

邻苯甲酰磺酰亚胺类 HDACs 抑制剂的设计、合成及 抗三阴性乳腺癌活性研究

李晓萌¹, 权梦瑶², 刘昱辰², 侯旭奔², 韩雷强^{1*}, 方浩^{2*}

(1. 山东大学第二医院药学部, 山东 济南 250033; 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: 作为一种关键的表观遗传调节因子, 组蛋白去乙酰化酶 (histone deacetylases, HDACs) 在癌症的发展中发挥着重要作用。小分子 HDACs 抑制剂已被证明能够抑制肿瘤增殖并诱导细胞凋亡, 因此受到了广泛的研究关注。本研究设计和合成了一系列新的邻苯甲酰磺酰亚胺衍生物作为 HDACs 抑制剂。生物学实验表明, 目标化合物 **9a** 展现出优于 vorinostat 的 HDACs 抑制活性, 且对三阴性乳腺癌 (triple-negative breast cancer, TNBC) 具有良好的体内外抗肿瘤活性。所有动物实验经山东大学药学院伦理委员会批准(批准号: 230094)。该项工作是以邻苯甲酰磺酰亚胺为母核发展 HDACs 抑制剂的一次探索, 以 **9a** 为代表的活性化合物可以作为先导化合物进一步研究。

关键词: 邻苯甲酰磺酰亚胺; HDAC 抑制剂; 抗肿瘤; 三阴性乳腺癌; 构效关系

中图分类号: R914 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)11-3017-10

Design, synthesis and biological evaluation of saccharin-based HDACs inhibitors for the treatment of triple-negative breast cancer

LI Xiao-meng¹, QUAN Meng-yao², LIU Yu-chen², HOU Xu-ben², HAN Lei-qiang^{1*}, FANG Hao^{2*}

(1. Department of Pharmacy, the Second Hospital of Shandong University, Ji'nan 250033, China; 2. School of Pharmaceutical Science, Key Laboratory of Chemical Biology (Ministry of Education), Shandong University, Ji'nan 250012, China)

Abstract: As a key epigenetic regulator, histone deacetylases (HDACs) play a crucial role in cancer development. Small molecule HDAC inhibitors have been shown to inhibit tumor proliferation and induce apoptosis, attracting significant research attention. In this study, we designed and synthesized a series of novel saccharin derivatives as HDAC inhibitors. Biological experiments demonstrated that the target compound **9a** exhibited superior HDACs inhibition activity to vorinostat and demonstrating promising *in vitro* and *in vivo* anti-tumor activity against triple-negative breast cancer (TNBC). All animal experiments in this study were performed in strict accordance with the protocols approved by the Ethical Committee of School of Pharmaceutical Sciences in Shandong University (Approval No. 230094). This work represents an initial exploration of developing saccharin-based HDAC inhibitors, and the active compound **9a** could serve as a lead compound for further study.

Key words: saccharin; histone deacetylase inhibitor; anti-tumor; triple-negative breast cancer; structure-activity relationship

表观遗传修饰与癌症的发生和发展密切相关^[1]。作

为一种常见的组蛋白翻译后修饰, 组蛋白乙酰化通过调节染色质构象来刺激基因转录^[2]。在人体中, 组蛋白的乙酰化水平由组蛋白乙酰转移酶 (histone acetyltransferase, HATs) 和组蛋白去乙酰化酶 (histone deacetylases, HDACs) 共同控制^[3]。HATs 将乙酰辅酶 A 的乙酰基转移到组蛋白的赖氨酸残基上, 而 HDACs 则

收稿日期: 2024-06-17; 修回日期: 2024-08-28.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81874288).

*通讯作者 Tel: 86-531-88381168, E-mail: haofangcn@sdu.edu.cn;

Tel: 86-531-85875139, E-mail: hanlq007@sina.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-0562

从赖氨酸残基上去除乙酰基^[4]。根据同源结构和细胞定位,经典的HDACs可分为4类:I类(HDAC1、2、3和8)、II类(IIa类:HDAC4、5、7和9,IIb类:HDAC6和10)、III类(Sirt1-Sirt7)和IV类(HDAC11)。其中,I、II和IV类HDACs是锌依赖型酶,而III类HDACs则是烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD⁺)依赖型酶^[5]。

抑制HDAC在癌症治疗中取得了良好的效果^[6]。迄今为止,已有多种HDACs抑制剂(vorinostat^[7]、romidepsin^[8]、belinostat^[9]、panobinostat^[10]和chidamide^[11])被批准用于治疗T细胞淋巴瘤等肿瘤的治疗。HDACs抑制剂的常见药效团包括3个特征部分:与活性位点Zn²⁺离子螯合的锌结合基团(zinc binding group, ZBG)、饱和或不饱和Linker基团及与HDACs表面氨基酸残基相互作用的表面识别Cap基团^[12]。前期研究表明,在保留异羟肟酸作为ZBG的同时,通过改变表面识别Cap基团和Linker基团结构,可以改善HDACs的抑制活性^[13]。

三阴性乳腺癌(triple-negative breast cancer, TNBC)是指雌激素受体(estrogens receptor, ER)、孕激素受体(progesterin receptor, PR)和人表皮生长因子受体-2(human epidermal growth factor receptor-2, HER2)均呈阴性表达的一种特殊类型的乳腺癌^[14]。与其他乳腺癌亚型相比,TNBC具有发病年龄小^[15]、侵袭性强和预后差的特点^[16]。TNBC对激素治疗不敏感,且缺乏靶向治疗^[17],因此迫切需要探索新的治疗方向。近期研究表明,HDACs可作为治疗TNBC的分子靶点^[18,19]。HDACs抑制剂可重组异染色质相关蛋白,恢复沉默的ER基因的表达^[20]。此外,有研究表明,选择性HDAC6抑制剂BAS-6可以通过改变TNBC细胞的糖代谢,选

择性地杀死抗凋亡的TNBC细胞^[21]。I类组蛋白去乙酰化酶抑制剂可增强抗血管生成基因的表达,从而抑制TNBC的肿瘤进展^[22]。因此,HDACs是TNBC的重要治疗靶点。

在前期的研究中,作者开发了一系列以糖精(1,2-二氢苯并[d]异噻唑-3-酮-1,1-二氧化物)为Cap基团的HDACs抑制剂,先后探索了脂肪链或苯环作为Linker基团的HDACs抑制活性,活性最优的化合物对TNBC细胞系具有较好的体外抗增殖活性^[23,24]。在本项研究中,设计并合成了11个以糖精环为Cap区、以苯丙烯酰胺为Linker的新型HDACs抑制剂。其中,活性最高的化合物**9a**的HDAC抑制活性和抗TNBC活性均优于vorinostat,且在MDA-MB-231小鼠肿瘤异种移植模型中也具备显著的抗肿瘤活性,可作为新的先导化合物用于HDAC抑制剂的优化。

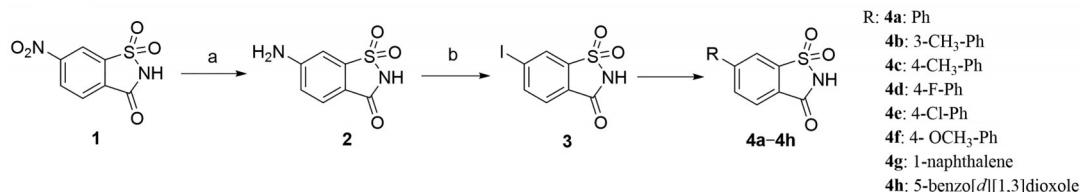
结果

1 目标化合物的合成

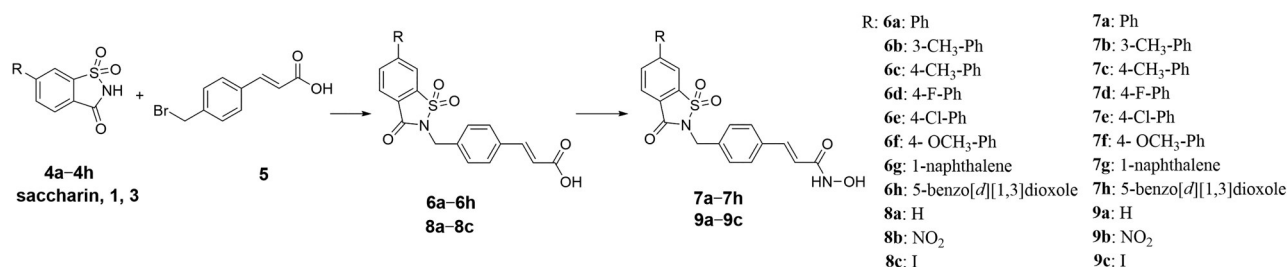
关键中间体和所有目标化合物的合成路线如合成路线1、2所示。中间体**2**是由起始原料**1**[6-硝基苯并[d]异噻唑-3(2H)-酮-1,1-二氧化物]通过氢化反应制备而成。然后,通过Sandmeyer反应得到中间体**3**。中间体**4a~4h**是由不同取代的苯硼酸和中间体**3**通过Suzuki反应合成的。将糖精或取代糖精与**5**混合,在DMF中于70℃加热,得到中间体**6a~6h**和**8a~8c**。然后,根据已报道的方法分别合成最终的异羟肟酸**7a~7h**和**9a~9c**^[25]。

2 HDACs抑制活性

以已上市的HDACs抑制剂vorinostat为阳性对



Scheme 1 Synthesis of intermediate **4a-4h**. Reagents: (a) H₂, Pd/C, THF; (b) CH₃COOH, HCl, NaNO₂, KI, H₂O



Scheme 2 Synthesis of compounds **7a-7h** and **9a-9c**. Reagents: (a) NaHCO₃, DMF; (b) ClCOBu-i, Et₃N, NH₂OH, CH₃OH

照, 使用 HeLa 细胞核提取物 (主要包含 HDAC1 和 HDAC2) 评估所有目标化合物的 HDACs 抑制活性。相关结果如表 1 所示, 在糖精环上引入苯基或者取代的苯基, 均表现出较好的 HDACs 抑制活性 (化合物 **7a**~**7f**, $IC_{50} = 0.13 \sim 1.00 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 但引入体积更大的萘基 (化合物 **7g**) 或 1,3-苯并间二氧杂环戊烯 (化合物 **7h**) 不利于 HDACs 抑制活性 ($IC_{50} > 5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。另一方面, 与无取代的化合物 **9a** 相比 ($IC_{50} = 0.08 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 在糖精环上引入硝基后 HDACs 抑制活性略有减弱 (化合物 **9b**, $IC_{50} = 0.27 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 但引入碘原子后活性进一步增强 (化合物 **9c**, $IC_{50} = 0.03 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。上述结果表明, 糖精环上的大取代基不利于目标化合物与 HDACs 的相互作用。在所有的目标化合物中, 化合物 **9a** 和 **9c** 具有优于 vorinostat ($IC_{50} = 0.13 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的 HDACs 抑制活性。

Table 1 Inhibitory activity of target compounds against histone deacetylases (HDACs). ^aInhibition rate lower than 50% ($5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)

Cpd.	R	HDACs $IC_{50}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
7a	Ph-	0.34 ± 0.07
7b	3-CH ₃ -Ph-	0.13 ± 0.03
7c	4-CH ₃ -Ph-	1.00 ± 0.11
7d	4-F-Ph-	0.31 ± 0.15
7e	4-Cl-Ph-	0.17 ± 0.06
7f	4-OCH ₃ -Ph-	0.41 ± 0.17
7g	1-Naphthalene-	NA ^a
7h	5-Benzo[d][1,3]dioxole-	NA ^a
9a	H-	0.08 ± 0.01
9b	NO ₂ -	0.27 ± 0.09
9c	I-	0.03 ± 0.01
Vorinostat	-	0.13 ± 0.05

3 分子对接研究

使用 AutoDock Vina 进行了分子对接研究, 以探索代表性化合物 **9a** 和 **9c** 与 HDAC1 的潜在结合模式。如图 1 所示, 化合物 **9a** 和 **9c** 能够嵌入 HDAC1 的催化口袋, 且异羟肟酸基团能够与口袋底部的锌原子形成适当的螯合作用。此外, 肉桂酸连接基团占据了 HDAC1 的疏水通道, 糖精环则作为表面识别基团与 HDAC1 活性位点表面的氨基酸相互作用。上述分子对接结果为进一步的结构优化提供了思路。

4 体外抗增殖活性

为了进一步研究活性化合物在细胞水平上的抗肿瘤活性, 使用 MTT 试验测定了化合物 **9a** 和 **9c** 对三阴性乳腺癌细胞 (MDA-MB-231) 及其他 3 种肿瘤细胞 (PC-3、KG1 和 K562) 的抗增殖活性。如表 2 所示, 两

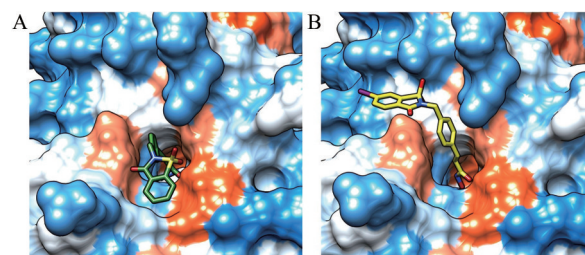


Figure 1 The predicted binding mode of different compounds in the active site of HDAC1. A: **9a** (green); B: **9c** (yellow)

个目标化合物都具有优于 vorinostat 的抑制活性。其中化合物 **9a** 的活性最优, 对 TNBC 细胞系 MDA-MB-231 的活性 ($IC_{50} = 2.04 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 是 vorinostat ($IC_{50} = 4.33 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的 2 倍。

Table 2 Anti-proliferation activity of selected HDAC inhibitors

Compound	$IC_{50}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$			
	MDA-MB-231	PC-3	KG1	K562
9a	2.04 ± 0.46	6.74 ± 1.99	1.36 ± 0.14	1.53 ± 1.08
9c	2.79 ± 0.12	7.04 ± 1.26	1.03 ± 0.40	1.65 ± 0.79
Vorinostat	4.33 ± 1.17	9.73 ± 0.62	3.14 ± 0.60	3.35 ± 0.23

5 化合物 9a 对组蛋白 H3 乙酰化的调控作用

上述实验已经证实, 化合物 **9a** 具有优于 vorinostat 的 HDACs 抑制活性及体外抗增殖活性。进一步使用 Western blot 实验检测化合物 **9a** 对组蛋白 H3 乙酰化 (Ac-H3) 水平的影响。如图 2 所示, 化合物 **9a** 能以剂量依赖的方式增加组蛋白 H3 的乙酰化水平, 且效果优于 vorinostat, 这与其更好的 HDAC 抑制活性和抗增殖活性结果一致。这些结果进一步证实了化合物 **9a** 能够在细胞内抑制 HDACs 活性。

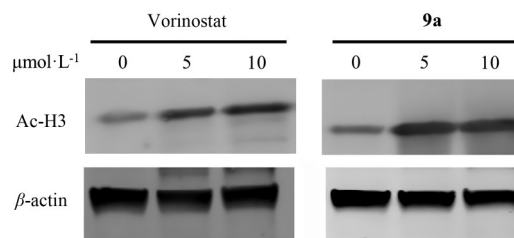


Figure 2 Effects of **9a** on the acetylation level of histone H3

6 体内抗肿瘤活性研究

进一步构建了 MDA-MB-231 异种移植小鼠模型, 以评估化合物 **9a** 的体内抗肿瘤活性。在荷瘤成功之后, 以腹腔注射的方式给予小鼠化合物 **9a** ($50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), 记录动物的体重及肿瘤体积变化。如图 3 所示, 化合物 **9a** 能够显著抑制 MDA-MB-231 肿瘤的体内生长, 且对小鼠体重没有显著影响。

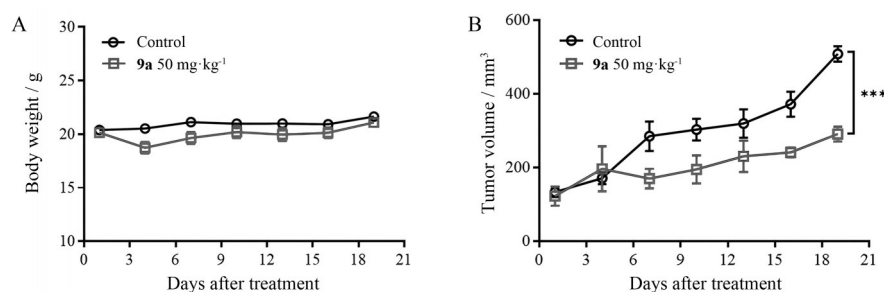


Figure 3 Anti-tumor activity of **9a** in MDA-MB-231 xenograft model. A: Changes of body weights during treatment; B: Changes of tumor volumes during treatment. $n = 5, \bar{x} \pm s, ***P < 0.001$

结论

表观遗传调控在TNBC的发生和发展过程中起着重要作用^[26]。研究表明, HDACs抑制剂 vorinostat 和 panobinostat 均能够显著地抑制 TNBC 细胞株的增殖并促进细胞凋亡^[27]。HDACs 在 TNBC 中的抗肿瘤作用机制包括: 激活上皮间质转化表型和下调生长因子 FOXA1^[28]、影响 DNA 同源重组修复途径^[29]、上调肿瘤抑制因子 p21 和 p27, 并下调抗凋亡蛋白 Bcl-2^[30]。

本文合成了一系列以糖精为 Cap、肉桂酸为 Linker、异羟肟酸为 ZBG 的新型 HDACs 抑制剂, 目标化合物在 HDACs 酶抑制实验中表现出良好的抑制活性。活性最优的化合物 **9a** 对 HDAC 抑制活性 ($IC_{50} = 0.08 \pm 0.01 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 优于 vorinostat ($IC_{50} = 0.13 \pm 0.05 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 且能够显著的调控细胞中组蛋白 H3 的乙酰化水平。化合物 **9a** ($IC_{50} = 2.04 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 对 TNBC 细胞株 MDA-MB-231 具有优于 vorinostat ($IC_{50} = 4.33 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的体外抗增殖活性。初步的体内实验也进一步证实, 化合物 **9a** 能够抑制 MDA-MB-231 的体内生长。上述结果表明, 邻苯甲酰磺酰亚胺类 HDACs 抑制剂 **9a** 有望成为用于 TNBC 治疗的新型先导化合物。

实验部分

所有试剂和溶剂未经说明的均为分析纯。化学材料购自 Bide Pharmatech 有限公司。所有反应均在 0.25 mm 硅胶板 (60GF₂₅₄) 上进行薄层色谱监测, 并用紫外光或氯化铁显色。使用 RY-1 电热熔点仪测量熔点。本实验中所有 ¹H NMR 和 ¹³C NMR 图谱通过 Bruker DRX 光谱仪测定 (400 MHz), 内标为四甲基硅烷 (TMS)。高分辨质谱 (HR-MS) 采用 SCI EX X500e Q TOF LC/MS 仪器测定。

1 化学合成

1.1 6-氨基苯并[d]异噻唑-3(2H)-酮-1,1-二氧化物 (2) 的合成 将起始原料 **1** (6.17 g, 27.0 mmol) 溶于 350 mL THF, 加入 10% Pd/C。然后用氢气还原 4 h, 过滤除去

催化剂。旋去溶剂, 得到略带黄色的粉末, 无需再提纯, 产率 95%。

1.2 6-碘苯并[d]异噻唑-3(2H)-酮-1,1-二氧化物 (3) 的合成 中间体 **3** 是根据文献^[23]相关步骤合成的。产率: 95%, 熔点: 224~226 °C。¹H NMR (CDCl₃) δ_{H} : 7.75 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 8.20 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 8.26 (s, 1H)。MS (ESI) m/z : 308.2 [M-H]⁻。

1.3 6-苯基苯并[d]异噻唑-3(2H)-酮-1,1-二氧化物 (4a) 的合成 将化合物 **3** (0.62 g, 2.0 mmol)、苯硼酸 (0.24 g, 2.0 mmol)、Na₂CO₃ (0.64 g, 6.0 mmol)、醋酸钯 (0.0018 g, 0.008 mmol) 和 H₂O (6 mL) 装入密封管中, 在 110 °C、150 W 的条件下微波辐照 10 min。冷却后, 将混合物倒入盐酸 (1 mol·L⁻¹, 20 mL) 中并过滤, 用 EtOH 重结晶纯化。产率: 96%, 熔点: 289~291 °C。¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ_{H} : 7.47 (m, 3H), 7.85 (m, 2H), 8.04 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 8.22 (dd, $J = 8.1$ Hz, 1.5 Hz, 1H), 8.50 (s, 1H)。MS (ESI) m/z : 258.2 [M-H]⁻。

1.4 6-(间甲苯基)苯并[d]异噻唑-3(2H)-酮-1,1-二氧化物 (4b) 的合成 以间甲基苯硼酸 (0.44 g, 3.2 mmol) 为起始原料, 合成与纯化方法类似 **4a**。产率: 86%, 熔点: 260~262 °C。¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ_{H} : 2.41 (s, 3H), 7.30 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.40 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.64 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.72 (s, 1H), 8.02 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 8.20 (dd, $J = 8.1$ Hz, 1.5 Hz, 1H), 8.47 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H)。MS (ESI) m/z : 272.4 [M-H]⁻。

1.5 6-(对甲苯基)苯并[d]异噻唑-3(2H)-酮-1,1-二氧化物 (4c) 的合成 以对甲基苯硼酸 (0.44 g, 3.2 mmol) 为起始原料, 合成与纯化方法类似 **4a**。产率: 87%, 熔点: 296~298 °C。¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ_{H} : 2.38 (s, 3H), 7.34 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H), 7.77 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 8.02 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 8.19 (dd, $J = 8.1$ Hz, 1.5 Hz, 1H), 8.47 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H)。MS (ESI) m/z : 272.4 [M-H]⁻。

1.6 6-(4-氟苯基)苯并[d]异噻唑-3(2H)-酮-1,1-二氧化物 (4d) 的合成 以 4-氟苯硼酸 (0.45 g, 3.2 mmol) 为起始原料, 合成与纯化方法类似 **4a**。产率: 89%, 熔点:

294~297 °C。¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ_H: 7.35 (m, 2H), 7.92 (m, 2H), 8.03 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.20 (dd, *J* = 8.1 Hz, 1.8 Hz, 1H), 8.50 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H)。MS (ESI) *m/z*: 276.3 [M-H]⁻。

1.7 6-(4-氯苯基)苯并[d]异噻唑-3(2H)-酮-1,1-二氧化物 (4e) 的合成 以 4-氯苯硼酸 (0.50 g, 3.2 mmol) 为起始原料, 合成与纯化方法类似 4a。产率: 92%, 熔点: > 300 °C。¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ_H: 7.59 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.90 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 8.04 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.22 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.53 (s, 1H)。MS (ESI) *m/z*: 292.3 [M-H]⁻。

1.8 6-(4-甲氧基苯基)苯并[d]异噻唑-3(2H)-酮-1,1-二氧化物 (4f) 的合成 以 4-甲氧基苯硼酸 (0.49 g, 3.2 mmol) 为起始原料, 合成与纯化方法类似 4a。产率: 95%, 熔点: > 300 °C。¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ_H: 3.84 (s, 3H), 7.07 (m, 2H), 7.83 (m, 2H), 7.99 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.17 (dd, *J* = 8.4 Hz, 1.8 Hz, 1H), 8.44 (s, 1H)。MS (ESI) *m/z*: 288.2 [M-H]⁻。

1.9 6-(萘-1-基)苯并[d]异噻唑-3(2H)-酮-1,1-二氧化物 (4g) 的合成 以 1-萘硼酸 (0.55 g, 3.2 mmol) 为起始原料, 合成与纯化方法类似 4a。产率: 85%, 熔点: 209~211 °C。¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ_H: 7.53 (m, 5H), 8.00 (dd, *J* = 7.8 Hz, 1.5 Hz, 1H), 8.06 (m, 2H), 8.12 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 8.29 (s, 1H)。MS (ESI) *m/z*: 308.4 [M-H]⁻。

1.10 6-(苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)苯并[d]异噻唑-3(2H)-酮-1,1-二氧化物 (4h) 的合成 以苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基硼酸 (0.53 g, 3.2 mmol) 为起始原料, 合成与纯化方法类似 4a。产率: 92%, 熔点: 281~284 °C。¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ_H: 6.12 (s, 2H), 7.06 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.38 (dd, *J* = 8.4 Hz, 1.8 Hz, 1H), 7.51 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 7.97 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 8.15 (dd, *J* = 8.1 Hz, 1.5 Hz, 1H), 8.43 (s, 1H)。MS (ESI) *m/z*: 302.4 [M-H]⁻。

1.11 (E)-3-(4-((1,1-二氧代-3-氧代-6-苯基)苯并[d]异噻唑-2(3H)-基)甲基)苯基)丙烯酸 (6a) 的合成 将 4a (1.71 g, 6.6 mmol) 和碳酸氢钠 (1.11 g, 13.2 mmol) 加入 3 mL DMF 中, 然后逐渐加入 5 (1.90 g, 7.9 mmol), 并在 60~80 °C 下搅拌 4 h。将混合物倒入 15 mL 水中, 用 EtOH 重结晶, 得到纯品 6a。产率: 87%, 熔点: 271~273 °C。¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ_H: 4.98 (s, 2H), 6.51 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 7.46 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.51 (m, 4H), 7.69 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.89 (dd, *J* = 8.4 Hz, 1.2 Hz, 2H), 8.16 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.30 (dd, *J* = 8.1 Hz, 1.5 Hz, 1H), 8.73 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 12.43 (s, 1H)。MS (ESI) *m/z*: 418.5 [M-H]⁻。

1.12 (E)-3-(4-((1,1-二氧代-3-氧代-6-(间甲基)苯并[d]异噻唑-2(3H)-基)甲基)苯基)丙烯酸 (6b) 的合成 以 4b (1.0 g, 3.7 mmol) 为起始原料, 合成与纯化方法类似 6a。产率: 88%, 熔点: 297~299 °C。¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ_H: 2.41 (s, 3H), 4.97 (s, 2H), 6.51 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H), 7.31 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.41 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.46 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.56 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 7.68 (d, *J* = 8.1 Hz, 3H), 7.75 (s, 1H), 8.14 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.29 (dd, *J* = 8.1 Hz, 1.5 Hz, 1H), 8.70 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 12.40 (s, 1H)。MS (ESI) *m/z*: 432.5 [M-H]⁻。

1.13 (E)-3-(4-((1,1-二氧代-3-氧代-6-(对甲基)苯并[d]异噻唑-2(3H)-基)甲基)苯基)丙烯酸 (6c) 的合成 以 4c (1.0 g, 3.7 mmol) 为起始原料, 合成与纯化方法类似 6a。产率: 90%, 熔点: 298~300 °C。¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ_H: 2.39 (s, 3H), 4.97 (s, 2H), 6.51 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 7.35 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 7.46 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.55 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 7.68 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.80 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 8.13 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.28 (dd, *J* = 8.1 Hz, 1.5 Hz, 1H), 8.70 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 12.42 (s, 1H)。MS (ESI) *m/z*: 432.5 [M-H]⁻。

1.14 (E)-3-(4-((6-(4-氟苯基)-1,1-二氧代-3-氧代)苯并[d]异噻唑-2(3H)-基)甲基)苯基)丙烯酸 (6d) 的合成 以 4d (1.0 g, 3.6 mmol) 为起始原料, 合成与纯化方法类似 6a。产率: 93%, 熔点: 264~266 °C。¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ_H: 4.97 (s, 2H), 6.50 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H), 7.37 (m, 2H), 7.46 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.55 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H), 7.68 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.95 (m, 2H), 8.15 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.29 (dd, *J* = 8.1 Hz, 1.5 Hz, 1H), 8.72 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 12.40 (s, 1H)。MS (ESI) *m/z*: 436.5 [M-H]⁻。

1.15 (E)-3-(4-((6-(4-氯苯基)-1,1-二氧代-3-氧代)苯并[d]异噻唑-2(3H)-基)甲基)苯基)丙烯酸 (6e) 的合成 以 4e (1.0 g, 3.4 mmol) 为起始原料, 合成与纯化方法类似 6a。产率: 92%, 熔点: > 300 °C。¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ_H: 4.98 (s, 2H), 6.50 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 7.46 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.55 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 7.60 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.68 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.93 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 8.16 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.30 (dd, *J* = 8.1 Hz, 1.5 Hz, 1H), 8.75 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 12.40 (s, 1H)。MS (ESI) *m/z*: 452.4 [M-H]⁻。

1.16 (E)-3-(4-((6-(4-甲氧基苯基)-1,1-二氧代-3-氧代)苯并[d]异噻唑-2(3H)-基)甲基)苯基)丙烯酸 (6f) 的合成 以 4f (1.0 g, 3.5 mmol) 为起始原料, 合成与纯化方法类似 6a。产率: 94%, 熔点: 289~292 °C。¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ_H: 3.84 (s, 3H), 4.96 (s, 2H), 6.50 (d, *J* =

15.9 Hz, 1H), 7.09 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.46 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 7.55 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H), 7.68 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 7.88 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 8.11 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 8.26 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 8.66 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H), 12.39 (s, 1H)。MS (ESI) m/z : 448.5 [M-H]⁻。

1.17 (E)-3-(4-((6-(萘-1-基)-1,1-二氧化-3-氧代苯并[d]异噻唑-2(3H)-基)甲基)苯基)丙烯酸 (6g) 的合成 以 **4g** (1.0 g, 3.2 mmol) 为起始原料, 合成与纯化方法类似 **6a**。产率: 75%, 熔点: 239~241 °C。¹H NMR (DMSO- d_6) δ_{H} : 5.01 (s, 2H), 6.52 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H), 7.49 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.54 (m, 8H), 8.06 (m, 3H), 8.23 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 8.51 (d, $J = 0.9$ Hz, 1H), 12.40 (s, 1H)。MS (ESI) m/z : 468.5[M-H]⁻。

1.18 (E)-3-(4-((6-(苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)-1,1-二氧化-3-氧代苯并[d]异噻唑-2(3H)-基)甲基)苯基)丙烯酸 (6h) 的合成 以 **4h** (1.0 g, 3.3 mmol) 为起始原料, 合成与纯化方法类似 **6a**。产率: 85%, 熔点: > 300 °C。¹H NMR (DMSO- d_6) δ_{H} : 4.96 (s, 2H), 6.13 (s, 2H), 6.50 (d, $J = 16.2$ Hz, 1H), 7.07 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.43 (m, 5H), 7.68 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 8.09 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 8.24 (dd, $J = 8.1$ Hz, 1.5 Hz, 1H), 8.65 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H), 12.39 (s, 1H)。MS (ESI) m/z : 462.4 [M-H]⁻。

1.19 (E)-3-(4-((1,1-二氧化-3-氧代苯并[d]异噻唑-2(3H)-基)甲基)苯基)丙烯酸 (8a) 的合成 将糖精 (1.21 g, 6.6 mmol) 和碳酸氢钠 (1.11 g, 13.2 mmol) 加入 3 mL DMF 中, 然后逐渐加入 **5** (1.90 g, 7.9 mmol), 并在 60~80 °C 下搅拌 4 h。将混合物倒入 15 mL 水中, 用 EtOH 重结晶, 得到纯品 **8a**。产率: 92%, 熔点: 273~276 °C。¹H NMR (DMSO- d_6) δ_{H} : 4.96 (s, 2H), 6.50 (d, $J = 16.2$ Hz, 1H), 7.45 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 7.55 (d, $J = 16.2$ Hz, 1H), 7.68 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 7.99 (m, 3H), 8.34 (dd, $J = 6.9$ Hz, 0.9 Hz, 1H), 12.42 (s, 1H)。MS (ESI) m/z : 342.2[M-H]⁻。

1.20 (E)-3-(4-((6-硝基-1,1-二氧化-3-氧代苯并[d]异噻唑-2(3H)-基)甲基)苯基)丙烯酸 (8b) 的合成 以 **1** (1.51 g, 6.6 mmol) 为起始原料, 合成与纯化方法类似 **8a**。产率: 71%, 熔点: 285~287 °C。¹H NMR (DMSO- d_6) δ_{H} : 5.00 (s, 2H), 6.51 (d, $J = 16.2$ Hz, 1H), 7.47 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.55 (d, $J = 16.2$ Hz, 1H), 7.68 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 8.33 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 8.71 (dd, $J = 8.4$ Hz, 2.1 Hz, 1H), 9.32 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H), 12.40 (s, 1H)。MS (ESI) m/z : 387.3 [M-H]⁻。

1.21 (E)-3-(4-((6-碘-1,1-二氧化-3-氧代苯并[d]异噻唑-2(3H)-基)甲基)苯基)丙烯酸 (8c) 的合成 以 **3** (2.04 g, 6.6 mmol) 为起始原料, 合成与纯化方法类似

8a。产率: 87%, 熔点: 295~297 °C。¹H NMR (DMSO- d_6) δ_{H} : 4.93 (s, 2H), 6.51 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H), 7.43 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 7.55 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H), 7.67 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 7.82 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 8.36 (dd, $J = 8.1$ Hz, 1.5 Hz, 1H), 8.87 (d, $J = 0.9$ Hz, 1H), 12.43 (s, 1H)。MS (ESI) m/z : 468.2 [M-H]⁻。

1.22 (E)-3-(4-((1,1-二氧化-3-氧代-6-苯基苯并[d]异噻唑-2(3H)-基)甲基)苯基)-N-羟基丙烯酰胺 (7a) 的合成 将 Et₃N (0.33 mL, 3.3 mmol) 和氯甲酸异丁酯 (0.43 mL, 3.3 mmol) 加入 **6a** (3.3 mmol) 的无水 THF (20 mL) 溶液中, 在 0 °C 下搅拌 10 min。然后, 加入溶于无水 CH₃OH (1 mL) 中的混合物 NH₂OH·HCl (0.34 g, 5.0 mmol) 和 Et₃N (0.53 mL, 5.0 mmol)。将所得溶液搅拌 3~6 h。过滤混合物并除去溶剂后, 用乙酸乙酯 (50 mL) 溶解, 并分别用盐酸 (1 mol·L⁻¹, 55 mL) 和饱和碳酸氢钠 (50 mL) 洗涤 3 次。粗产物可通过柱色谱法 (DCM/MeOH, 100:1) 纯化最终得到终产物。产率: 56%。熔点: 214~216 °C。¹H NMR (DMSO- d_6) δ_{H} : 4.97 (s, 2H), 6.43 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H), 7.42 (m, 8H), 7.89 (dd, $J = 7.8$ Hz, 1.2 Hz, 2H), 8.16 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 8.30 (dd, $J = 8.1$ Hz, 1.5 Hz, 1H), 8.72 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H), 9.03 (s, 1H), 10.76 (s, 1H); ¹³C NMR (DMSO- d_6) δ_{C} : 41.42, 119.37, 119.53, 124.80, 125.71, 127.51, 127.61, 128.36, 129.25, 129.49, 133.19, 134.38, 136.44, 136.97, 137.76, 138.00, 147.49, 158.41, 162.65。HRMS (AP-ESI): m/z calcd. for C₂₃H₁₈N₂O₅S [M+H]⁺ 435.100 9, found 435.100 6。

1.23 (E)-3-(4-((1,1-二氧化-3-氧代-6-(间甲苯基)苯并[d]异噻唑-2(3H)-基)甲基)苯基)-N-羟基丙烯酰胺 (7b) 的合成 以 **6b** (1.0 g, 2.3 mmol) 为起始原料, 合成与纯化方法参照 **7a**。产率: 59%。熔点: 188~190 °C。¹H NMR (DMSO- d_6) δ_{H} : 2.41 (s, 3H), 4.96 (s, 2H), 6.43 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H), 7.32 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.42 (m, 4H), 7.55 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.68 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.76 (s, 1H), 8.15 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 8.29 (dd, $J = 8.4$ Hz, 1.8 Hz, 1H), 8.71 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H), 9.04 (s, 1H), 10.77 (s, 1H); ¹³C NMR (DMSO- d_6) δ_{C} : 20.93, 41.41, 119.36, 119.44, 124.55, 124.70, 125.67, 127.61, 128.12, 128.36, 129.14, 130.13, 133.08, 134.37, 136.45, 136.86, 137.75, 137.98, 138.63, 147.59, 158.44, 162.64。HRMS (AP-ESI) m/z calcd. for C₂₄H₂₀N₂O₅S [M+H]⁺ 449.116 6, found 449.116 4。

1.24 (E)-3-(4-((1,1-二氧化-3-氧代-6-(对甲苯基)苯并[d]异噻唑-2(3H)-基)甲基)苯基)-N-羟基丙烯酰胺 (7c) 的合成 以 **6c** (1.0 g, 2.3 mmol) 为起始原料, 合成与

纯化方法参照 **7a**。产率: 50%。熔点: 211~213 °C。¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ_H: 2.38 (s, 3H), 4.96 (s, 2H), 6.43 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 7.35 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 7.42 (m, 3H), 7.55 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.80 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 8.13 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.28 (dd, *J* = 8.1 Hz, 1.2 Hz, 1H), 8.69 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 9.04 (s, 1H), 10.76 (s, 1H); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ_C: 20.71, 41.40, 119.10, 119.36, 124.43, 125.66, 127.32, 127.61, 128.36, 129.85, 132.73, 134.04, 134.37, 136.46, 137.76, 138.02, 139.33, 147.42, 158.44, 162.65。HRMS (AP-ESI) *m/z* calcd. for C₂₄H₂₀N₂O₅S [M+H]⁺ 449.116 6, found 449.116 5。

1.25 (E)-3-(4-((6-(4-氟苯基)-1,1-二氧化-3-氧代苯并[d]异噻唑-2(3H)-基)甲基)苯基)-N-羟基丙烯酰胺 (7d) 的合成 以 **6d** (1.0 g, 2.3 mmol) 为起始原料, 合成与纯化方法参照 **7a**。产率: 43%。熔点: 204~206 °C。¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ_H: 4.96 (s, 2H), 6.43 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 7.37 (m, 5H), 7.55 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.95 (m, 2H), 8.15 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.29 (dd, *J* = 8.1 Hz, 1.2 Hz, 1H), 8.73 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 9.05 (s, 1H), 10.77 (s, 1H); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ_C: 41.43, 116.14 (d, *J* = 21.5 Hz), 119.37, 119.50, 124.74, 125.70, 127.61, 128.36, 129.85 (d, *J* = 8.6 Hz), 133.10, 133.45 (d, *J* = 3.1 Hz), 134.38, 136.42, 137.75, 137.99, 146.38, 158.38, 162.65, 163.02 (d, *J* = 246.1 Hz)。HRMS (AP-ESI) *m/z* calcd for C₂₃H₁₇FN₂O₅S [M+H]⁺ 453.091 5, found 453.091 9。

1.26 (E)-3-(4-((6-(4-氯苯基)-1,1-二氧化-3-氧代苯并[d]异噻唑-2(3H)-基)甲基)苯基)-N-羟基丙烯酰胺 (7e) 的合成 以 **6e** (1.0 g, 2.2 mmol) 为起始原料, 合成与纯化方法参照 **7a**。产率: 52%。熔点: 230~232 °C。¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ_H: 4.97 (s, 2H), 6.43 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 7.42 (m, 3H), 7.55 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.61 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.93 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 8.16 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.31 (dd, *J* = 8.1 Hz, 1.5 Hz, 1H), 8.76 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 9.05 (s, 1H), 10.77 (s, 1H); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ_C: 41.45, 119.37, 119.61, 125.05, 125.74, 127.61, 128.37, 129.18, 129.33, 133.15, 134.39, 134.54, 135.75, 136.40, 137.76, 137.98, 146.09, 158.33, 162.66。HRMS (AP-ESI) *m/z* calcd. for C₂₃H₁₇ClN₂O₅S [M+H]⁺ 469.061 9, found 469.061 9。

1.27 (E)-3-(4-((6-(4-甲氧基苯基)-1,1-二氧化-3-氧代苯并[d]异噻唑-2(3H)-基)甲基)苯基)-N-羟基丙烯酰胺 (7f) 的合成 以 **6f** (1.0 g, 2.2 mmol) 为起始原料, 合成与纯化方法参照 **7a**。产率: 54%。熔点: 216~217 °C。¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ_H: 3.84 (s, 3H), 4.95 (s, 2H), 6.43 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 7.09 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.42 (m,

3H), 7.55 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.88 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 8.11 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.26 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 8.67 (s, 1H), 9.05 (s, 1H), 10.77 (s, 1H); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ_C: 41.37, 55.35, 114.71, 118.62, 119.35, 123.87, 125.64, 127.60, 128.33, 128.87, 129.08, 132.25, 134.35, 136.49, 137.74, 138.08, 147.13, 158.48, 160.54, 162.64。HRMS (AP-ESI) *m/z* calcd. for C₂₄H₂₀N₂O₆S [M+H]⁺ 465.111 5, found 465.111 5。

1.28 (E)-3-(4-((6-(萘-1-基)-1,1-二氧化-3-氧代苯并[d]异噻唑-2(3H)-基)甲基)苯基)-N-羟基丙烯酰胺 (7g) 的合成 以 **6g** (1.0 g, 2.1 mmol) 为起始原料, 合成与纯化方法参照 **7a**。产率: 55%。熔点: 188~190 °C。¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ_H: 5.00 (s, 2H), 6.44 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 7.43 (m, 10H), 8.06 (m, 3H), 8.23 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 8.51 (d, *J* = 0.9 Hz, 1H), 9.04 (s, 1H), 10.77 (s, 1H); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ_C: 41.45, 119.37, 122.60, 124.49, 125.23, 125.25, 125.54, 126.35, 127.13, 127.61, 127.66, 128.37, 128.56, 129.19, 130.22, 133.32, 134.39, 136.43, 136.48, 136.68, 137.46, 137.76, 147.70, 158.44, 162.64。HRMS (AP-ESI) *m/z* calcd. for C₂₇H₂₀N₂O₅S [M+H]⁺ 485.116 6, found 485.116 5。

1.29 (E)-3-(4-((6-(苯并[d][1,3]二氧杂环戊烯-5-基)-1,1-二氧化-3-氧代苯并[d]异噻唑-2(3H)-基)甲基)苯基)-N-羟基丙烯酰胺 (7h) 的合成 以 **6h** (1.0 g, 2.2 mmol) 为起始原料, 合成与纯化方法参照 **7a**。产率: 45%。熔点: 200~202 °C。¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ_H: 4.95 (s, 2H), 6.13 (s, 2H), 6.43 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 7.07 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.42 (m, 7H), 8.09 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.24 (dd, *J* = 8.1 Hz, 1.5 Hz, 1H), 8.65 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 9.03 (s, 1H), 10.76 (s, 1H); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ_C: 41.37, 101.64, 107.63, 108.90, 119.00, 119.34, 121.93, 124.13, 125.57, 127.60, 128.33, 130.93, 132.61, 134.35, 136.48, 137.74, 138.01, 147.11, 148.35, 148.63, 158.43, 162.63。HRMS (AP-ESI) *m/z* calcd. for C₂₄H₁₈N₂O₇S [M+H]⁺ 479.090 7, found 479.090 5。

1.30 (E)-3-(4-((1,1-二氧化-3-氧代苯并[d]异噻唑-2(3H)-基)甲基)苯基)-N-羟基丙烯酰胺 (9a) 的合成 将 Et₃N (0.33 mL, 3.3 mmol) 和氯甲酸异丁酯 (0.43 mL, 3.3 mmol) 加入 **8a** (3.3 mmol) 的无水 THF (20 mL) 溶液中, 在 0 °C 下搅拌 10 min。然后, 加入溶于无水 CH₃OH (1 mL) 中的混合物 NH₂OH·HCl (0.34 g, 5.0 mmol) 和 Et₃N (0.53 mL, 5.0 mmol)。将所得溶液搅拌 3~6 h。过滤混合物并除去溶剂后, 用乙酸乙酯 (50 mL) 溶解, 并分别用盐酸 (1 mol·L⁻¹, 55 mL) 和饱和碳酸氢钠 (50 mL) 洗涤 3 次。粗产物可通过柱色谱法 (DCM/MeOH, 100:1)

纯化最终得到终产物。产率: 52%。熔点: 191~193 °C。¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ_H: 4.94 (s, 2H), 6.43 (d, *J* = 15.3 Hz, 1H), 7.42 (d, *J* = 15.3 Hz, 1H), 7.44 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.54 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.99 (m, 3H), 8.33 (dd, *J* = 6.9 Hz, 0.9 Hz, 1H), 9.03 (s, 1H), 10.76 (s, 1H); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ_C: 41.36, 119.37, 121.62, 125.19, 126.18, 127.59, 128.36, 134.37, 135.30, 135.89, 136.36, 136.83, 137.72, 158.59, 162.62。HRMS (AP-ESI) *m/z* calcd. for C₁₇H₁₄N₂O₅S [M+H]⁺ 359.069 6, found 359.069 6。

1.31 (E)-3-(4-((6-硝基-1,1-二氧化-3-氧代苯并[d]异噻唑-2(3H)-基)甲基)苯基)-N-羟基丙烯酰胺 (9b) 的合成 以 **8b** (1.0 g, 2.6 mmol) 为起始原料, 合成与纯化方法参照 **9a**。产率: 57%。熔点: 198~200 °C。¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ_H: 5.00 (s, 2H), 6.44 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 7.42 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 7.46 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.55 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 8.33 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 8.72 (dd, *J* = 8.7 Hz, 2.1 Hz, 1H), 9.06 (s, 1H), 9.32 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 10.79 (s, 1H); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ_C: 41.90, 118.06, 119.54, 126.96, 127.59, 128.49, 130.27, 130.92, 134.52, 135.92, 137.63, 137.72, 151.85, 157.10, 162.61。HRMS (AP-ESI) *m/z* calcd. for C₁₇H₁₃N₃O₇S [M+H]⁺ 404.054 7, found 404.054 9。

1.32 (E)-3-(4-((6-碘-1,1-二氧化-3-氧代苯并[d]异噻唑-2(3H)-基)甲基)苯基)-N-羟基丙烯酰胺 (9c) 的合成 以 **8c** (1.0 g, 2.1 mmol) 为起始原料, 合成与纯化方法参照 **9a**。产率: 47%。熔点: 193~195 °C。¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ_H: 4.92 (s, 2H), 6.42 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 7.41 (d, *J* = 15.6 Hz, 2H), 7.43 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.54 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.83 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.36 (dd, *J* = 8.1 Hz, 1.5 Hz, 1H), 8.86 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 9.05 (s, 1H), 10.77 (s, 1H); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ_C: 41.43, 103.95, 119.39, 125.63, 126.41, 127.58, 128.39, 129.97, 134.41, 136.19, 137.69, 137.84, 144.07, 158.29, 162.59。HRMS (AP-ESI) *m/z* calcd. for C₁₇H₁₃I_N₂O₅S [M+H]⁺ 484.966 3, found 484.966 2。

2 HDACs 酶抑制活性测试

在 96 孔黑色酶标板中加入 50 μL 不同浓度的待测化合物和 10 μL HDACs 酶溶液 (HeLa 细胞核提取物), 将混合物在 37 °C 下孵育 5 min。然后, 加入 40 μL 荧光底物 Ac-LeuGlyLys (Ac)-AMC (25 μmol·L⁻¹), 在 37 °C 下继续孵育 30 min。孵育结束后, 加入 100 μL 含有胰蛋白酶 (10 mg·mL⁻¹) 和 TSA (2 μmol·L⁻¹) 的终止液以终止反应。反应在 37 °C 终止 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。最后, 计算抑制率并使用 GraphPad

Prism 软件计算 IC₅₀ 值。

3 细胞培养

所有细胞在含 5% CO₂ 的恒温培养箱中培养, 温度为 37 °C。人乳腺癌细胞系 MDA-MB-231、人急性髓系白血病细胞系 KG1 使用 DMEM 培养基; 人前列腺癌细胞系 PC-3 使用 Ham's F-12K 培养基; 人急性髓系白血病细胞系 K562 使用 IMDM 培养基, 所有细胞均培养于 10% FBS (VivaCell, C04001500) + 1% P/S (Solarbio, P1400) 中, 细胞长至 90% 密度时进行传代处理, 所有细胞均购自中国科学院上海细胞库。

4 抗增殖实验

取对数生长期的细胞, 常规细胞消化后接种于 96 孔板中, 每孔 100 μL。MDA-MB-231 细胞、PC-3 细胞铺板密度为每毫升 3×10⁴, KG1 细胞、K562 细胞铺板密度为每毫升 8×10⁴, 37 °C 培养 12 h 使贴壁细胞进行贴壁。使用相应培养基对化合物进行不同梯度的稀释, 并设置相应的对照组和空白组。每组设 3 个复孔, 所有化合物均使用 DMSO 配制为 10 mmol·L⁻¹ 储备液。37 °C、5% CO₂ 条件下继续培养 48 h, 每孔加入 MTT (Solarbio, M8180) 溶液 (5 mg·mL⁻¹) 20 μL, 37 °C 避光孵育 4 h。以 100 r·min⁻¹ 离心 10 min, 小心吸弃培养基, 每孔加入 200 μL DMSO, 低速振摇 10 min 使结晶物充分溶解。在酶标仪上测定 490 nm (630 nm 校准) 处的吸光度, 并使用 GraphPad Prism 软件计算抑制率和 IC₅₀ 值。

5 分子对接

HDAC1 蛋白结构来自 RCSB 数据库 (PDB: 5ICN), 然后使用 Sybyl-x 软件包对蛋白和小分子的结构进行准备处理。分子对接使用 AutoDock Vina 进行, 根据对接得分及异羟肟酸与活性位点的锌离子的螯合作用, 选择代表性的构象作为目标化合物的预测结合模式。图片使用 UCSF Chimera 生成。

6 蛋白质分离和蛋白免疫印迹

将 MDA-MB-231 细胞 (4×10⁶) 置于 60 mm 培养皿中, 加入指定浓度的目标化合物继续培养 24 h。使用总蛋白提取试剂盒 (Bestbio, 中国上海) 提取蛋白质, 在 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 上电泳分离, 然后电转移到聚偏二氟乙烯膜上。用 5% 脱脂牛奶封闭膜, 并与抗乙酰组蛋白兔单克隆抗体 (H3K9) 和抗 β-actin 兔多克隆抗体一起孵育。最后, 用 Odyssey 红外成像系统对印迹膜进行成像。

7 肿瘤异种移植模型

本研究所有动物实验均严格按照山东大学药学院伦理委员会批准的研究方案进行 (批准号: 230094)。BALB/c 裸鼠购自维通利华公司, 并在山东大学模式动物研究中心饲养 (SPF 级)。当 MDA-MB-231 细胞长至

对数生长期时, $1\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 $10\ \text{min}$ 收集细胞, 并使用无菌 PBS 溶液洗涤两次。充分混匀细胞悬液, 调整细胞密度至每毫升 4×10^7 个, 以每只 $100\ \mu\text{L}$ 的体积对裸鼠 (雄性, 8 周龄) 右侧腋下进行皮下接种。待肿瘤体积达到 $100\ \text{mm}^3$ 时, 对小鼠随机分组并开始给药, 以 $20\ \text{g}$ 小鼠体重给药 $200\ \mu\text{L}$ 的体积配置目标化合物浓度, 每隔 3 天称量并记录小鼠体重和肿瘤体积。治疗结束后, 对小鼠进行 CO_2 安乐死, 称量并记录肿瘤组织的重量。

作者贡献: 李晓萌负责化学合成、生物评价和文章写作; 方浩对本文提供指导性支持, 设计论文总纲, 终审论文; 韩雷强负责设计研究方案, 指导研究开展, 对文章进行修改; 侯旭奔负责分子对接研究; 刘昱辰负责中间体和目标化合物合成; 权梦瑶负责文章修改与统计分析。

利益冲突: 本文所有作者声明不存在利益冲突关系。

References

- [1] Abdelfatah E, Kerner Z, Nanda N, et al. Epigenetic therapy in gastrointestinal cancer: the right combination [J]. *Therap Adv Gastroenterol*, 2016, 9: 560-579.
- [2] Li XJ, Egervari G, Wang YG, et al. Regulation of chromatin and gene expression by metabolic enzymes and metabolites [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018, 19: 563-578.
- [3] Ho TCS, Chan AHY, Ganesan A. Thirty years of HDAC inhibitors: 2020 insight and hindsight [J]. *J Med Chem*, 2020, 63: 12460-12484.
- [4] Zhang YJ, Fang H, Jiao J, et al. The structure and function of histone deacetylases: the target for anti-cancer therapy [J]. *Curr Med Chem*, 2008, 15: 2840-2849.
- [5] Seto E, Yoshida M. Erasers of histone acetylation: the histone deacetylase enzymes [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2014, 6: a018713.
- [6] Eckschlager T, Plch J, Stiborova M, et al. Histone deacetylase inhibitors as anticancer drugs [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18: 1414.
- [7] Lee JH, Choy ML, Ngo L, et al. Histone deacetylase inhibitor induces DNA damage, which normal but not transformed cells can repair [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107: 14639-14644.
- [8] Coiffier B, Pro B, Prince HM, et al. Results from a pivotal, open-label, phase II study of romidepsin in relapsed or refractory peripheral T-cell lymphoma after prior systemic therapy [J]. *J Clin Oncol*, 2012, 30: 631-636.
- [9] O'Connor OA, Horwitz S, Masszi T, et al. Belinostat in patients with relapsed or refractory peripheral T-cell lymphoma: results of the pivotal phase II BELIEF (CLN-19) study [J]. *J Clin Oncol*, 2015, 33: 2492-2499.
- [10] Garnock-Jones KP. Panobinostat: first global approval [J]. *Drugs*, 2015, 75: 695-704.
- [11] Shi YK, Jia B, Xu W, et al. Chidamide in relapsed or refractory peripheral T cell lymphoma: a multicenter real-world study in China [J]. *J Hematol Oncol*, 2017, 10: 69.
- [12] Yu LQ, Liu F, Chen YD, et al. Pharmacophore identification of hydroxamate HDAC 1 inhibitors [J]. *Chin J Chem*, 2009, 27: 557-564.
- [13] Yoon S, Eom GH. HDAC and HDAC inhibitor: from cancer to cardiovascular diseases [J]. *Chonnam Med J*, 2016, 52: 1-11.
- [14] Yin L, Duan JJ, Bian XW, et al. Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress [J]. *Breast Cancer Res*, 2020, 22: 61.
- [15] Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, et al. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence [J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13: 4429-4434.
- [16] Jiang YZ, Ma D, Suo C, et al. Genomic and transcriptomic landscape of triple-negative breast cancers: subtypes and treatment strategies [J]. *Cancer Cell*, 2019, 35: 428-440.
- [17] Hudis CA, Gianni L. Triple-negative breast cancer: an unmet medical need [J]. *Oncologist*, 2011, 16 (Suppl 1): 1-11.
- [18] Zhang KJ, Liu ZY, Yao YW, et al. Structure-based design of a selective class I histone deacetylase (HDAC) near-infrared (NIR) probe for epigenetic regulation detection in triple-negative breast cancer (TNBC) [J]. *J Med Chem*, 2021, 64: 4020-4033.
- [19] Tang C, Du Y, Liang Q, et al. Development of a novel ferrocenyl histone deacetylase inhibitor for triple-negative breast cancer therapy [J]. *Organometallics*, 2018, 37: 2368-2375.
- [20] Zhou Q, Atadja P, Davidson NE. Histone deacetylase inhibitor LBH589 reactivates silenced estrogen receptor alpha (ER) gene expression without loss of DNA hypermethylation [J]. *Cancer Biol Ther*, 2007, 6: 64-69.
- [21] Dowling CM, Hollinshead KER, Di Grande A, et al. Multiple screening approaches reveal HDAC6 as a novel regulator of glycolytic metabolism in triple-negative breast cancer [J]. *Sci Adv*, 2021, 7: 13.
- [22] Maiti A, Qi QY, Peng X, et al. Class I histone deacetylase inhibitor suppresses vasculogenic mimicry by enhancing the expression of tumor suppressor and anti-angiogenesis genes in aggressive human TNBC cells [J]. *Int J Oncol*, 2019, 55: 116-130.
- [23] Han LQ, Wang L, Hou XB, et al. Design, synthesis and preliminary bioactivity studies of 1,2-dihydrobenzo[d]isothiazol-3-one-1,1-dioxide hydroxamic acid derivatives as novel histone deacetylase inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2014, 22: 1529-1538.
- [24] Fu HS, Han LQ, Hou XB, et al. Design, synthesis and biological evaluation of saccharin-based N-hydroxybenzamides as histone deacetylases (HDACs) inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2015, 23: 5774-5781.
- [25] Jiao J, Fang H, Wang XJ, et al. Design, synthesis and preliminary biological evaluation of N-hydroxy-4-(3-phenylpropanamido) benzamide (HPPB) derivatives as novel histone deacetylase inhibitors [J]. *Eur J Med Chem*, 2009, 44: 4470-4476.

- [26] Zolota V, Tzelepi V, Piperigkou Z, et al. Epigenetic alterations in triple-negative breast cancer-the critical role of extracellular matrix [J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13: 713.
- [27] Amoroso R. HDAC inhibitors for the therapy of triple negative breast cancer [J]. *Pharmaceuticals*, 2022, 15: 667.
- [28] Wu S, Luo Z, Yu PJ, et al. Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) promotes the epithelial mesenchymal transition of triple negative breast cancer cells *via* HDAC8/FOXA1 signals [J]. *Biol Chem*, 2016, 397: 75-83.
- [29] Woo YM. Epigenetic regulation in cystogenesis [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2016, 933: 59-68.
- [30] Carlisi D, Lauricella M, D'Anneo A, et al. The synergistic effect of SAHA and parthenolide in MDA-MB231 breast cancer cells [J]. *J Cell Physiol*, 2015, 230: 1276-1289.