

# 双功能羟肟酸类钌配合物作为 HDAC6 抑制剂的设计、合成及生物活性研究

何唯瑜<sup>1</sup>, 石小燕<sup>1</sup>, 陈涂薇<sup>1</sup>, 赵健<sup>2</sup>, 孙艳艳<sup>1\*</sup> (1. 苏州科技大学化学与生命科学学院, 江苏 苏州 215009; 2. 东南大学化学化工学院, 南京 211189)

**摘要:**目的 设计将具有组蛋白去乙酰化酶 (histone deacetylase, HDAC) 抑制活性的芳香羟肟酸与双联吡啶钌 (II) 配合物进行偶联, 合成一系列双功能羟肟酸类钌配合物作为 HDAC6 选择性抑制剂, 并评价其抗肿瘤活性。方法 以芳香环为连接基团 (Linker), 羟肟酸为 Zn<sup>2+</sup> 螯合基团 (zinc binding group, ZBG) 合成得到 3 个钌配合物, 并通过 <sup>1</sup>H-NMR、<sup>13</sup>C-NMR 和质谱进行结构表征。荧光分析法评价化合物的 HDACs 抑制活性, 噻唑蓝 (MTT) 法评价化合物对 A549、MDA-MB-231、MCF-7、HepG-2 和 LO2 细胞的体外抗增殖活性, 通过分子对接研究化合物与 HDAC6 蛋白活性位点的结合情况。结果 目标化合物均表现出 HDAC6 抑制活性和选择性、体外抗肿瘤活性和靶向性, 并筛选出代表化合物 **3**, 细胞毒活性与顺铂相当, 且体外肿瘤靶向性远高于顺铂。结论 在药效团模型中引入较宽较大的帽子 (Cap) 结构 (双联吡啶钌), 可以更好地发挥化合物对 HDAC6 的特异性识别作用; 同时引入具有抗肿瘤活性的钌 (II) 结构, 在提高化合物的 HDAC6 选择性抑制活性的同时兼具良好的抗肿瘤活性, 证明双联吡啶钌配合物偶联芳香羟肟酸的双功能设计是合理有效的。

**关键词:** 钌配合物; 羟肟酸; 双功能; 组蛋白去乙酰化酶 6; 选择性抑制剂; 抗肿瘤

doi: 10. 11669/cpj. 2024. 15. 004 中图分类号: R914 文献标志码: A 文章编号: 1001-2494(2024)15-1384-09

## Design, Synthesis and Biological Activity of Bifunctional Ruthenium Complexes Bearing Hydroxamic Acid as HDAC6 Inhibitors

HE Weiyu<sup>1</sup>, SHI Xiaoyan<sup>1</sup>, CHEN Tuwei<sup>1</sup>, ZHAO Jian<sup>2</sup>, SUN Yanyan<sup>1\*</sup> (1. School of Chemistry and Life Sciences, Suzhou University of Science and Technology, Suzhou 215009, China; 2. School of Chemistry and Chemical Engineering, Southeast University, Nanjing 211189, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To design and synthesize a series of bifunctional ruthenium complexes containing hydroxamic acid as HDAC6 selective inhibitors by conjugating aromatic hydroxamic acid with bipyridine ruthenium (II) complexes, and investigate the *in vitro* antitumor activity. **METHODS** Three ruthenium complexes were synthesized with aromatic ring as 'Linker' and hydroxamic acid as zinc binding group (ZBG), and their structures were characterized by <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR and HRMS spectrometry. The HDAC inhibitory activity was evaluated by fluorescence analysis. The *in vitro* antitumor activities against A549, MDA-MB-231, MCF-7, HepG-2 and LO2 cell lines were evaluated by MTT assay. The binding of compounds to the active site of HDAC6 protein was studied by molecular docking. **RESULTS** All compounds showed selective HDAC6 inhibitory effect, *in vitro* antitumor activity and tumor-targeting activity, among which representative compound **3** exhibited comparable cytotoxic activity to cisplatin and much higher tumor-targeting activity than cisplatin. **CONCLUSION** The introduction of a wider "Cap" (surface recognition unit) in the pharmacophore model can improve the specific recognition of the compound against HDAC6, which proved that the design of bifunctional aromatic hydroxamic acid and bipyridine ruthenium complexes is rational.

**KEY WORDS:** ruthenium complex; hydroxamic acid; bifunctional; HDAC6; selective inhibitor; antitumor

组蛋白去乙酰化酶 (histone deacetylases, HDACs) 可以催化染色体的基本组成单位核小体的组蛋白去乙酰化, 对基因的表达调控发挥重要作用, 属于表观遗传修饰相关酶, 而表观遗传修饰紊乱会导致各种疾病的发生<sup>[1-3]</sup>, 尤其成为抗肿瘤药物设计

的热门靶点。目前已上市的 HDAC 抑制剂有伏立诺他 (SAHA)、贝利司他、帕比司他、罗米地辛和西达本胺, 前三者均为广谱 HDAC 抑制剂, 后两者主要抑制 HDACs I 类, 其中西达本胺是我国自主研发的第一个选择性 HDAC 抑制剂, 于 2015 年获原国家

基金项目: 国家自然科学基金项目资助 (21401137, 22271045, 21601034); 江苏省研究生科研与实践创新计划项目资助 (KYCX22\_3292)

作者简介: 何唯瑜, 女, 学士 研究方向: 抗肿瘤药物的研发 \* 通讯作者: 孙艳艳, 女, 博士, 副教授 研究方向: 金属抗肿瘤药物的研发、生物无机化学 Tel: (0512)68418433

食品药品监督管理局 (CFDA) 批准上市<sup>[4]</sup>。伏立诺他和罗米地辛用于治疗皮肤 T 细胞淋巴瘤, 贝利司他和西达本胺用于治疗复发及难治性外周 T 细胞淋巴瘤, 而帕比司他主要用于治疗多发性骨髓瘤, 这些抑制剂在临床上均表现良好的抗肿瘤效果。但广谱 HDAC 抑制剂普遍存在恶心、呕吐、骨髓抑制及 QT 间期延长等毒副作用, 临床应用受到较大的限制。罗米地辛和西达本胺作为 HDACs I 类的选择性抑制剂, 虽然毒副作用相对较小, 但其治疗窗口小, 阻碍了在其他疾病领域的进一步应用<sup>[5-6]</sup>。因此, 寻找高效、低毒的亚型选择性 HDAC 抑制剂成为该领域的研究热点。

HDAC6 是组蛋白去乙酰化酶 II b 家族的特殊成员, 是唯一 1 个具有 2 个催化功能区和 2 个锌指结构区的 HDAC 酶。HDAC6 的催化底物主要包括  $\alpha$ -微管蛋白、热休克蛋白 90 (heat shock protein 90, Hsp90)、皮质肌动蛋白及过氧化物还原酶等<sup>[7]</sup>。HDAC6 通过与底物蛋白相互作用, 参与并调节众多生理或病理进程。其中,  $\alpha$ -微管蛋白会影响细胞骨架完整性; Hsp90 可帮助伴侣蛋白正确折叠以维持其正常的生理功能; 皮质肌动蛋白调节细胞转移; 过氧化物还原酶在 HDAC6 的作用下发生去乙酰化, 可能是造成癌细胞对化学治疗耐受的重要因素之一<sup>[8]</sup>。HDAC6 因其独特的结构及生化功能, 成为一个极具应用前景的药物靶标。而且, 其相应的选择性 HDAC6 抑制剂对正常细胞几乎没有细胞毒性, 这与现有的广谱 HDAC 抑制剂及 HDACs I 类的选择性抑制剂不同, 这一优点引起研究者的广泛关注, 选择性 HDAC6 抑制剂有望克服广谱 HDAC 抑制剂存在的选择性差、副作用大等缺点。

大多数的 HDAC 抑制剂都可以用经典的药效团模型来描述 (图 1), 主要包括 3 个部分<sup>[9-10]</sup>: ①帽子 (Cap) 结构部分, 即酶表面识别区 (surface recognition unit); ②  $Zn^{2+}$  螯合基团 (zinc binding group, ZBG), 例如异羟肟酸、羧酸或苯甲酰胺结构, 用于螯合酶活性区域底端的  $Zn^{2+}$ ; ③将 Cap 和 ZBG 这 2 个部分连接起来的疏水性长链连接基团 (Linker), 一般为饱和或不饱和的线性或带有环状结构的基团。目前已报道的选择性 HDAC6 抑制剂按不同类型的 ZBG 分类, 主要包括脂肪族 Linker 异羟肟酸类、芳香族 Linker 异羟肟酸类、其他类等, 其中报道较多的是芳香族 Linker 异羟肟酸类<sup>[11-43]</sup>。

铂类抗肿瘤药物是重要的化疗药物之一, 已被广泛用于实体肿瘤的治疗<sup>[44]</sup>。不同于大多数有机

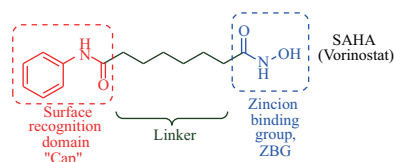


图 1 组蛋白去乙酰化酶 (HDAC) 抑制剂 [伏立诺他 (SAHA) 为例] 的药效团模型

Fig. 1 Pharmacophore model of histone deacetylase (HDAC) inhibitors (SAHA as an example)

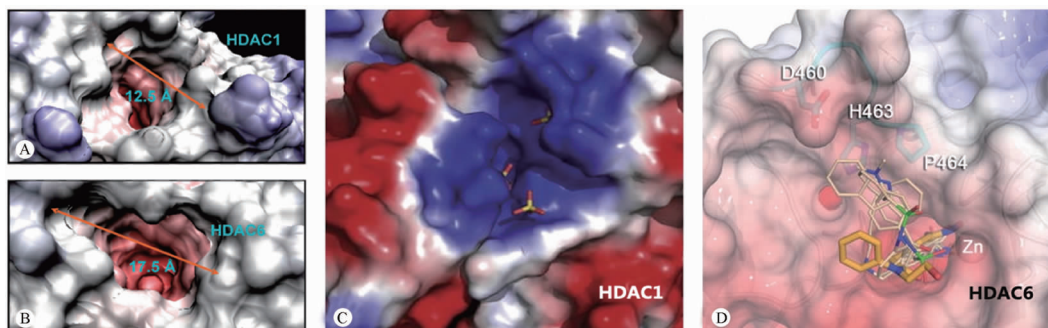
小分子药物, 铂配合物在肿瘤治疗领域表现出独特的优势, 这是由于它们可以与肿瘤细胞 DNA 产生共价结合, 从而通过抑制靶点的生物活性来延长药物作用时间和提高治疗效果<sup>[45]</sup>。然而, 由于与 DNA 的不可逆共价结合, 铂类药物具有严重的副作用和耐药性, 从而限制了其在临床上的应用<sup>[46]</sup>。鉴于铂类药物的缺点, 其他金属配合物成为抗肿瘤药物的另一研究热点, 特别是钆类抗肿瘤药物, 由于其独特的生物特性和低毒性, 在癌症治疗中显示出巨大的应用前景<sup>[47-51]</sup>。迄今已有 3 个钆配合物进入临床试验, 包括 2 个化疗药物 (NAMI-A、KPI019 及其钠盐 KPI339) 和 1 个光敏剂 (TLD1433), 尤其是 KPI339 和 TLD1433, 均已成功完成 I 期临床试验<sup>[52-55]</sup>。但 NAMI-A 的临床试验因疗效不确切而中断<sup>[56-57]</sup>。因此, 针对新型钆类抗肿瘤药物的结构改造迫在眉睫。

根据同源建模及晶体结构研究发现<sup>[7-9, 58]</sup>, HDAC6 的催化活性通道口比 HDAC1 更大, 通道深度更短 (图 2)。同时, 鉴于钆配合物在抗肿瘤临床试验中表现出良好的治疗效果, 以及金属钆的杂化特性和灵活丰富的配位模式, 本实验设计在 HDAC 抑制剂药效团模型的“Cap”部分引入具有较宽较大的双“帽檐”的双齿钆 (II) 配合物单元, 以吡啶环为 Linker, 以异羟肟酸为 ZBG, 合成一系列双功能异羟肟酸类钆配合物作为 HDAC6 抑制剂, 从而增加化合物对 HDAC6 活性通道入口的特异性识别和“占位”作用, 以期发挥其钆配合物和 HDAC 抑制剂药效团的双功能活性作用, 并评价化合物对 HDACs 的体外抑制活性和肿瘤细胞的体外抗增殖活性。

## 1 实验仪器与材料

### 1.1 实验仪器

傅里叶变换红外光谱仪 Spectrum Two (美国 PE 公司); 核磁共振波谱仪 AVANCE III (德国 Bruker 公司); 质谱仪 Q-TOF 6540 (美国 Agilent 公司); 荧光分光光度计 F-7000 (北京泰克仪器有限公司);



A - HDAC1 的同源建模; B - HDAC6 的同源建模; C - HDAC1 的 X-Ray 晶体结构; D - HDAC6 的 X 射线晶体结构。

A - homology modeling of HDAC1; B - homology modeling of HDAC6; C - X-ray crystal structure of HDAC1; D - X-ray crystal structure of HDAC6.

图2 HDAC1 和 HDAC6 的同源建模及其 X 射线晶体结构

Fig. 2 Homology modeling and X-ray crystal structures of HDAC1 and HDAC6

细胞培养箱 BIOBASE QP-160 (山东博科科学仪器有限公司); 酶标仪 HALO MPR-96 (上海天美科学仪器有限公司); 流式细胞仪 CytoFLEX LX (美国贝克曼库尔特有限公司)。

## 1.2 细胞株

人非小细胞肺癌细胞系 (A549)、高转移性恶性乳腺癌细胞系 (MDA-MB-231)、原位 ER 阳性人乳腺癌细胞系 (MCF-7)、人肝癌细胞系 (HepG-2)、人正常肝细胞系 (LO2) (江苏凯基生物技术股份有限公司)。

## 1.3 药品与试剂

2-吡啶甲酸甲酯 (化学纯, 98%)、3-吡啶甲酸甲酯 (化学纯, 98%)、4-吡啶甲酸甲酯 (化学纯, 98%); 甲醇、乙酸乙酯、氢氧化钠、二甲基甲酰胺 (DMF)、丙酮、乙醇等常规试剂均为分析纯; 盐酸羟胺、2,2'-联吡啶、三水合三氯化钌、氯化锂均为分析纯; MTT 检测试剂盒 (江苏凯基生物技术股份有限公司)。

## 2 实验方法与步骤

### 2.1 配体的合成与表征

配体 **L1**: 0.58 g (14.6 mmol) NaOH 加入 10 mL 水中再加入 0.51 g (7.3 mmol) 盐酸羟胺搅拌溶解, 取 0.5 g (3.6 mmol) 2-吡啶甲酸甲酯溶于 15 mL 甲醇中, 将水溶液逐滴加入甲醇溶液中, 室温搅拌 72 h, 停止反应时加入体积分数 5% 盐酸 (HCl) 溶液调节溶液 pH 约为 5.5, 然后浓缩得白色固体, 加甲醇溶解, 过滤不溶物, 浓缩得到油状物质, 用水重结晶得到白色针晶。产率 30%。IR (ATR): 3 336, 3 154, 1 645, 1 589, 1 511, 1 428, 1 177, 1 027  $\text{cm}^{-1}$ 。 $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 7.57 (ddd, 1H,  $J = 2.9, 2.4, 1.4$  Hz), 7.97 (m,

2H), 8.59 (dt, 1H,  $J = 2.4, 0.7$  Hz), 9.06 (d, 1H,  $J = 1.0$  Hz), 11.39 (s, 1H)。HR-MS (ESI):  $m/z$  [M + H] $^+$  计算值  $\text{C}_6\text{H}_7\text{N}_2\text{O}_2$ : 139.050 75, 实验值: 139.050 78 (图 3)。

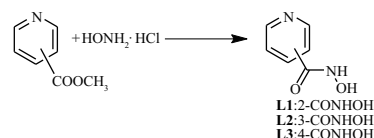


图3 含羟肟酸的吡啶配体 **L1** ~ **L3** 的合成路线

Fig. 3 Synthesis of pyridine ligands containing hydroxamic acid (compounds **L1** - **L3**)

配体 **L2**: 通过 3-吡啶甲酸甲酯与羟胺反应制备配体 **L2**, 步骤同上, 得到白色针晶, 产率 40%。IR (ATR): 3 183, 1 636, 1 593, 1 494, 1 471, 1 420, 1 305, 1 023  $\text{cm}^{-1}$ 。 $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 7.51 (ddd, 1H,  $J = 2.8, 2.4, 0.4$  Hz), 8.11 (dt, 1H,  $J = 4.0, 1.0$  Hz), 8.71 (dd, 1H,  $J = 2.4, 0.9$  Hz), 8.92 (d, 1H,  $J = 0.8$  Hz), 9.24 (s, 1H), 11.43 (s, 1H)。HR-MS (ESI):  $m/z$  [M + H] $^+$  计算值  $\text{C}_6\text{H}_7\text{N}_2\text{O}_2$ : 139.050 75, 实验值: 139.050 31。

配体 **L3**: 通过 4-吡啶甲酸甲酯与羟胺反应制备配体 **L3**, 步骤同上, 得到白色针晶, 产率 42%。IR (ATR): 3 148, 1 633, 1 606, 1 538, 1 488, 1 408, 1 320, 1 163, 1 029  $\text{cm}^{-1}$ 。 $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 7.67 (m, 2H), 8.71 (m, 2H), 9.32 (s, 1H), 11.51 (s, 1H)。HR-MS (ESI):  $m/z$  [M + H] $^+$  计算值  $\text{C}_6\text{H}_7\text{N}_2\text{O}_2$ : 139.050 75, 实验值: 138.050 06。

### 2.2 配合物的合成与表征

双 (2, 2'-联吡啶) 二氯化钌水合物 [Ru(Bipy) $_2$ Cl $_2$  · 2H $_2$ O]: 将 RuCl $_3$  · 3H $_2$ O (1 g,

4 mmol)、联吡啶(1.24 g, 8 mmol)和氯化锂(LiCl, 0.005 g, 0.12 mmol)加入 DMF(8 mL)中加热回流搅拌8 h。反应混合物冷却至室温后,加入35 mL丙

酮,反应液在 0 °C 下冷却过夜析晶,过滤,滤饼用 5 mL水洗涤 3 次,再用 5 mL 乙醚洗涤 3 次,干燥得到深绿色固体,产率 65% (图 4)。

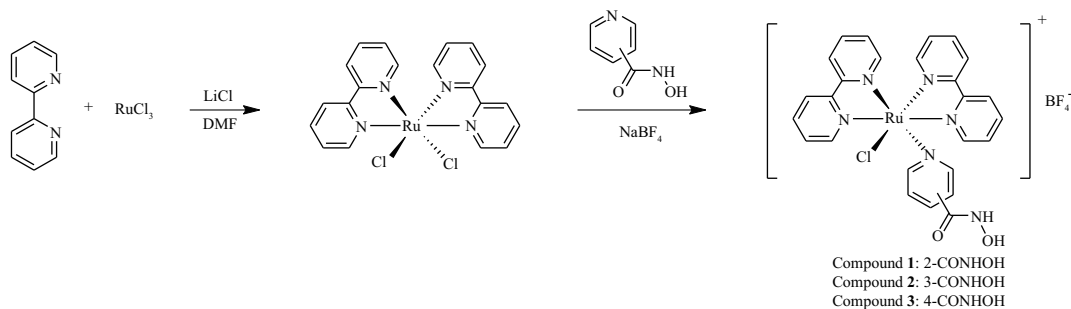


图 4 含羟肟酸的双联吡啶钌配合物 1~3 的合成路线

Fig. 4 Synthesis of bipyridine ruthenium complexes containing hydroxamic acid (compounds 1–3)

配合物 **1**: 0.258 g  $\text{Ru}(\text{Bipy})_2\text{Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0.5 mmol) 悬浮在 25 mL 的水-乙醇混合液(1:4)中,加入稍过量的 0.072 g 配体 **L1** (0.6 mmol)。将混合物回流 3 h 后浓缩溶剂至干,残留物溶解在约 4 mL 蒸馏水中,加入 1 mL 饱和  $\text{NaBF}_4$  水溶液后析出沉淀。沉淀用甲醇-乙醚混合物(1:3)洗涤后烘干,得到黄色固体,产率为 44%。 $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 7.33 (dt, 2H,  $J = 15.0, 3.0$  Hz), 7.55 ~ 7.63 (m, 2H), 7.72 (ddd, 4H,  $J = 15.0, 9.0, 3.0$  Hz), 7.79 ~ 7.97 (m, 6H), 8.19 (q, 2H,  $J = 3.0$  Hz), 8.49 ~ 8.56 (m, 2H), 8.57 ~ 8.74 (m, 5H), 8.80 (dt, 2H,  $J = 9.0, 3.0$  Hz), 9.79 ~ 9.83 (m, 1H)。 $^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 124.03, 124.31, 124.56, 124.71, 124.92, 127.15, 127.49, 127.78, 127.92, 129.20, 136.08, 136.66, 136.95, 137.27, 137.89, 150.32, 150.66, 151.28, 152.00, 153.58, 157.38, 157.74, 157.86, 158.03, 159.04, 171.76。HR-MS (ESI):  $m/z$  [ $\text{M} - \text{BF}_4$ ] $^+$  计算值:  $\text{C}_{26}\text{H}_{22}\text{N}_6\text{O}_2\text{RuCl}$ : 587.053 63, 实验值: 587.049 09。

配合物 **2**: 用配体 **L2** 和  $\text{Ru}(\text{Bipy})_2\text{Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  反应制备配合物 **2**, 步骤同上, 得到黄色固体, 产率为 48%。 $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 7.30 (t, 2H,  $J = 3.0$  Hz), 7.37 (t, 2H,  $J = 3.0$  Hz), 7.52 ~ 7.59 (m, 4H), 7.67 ~ 7.76 (m, 2H), 7.85 ~ 7.95 (m, 5H), 8.08 ~ 8.24 (m, 5H), 8.50 (d, 1H,  $J = 3.0$  Hz), 8.58 ~ 8.83 (m, 4H), 9.84 (d, 1H,  $J = 3.0$  Hz)。 $^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 123.64, 124.13, 124.44, 125.28, 126.66, 127.23, 127.64, 127.76, 136.21, 136.83, 137.21, 137.44, 137.94, 150.69, 152.08,

152.37, 152.86, 153.12, 157.76, 158.10, 158.53, 159.36, 159.41。HR-MS (ESI):  $m/z$  [ $\text{M} - \text{BF}_4$ ] $^+$  计算值  $\text{C}_{26}\text{H}_{22}\text{N}_6\text{O}_2\text{RuCl}$ : 587.053 63, 实验值: 587.052 79。

配合物 **3**: 用配体 **L3** 和  $\text{Ru}(\text{Bipy})_2\text{Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  反应制备配合物 **3**, 步骤同上, 得到黄色固体, 产率为 40%。 $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 7.33 (dt, 2H,  $J = 15.0, 3.0$  Hz), 7.56 ~ 7.62 (m, 2H), 7.65 ~ 7.77 (m, 4H), 7.80 ~ 7.99 (m, 6H), 8.19 (q, 2H,  $J = 3.0$  Hz), 8.51 (t, 1H,  $J = 6.0$  Hz), 8.60 (t, 1H,  $J = 3.0$  Hz), 8.67 ~ 8.71 (m, 3H), 8.80 (dt, 2H,  $J = 9.0, 3.0$  Hz), 9.79 ~ 9.86 (m, 1H)。 $^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ : 123.23, 123.65, 124.08, 124.16, 124.43, 126.69, 127.24, 127.27, 127.69, 127.81, 136.28, 136.80, 136.91, 137.31, 138.56, 151.11, 151.94, 152.37, 152.81, 153.00, 157.76, 158.06, 158.34, 158.40, 159.27, 165.87。HR-MS (ESI):  $m/z$  [ $\text{M} - \text{BF}_4$ ] $^+$  计算值  $\text{C}_{26}\text{H}_{22}\text{N}_6\text{O}_2\text{RuCl}$ : 587.053 63, 实验值: 587.050 28。

### 2.3 HDAC 抑制活性实验

以 SAHA 为阳性对照, 选择 HDACs 酶家族中 class I 亚族的 HDAC1、HDAC8 和 class II b 亚族的 HDAC6 作为靶标。采用荧光分析法考查化合物在体外的 HDAC 抑制活性, 得到相应的半数抑制浓度 (50% inhibitory concentration,  $\text{IC}_{50}$ ) 值, 并探讨对 HDAC 抑制的选择性。

以 HeLa 细胞核提取物的 HDAC1 亚型为例, 对待测化合物与 HDACs 和特异性荧光底物共同孵育 24 h, 然后在 390 nm 激发光和 460 nm 发射

下测定每个反应的荧光。在进行 3 次平行实验的情况下,记录所得数据并计算化合物对 HDACs 的抑制率,结果见表 1。其他 HDACs 亚型抑制活性测定的实验原理与 HeLa 细胞核提取物类

似,不同的亚型使用各自特异性荧光底物。这一实验方法具有误差小、灵敏度高、操作简单等特点,可用于评估化合物的 HDAC 抑制活性和选择性。

表 1 化合物 1~3 对 HDAC1、HDAC6 和 HDAC8 酶的体外抑制活性及选择性。n=6,  $\bar{x} \pm s$

Tab. 1 *In vitro* inhibitory activity and selectivity of compounds 1–3 against HDAC1, HDAC6 and HDAC8 enzymes. n=6,  $\bar{x} \pm s$

Compound	IC <sub>50</sub> /μmol · L <sup>-1</sup>			Selectivity ratio (SR)	
	HDAC1	HDAC6	HDAC8	HDAC1/ HDAC6	HDAC8/ HDAC6
1	5.66 ± 0.30	0.35 ± 0.02	10.22 ± 0.64	16.17	29.20
2	4.89 ± 0.25	0.41 ± 0.02	11.88 ± 0.58	11.93	28.98
3	2.32 ± 0.13	0.24 ± 0.01	9.70 ± 0.50	9.67	40.41
Cisplatin	13.25 ± 0.76	10.40 ± 0.71	21.82 ± 1.40	1.27	2.10
SAHA	0.20 ± 0.01	0.08 ± 0.01	2.21 ± 0.16	2.50	27.63

## 2.4 细胞培养

将 A549、MDA-MB-231、MCF-7、HepG-2 和 LO2 在 37 °C、体积分数 5% CO<sub>2</sub> 的湿化环境中培养,保存于添加体积分数 10% 胎牛血清 (FBS)、100 mg · mL<sup>-1</sup> 链霉素和 100 mg · mL<sup>-1</sup> 青霉素的 RPMI-1640 培养基中。

## 2.5 体外抗肿瘤活性实验

采用 MTT 法检测化合物 1~3 对 A549、MDA-MB-231、MCF-7、HepG-2 和 LO2 细胞系的细胞毒活性,并以顺铂和 SAHA 为阳性对照。经过 3 次平行实验,得到化合物的 IC<sub>50</sub> 值见表 2。

实验方法:将细胞悬浮于培养基中,并将其接种于 96 孔板(每孔 5 000 个细胞),然后在 37 °C、体积分数 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养 24 h。将所测化合物预溶于 DMF 中,用培养基稀释至所需梯度浓度,最终 DMF 浓度小于 0.3%。将梯度浓度的溶液加入到 96 孔板中,37 °C 孵育 72 h,然后用 10 μL MTT (5 mg · mL<sup>-1</sup>) 染色 4 h。取上层清液,加入 150 μL 的 DMSO 溶解生成的甲瓖物。用酶标板酶联免疫吸附测定仪测定 490 nm 处的吸光度。通过 SPSS 软件计算 3 次平行实验后的 IC<sub>50</sub> 值。

## 2.6 分子对接研究

从蛋白质数据库中获得 HDAC6 的晶体数据 (PDB ID: 7u8z),通过 Autodock 4.2 软件,对化合物 1~3 进入 HDAC6 蛋白进行分子对接研究,得到最佳结合位点和对接模式,并使用 Pymol 1.7 软件对接结果进行处理,并生成对接图。

## 3 结果与讨论

### 3.1 体外 HDAC 抑制活性研究

通过荧光分析法得到化合物在体外的 HDAC

抑制活性数据见表 1。从表 1 中的数据可知,阳性对照顺铂对 HDAC1 (IC<sub>50</sub> = 13.25 μmol · L<sup>-1</sup>)、HDAC6 (IC<sub>50</sub> = 10.40 μmol · L<sup>-1</sup>) 和 HDAC8 (IC<sub>50</sub> = 21.82 μmol · L<sup>-1</sup>) 的抑制效果不明显,且对 HDAC6 的选择性较低;阳性对照 SAHA 对 HDAC1 (IC<sub>50</sub> = 0.20 μmol · L<sup>-1</sup>)、HDAC6 (IC<sub>50</sub> = 0.08 μmol · L<sup>-1</sup>) 和 HDAC8 (IC<sub>50</sub> = 2.21 μmol · L<sup>-1</sup>) 均表现良好的抑制效果,SAHA 是已报道的一种良好的 HDACs 抑制剂,但是很显然 SAHA 对 HDACs 没有表现出较为专一的亚型选择性[选择性因子(selectivity ratio, SR), SR1/6 代表化合物在 HDAC1 和 HDAC6 之间的选择性因子,SR1/6 和 SR8/6 分别为 2.50 和 27.63 倍],是个广谱 HDAC 抑制剂,这就导致 SAHA 在临床使用的时候有着难以避免的副作用。针对 HDAC 亚型选择性的问题,本实验以具有较大位阻的双联吡啶金属钉作为“Cap”,结合以吡啶芳香环为 Linker 的异羟肟酸设计并合成了化合物 1~3,希望能提高对 HDACs 的亚型选择性。从表 1 可知,化合物 1~3 对 HDAC1、HDAC6 和 HDAC8 的体外 IC<sub>50</sub> 均远低于阳性对照金属铂药(顺铂),说明化合物 1~3 对 HDAC 的体外抑制活性远高于顺铂,尤其是针对 HDAC6 的体外 IC<sub>50</sub> 分别为 0.35、0.41 和 0.24 μmol · L<sup>-1</sup>,低于阳性对照顺铂的 29.7、25.4 和 43.3 倍,高于阳性对照 SAHA 的 4.4、5.1 和 3.0 倍,虽然这 3 个化合物的 IC<sub>50</sub> 较阳性对照 SAHA 有较大幅度的提高,但增幅均未超过 0.5 μmol · L<sup>-1</sup>。此外,化合物 1 的选择性因子 SR1/6 和 SR8/6 分别为 16.17 和 29.20 倍,高于阳性对照顺铂的 12.7 和 13.9 倍,高于 SAHA 的 6.5 和 1.1 倍;化合物 2 的选择性因子 SR1/6 和 SR8/6 分别为 11.93 和 28.98 倍,高于阳性对照顺铂的 9.4 和 13.8 倍,高于 SAHA

的 4.8 和 1.0 倍;化合物 **3** 的选择性因子 SR1/6 和 SR8/6 分别为 9.67 和 40.41 倍,高于阳性对照顺铂的 7.6 和 19.2 倍,高于 SAHA 的 3.9 和 1.5 倍。以上数据表明,与阳性对照顺铂和 SAHA 相比,目标化合物 **1**~**3** 对 HDAC6 的亚型选择性均得到了较大幅度的提升,证明通过引入较大位阻的金属钌配位单元和 SAHA 类似物设计双功能 HDAC 抑制剂可以显著增加其对 HDAC6 的选择性抑制活性,这一设计是合理的。

对比化合物 **1**~**3** 和 SAHA 对 HDAC6 的  $IC_{50}$  值及其选择性抑制因子,对 HDAC6 的抑制活性顺序大致为:SAHA > **3** > **1** ≈ **2**;对 HDAC6 的选择性强度顺序大致为:**1** ≈ **2** ≈ **3** > SAHA。由此可见,化合物 **3** 对 HDAC6 的选择性抑制活性最佳,其选择性高于阳性对照 SAHA,这可能由于 ZBG 基团(异羟肟酸)与双联吡啶钌 Cap 结构之间处于对位关系,相比于邻位化合物 **1** 和间位化合物 **2**,对位化合物 **3** 的 ZBG 受到双联吡啶钌 Cap 结构的位阻影响较小,因此更有利于化合物进入 HDAC6 活性通道并与  $Zn^{2+}$  发生特异性结合。

总之,该系列中的目标化合物 **3** 在保持良好 HDAC6 抑制效果的同时也一定程度上提高了对 HDAC6 的选择性,是 3 个目标化合物中对 HDAC6 选择性抑制活性最佳的钌配合物。本实验所合成的 3 个目标化合物具有同样的双联吡啶钌 Cap 结构,但芳香异羟肟酸的立体构型各有不同,**1**、**2** 和 **3** 分别具有邻位、间位和对位芳香异羟肟酸,其中具有对位结构的化合物 **3** 有更好的构型选择性,首先化合物 **3**

有宽大的双联吡啶钌 Cap 结构,能够在 HDAC6 通道入口起到占位作用;其次已有文献[59]报道苯基异羟肟酸 HDAC6 和 HDAC8 的  $IC_{50}$  为 0.15 和  $1.9 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , SR8/6 约为 16.52 倍,相对于 HDAC8 苯基异羟肟酸具有相对更高的 HDAC6 选择性抑制作用;并且另一个报道[60]里展示了以芳环为 Linker 的 HDAC6 选择性抑制剂与 HDAC6 蛋白结合的 X 射线晶体结构指出,芳环 Linker 插入 HDAC6 活性通道内的 F583 和 F643 芳香环残基之间,并与这 2 个芳香环残基形成有利的错位面对面  $\pi$ - $\pi$  堆叠,这种 Linker 与残基之间的弱相互作用一定程度上能够影响结构的选择性,说明了以芳香为 Linker 与提升对 HDAC6 的特异性识别和特异性结合有一定关联。而且将目标化合物 **3** 与苯基异羟肟酸对比,在 **3** 中引入了含联吡啶钌配位结构的宽大 Cap 结构后,其 SR8/6 提升至苯基异羟肟酸的 2 倍以上,更印证了这类“Cap”设计的合理性。另一方面,比较了化合物 **1**~**3** 对 HDAC6 体外抑制活性实验,说明本实验的设计是合理且有效的,达到了设计的初衷。

### 3.2 体外抗肿瘤活性研究

通过 MTT 法测试化合物 **1**~**3** 对 A549、MDA-MB-231、MCF-7、HepG-2 和 LO2 的细胞毒活性,结果见表 2。阳性对照顺铂对 A549、MDA-MB-231、MCF-7 和 HepG-2 4 种肿瘤细胞都展现出了良好的体外抗肿瘤活性, $IC_{50}$  值范围在  $4.47 \sim 12.82 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  之间,而阳性对照 SAHA 对 A549、MDA-MB-231 和 MCF-7 这 3 种细胞系的  $IC_{50}$  值范围在  $10.51 \sim 35.20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  之间,对 HepG-2 几乎无细胞毒活性。

表 2 化合物 **1**~**3** 对 A549、MDA-MB-231、MCF-7、HepG-2 肿瘤细胞和 LO2 人正常肝细胞的体外细胞毒活性。  $n=6, \bar{x} \pm s$

Tab. 2 The *in vitro* cytotoxic activities of compounds **1**–**3** against A549, MDA-MB-231, MCF-7, HepG-2 tumor cells and LO2 human normal liver cell.  $n=6, \bar{x} \pm s$

Compound	$IC_{50}/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$				
	A549	MDA-MB-231	MCF-7	HepG-2	LO2
<b>1</b>	$8.42 \pm 0.35$	$10.64 \pm 0.60$	> 50	$20.32 \pm 1.15$	> 50
<b>2</b>	$12.10 \pm 0.71$	$8.45 \pm 0.36$	> 50	$17.25 \pm 0.92$	> 50
<b>3</b>	$4.08 \pm 0.23$	$5.20 \pm 0.27$	> 50	$14.50 \pm 0.78$	> 50
Cisplatin	$6.88 \pm 0.21$	$4.47 \pm 0.25$	$9.85 \pm 0.61$	$12.82 \pm 0.70$	$6.10 \pm 0.20$
SAHA	$10.51 \pm 0.83$	$17.32 \pm 1.25$	$35.20 \pm 2.04$	> 50	Not tested

化合物 **1** 对 A549、MDA-MB-231 和 HepG-2 细胞的  $IC_{50}$  为  $8.42 \sim 20.32 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 高于阳性对照顺铂( $4.47 \sim 12.82 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 的 1.2 ~ 2.3 倍;对 A549 和 MDA-MB-231 的  $IC_{50}$  低于阳性对照 SAHA ( $10.51 \sim 17.32 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 的 1.2 ~ 1.6 倍,且对

HepG-2 的  $IC_{50}$  远低于 SAHA,说明化合物 **1** 的体外抗肿瘤活性略低于顺铂、高于 SAHA。

化合物 **2** 对 3 种肿瘤细胞的  $IC_{50}$  为  $8.45 \sim 17.25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 高于阳性对照顺铂的 1.3 ~ 1.9 倍,对 A549 和 MDA-MB-231 的  $IC_{50}$  与阳性对照

SAHA相当,且对 HepG-2 的  $IC_{50}$  远低于 SAHA,说明化合物 **2** 的体外抗肿瘤活性略低于顺铂、高于 SAHA。

化合物 **3** 对 3 种肿瘤细胞的  $IC_{50}$  为 4.08 ~ 14.50  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,与阳性对照顺铂相当,对 A549 和 MDA-MB-231 的  $IC_{50}$  低于阳性对照 SAHA 的 2.6 ~ 3.3 倍,且对 HepG-2 的  $IC_{50}$  远低于 SAHA,说明化合物 **3** 的体外抗肿瘤活性与阳性对照顺铂相当、远高于 SAHA。

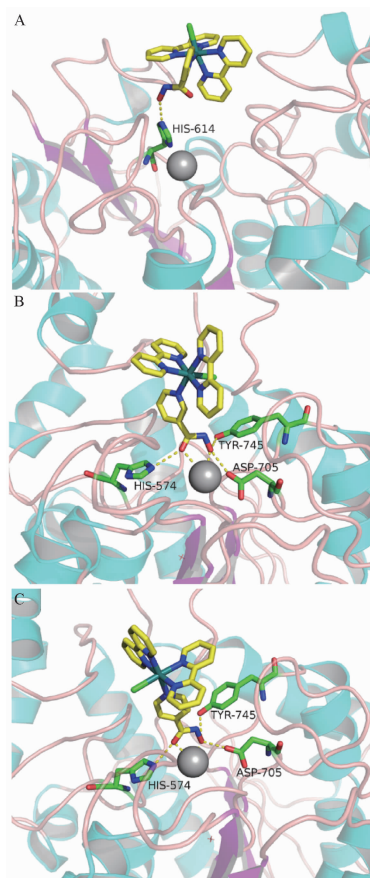
此外,化合物 **1~3** 对人正常肝细胞 LO2 的  $IC_{50}$  均大于 50  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,远高于阳性对照顺铂 (6.10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ),说明目标化合物 **1~3** 对人正常肝细胞几乎无毒性,对肿瘤细胞的选择性较好。综合化合物 **1~3** 的体外抗肿瘤活性结果,得到目标化合物和阳性对照的体外抗肿瘤活性顺序大致为: **3** > 顺铂 > **1**  $\approx$  **2** > SAHA; 体外肿瘤选择性的顺序大致为: **1**  $\approx$  **2**  $\approx$  **3** > 顺铂。

综上所述,化合物 **3** 是该系列化合物中体外细胞毒活性和体外肿瘤靶向性均表现优异的代表化合物,与阳性对照相比,活性与顺铂相当、远高于 SAHA,且肿瘤选择性和靶向性远高于顺铂。

细胞毒活性实验的结果与 HDACs 酶抑制活性结果基本一致,说明该系列设计在药效团模型中引入较宽较大的“Cap”(双联吡啶钉部分),可以更好地发挥对 HDAC6 的特异性识别和占位作用,说明这一思路是合理的;同时引入金属钉配位药效团,从而发挥其双功能的活性作用,在提高化合物的选择性酶抑制活性的同时还兼具良好的抗肿瘤活性及肿瘤靶向性,证明含异羟肟酸的双联吡啶钉配合物的双功能设计是合理且有效的。

### 3.3 分子对接研究

为了进一步考查目标化合物对 HDAC6 的抑制活性,通过分子对接技术研究化合物 **1~3** 与 HDAC6 蛋白(PDB ID: 7u8z)活性位点口袋的结合情况。利用 Autodock 4.2 和 Pymol 1.7 软件进行分子对接并得到对接结果,见图 5。结果表明,化合物 **2** 和 **3** 的异羟肟酸部分(ZBG 基团)能很好地螯合活性口袋底部的锌离子,且异羟肟酸的羰基(C=O)与 HIS574 残基形成氢键,异羟肟酸的羟基(OH)与 TYR745、ASP705 残基形成氢键,这可能是化合物 **2** 和 **3** HDAC6 抑制活性较高的原因。而从图 5 中发现,化合物 **1** 的异羟肟酸部分与锌离子的螯合较弱,且羟基(OH)与活性口袋口部的 HIS614 残基形成氢键,这可能是由于相对于间位、对位,邻位的异羟肟酸基团更难进入 HDAC6 的活性口袋底部。



A - 化合物 **1** 与 HDAC6 的分子对接; B - 化合物 **2** 与 HDAC6 的分子对接; C - 化合物 **3** 与 HDAC6 的分子对接。

A - the binding model of compound **1** with HDAC6; B - the binding model of compound **2** with HDAC6; C - the binding model of compound **3** with HDAC6.

图 5 化合物 **1~3** 与 HDAC6 蛋白(PDB ID: 7u8z)活性位点的分子对接情况

Fig. 5 The binding models of compounds **1-3** in the active sites of HDAC6 (PDB ID: 7u8z)

## 4 结论

基于 HDAC6 酶的结构特点,本实验合理设计并合成一系列双联吡啶钉配合物偶联芳香异羟肟酸结构作为双功能 HDAC6 抑制剂。目标化合物均具有较高的 HDACs 酶抑制活性、HDAC6 选择性、体外细胞毒活性及肿瘤选择性,尤其是含对位异羟肟酸基团的化合物 **3** 表现出比阳性对照更优的 HDAC6 选择性抑制活性和抗肿瘤活性。分子对接研究表明,化合物 **3** 可以和 HDAC6 活性口袋底部的  $\text{Zn}^{2+}$  发生特异性结合,这与 HDAC 酶抑制活性结果、抗肿瘤活性结果一致,证明双联吡啶钉配合物偶联芳香异羟肟酸作为 HDAC6 抑制剂的双功能设计是合理的。这为后续研发更高效的双功能 HDAC6 选择性抑制剂提供了思路。

## REFERENCES

- [ 1 ] CHEN X, DING A B, ZHONG X. Functions and mechanisms of plant histone deacetylases[J]. *Sci China Life Sci* (科学中国 生命科学), 2020, 63(2): 206-216.
- [ 2 ] ROCHE J, BERTRAND P. Inside HDACs with more selective HDAC inhibitors[J]. *Eur J Med Chem*, 2016, 121: 451-483. DOI: 10.1016/j.ejmech.2016.05.047.
- [ 3 ] LU A J, LIU J. Progress in the development of non-cancer uses of histone deacetylase [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2012, 47(5): 321-325.
- [ 4 ] ZHAO C, DONG H, XU Q, *et al.* Histone deacetylase (HDAC) inhibitors in cancer: a patent review (2017-present)[J]. *Expert Opin Ther Pat*, 2020, 30(4): 263-274.
- [ 5 ] TSILIMIGRAS D I, NTANASIS-STATHOPOULOS I, MORIS D, *et al.* Histone deacetylase inhibitors in hepatocellular carcinoma; a therapeutic perspective[J]. *Surg Oncol*, 2018, 27(4): 611-618.
- [ 6 ] SHAH R R. Safety and tolerability of histone deacetylase (HDAC) inhibitors in oncology[J]. *Drug Safety*, 2019, 42(2): 235-245.
- [ 7 ] SONG H, NIU X, QUAN J, *et al.* Discovery of specific HDAC6 inhibitor with anti-metastatic effects in pancreatic cancer cells through virtual screening and biological evaluation [J]. *Bioorg Chem*, 2020, 97: 103679. DOI: 10.1016/j.bioorg.2020.103679.
- [ 8 ] CHEN M C, LIN Y C, LIAO Y H, *et al.* MPTOG612, a novel HDAC6 inhibitor, induces apoptosis and suppresses IFN- $\gamma$ -induced programmed death-ligand 1 in human colorectal carcinoma cells [J]. *Cancers*, 2019, 11: 1617. DOI: 10.3390/cancers11101617.
- [ 9 ] SHEN S D, KOZIKOWSKI A P. A patent review of histone deacetylase 6 inhibitors in neurodegenerative diseases (2014-2019)[J]. *Expert Opin Ther Pat*, 2019, 30(2): 121-136.
- [ 10 ] LIU R S, FANG H. Histone deacetylase 6: structure, functions and development of selective inhibitors[J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2015, 50(1): 7-14.
- [ 11 ] BUTLER K V, KALIN J, BROCHIER C, *et al.* Rational design and simple chemistry yield a superior, neuroprotective HDAC6 inhibitor, tubastatin A[J]. *J Am Chem Soc*, 2010, 132(31): 10842-10846.
- [ 12 ] KALIN J H, BUTLER K V, AKIMOVA T, *et al.* Second-generation histone deacetylase 6 inhibitors enhance the immunosuppressive effects of Foxp3 + T-regulatory cells[J]. *J Med Chem*, 2012, 55(2): 639-651.
- [ 13 ] DE VREESE R, VERHAEGHE T, DESMET T, *et al.* Potent and selective HDAC6 inhibitory activity of *N*-(4-hydroxycarbamoylbenzyl)-1,2,4,9-tetrahydro-3-thia-9-azafluorenes as novel sulfur analogues of tubastatin A[J]. *Chem Commun*, 2013, 49(36): 3775-3777.
- [ 14 ] DE VREESE R, DEPETTER Y, VERHAEGHE T, *et al.* Synthesis and SAR assessment of novel tubastatin analogs in the pursuit of potent and selective HDAC6 inhibitors [J]. *Org Biomol Chem*, 2016, 14(8): 2537-2549.
- [ 15 ] LEONHARDT M, SELLMER A, KRÄMER O H, *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. DOI: 10.1016/j.ejmech.2018.04.046.
- [ 16 ] DE VREESE R, GALLE L, DEPETTER Y, *et al.* Synthesis of potent and selective HDAC6 inhibitors bearing a cyclohexane-or cycloheptane-annulated 1,5-benzothiazepine scaffold[J]. *Chemistry*, 2017, 23(1): 128-136.
- [ 17 ] SENGER J, MELESINA J, MAREK M, *et al.* Synthesis and biological investigation of oxazole hydroxamates as highly selective histone deacetylase 6 (HDAC6) inhibitors [J]. *J Med Chem*, 2015, 59(4): 1545-1555.
- [ 18 ] LIN X, CHEN W, QIU Z, *et al.* Design and synthesis of orally bioavailable aminopyrrolidinone histone deacetylase 6 inhibitors [J]. *J Med Chem*, 2015, 58(6): 2809-2820.
- [ 19 ] BERGMAN J A, WOAN K, PEREZ-VILLARROEL P, *et al.* Selective histone deacetylase 6 inhibitors bearing substituted urea linkers inhibit melanoma cell growth[J]. *J Med Chem*, 2012, 55(22): 9891-9899.
- [ 20 ] TAVARES M T, SHEN S, KNOX T, *et al.* Synthesis and pharmacological evaluation of selective histone deacetylase 6 inhibitors in melanoma models[J]. *ACS Med Chem Lett*, 2017, 8(10): 1031-1036.
- [ 21 ] LEE J H, MAHENDRAN A, YAO Y, *et al.* Development of a histone deacetylase 6 inhibitor and its biological effects [J]. *P Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(39): 15704-15709.
- [ 22 ] NOONEPALLE S, SHEN S, PTÁČEK J, *et al.* Rational design of suprastat: a novel selective histone deacetylase 6 inhibitor with the ability to potentiate immunotherapy in melanoma models[J]. *J Med Chem*, 2020, 63(18): 10246-10262.
- [ 23 ] PFLIEGER M, HAMACHER A, ÖZ T, *et al.* Novel  $\alpha,\beta$ -unsaturated hydroxamic acid derivatives overcome cisplatin resistance [J]. *Bioorgan Med Chem*, 2019, 27(19): 115036-115101.
- [ 24 ] ASFAHA Y, SCHRENK C, ALVES AVELAR L A, *et al.* Novel alkoxyamide-based histone deacetylase inhibitors reverse cisplatin resistance in chemoresistant cancer cells[J]. *Bioorg Med Chem*, 2020, 28(1): 115108-115136.
- [ 25 ] PFLIEGER M, SÖNNICHSEN M, HORSTICK MUCHE N, *et al.* Oxa analogues of nexturastat A demonstrate improved HDAC6 selectivity and superior antileukaemia activity [J]. *Chem Med Chem*, 2021, 16(11): 1798-1803.
- [ 26 ] REBING N, SÖNNICHSEN M, OSKO J D, *et al.* Multicomponent synthesis, binding mode, and structure-activity relationship of selective histone deacetylase 6 (HDAC6) inhibitors with bifurcated capping groups[J]. *J Med Chem*, 2020, 63(18): 10339-10351.
- [ 27 ] VERGANI B, SANDRONE G, MARCHINI M, *et al.* Novel benzo-hydroxamate-based potent and selective histone deacetylase 6 (HDAC6) inhibitors bearing a pentaheterocyclic scaffold: design, synthesis, and biological evaluation [J]. *J Med Chem*, 2019, 62(23): 10711-10739.
- [ 28 ] SONG Y, LIM J, SEO Y H. A novel class of anthraquinone-based HDAC6 inhibitors [J]. *Eur J Med Chem*, 2019, 164: 263-272. DOI: 10.1016/j.ejmech.2018.12.056.
- [ 29 ] CHEN X, CHEN X, STEIMBACH R R, *et al.* Novel 2,5-diketopiperazine derivatives as potent selective histone deacetylase 6 inhibitors: rational design, synthesis and antiproliferative activity [J]. *Eur J Med Chem*, 2020, 187: 111950. DOI: 10.1016/j.ejmech.2019.111950.
- [ 30 ] YU C, HUNG P, YANG H, *et al.* Quinazolin-2,4-dione-based hydroxamic acids as selective histone deacetylase-6 inhibitors for treatment of non-small cell lung cancer[J]. *J Med Chem*, 2019, 62(2): 857-874.
- [ 31 ] LIU J R, YU C W, HUNG P Y, *et al.* High-selective HDAC6 inhibitor promotes HDAC6 degradation following autophagy modulation and enhanced antitumor immunity in glioblastoma [J]. *Biochem Pharmacol*, 2019, 163: 458-471. DOI: 10.1016/j.bcp.2019.03.023.
- [ 32 ] ANH D T, HAI P, HUY L D, *et al.* Novel 4-oxoquinazoline-based *N*-hydroxypropanamides as histone deacetylase inhibitors: design, synthesis, and biological evaluation [J]. *ACS Omega*, 2021, 6(7): 4907-4920.
- [ 33 ] RELITTI N, SARASWATI A P, CHEMI G, *et al.* Novel quinolone-based potent and selective HDAC6 inhibitors; synthesis, molecular modeling studies and biological investigation [J]. *Eur J Med Chem*, 2021, 212: 112998-113047. DOI: 10.1016/j.ejmech.2020.112998.

- [34] XU Q, MOU Y, WANG S, *et al.* Design, synthesis and biological evaluation of selective histone deacetylase 6 (HDAC6) inhibitors bearing benzimidazole or pyrazoloindazole scaffold as surface recognition motif[J]. *Bioorg Chem*, 2021, 111:104910. DOI: 10.1016/j.bioorg.2021.104910.
- [35] KHETMALIS Y M, SHREE B, KUMAR B V S, *et al.* Design, synthesis, and biological evaluation of tetrahydroisoquinoline based hydroxamate derivatives as HDAC 6 inhibitors for cancer therapy[J]. *J Mol Struct*, 2023, 1278: 134952. DOI: 10.1016/j.molstruc.2023.134952.
- [36] WANG X X, XIE F, JIA C C, *et al.* Synthesis and biological evaluation of selective histone deacetylase 6 inhibitors as multifunctional agents against Alzheimer's disease[J]. *Eur J Med Chem*, 2021, 225: 113821. DOI: 10.1016/j.ejmech.2021.113821.
- [37] LI S, ZHAO C, ZHANG G, *et al.* Development of selective HDAC6 inhibitors with *in vitro* and *in vivo* anti-multiple myeloma activity[J]. *Bioorg Chem*, 2021, 116: 105278. DOI: 10.1016/j.bioorg.2021.105278.
- [38] LI X, LIU X, WANG S, *et al.* Design, synthesis, and biological evaluation of HDAC6 inhibitors based on Cap modification strategy[J]. *Bioorg Chem*, 2022, 125: 105874. DOI: 10.1016/j.bioorg.2022.105874.
- [39] GUO Z, ZHANG Z, ZHANG Y, *et al.* Design, synthesis and biological evaluation of brain penetrant benzazepine-based histone deacetylase 6 inhibitors for alleviating stroke-induced brain infarction[J]. *Eur J Med Chem*, 2021, 218: 113383. DOI: 10.1016/j.ejmech.2021.113383.
- [40] NAWAR N, BUKHARI S, ADILE A A, *et al.* Discovery of HDAC6-selective inhibitor NN-390 with *in vitro* efficacy in group 3 medulloblastoma[J]. *J Med Chem*, 2022, 65(4): 3193-3217.
- [41] YAN J, YUE K, FAN X, *et al.* Synthesis and bioactivity evaluation of ferrocene-based hydroxamic acids as selective histone deacetylase 6 inhibitors[J]. *Eur J Med Chem*, 2023, 246: 115004. DOI: 10.1016/j.ejmech.2022.115004.
- [42] KONG S J, NAM G, BOGGU P R, *et al.* Synthesis and biological evaluation of novel *N*-benzyltriazolyl-hydroxamate derivatives as selective histone deacetylase 6 inhibitors[J]. *Bioorg Med Chem*, 2023, 79: 117154. DOI: 10.1016/j.bmc.2023.117154.
- [43] LIANG T, XUE J, YAO Z, *et al.* Design, synthesis and biological evaluation of 3,4-disubstituted-imidazolidine-2,5-dione derivatives as HDAC6 selective inhibitors[J]. *Eur J Med Chem*, 2021, 221: 113526. DOI: 10.1016/j.ejmech.2021.113526.
- [44] JOHNSTONE T C, SUNTHARALINGAM K, LIPPARD S J. The next generation of platinum drugs: targeted Pt(II) agents, nanoparticle delivery, and Pt(IV) prodrugs[J]. *Chem Rev*, 2016, 116(5): 3436-3486.
- [45] WHEATE N J, WALKER S, CRAIG G E, *et al.* The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials[J]. *Dalton Tran*, 2010, 39(35): 8113-8127.
- [46] KELLAND L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy[J]. *Nat Rev Cancer*, 2007, 7(8): 573-584.
- [47] MEIER-MENCHES S M, GERNER C, BERGER W, *et al.* Structure-activity relationships for ruthenium and osmium anticancer agents-towards clinical development[J]. *Chem Soc Rev*, 2018, 47(3): 909-928.
- [48] ZENG L, GUPTA P, CHEN Y, *et al.* The development of anticancer ruthenium(II) complexes: from single molecule compounds to nanomaterials[J]. *Chem Soc Rev*, 2017, 46(19): 5771-5804.
- [49] LIN Y, WANG J, ZHENG W, *et al.* Organometallic ruthenium anticancer complexes inhibit human peroxiredoxin I activity by binding to and inducing oxidation of its catalytic cysteine residue[J]. *Metallomics*, 2019, 11(3): 546-555.
- [50] RIBEIRO G H, GUEDES A P M, DE OLIVEIRA T D, *et al.* Ruthenium(II) phosphine/mercapto complexes: their *in vitro* cytotoxicity evaluation and actions as inhibitors of topoisomerase and proteasome acting as possible triggers of cell death induction[J]. *Inorg Chem*, 2020, 59(20): 15004-15018.
- [51] ROY N, SEN U, MADAAN Y, *et al.* Mitochondria-targeting click-derived pyridinyltriazolylmethylquinoxaline-based Y-shaped binuclear luminescent ruthenium(II) and iridium(III) complexes as cancer theranostic agents[J]. *Inorg Chem*, 2020, 59(23): 17689-17711.
- [52] BERGAMO A, SAVA G. Ruthenium anticancer compounds: myths and realities of the emerging metal-based drugs[J]. *Dalton Trans*, 2011, 40(31): 7817-7823.
- [53] HARTINGER C G, JAKUPEC M A, ZORBAS-SEIFRIED S, *et al.* KP1019, a new redox-active anticancer agent--preclinical development and results of a clinical phase I study in tumor patients[J]. *Chem Biodiv*, 2008, 5(10): 2140-2155.
- [54] RIEDL C A, FLOCKE L S, HEJL M, *et al.* Introducing the 4-phenyl-1,2,3-triazole moiety as a versatile scaffold for the development of cytotoxic ruthenium(II) and osmium(II) arene cyclometalates[J]. *Inorg Chem*, 2017, 56(1): 528-541.
- [55] TRONDL R, HEFFETER P, KOWOL C R, *et al.* NKP-1339, the first ruthenium-based anticancer drug on the edge to clinical application[J]. *Chem Sci*, 2014, 5(8): 2925-2932.
- [56] ALESSIO E. Thirty years of the drug candidate NAMI-A and the myths in the field of ruthenium anticancer compounds: a personal perspective[J]. *Eur J Inorg Chem*, 2017, 2017(12): 1549-1560.
- [57] ALESSIO E, MESSORI L. NAMI-A and KP1019/1339, two iconic ruthenium anticancer drug candidates face-to-face; a case story in medicinal inorganic chemistry[J]. *Molecule*, 2019, 24(10): 1995. DOI: 10.3390/molecules24101995.
- [58] OSKO J D, PORTER N J, NARAYANA REDDY P A, *et al.* Exploring structural determinants of inhibitor affinity and selectivity in complexes with histone deacetylase 6[J]. *J Med Chem*, 2020, 63(1): 295-308.
- [59] SHIMIZU T, LORUSSO P M, PAPADOPOULOS K P, *et al.* Phase I first-in-human study of CUDC-101, a multitargeted inhibitor of HDACs, EGFR, and HER2 in patients with advanced solid tumors[J]. *Clin Cancer Res*, 2014, 20(19): 5032-5040.
- [60] WU C P, HSIEH Y J, HSIAO S H, *et al.* Human ATP-binding cassette transporter ABCG2 confers resistance to CUDC-907, a dual inhibitor of histone deacetylase and phosphatidylinositol 3-kinase[J]. *Mol Pharm*, 2016, 13(3): 784-794.

(收稿日期:2023-05-22)