式较为稳定。另一方面, 根据蛋白各个氨基酸在 MD 模拟中的 RMSF 值, 发现 Ser13 和 Asp87 表现出较大的柔性 ($RMSF > 3 \text{ \AA}$), 但上述氨基酸位于远离催化口袋的 Loop 区, 与 SDFZ-E2 与 HDAC8 的结合



Scheme 1 The synthetic route of target compounds. Reagent and conditions: (a) Dimethyl succinate, methanol, 0 °C to 80 °C, 8 h, yield: 70%; (b) Polyphosphate, 120 °C, 2 h, yield: 75%; (c) Substituted bromobenzene or iodomethane or 2-chlorohexylbenzene, DMF (*N,N*-dimethylformamide), K_2CO_3 , yield: 55%–75%; (d) LiOH, H_2O/THF (tetrahydrofuran), yield: 50%–85%; (e) *O*-(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl) hydroxylamine, HATU (2-(1*H*-azole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate), NMM (4-methylmorpholine), DMF, room temperature, 9 h; (f) HCl, ethyl acetate, room temperature, 10 min, yield: 13%–32%

Table 1 The characterization and physical properties of target compounds

Compound	NMR spectrum and HRMS result	Property	Melting point/°C	Yield
SDFZ-E1	¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ (dimethyl sulfoxide- <i>d</i> ₆)) δ 11.73 (s, 1H), 8.26–8.19 (m, 1H), 8.18–8.08 (m, 2H), 8.02 (t, <i>J</i> = 6.6 Hz, 2H), 7.95 (s, 1H), 7.91–7.80 (m, 2H), 7.61 (p, <i>J</i> = 7.4 Hz, 4H), 6.01 (s, 2H). ¹³ C NMR (101 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 133.8, 132.1, 131.6, 131.6, 129.7, 129.0, 128.2, 127.6, 127.1, 126.6, 125.9, 124.3, 122.3, 121.7, 100.4, 70.0. HRMS (ESI ⁺): <i>m/z</i> calculated for C ₂₁ H ₁₆ N ₂ O ₃ 345.123 4, found [M+H] ⁺ 345.121 0.	White solid	250–252	15%
SDFZ-E2	¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 11.77 (s, 1H), 8.25 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H), 8.13 (d, <i>J</i> = 8.5 Hz, 1H), 7.90 (t, <i>J</i> = 7.7 Hz, 1H), 7.76 (s, 1H), 7.71 (t, <i>J</i> = 7.7 Hz, 1H), 7.60 (d, <i>J</i> = 7.5 Hz, 2H), 7.52–7.36 (m, 3H), 5.55 (s, 2H). ¹³ C NMR (101 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 136.3, 136.3, 131.4, 131.4, 129.8, 129.1, 128.7, 128.7, 128.1, 122.2, 70.8. HRMS (ESI ⁺): <i>m/z</i> calculated for C ₁₇ H ₁₄ N ₂ O ₃ 295.107 7, found [M+H] ⁺ 295.105 2.	White solid	248–250	18%
SDFZ-E3	¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 11.48 (s, 1H), 9.20 (s, 1H), 8.23 (d, <i>J</i> = 8.3 Hz, 1H), 8.04 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H), 7.84 (q, <i>J</i> = 6.9, 6.3 Hz, 1H), 7.66 (q, <i>J</i> = 6.6 Hz, 4H), 7.56 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 2H), 5.49 (s, 2H). ¹³ C NMR (101 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 163.2, 162.0, 151.9, 147.7, 139.2, 131.5, 131.3, 131.3, 131.1, 130.7, 129.5, 127.7, 127.6, 127.1, 127.1, 122.2, 122.1, 121.6, 99.5, 69.6. HRMS (ESI ⁺): <i>m/z</i> calculated for C ₁₇ H ₁₃ BrN ₂ O ₃ 373.018 2, found [M+H] ⁺ 373.018 0.	Yellowish solid	220–222	22%
SDFZ-E4	¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 11.90 (s, 1H), 8.18 (dd, <i>J</i> = 23.3, 8.7 Hz, 2H), 8.04–7.63 (m, 4H), 7.59–7.51 (m, 2H), 7.07–6.99 (m, 2H), 5.49 (d, <i>J</i> = 5.3 Hz, 2H), 3.79 (s, 3H). ¹³ C NMR (101 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 159.9, 159.7, 140.6, 133.4, 130.8, 130.4, 129.6, 128.3, 124.6, 114.5, 114.4, 106.0, 100.5, 71.7, 71.2, 55.6, 55.5, 46.7. HRMS (ESI ⁺): <i>m/z</i> calculated for C ₁₈ H ₁₆ N ₂ O ₄ 325.118 3, found [M+H] ⁺ 325.118 8.	White solid	248–250	16%
SDFZ-E5	¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 11.85 (s, 1H), 8.24 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H), 8.16 (d, <i>J</i> = 8.5 Hz, 1H), 7.92 (t, <i>J</i> = 7.8 Hz, 1H), 7.82 (d, <i>J</i> = 3.4 Hz, 1H), 7.71 (t, <i>J</i> = 7.7 Hz, 1H), 7.57–7.45 (m, 4H), 5.52 (s, 2H), 1.31 (d, <i>J</i> = 1.9 Hz, 9H). ¹³ C NMR (101 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 151.4, 132.8, 128.4, 125.9, 122.6, 121.5, 100.4, 71.7, 34.8, 31.5. HRMS (ESI ⁺): <i>m/z</i> calculated for C ₂₁ H ₂₂ N ₂ O ₃ 351.170 3, found [M+H] ⁺ 351.167 7.	White solid	256–258	32%
SDFZ-E6	¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 11.58 (s, 1H), 8.24 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H), 8.10 (d, <i>J</i> = 9.5 Hz, 1H), 7.88 (t, <i>J</i> = 7.4 Hz, 1H), 7.82–7.40 (m, 6H), 5.54 (t, <i>J</i> = 4.4 Hz, 2H). ¹³ C NMR (101 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 163.2, 162.1, 151.9, 147.7, 136.0, 132.0, 131.1, 130.2, 129.5, 127.6, 122.1, 121.8, 121.7, 99.6, 69.7. HRMS (ESI ⁺): <i>m/z</i> calculated for C ₁₇ H ₁₃ BrN ₂ O ₃ 373.018 2, found [M+H] ⁺ 373.017 2.	White solid	286–288	16%
SDFZ-E7	¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 11.67 (s, 1H), 8.25 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H), 8.11 (dd, <i>J</i> = 8.5, 3.4 Hz, 1H), 7.89 (t, <i>J</i> = 7.9 Hz, 1H), 7.84–7.63 (m, 4H), 7.57 (d, <i>J</i> = 8.1 Hz, 2H), 5.53 (s, 2H). ¹³ C NMR (101 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 135.6, 132.1, 132.0, 131.8, 130.4, 128.2, 122.4, 122.0, 121.6, 100.2, 70.4, 57.8. HRMS (ESI ⁺): <i>m/z</i> calculated for C ₁₇ H ₁₃ ClN ₂ O ₃ 329.068 8, found [M+H] ⁺ 329.067 4.	White solid	214–216	18%
SDFZ-E8	¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 11.79 (s, 1H), 8.26 (d, <i>J</i> = 9.2 Hz, 2H), 7.96 (s, 1H), 7.76 (s, 2H), 4.70–4.42 (m, 2H), 1.53 (dt, <i>J</i> = 9.2, 4.7 Hz, 3H). ¹³ C NMR (101 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 166.1, 158.8, 149.0, 143.0, 133.5, 128.7, 125.2, 122.7, 121.3, 100.4, 67.1, 14.6. HRMS (ESI ⁺): <i>m/z</i> calculated for C ₁₂ H ₁₂ N ₂ O ₃ 233.092 1, found [M+H] ⁺ 233.091 0.	White solid	194–196	23%
SDFZ-E9	¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 11.65 (s, 1H), 8.25–8.02 (m, 3H), 7.87 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 2H), 7.77 (s, 1H), 7.64 (t, <i>J</i> = 7.6 Hz, 1H), 7.46 (dq, <i>J</i> = 24.6, 7.8 Hz, 4H), 7.13 (d, <i>J</i> = 7.5 Hz, 1H), 4.91 (d, <i>J</i> = 4.9 Hz, 2H), 4.71 (d, <i>J</i> = 3.6 Hz, 2H). ¹³ C NMR (101 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 154.2, 134.5, 127.9, 126.9, 126.6, 125.8, 125.4, 122.3, 121.9, 121.6, 120.8, 106.3, 99.9, 68.7, 67.1. HRMS (ESI ⁺): <i>m/z</i> calculated for C ₂₂ H ₁₈ N ₂ O ₄ 375.133 9, found [M+H] ⁺ 375.131 8.	Yellowish solid	192–194	14%
SDFZ-E10	¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 11.69 (s, 1H), 8.21 (d, <i>J</i> = 8.5 Hz, 1H), 8.10 (d, <i>J</i> = 8.5 Hz, 1H), 7.93–7.85 (m, 1H), 7.70 (t, <i>J</i> = 7.7 Hz, 1H), 7.61 (s, 1H), 4.17 (s, 3H). ¹³ C NMR (101 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 145.4, 144.9, 134.2, 133.6, 132.8, 132.2, 131.9, 5.3. HRMS (ESI ⁺): <i>m/z</i> calculated for C ₁₁ H ₁₀ N ₂ O ₃ 219.076 4, found [M+H] ⁺ 219.075 2.	White solid	238–240	20%
SDFZ-E11	¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 10.92 (s, 1H), 8.34 – 8.20 (m, 3H), 7.93 (dd, <i>J</i> = 8.8, 6.7 Hz, 2H), 7.74 (h, <i>J</i> = 8.2 Hz, 5H), 7.55–7.32 (m, 4H), 4.19 (s, 2H). ¹³ C NMR (101 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 131.9, 131.4, 128.9, 128.4, 128.2, 128.1, 127.5, 127.2, 125.2, 124.4, 122.2, 121.8, 99.0, 57.3, 57.1. HRMS (ESI ⁺): <i>m/z</i> calculated for C ₂₃ H ₁₈ N ₂ O ₃ 371.139 0, found [M+H] ⁺ 371.139 4.	White solid	> 300	13%
SDFZ-E12	¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 11.95 (s, 1H), 8.19 (dt, <i>J</i> = 8.4, 2.2 Hz, 2H), 7.99–7.90 (m, 1H), 7.83–7.71 (m, 2H), 7.44 (d, <i>J</i> = 7.1 Hz, 2H), 7.34 (t, <i>J</i> = 7.6 Hz, 2H), 7.28–7.22 (m, 1H), 4.68 (t, <i>J</i> = 6.4 Hz, 2H), 3.26 (t, <i>J</i> = 6.4 Hz, 2H). ¹³ C NMR (101 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 165.6, 159.1, 149.4, 138.3, 133.3, 129.5, 128.8, 128.7, 126.9, 125.7, 122.5, 121.3, 100.4, 71.3, 34.8. HRMS (ESI ⁺): <i>m/z</i> calculated for C ₁₈ H ₁₆ N ₂ O ₃ 309.123 4, found [M+H] ⁺ 309.121 9.	White solid	180–182	21%
SDFZ-E13	¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 11.73 (s, 1H), 8.21–8.04 (m, 2H), 7.89 (t, <i>J</i> = 7.4 Hz, 1H), 7.69 (d, <i>J</i> = 6.9 Hz, 2H), 6.91 (s, 2H), 4.86–4.67 (m, 2H), 4.62–4.46 (m, 2H), 2.30 (s, 6H). ¹³ C NMR (101 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 156.8, 137.1, 128.2, 125.8, 122.4, 121.4, 115.4, 100.0, 69.1, 66.5, 20.8. HRMS (ESI ⁺): <i>m/z</i> calculated for C ₂₀ H ₁₉ ClN ₂ O ₄ 387.110 6, found [M+H] ⁺ 387.109 5.	White solid	216–218	17%

Table 2 The structures and HDAC8 inhibitory activity of target compounds. ^aResults are expressed as the mean \pm SD of at least two separate determinations

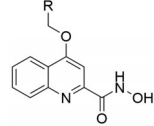

Compound	R	^a IC ₅₀ of HDAC8/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
SDFZ-E2	-Ph	2.49 \pm 0.49
SDFZ-E3	-3-Br-Ph	7.45 \pm 0.26
SDFZ-E4	-4-Methoxy-Ph	32.98 \pm 0.29
SDFZ-E5	-4-t-Bu-Ph	> 50
SDFZ-E6	-4-Br-Ph	> 50
SDFZ-E7	-4-Cl-Ph	> 50
SDFZ-E8	-CH ₃	> 50
SDFZ-E9		> 50
SDFZ-E10	H	> 50
SDFZ-E11	-4-Ph-Ph	> 50
SDFZ-E12	-Bn	12.94 \pm 1.14
SDFZ-E13		> 50
SAHA	-	6.39 \pm 0.62
PCI-34051	-	0.051 \pm 0.016

Table 3 HDAC isoforms selectivity of selected target compounds. ^aResults are expressed as the mean \pm SD of at least two separate determinations

Compound	^a IC ₅₀ / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$			
	HDAC1	HDAC2	HDAC6	HDAC8
SDFZ-E2	> 50	> 50	33.12 \pm 10.51	2.49 \pm 0.49
SDFZ-E3	> 50	> 50	> 50	7.45 \pm 0.26
SDFZ-E12	> 50	> 50	41.23 \pm 3.21	12.95 \pm 1.14
SAHA	0.037 \pm 0.007	0.015 \pm 0.002	0.090 \pm 0.007	6.39 \pm 0.62

Table 4 Anti-proliferative activity of selected target compounds. ^aResults are expressed as the mean \pm SD of at least two separate determinations

Compound	^a IC ₅₀ / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		
	SK-N-BE(2)	SU-DHL-2	Jurkat
SDFZ-E2	13.99 \pm 1.75	11.25 \pm 0.94	42.07 \pm 5.17
SDFZ-E3	9.68 \pm 0.24	3.72 \pm 1.12	10.65 \pm 0.25
SDFZ-E12	37.44 \pm 4.02	26.44 \pm 5.90	> 200
PCI-34051	15.91 \pm 0.58	21.12 \pm 2.25	67.10 \pm 9.97

关系不密切(图4B)。在MD模拟中, SDFZ-E2结构中异羟肟酸的羟基和羰基与锌离子螯合较好, 锌离子与羰基O原子和羟基O原子的距离在模拟过程中始终小于3 Å, 符合形成配位键的距离(图4C、D)。

4 小结

本文设计并合成了一系列新型喹啉类 HDAC8 小

分子抑制剂。在化合物设计中, 根据前期发展的药效团模型, 以喹啉作为母核, 通过在4位引入不同的取代基探究目标化合物的构效关系。在活性评价中, 目标化合物 SDFZ-E2 表现出优于已上市 HDAC 抑制剂 SAHA 的 HDAC8 抑制活性和亚型选择性; 在抗肿瘤细胞增殖活性实验中, 目标化合物 SDFZ-E2、SDFZ-E3 表现出了较好的抗肿瘤活性, 显著优于 HDAC8 选择性抑制剂 PCI-34051; 还通过分子对接和分子动力学模拟, 研究了代表性目标化合物和 HDAC8 的相互作用。该项工作是以喹啉为母核发展 HDAC8 选择性抑制剂的一次探索, 相关活性化合物可以作为先导化合物进行进一步的结构优化, 以获得活性更高、选择性更强的 HDAC8 抑制剂。

实验部分

本实验所有试剂和溶剂未经说明的均为分析纯。HDAC 蛋白 (HDACs 混酶 HDAC1、HDAC2、HDAC6、HDAC8) 购自 Enzo 公司。HDAC 底物购自上海毕得公司。Tris-base、胰酶购自北京索莱宝公司。HDACs 抑制剂 TSA 购自 MCE 公司。本实验中所有 ¹H NMR 谱和 ¹³C NMR 谱通过 Bruker DRX 光谱仪测定 (400 MHz)。HRMS 谱由 SCI-EX X500e Q-TOF LC/MS 系统测定。本实验所有熔点用电热熔点仪测定。超纯水由 MilliQ 超纯水制备系统制得。

1 化学合成

1.1 2-(苯氨基)富马酸二甲酯 (2) 的合成 苯胺 (20 g, 215 mmol) 溶于 40 mL 甲醇, 0 °C 下逐滴滴入丁炔二酸二甲酯 (30.54 g, 215 mmol)。随后, 将反应液加热至 80 °C 回流 8 h。旋去溶剂, 得到黄色油状产物, 用硅胶拌样后, 柱层析纯化 (石油醚: 乙酸乙酯 = 99:1), 最终得到纯的淡黄色油状中间体 2, 产率 70%。

1.2 4-羟基喹啉-2-羧酸甲酯 (3) 的合成 将 30 g 中间体 2 与 100 g 多聚磷酸用机械搅拌混合, 缓慢加热至 120 °C, 待反应液逐渐变红后保持温度 2 h。随后, 向反应液中缓慢滴加 10% 的碳酸钾溶液至所有黏稠状液体溶解, 并不再产生气泡, 过滤悬浊液, 滤饼用少量水洗, 烘干即得中间体 3, 收率 75%。棕色粉末, 熔点: 224~226 °C。

1.3 4-甲氧基喹啉-2-羧酸甲酯 (4a) 的合成 中间体 3 (2 g, 10 mmol)、碘甲烷 (1.68 g, 11 mmol)、碳酸钾 (4.08 g, 30 mmol) 溶于 50 mL DMF, 加热至 70 °C 反应 8 h。自然冷却至室温后, 加水淬灭反应, 静置沉淀, 过滤分离固体, 用少量水洗滤饼, 烘干即得 4a。产率: 74%, 棕色粉末, 熔点: 224~226 °C。

1.4 4-乙氧基喹啉-2-羧酸甲酯 (4b) 的合成 中间体 3 (2 g, 10 mmol)、溴乙烷 (1.09 g, 10 mmol)、碳酸钾

220~222 °C。

1.10 4-(2-(4-氯-3,5-二甲基苯氧基)乙氧基)喹啉-2-羧酸甲酯 (4h) 的合成 合成与纯化方法类似 4b。产率: 55%, 棕色油。

1.11 4-((4-甲氧基苄基)氧基)喹啉-2-羧酸甲酯 (4i) 的合成 合成与纯化方法类似 4a。产率: 75%, 白色固体, 熔点: 190~192 °C。

1.12 4-苯乙氧基喹啉-2-羧酸甲酯 (4j) 的合成 合成与纯化方法类似 4a。产率: 74%, 白色固体, 熔点: 170~172 °C。

1.13 4-([1,1'-联苯]-4-基甲氧基)喹啉-2-羧酸甲酯 (4k) 的合成 合成与纯化方法类似 4a。产率: 58%, 白色固体, 熔点: > 300 °C。

1.14 4-(萘-1-基甲氧基)喹啉-2-羧酸甲酯 (4l) 的合成 合成与纯化方法类似 4b。产率: 60%, 黄色油。

1.15 4-(2-(萘-1-基氧基)乙氧基)喹啉-2-羧酸甲酯 (4m) 的合成 合成与纯化方法类似 4a。产率: 60%, 淡黄色固体, 熔点: 194~196 °C。

1.16 4-甲氧基喹啉-2-羧酸 (5a) 的合成 中间体 4a (1.5 g, 6.91 mmol) 和氢氧化锂 (0.83 g, 34.53 mmol) 溶于 80 mL 的四氢呋喃/水 (2/1) 溶液, 室温搅拌 12 h, 反应完毕后旋去四氢呋喃, 用 2 mol·L⁻¹ 盐酸调节 pH 至中性, 过滤分离沉淀, 用少量水洗滤饼, 烘干, 乙酸乙酯打浆, 过滤, 烘干, 即得产物 5a。产率: 85%, 白色固体, 熔点: > 300 °C。

1.17 4-乙氧基喹啉-2-羧酸 (5b) 的合成 合成与纯化方法类似 5a。产率: 80%, 黄白色固体, 熔点: 104~106 °C。

1.18 4-(苄氧基)喹啉-2-羧酸 (5c) 的合成 合成与纯化方法类似 5a。产率: 75%, 白色固体, 熔点: 272~274 °C。

1.19 4-((4-溴苄基)氧基)喹啉-2-羧酸 (5d) 的合成 合成与纯化方法类似 5a。产率: 72%, 白色固体, 熔点: > 300 °C。

1.20 4-((3-溴苄基)氧基)喹啉-2-羧酸 (5e) 的合成 合成与纯化方法类似 5a。产率: 78%, 白色固体, 熔点: > 300 °C。

1.21 4-((4-(叔丁基)苄基)氧基)喹啉-2-羧酸 (5f) 的合成 合成与纯化方法类似 5a。产率: 64%, 棕色固体, 熔点: 286~288 °C。

1.22 4-((4-氯苄基)氧基)喹啉-2-羧酸 (5g) 的合成 合成与纯化方法类似 5a。产率: 70%, 白色固体, 熔点: 254~256 °C。

1.23 4-(2-(4-氯-3,5-二甲基苯氧基)乙氧基)喹啉-2-羧酸 (5h) 的合成 合成与纯化方法类似 5a。产率: 55%,

黄白色固体, 熔点: 196~198 °C。

1.24 4-((4-甲氧基苄基)氧基)喹啉-2-羧酸 (5i) 的合成 合成与纯化方法类似 5a。产率: 78%, 白色固体, 熔点: > 300 °C。

1.25 4-苯乙基喹啉-2-羧酸 (5j) 的合成 合成与纯化方法类似 5a。产率: 65%, 白色固体, 熔点: 236~238 °C。

1.26 4-([1,1'-联苯]-4-基甲氧基)喹啉-2-羧酸 (5k) 的合成 合成与纯化方法类似 5a。产率: 60%, 白色固体, 熔点: > 300 °C。

1.27 4-(萘-1-基甲氧基)喹啉-2-羧酸 (5l) 的合成 合成与纯化方法类似 5a。产率: 80%, 白色固体, 熔点: > 300 °C。

1.28 4-(2-(萘-1-基氧基)乙氧基)喹啉-2-羧酸 (5m) 的合成 合成与纯化方法类似 5a。产率: 50%, 黄白色固体, 熔点: 160~162 °C。

1.29 N-羟基-4-(萘-1-基甲氧基)喹啉-2-羧酰胺 (SDFZ-E1) 的合成 将 5l (0.33 g, 1 mmol)、O-(四氢-2H-吡喃-2-基)羟胺 (0.14 g, 1.2 mmol) 和 HATU (0.45 g, 1.2 mmol) 在冰浴下溶解在 DMF 中, 加入 NMM (0.3 mL, 3 mmol), 在氮气保护下搅拌 8 h, 倒入水中, 并用乙酸乙酯 (3×20 mL) 萃取。合并的有机层用 5% 柠檬酸, 饱和 NaHCO₃ 和饱和食盐水洗涤。用无水 MgSO₄ 干燥后, 过滤并旋干, 得到粗中间体。将该中间体溶于氯化氢的乙酸乙酯饱和溶液中。搅拌 10 min 后, 过滤沉淀, 得到粗产物。通过无水乙醇重结晶纯化最终得到终产物。

1.30 SDFZ-E2~SDFZ-E13 的合成 SDFZ-E2~SDFZ-E13 的合成与 SDFZ-E1 的合成类似。

2 生物活性评价

2.1 HDAC 酶活测试 将 10 μL 酶溶液 (HDAC1、HDAC2、HDAC6 或 HDAC8) 与不同浓度的受试化合物 (50 μL) 混合。将混合物在 37 °C 下孵育 5 min, 然后加入荧光底物 Boc-Lys(Ac)-AMC。在 37 °C 下孵育 30 min 后, 通过添加 100 μL 含有胰蛋白酶和 TSA 的终止剂来停止反应, 并将去乙酰化的底物转化为具有荧光的化合物。20 min 后, 使用微孔板读取器分别在 390 和 460 nm 的激发波长和发射波长下测量荧光强度。根据测试并相对于对照井的荧光强度读数计算抑制率, 并使用 GraphPad Prism 软件中的浓度/抑制数据的回归分析计算 IC₅₀ 值^[18]。

2.2 抗肿瘤细胞增殖活性研究 本工作中的所有细胞都用 RPMI-1640 (含有 10% 的胎牛血清) 培养。首先, 将持续培养至对数期的实体瘤细胞 (3 000 个细胞/孔) 或血液瘤细胞 (10 000 个细胞/孔) 接种在 96 孔板中。12 h 后, 加入溶解在培养基中的不同浓度的药物。培养 48 h 后, 将 CCK-8 溶液加入每个孔中。将 96 孔板

置于 37 °C 孵育 1~4 h, 待 96 孔板变为橘黄色后, 将 96 孔板置于摇床摇匀, 用酶标仪测量 450 nm 处的吸收值, 并计算不同浓度的抑制率和 IC₅₀ 值。

3 结合模式预测

3.1 对接研究 应用 Schrodinger 2018 suite 中的 LigPrep 对目标化合物进行处理, 选取 OPLS_2005 全原子力场, 目标 pH 设为 7 ± 2, 其余参数保持默认。随后, 导入人源的 HDAC8 蛋白结构 (PDB ID: 5FCW), 应用 Protein preparation wizard 对其进行删除水分子、加氢、加电荷、调整锌离子附近组氨酸残基的质子化状态等预处理。接着, 以 HDAC8 催化位点为中心, 生成边长为 20 Å 的网格, 其余参数均保持默认。使用 Schrodinger 2018 suite 中的对接模块, 对处理好的配体和对接格子进行对接, 其余选项保持默认。选取打分最高的构象作为对接结果, 并用于后续分子动力学模拟。

3.2 分子动力学模拟 应用 Desmond 进行^[19]对目标化合物-靶蛋白复合物进行分子动力学模拟, 以分子对接生成的复合物作为起始结构进行 10 ns 的分子动力学模拟。选用 OPLS_2005 全原子力场, SPC 水模型, 引入 Na⁺ 或 Cl⁻ 使体系电荷保持中性。结果的处理应用 Schrodinger 中的 simulation events analysis 模块, 分析蛋白和配体的 RMSD 变化, 蛋白中各氨基酸残基的 RMSF 变化, 关键原子间的距离变化。

作者贡献: 方浩对本文提供指导性支持, 设计论文总纲, 终审论文; 侯旭负责设计研究方案, 指导研究开展, 对文章进行修改; 杨新颖负责提供技术指导, 进行结构确证; 周易负责化学合成、生物评价、计算机模拟和文章写作; 邵文晴负责生物评价、计算机模拟和统计分析。

利益冲突: 本文不存在任何利益相关问题。

References

- [1] Peixoto P, Cartron PF, Serandour AA, et al. From 1957 to nowadays: a brief history of epigenetics [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21: 7571.
- [2] Witt O, Deubzer HE, Milde T, et al. HDAC family: what are the cancer relevant targets? [J]. *Cancer Lett*, 2009, 277: 8-21.
- [3] Gao X, Han W, Tian S, et al. Structurally novel HDAC inhibitors based on the trans- β -arylacryl tetrahydroisoquinoline scaffold: the design, synthesis, and anticancer activity [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2023, 58: 413-422.
- [4] Kim JY, Cho H, Yoo J, et al. Pathological role of HDAC8: cancer and beyond [J]. *Cells*, 2022, 11: 3161.
- [5] Deardorff MA, Bando M, Nakato R, et al. HDAC8 mutations in Cornelia de Lange syndrome affect the cohesin acetylation cycle [J]. *Nature*, 2012, 489: 313-317.
- [6] Wilson BJ, Tremblay AM, Deblois G, et al. An acetylation switch modulates the transcriptional activity of estrogen-related receptor alpha [J]. *Mol Endocrinol*, 2010, 24: 1349-1358.
- [7] Chakrabarti A, Oehme I, Witt O, et al. HDAC8: a multifaceted target for therapeutic interventions [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2015, 36: 481-492.
- [8] Nakagawa M, Oda Y, Eguchi T, et al. Expression profile of class I histone deacetylases in human cancer tissues [J]. *Oncol Rep*, 2007, 18: 769-774.
- [9] Wu J, Du C, Lv Z, et al. The up-regulation of histone deacetylase 8 promotes proliferation and inhibits apoptosis in hepatocellular carcinoma [J]. *Dig Dis Sci*, 2013, 58: 3545-3553.
- [10] Vanaja GR, Ramulu HG, Kalle AM. Overexpressed HDAC8 in cervical cancer cells shows functional redundancy of tubulin deacetylation with HDAC6 [J]. *Cell Commun Signal*, 2018, 16: 20.
- [11] Liang T, Wang F, Elhassan RM, et al. Targeting histone deacetylases for cancer therapy: trends and challenges [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2023, 13: 2425-2463.
- [12] Bai SY, Li ML, Ren Y, et al. HDAC8-inhibitor PCI-34051-induced exosomes inhibit human bronchial smooth muscle cell proliferation via miR-381-3p mediated TGF β 3 [J]. *Pulm Pharmacol Ther*, 2021, 71: 102096.
- [13] Hou X, Du J, Liu R, et al. Enhancing the sensitivity of pharmacophore-based virtual screening by incorporating customized ZBG features: a case study using histone deacetylase 8 [J]. *J Chem Inf Model*, 2015, 55: 861-871.
- [14] Wang L, Hou XB, Fu HS, et al. Design, synthesis and preliminary bioactivity evaluations of substituted quinoline hydroxamic acid derivatives as novel histone deacetylase (HDAC) inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem*, 2015, 23: 4364-4374.
- [15] Chen C, Hou X, Wang G, et al. Design, synthesis and biological evaluation of quinoline derivatives as HDAC class I inhibitors [J]. *Eur J Med Chem*, 2017, 133: 11-23.
- [16] Heimburg T, Kolbinger FR, Zeyen P, et al. Structure-based design and biological characterization of selective histone deacetylase 8 (HDAC8) inhibitors with anti-neuroblastoma activity [J]. *J Med Chem*, 2017, 60: 10188-10204.
- [17] Sixto-Lopez Y, Gomez-Vidal JA, De Pedro N, et al. Hydroxamic acid derivatives as HDAC1, HDAC6 and HDAC8 inhibitors with antiproliferative activity in cancer cell lines [J]. *Sci Rep*, 2020, 10: 10462.
- [18] Zhou Y, Liu X, Xue J, et al. Discovery of peptide boronate derivatives as histone deacetylase and proteasome dual inhibitors for overcoming bortezomib resistance of multiple myeloma [J]. *J Med Chem*, 2020, 63: 4701-4715.
- [19] Shaw DE. A fast, scalable method for the parallel evaluation of distance-limited pairwise particle interactions [J]. *J Comput Chem*, 2005, 26: 1318-1328.