[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
A61K 31/4045 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200880015739.2

[43] 公开日 2010 年 3 月 24 日

[11] 公开号 CN 101677995A

[22] 申请日 2008.5.9
[21] 申请号 200880015739.2
[30] 优先权
[32] 2007. 5.11 [33] US [31] 60/917,345
[32] 2007. 5.16 [33] US [31] 60/938,272
[86] 国际申请 PCT/US2008/063136 2008.5.9
[87] 国际公布 WO2008/141114 英 2008.11.20
[85] 进入国家阶段日期 2009.11.11
[71] 申请人 诺瓦提斯公司
地址 瑞士巴塞尔
[72] 发明人 P·W·阿塔贾
[74] 专利代理机构 北京市中咨律师事务所
代理人 黄革生 林柏楠
权利要求书 5 页 说明书 17 页

[54] 发明名称

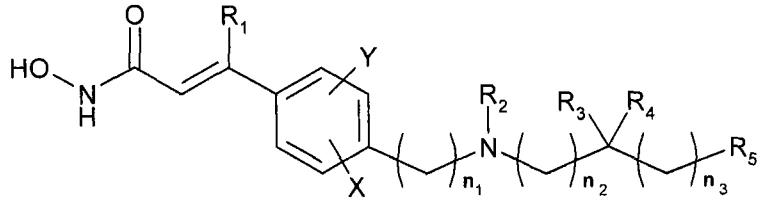
HDAC 抑制剂用于治疗黑素瘤的用途

[57] 摘要

本发明涉及 HDAC 抑制剂、更尤其或其药学可接受盐在制备用于治疗黑素瘤的药物组合物中的用途；HDAC 抑制剂或其药学可接受盐在治疗黑素瘤中的用途；治疗患有黑素瘤的温血动物、包括哺乳动物、尤其人类的方法，通过向需要该治疗的所述动物施用有效对抗所述疾病剂量的 HDAC 抑制剂或其药学可接受盐。

1. HDAC 抑制剂在制备用于治疗黑素瘤的药物中的用途。

2. 根据权利要求 1 的用途，其中 HDAC 抑制剂是式(I)化合物：



(I)

其中

R_1 为 H；卤素；或直链 C_1-C_6 烷基，特别是甲基、乙基或正丙基，所述甲基、乙基或正丙基取代基是未取代的或被以下关于烷基取代基描述的一个或多个取代基取代；

R_2 选自 H；C_1-C_{10} 烷基，优选 C_1-C_6 烷基，例如甲基、乙基或 $-CH_2CH_2-OH$；C_4-C_9 环烷基；C_4-C_9 杂环烷基；C_4-C_9 杂环烷基烷基；环烷基烷基，例如环丙基甲基；芳基；杂芳基；芳基烷基，例如苄基；杂芳基烷基，例如吡啶基甲基；$-(CH_2)_nC(O)R_6$；$-(CH_2)_nOC(O)R_6$；氨基酰基；$HON-C(O)-CH=C(R_1)-$芳基-烷基-；和$-(CH_2)_nR_7$；

R_3 和 R_4 是相同或不同的，且独立地为 H；C_1-C_6 烷基；酰基；或酰基氨基；或

R_3 和 R_4 与它们结合的碳一起代表 C=O、C=S 或 $C=NR_8$；或

R_2 与它结合的氮一起和 R_3 与它结合的碳一起可形成 C_4-C_9 杂环烷基；杂芳基；多环杂芳基；非芳族多环杂环；或混合的芳基和非芳基多环杂环；

R_5 选自 H；C_1-C_6 烷基；C_4-C_9 环烷基；C_4-C_9 杂环烷基；酰基；芳基；杂芳基；芳基烷基，例如苄基；杂芳基烷基，例如吡啶基甲基；芳族多环；非芳族多环；混合的芳基及非芳基多环；多环杂芳基；非芳族多环杂环；及混合的芳基和非芳基多环杂环；

n、n_1、n_2 和 n_3 相同或不同且独立地选自 0-6，当 n_1 是 1-6 时，每个碳原子可任选且独立地被 R_3 和/或 R_4 取代；

X 和 Y 相同或不同且独立地选自 H；卤素；C_1-C_4 烷基，如 CH_3 和 CF_3；

NO_2；$C(O)R_1$；OR_9；SR_9；CN；和 $NR_{10}R_{11}$；

R_6 选自 H；C_1-C_6 烷基；C_4-C_9 环烷基；C_4-C_9 杂环烷基；环烷基烷基，例如环丙基甲基；芳基；杂芳基；芳基烷基，例如苄基和 2-苯基乙烯基；杂芳基烷基，例如吡啶基甲基；OR_{12}；和 $NR_{13}R_{14}$；

R_7 选自 OR_{15}；SR_{15}；$S(O)R_{16}$；SO_2R_{17}；$NR_{13}R_{14}$；和 $NR_{12}SO_2R_6$；

R_8 选自 H；OR_{15}；$NR_{13}R_{14}$；C_1-C_6 烷基；C_4-C_9 环烷基；C_4-C_9 杂环烷基；芳基；杂芳基；芳基烷基，例如苄基；和杂芳基烷基，例如吡啶基甲基；

R_9 选自 C_1-C_4 烷基，例如 CH_3 和 CF_3；C(O)-烷基，例如 $C(O)CH_3$；和 $C(O)CF_3$；

R_{10} 和 R_{11} 相同或不同且独立地选自 H；C_1-C_4 烷基；和-C(O)-烷基；

R_{12} 选自 H；C_1-C_6 烷基；C_4-C_9 环烷基；C_4-C_9 杂环烷基；C_4-C_9 杂环烷基烷基；芳基；混合的芳基和非芳基多环；杂芳基；芳基烷基，例如苄基；和杂芳基烷基，例如吡啶基甲基；

R_{13} 和 R_{14} 相同或不同且独立地选自 H；C_1-C_6 烷基；C_4-C_9 环烷基；C_4-C_9 杂环烷基；芳基；杂芳基；芳基烷基，例如苄基；杂芳基烷基，例如吡啶基甲基；氨基酰基；或

R_{13} 和 R_{14} 与它们结合的氮一起为 C_4-C_9 杂环烷基；杂芳基；多环杂芳基；非芳族多环杂环；或混合的芳基和非芳基多环杂环；

R_{15} 选自 H；C_1-C_6 烷基；C_4-C_9 环烷基；C_4-C_9 杂环烷基；芳基；杂芳基；芳基烷基；杂芳基烷基；和$(CH_2)_mZR_{12}$；

R_{16} 选自 C_1-C_6 烷基；C_4-C_9 环烷基；C_4-C_9 杂环烷基；芳基；杂芳基；多环杂芳基；芳基烷基；杂芳基烷基；和$(CH_2)_mZR_{12}$；

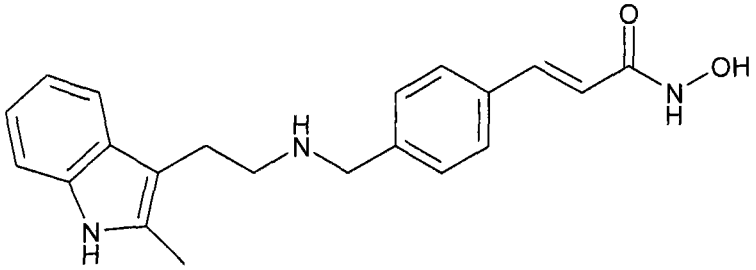
R_{17} 选自 C_1-C_6 烷基；C_4-C_9 环烷基；C_4-C_9 杂环烷基；芳基；芳族多环；杂芳基；芳基烷基；杂芳基烷基；多环杂芳基和 $NR_{13}R_{14}$；

m 为选自 0-6 的整数；且

Z 选自 O；NR_{13}；S；和 S(O)，

或其药学可接受盐。

3. 根据权利要求 2 的用途，其中式(I)化合物是具有式(III)的 *N*-羟基-3-[4-[[[2-(2-甲基-1*H*-吲哚-3-基)-乙基]-氨基]甲基]苯基]-2*E*-2-丙烯酰胺：



(III)

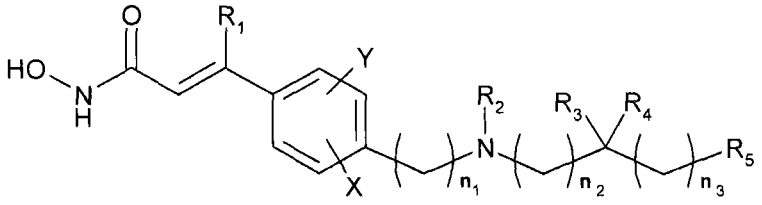
，

或其药学可接受的盐。

4. 根据权利要求 1 至 3 任一项的用途，其中所述温血动物是人。

5. 治疗黑素瘤的方法，包括向有需要的温血动物施用治疗有效量的 HDAC 抑制剂。

6. 根据权利要求 5 的方法，包括向有需要的温血动物施用治疗有效量的式(I)化合物：



(I)

，

其中

R_1 为 H；卤素；或直链 C_1-C_6 烷基，特别是甲基、乙基或正丙基，所述甲基、乙基或正丙基取代基是未取代的或被以下关于烷基取代基描述的一个或多个取代基取代；

R_2 选自 H；C_1-C_{10} 烷基，优选 C_1-C_6 烷基，例如甲基、乙基或 $-CH_2CH_2-OH$；C_4-C_9 环烷基；C_4-C_9 杂环烷基；C_4-C_9 杂环烷基烷基；环烷基烷基，例如环丙基甲基；芳基；杂芳基；芳基烷基，例如苄基；杂芳基烷基，例如吡啶基甲基；$-(CH_2)_nC(O)R_6$；$-(CH_2)_nOC(O)R_6$；氨基酰基；$HON-C(O)-CH=C(R_1)-$芳基-烷基-；和$-(CH_2)_nR_7$；

R_3 和 R_4 是相同或不同的，且独立地为 H；C_1-C_6 烷基；酰基；或酰基氨基；或

R_3 和 R_4 与它们结合的碳一起代表 C=O、C=S 或 $C=NR_8$；或

R_2与它结合的氮一起和R_3与它结合的碳一起可形成C_4-C_9杂环烷基；杂芳基；多环杂芳基；非芳族多环杂环；或混合的芳基和非芳基多环杂环；

R_5选自 H；C_1-C_6烷基；C_4-C_9环烷基；C_4-C_9杂环烷基；酰基；芳基；杂芳基；芳基烷基，例如苄基；杂芳基烷基，例如吡啶基甲基；芳族多环；非芳族多环；混合的芳基和非芳基多环；多环杂芳基；非芳族多环杂环；及混合的芳基和非芳基多环杂环；

n、n_1、n_2和n_3相同或不同且独立地选自 0-6，当n_1是 1-6 时，每个碳原子可任选且独立地被R_3和/或R_4取代；

X 和 Y 相同或不同且独立地选自 H；卤素；C_1-C_4烷基，如CH_3和CF_3；NO_2；$C(O)R_1$；OR_9；SR_9；CN；和$NR_{10}R_{11}$；

R_6选自 H；C_1-C_6烷基；C_4-C_9环烷基；C_4-C_9杂环烷基；环烷基烷基，例如环丙基甲基；芳基；杂芳基；芳基烷基，例如苄基和 2-苯基乙烯基；杂芳基烷基，例如吡啶基甲基；OR_{12}；和$NR_{13}R_{14}$；

R_7选自OR_{15}；SR_{15}；$S(O)R_{16}$；SO_2R_{17}；$NR_{13}R_{14}$；和$NR_{12}SO_2R_6$；

R_8选自 H；OR_{15}；$NR_{13}R_{14}$；C_1-C_6烷基；C_4-C_9环烷基；C_4-C_9杂环烷基；芳基；杂芳基；芳基烷基，例如苄基；和杂芳基烷基，例如吡啶基甲基；

R_9选自C_1-C_4烷基，例如CH_3和CF_3；C(O)-烷基，例如$C(O)CH_3$；和$C(O)CF_3$；

R_{10}和R_{11}相同或不同且独立地选自 H；C_1-C_4烷基；和-C(O)-烷基；

R_{12}选自 H；C_1-C_6烷基；C_4-C_9环烷基；C_4-C_9杂环烷基；C_4-C_9杂环烷基烷基；芳基；混合的芳基和非芳基多环；杂芳基；芳基烷基，例如苄基；和杂芳基烷基，例如吡啶基甲基；

R_{13}和R_{14}相同或不同且独立地选自 H；C_1-C_6烷基；C_4-C_9环烷基；C_4-C_9杂环烷基；芳基；杂芳基；芳基烷基，例如苄基；杂芳基烷基，例如吡啶基甲基；氨基酰基；或

R_{13}和R_{14}与它们结合的氮一起为C_4-C_9杂环烷基；杂芳基；多环杂芳基；非芳族多环杂环；或混合的芳基和非芳基多环杂环；

R_{15}选自 H；C_1-C_6烷基；C_4-C_9环烷基；C_4-C_9杂环烷基；芳基；杂芳基；芳基烷基；杂芳基烷基；和$(CH_2)_mZR_{12}$；

R_{16}选自 C_1-C_6烷基；C_4-C_9环烷基；C_4-C_9杂环烷基；芳基；杂芳基；多环杂芳基；芳基烷基；杂芳基烷基；和$(CH_2)_mZR_{12}$；

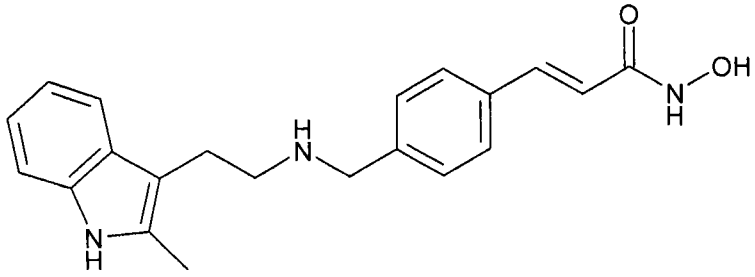
R_{17}选自 C_1-C_6烷基；C_4-C_9环烷基；C_4-C_9杂环烷基；芳基；芳族多环；杂芳基；芳基烷基；杂芳基烷基；多环杂芳基和 $NR_{13}R_{14}$；

m 为选自 0-6 的整数；且

Z 选自 O；NR_{13}；S；和 S(O)，

或其药学可接受盐。

7. 根据权利要求 5 的方法，其中式(I)化合物是具有式(III)的 *N*-羟基-3-[4-[[[2-(2-甲基-1*H*-吲哚-3-基)-乙基]-氨基]甲基]苯基]-2*E*-2-丙烯酰胺:



(III)

，

或其药学可接受的盐。

8. 根据权利要求 5 的方法，其中温血动物是人类。

HDAC 抑制剂用于治疗黑素瘤的用途

发明领域

本发明涉及组蛋白脱乙酰酶(HDAC)抑制剂或其药学可接受盐在制备用于治疗黑素瘤的药物组合物中的用途；HDAC 抑制剂或其药学可接受盐治疗黑素瘤的用途；通过向所述需要此类治疗的动物施用有效对抗所述疾病剂量的 HDAC 抑制剂或其药学可接受盐、治疗患有黑素瘤的温血动物包括哺乳动物、尤其人类的方法。

发明背景

黑素瘤是最严重类型的皮肤癌症。它起于被称为黑素细胞的皮肤细胞。黑素细胞是制备黑色素的细胞，其赋予皮肤其颜色。黑色素还保护皮肤深层以免太阳的有害紫外线(UV)。当人们在太阳光下消耗时间时，黑素细胞产生更多的黑色素并使得皮肤变褐色。当皮肤暴露于其他形式的紫外光如在晒黑间(tanning booth)中时，这也会发生。如果皮肤接受过多的紫外光，黑素细胞可能开始异常生长，变成癌性的。这种病症被称为黑素瘤。因此，需要开发新的治疗方法。

发明概述

如本文定义的式(I)化合物是 HDAC 抑制剂。组蛋白的可逆乙酰化是基因表达的主要调节剂，其通过改变转录因子对 DNA 的可利用性发挥作用。在正常细胞中，组蛋白脱乙酰酶(HDA)和组蛋白乙酰基转移酶一起控制组蛋白的乙酰化水平以保持平衡。HAD 抑制导致过乙酰化组蛋白的蓄积，这导致多种细胞响应。

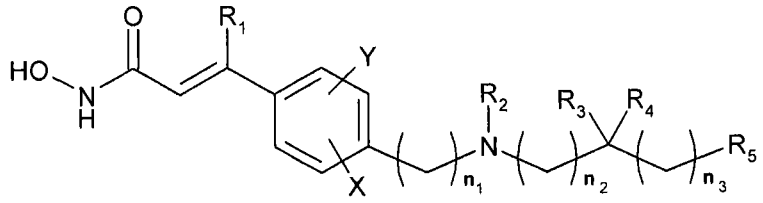
令人惊讶的是，现已发现，HDAC 抑制剂、尤其本文定义的式(I)化合物可治疗黑素瘤。因此，本发明涉及 HDAC 抑制在制备用于治疗黑素瘤的

药物中的用途。本发明还涉及 HDAC 抑制剂或其药学可接受盐治疗黑素瘤的用途。本发明涉及通过向所述需要此类治疗的动物施用有效对抗所述疾病剂量的 HDAC 抑制剂或其药学可接受盐、治疗患有黑素瘤的温血动物、包括哺乳动物、尤其人类的方法。

发明详述

HDAC 抑制剂化合物

特别相关的用于本发明组合的 HDAC 抑制剂化合物为式(I)所述的异羟肟酸盐化合物:



(I)

其中:

R_1 为 H; 卤素; 或直链 C_1-C_6 烷基，特别是甲基、乙基或正丙基，所述甲基、乙基或正丙基取代基是未取代的或被以下关于烷基取代基描述的一个或多个取代基取代;

R_2 选自 H; C_1-C_{10} 烷基，优选 C_1-C_6 烷基，例如甲基、乙基或 $-CH_2CH_2-OH$; C_4-C_9 环烷基; C_4-C_9 杂环烷基; C_4-C_9 杂环烷基烷基; 环烷基烷基，例如环丙基甲基; 芳基; 杂芳基; 芳基烷基，例如苄基; 杂芳基烷基，例如吡啶基甲基; $-(CH_2)_nC(O)R_6$; $-(CH_2)_nOC(O)R_6$; 氨基酰基; $HON-C(O)-CH=C(R_1)$-芳基-烷基-; 和$-(CH_2)_nR_7$;

R_3 和 R_4 是相同或不同的，且独立地为 H; C_1-C_6 烷基; 酰基; 或酰基氨基; 或

R_3 和 R_4 与它们结合的碳一起代表 C=O、C=S 或 $C=NR_8$; 或

R_2 与它结合的氮一起和 R_3 与它结合的碳一起可形成 C_4-C_9 杂环烷基; 杂芳基; 多环杂芳基; 非芳族多环杂环; 或混合的芳基和非芳基多环杂环;

R_5 选自 H; C_1-C_6 烷基; C_4-C_9 环烷基; C_4-C_9 杂环烷基; 酰基; 芳基; 杂芳基; 芳基烷基，例如苄基; 杂芳基烷基，例如吡啶基甲基; 芳族多环;

非芳族多环；混合的芳基和非芳基多环；多环杂芳基，非芳族多环杂环；及混合的芳基和非芳基多环杂环；

n、n_1、n_2和n_3相同或不同且独立地选自0-6，当n_1是1-6时，每个碳原子可任选且独立地被R_3和/或R_4取代；

X和Y相同或不同且独立地选自H；卤素；C_1-C_4烷基，如CH_3和CF_3；NO_2；$C(O)R_1$；OR_9；SR_9；CN；和$NR_{10}R_{11}$；

R_6选自H；C_1-C_6烷基；C_4-C_9环烷基；C_4-C_9杂环烷基；环烷基烷基，例如环丙基甲基；芳基；杂芳基；芳基烷基，例如苄基及2-苯基乙烯基；杂芳基烷基，例如吡啶基甲基；OR_{12}；和$NR_{13}R_{14}$；

R_7选自OR_{15}；SR_{15}；$S(O)R_{16}$；SO_2R_{17}；$NR_{13}R_{14}$；和$NR_{12}SO_2R_6$；

R_8选自H；OR_{15}；$NR_{13}R_{14}$；C_1-C_6烷基；C_4-C_9环烷基；C_4-C_9杂环烷基；芳基；杂芳基；芳基烷基，例如苄基；和杂芳基烷基，例如吡啶基甲基；

R_9选自C_1-C_4烷基，例如CH_3和CF_3；C(O)-烷基，例如$C(O)CH_3$；和$C(O)CF_3$；

R_{10}和R_{11}相同或不同且独立地选自H；C_1-C_4烷基；和-C(O)-烷基；

R_{12}选自H；C_1-C_6烷基；C_4-C_9环烷基；C_4-C_9杂环烷基；C_4-C_9杂环烷基烷基；芳基；混合的芳基和非芳基多环；杂芳基；芳基烷基，例如苄基；和杂芳基烷基，例如吡啶基甲基；

R_{13}和R_{14}相同或不同且独立地选自H；C_1-C_6烷基；C_4-C_9环烷基；C_4-C_9杂环烷基；芳基；杂芳基；芳基烷基，例如苄基；杂芳基烷基，例如吡啶基甲基；氨基酰基；或

R_{13}和R_{14}与它们结合的氮一起为C_4-C_9杂环烷基；杂芳基；多环杂芳基；非芳族多环杂环；或混合的芳基和非芳基多环杂环；

R_{15}选自H；C_1-C_6烷基；C_4-C_9环烷基；C_4-C_9杂环烷基；芳基；杂芳基；芳基烷基；杂芳基烷基；和$(CH_2)_mZR_{12}$；

R_{16}选自C_1-C_6烷基；C_4-C_9环烷基；C_4-C_9杂环烷基；芳基；杂芳基；多环杂芳基；芳基烷基；杂芳基烷基；和$(CH_2)_mZR_{12}$；

R_{17}选自 C_1-C_6烷基；C_4-C_9环烷基；C_4-C_9杂环烷基；芳基；芳族多环；杂芳基；芳基烷基；杂芳基烷基；多环杂芳基和$NR_{13}R_{14}$；

m为选自0-6的整数；且

Z选自O；NR_{13}；S；和S(O)，

或其药学可接受盐。

“未取代的”酌情表示没有取代基或唯一的取代基为氢。

卤素取代基选自氟、氯、溴和碘，优选氟或氯。

除非另外注明，烷基取代基包括直链和支链-C_1-C_6烷基。合适的直链和支链-C_1-C_6烷基取代基的实例包括甲基、乙基、正丙基、2-丙基、正丁基、仲丁基、叔丁基等。除非另外注明，烷基取代基包括未取代的烷基和被一个或多个合适取代基取代的烷基，所述取代基包括不饱和取代基，即有一个或多个C-C双键或三键；酰基；环烷基；卤素；氧基烷基；烷基氨基；氨基烷基；酰基氨基；和OR_{15}，例如烷氧基。烷基的优选取代基包括卤素、羟基、烷氧基、氧基烷基、烷基氨基和氨基烷基。

除非另外说明，环烷基取代基包括C_3-C_9环烷基，如环丙基、环丁基、环戊基、环己基等。除非另外注明，环烷基取代基包括未取代的环烷基和被一个或多个合适取代基取代的环烷基，所述取代基包括C_1-C_6烷基、卤素、烃基、氨基烷基、氧基烷基、烷基氨基和OR_{15}，如烷氧基。环烷基的优选取代基包括卤素、羟基、烷氧基、氧基烷基、烷基氨基和氨基烷基。

烷基和环烷基取代基的以上讨论也用于其它取代基的烷基部分，例如但不限于烷氧基、烷基胺、烷基酮、芳基烷基、杂芳基烷基、烷基磺酰基和烷基酯取代基等。

杂环烷基取代基包括3至9元脂肪族环，如4至7元脂肪族环，其含有选自氮、硫、氧的1-3个杂原子。合适的杂环烷基取代基的实例包括吡咯烷基、四氢呋喃基、四氢噻吩基(tetrahydrothiofuranyl)、哌啶基、哌嗪基、四氢吡喃基、吗啉代、1,3-二氮杂环庚烷(diazapane)、1,4-二氮杂环庚烷、1,4-氧氮杂环庚烷(oxazepane)和1,4-氧硫杂环庚烷(oxathiapane)。除非另外注明，环为未取代的或在碳原子上被一个或多个适宜的取代基取代，

所述取代基包括 C_1-C_6 烷基；C_4-C_9 环烷基；芳基；杂芳基；芳基烷基，例如苄基；杂芳基烷基，例如吡啶基甲基；卤素；氨基；烷基氨基和 OR_{15}，例如烷氧基。除非另外注明，氮杂原子是未取代的或被 H、C_1-C_4 烷基；芳基烷基，例如苄基；杂芳基烷基，例如吡啶基甲基；酰基；氨基酰基；烷基磺酰基；和芳基磺酰基取代。

环烷基烷基取代基包括式-$(CH_2)_{n5}$-环烷基的化合物，其中 n5 为 1-6 的数。合适的烷基环烷基取代基包括环戊基甲基、环戊基乙基、环己基甲基等。此类取代基为未取代的或被合适的取代基、包括以上列出的用于烷基和环烷基的取代基在烷基部分或环烷基部分取代。

芳基取代基包括未取代的苯基和被一个或多个合适取代基取代的苯基，所述取代基包括 C_1-C_6 烷基；环烷基烷基，例如环丙基甲基；O(CO)烷基；氧基烷基；卤素；硝基；氨基；烷基氨基；氨基烷基；烷基酮；腈；羧基烷基；烷基磺酰基；氨基磺酰基；芳基磺酰基和 OR_{15}，如烷氧基。优选的取代基包括 C_1-C_6 烷基；环烷基，例如环丙基甲基；烷氧基；氧基烷基；卤素；硝基；氨基；烷基氨基；氨基烷基；烷基酮；腈；羧基烷基；烷基磺酰基；芳基磺酰基和氨基磺酰基。合适的芳基的实例包括 C_1-C_4 烷基苯基、C_1-C_4 烷氧基苯基、三氟甲基苯基、甲氧基苯基、羟基乙基苯基、二甲基氨基苯基、氨基丙基苯基、乙酯基苯基、甲磺酰基苯基和甲苯磺酰基苯基。

芳族多环包括萘基，和被一个或多个合适取代基取代的萘基，所述取代基包括 C_1-C_6 烷基；烷基环烷基，例如环丙基甲基；氧基烷基；卤素；硝基；氨基；烷基氨基；氨基烷基；烷基酮；腈；羧基烷基；烷基磺酰基；芳基磺酰基；氨基磺酰基和 OR_{15}，如烷氧基。

杂芳基取代基包括含有选自 N、O 和 S 的一个或多个杂原子、例如 1-4 个杂原子的 5 至 7 元芳族环化合物。典型的杂芳基取代基包括呋喃基、噻吩基、吡咯、吡唑、三唑、噻唑、噁唑、吡啶、嘧啶、异噁唑基、吡嗪等。除非另外注明，杂芳基取代基为未取代的或被一个或多个合适取代基、包括烷基、以上鉴定的烷基取代基和另一杂芳基取代基在碳原子上取代。氮

原子为未取代的或例如被 R_{13} 取代；特别有用的 N 取代基包括 H、C_1-C_4 烷基、酰基、氨基酰基和磺酰基。

芳基烷基取代基包括式-$(CH_2)_{n5}$-芳基、-$(CH_2)_{n5-1}$-(CH-芳基)-$(CH_2)_{n5}$-芳基或-$(CH_2)_{n5-1}$CH(芳基)(芳基)的基团，其中芳基和 n5 如上所定义。此类芳基烷基取代基包括苄基、2-苯乙基、1-苯乙基、甲苯基-3-丙基、2-苯基丙基、二苯基甲基、2-二苯乙基、5,5-二甲基-3-苯基戊基等。芳基烷基取代基为未取代的或如以上关于烷基和芳基取代基描述的在烷基部分或芳基部分或两部分均被取代。

杂芳基烷基取代基包括式-$(CH_2)_{n5}$-杂芳基的基团，其中杂芳基和 n5 如上所定义且桥基与杂芳基部分的碳或氮连接，如 2-、3-或 4-吡啶基甲基、咪唑基甲基、喹啉基乙基和吡咯基丁基。杂芳基取代基为未取代的或如以上对于杂芳基和烷基取代基所描述的那样被取代。

氨基酰基取代基包括式-C(O)-$(CH_2)_n$-C(H)($NR_{13}R_{14}$)-$(CH_2)_n$-R_5 的基团，其中 n、R_{13}、R_{14} 和 R_5 如上所述。合适的氨基酰基取代基包括天然氨基酸和非天然氨基酸，如甘氨酰基、D-色氨酰基、L-赖氨酰基、D-或 L-高丝氨酰基、4-氨基丁酰基和±-3-氨基-4-己烯酰基。

非芳族多环取代基包括二环和三环稠合环系统，其中每个环可为 4 至 9 元且每个环可包含零个、一个或多个双和/或三键。非芳族多环的合适实例包括萘烷、八氢茚、全氢化苯并环庚烯和全氢化苯并-[f]-甘菊环。此类取代基为未取代的或如以上关于环烷基所描述的那样被取代。

混合的芳基和非芳基多环取代基包括二环和三环稠合环系统，其中每个环可为 4 至 9 元且至少一个环为芳族。混合的芳基和非芳基多环的合适实例包括亚甲基二氧基苯基、二-亚甲基二氧基苯基、1,2,3,4-四氢化萘、二苯并环庚烷(dibenzosuberane)、二氢蒽和 9H-芴。此类取代基为未取代的或被硝基取代或如以上关于环烷基所描述的那样被取代。

多环杂芳基取代基包括二环和三环稠合环系统，其中每个环可独立地为 5 或 6 元且含有一个或多个杂原子，例如选自 O、N 或 S 的 1、2、3 或 4 个杂原子使稠环系统为芳族。多环杂芳基环系统的合适实例包括喹啉、

异喹啉、吡啶并吡嗪、吡咯并吡啶、呋喃并吡啶(furopyridine)、吲哚、苯并呋喃、苯并噻吩、苯并吲哚、苯并噁唑、吡咯并喹啉等。除非另外注明，多环杂芳基取代基为未取代的或被一个或多个合适取代基、包括烷基、以上指出的烷基取代基和式-O-$(CH_2CH=CH(CH_3)(CH_2))_{1-3}H$ 的取代基在碳原子上取代。氮原子为未取代的或例如被 R_{13} 取代，特别有用的 N 取代基包括 H、C_1-C_4 烷基、酰基、氨基酰基和磺酰基。

非芳族多环杂环取代基包括二环和三环稠合环系统，其中每个环可为 4 至 9 元，含有一个或多个杂原子，例如选自 O、N 或 S 的 1、2、3 或 4 个杂原子且包含零个或一个或多个 C-C 双键或三键。非芳族多环杂环的合适实例包括己糖醇、顺式-全氢-环庚三烯并[b]吡啶基、十氢-苯并[f][1,4]氧氮杂䓬、2,8-二氧杂二环[3.3.0]辛烷、六氢-噻吩并[3,2-b]噻吩、全氢吡咯并[3,2-b]吡咯、全氢二氮杂萘、全氢-1H-二环戊二烯并[b,e]吡喃。除非另外注明，非芳族多环杂环取代基为未取代的或被一个或多个取代基、包括烷基和以上鉴定的烷基取代基在碳原子上取代。氮原子为未取代的或例如被 R_{13} 取代，特别有用的 N 取代基包括 H、C_1-C_4 烷基、酰基、氨基酰基和磺酰基。

混合的芳基和非芳基多环杂环取代基包括二环和三环稠合环系统，其中每个环可为 4 至 9 元，包含选自 O、N 或 S 的一个或多个杂原子且至少环中的一个必须为芳族。混合的芳基和非芳基多环杂环的合适实例包括 2,3-二氢吲哚、1,2,3,4-四氢喹啉、5,11-二氢-10H-二苯并[b,e][1,4]二氮杂䓬、5H-二苯并[b,e][1,4]二氮杂䓬、1,2-二氢吡咯并[3,4-b][1,5]苯并二氮杂䓬、1,5-二氢-吡啶并[2,3-b][1,4]二氮杂䓬-4-酮、1,2,3,4,6,11-六氢-苯并[b]吡啶并[2,3-e][1,4]二氮杂䓬-5-酮。除非另外注明，混合的芳基和非芳基多环杂环取代基为未取代的或被一个或多个合适取代基包括-N-OH、=N-OH、烷基和以上鉴定的烷基取代基在碳原子上取代。氮原子为未取代的或例如被 R_{13} 取代；特别有用的 N 取代基包括 H、C_1-C_4 烷基、酰基、氨基酰基和磺酰基。

氨基取代基包括伯胺、仲胺和叔胺和盐形式、季胺。氨基取代基的实

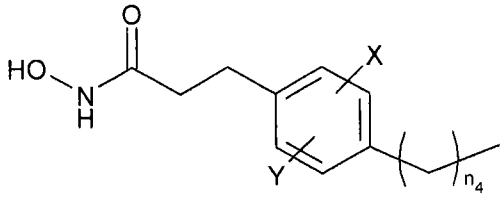
例包括单和二烷基氨基、单和二芳基氨基、单和二芳基烷基氨基、芳基-芳基烷基氨基、烷基-芳基氨基、烷基-芳基烷基氨基等。

磺酰基取代基包括烷基磺酰基和芳基磺酰基，例如甲磺酰基、苯磺酰基、甲苯磺酰基等。

酰基取代基包括式-C(O)-W、-OC(O)-W、-C(O)-O-W 或-C(O)$NR_{13}R_{14}$的基团，其中 W 为 R_{16}、H 或环烷基烷基。

酰基氨基取代基包括式-$N(R_{12})$C(O)-W、-$N(R_{12})$C(O)-O-W 和-$N(R_{12})$C(O)-NHOH 的取代基，R_{12}和 W 如上所定义。

R_2取代基 HON-C(O)-CH=C(R_1)-芳基-烷基-为下式的基团



。

每个取代基优选地包括以下：

R_1为 H、卤素或直链 C_1-C_4烷基；

R_2选自 H、C_1-C_6烷基、C_4-C_9环烷基、C_4-C_9杂环烷基、环烷基烷基、芳基、杂芳基、芳基烷基、杂芳基烷基、-$(CH_2)_n$C(O)R_6、氨基酰基和-$(CH_2)_n$$R_7$；

R_3和 R_4相同或不同且独立地选自 H 和 C_1-C_6烷基；或

R_3和 R_4与它们结合的碳一起代表 C=O、C=S 或 C=NR_8；

R_5选自 H、C_1-C_6烷基、C_4-C_9环烷基、C_4-C_9杂环烷基、芳基、杂芳基、芳基烷基、杂芳基烷基、芳族多环、非芳族多环、混合的芳基和非芳基多环、多环杂芳基、非芳族多环杂环以及混合的芳基和非芳基多环杂环；

n、n_1、n_2和 n_3相同或不同且独立地选自 0-6，n_1为 1-6 时，每个碳原子为未取代的或独立地被 R_3和/或 R_4取代；

X 和 Y 相同或不同且独立地选自 H、卤素、C_1-C_4烷基、CF_3、NO_2、C(O)R_1、OR_9、SR_9、CN 和 $NR_{10}R_{11}$；

R_6选自 H、C_1-C_6烷基、C_4-C_9环烷基、C_4-C_9杂环烷基、烷基环烷基、

芳基、杂芳基、芳基烷基、杂芳基烷基、OR_{12}和$NR_{13}R_{14}$;

R_7选自OR_{15}、SR_{15}、$S(O)R_{16}$、SO_2R_{17}、$NR_{13}R_{14}$和$NR_{12}SO_2R_6$;

R_8选自 H、OR_{15}、$NR_{13}R_{14}$、C_1-C_6烷基、C_4-C_9环烷基、C_4-C_9杂环烷基、芳基、杂芳基、芳基烷基和杂芳基烷基;

R_9选自C_1-C_4烷基和 C(O)-烷基;

R_{10}和R_{11}相同或不同且独立地选自 H、C_1-C_4烷基和-C(O)-烷基;

R_{12}选自 H、C_1-C_6烷基、C_4-C_9环烷基、C_4-C_9杂环烷基、芳基、杂芳基、芳基烷基和杂芳基烷基;

R_{13}和 R_{14}相同或不同且独立地选自 H、C_1-C_6烷基、C_4-C_9环烷基、C_4-C_9杂环烷基、芳基、杂芳基、芳基烷基、杂芳基烷基和氨基酰基;

R_{15}选自 H、C_1-C_6烷基、C_4-C_9环烷基、C_4-C_9杂环烷基、芳基、杂芳基、芳基烷基、杂芳基烷基和$(CH_2)_mZR_{12}$;

R_{16}选自C_1-C_6烷基、C_4-C_9环烷基、C_4-C_9杂环烷基、芳基、杂芳基、芳基烷基、杂芳基烷基和$(CH_2)_mZR_{12}$;

R_{17}选自C_1-C_6烷基、C_4-C_9环烷基、C_4-C_9杂环烷基、芳基、杂芳基、芳基烷基、杂芳基烷基和$NR_{13}R_{14}$;

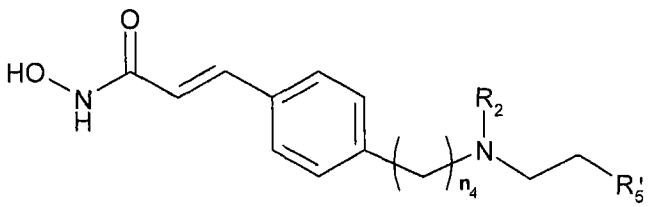
m 为选自 0-6 的整数; 且

Z 选自 O、NR_{13}、S 和 S(O);

或其药学可接受盐。

式(I)的有用化合物包括其中每个R_1、X、Y、R_3和R_4为 H 的化合物,包括其中n_2和n_3之一为 0 且另一个为 1 的化合物,特别是其中R_2为 H 或$-CH_2-CH_2-OH$的那些。

一类合适的异羟肟酸盐化合物为式(Ia)的那些:



(Ia)

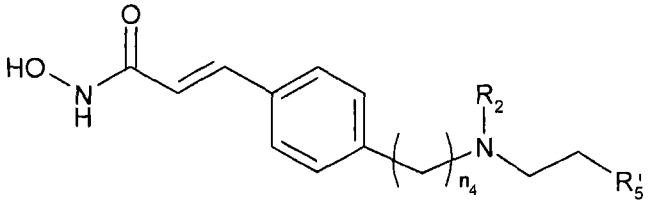
其中

n_4为 0-3;

R_2选自 H、C_1-C_6烷基、C_4-C_9环烷基、C_4-C_9杂环烷基、环烷基烷基、芳基、杂芳基、芳基烷基、杂芳基烷基、$-(CH_2)_nC(O)R_6$、氨基酰基和$-(CH_2)_nR_7$；且

R_5'为杂芳基；杂芳基烷基，例如吡啶基甲基；芳族多环；非芳族多环；混合的芳基和非芳基多环；多环杂芳基或混合的芳基；和非芳基多环杂环；或其药学可接受盐。

另一类合适的异羟肟酸盐化合物为式(Ia)的那些



(Ia)

其中

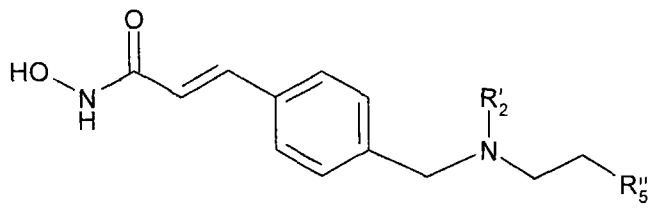
n_4为 0-3;

R_2选自 H、C_1-C_6烷基、C_4-C_9环烷基、C_4-C_9杂环烷基、环烷基烷基、芳基、杂芳基、芳基烷基、杂芳基烷基、$-(CH_2)_nC(O)R_6$、氨基酰基和$-(CH_2)_nR_7$;

R_5'为芳基；芳基烷基；芳族多环；非芳族多环和混合的芳基；和非芳基多环，特别是芳基，如对-氟苯基、对-氯苯基、对-O-C_1-C_4烷基苯基，如对-甲氧基苯基和对-C_1-C_4烷基苯基；和芳基烷基，如苄基、邻-、间-或对-氟苄基、邻-、间-或对-氯苄基、邻-、间-或对-单、二-或三-O-C_1-C_4烷基苄基，如邻-、间-或对-甲氧基苄基、间,对-二乙氧基苄基、邻,间,对-三甲氧基苄基和邻-、间-或对-单、二-或三-C_1-C_4烷基苯基，如对-甲基、间,间-二乙基苯基;

或其药学可接受盐。

另一令人感兴趣的类别为式(Ib)的化合物:



(Ib)

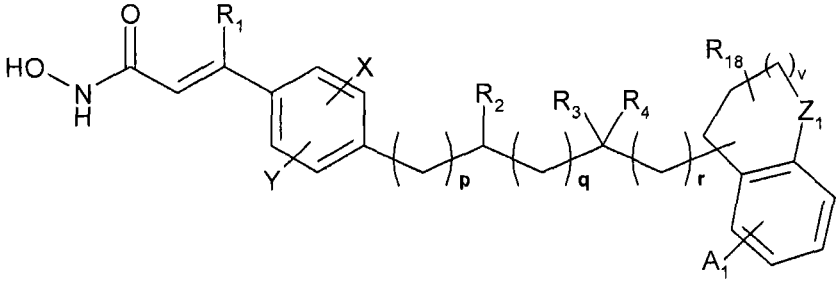
其中

R_2'选自 H；C_1-C_6烷基；C_4-C_6环烷基；环烷基烷基，例如环丙基甲基；$(CH_2)_{2-4}OR_{21}$，其中 R_{21} 为 H、甲基、乙基、丙基和异丙基；且

R_5''为未取代的 1H-吲哚-3-基、苯并呋喃-3-基或喹啉-3-基，或取代的 1H-吲哚-3-基，如 5-氟-1H-吲哚-3-基或 5-甲氧基-1H-吲哚-3-基、苯并呋喃-3-基或喹啉-3-基；

或其药学可接受盐。

另一类令人感兴趣的异羟肟酸盐化合物为式(Ic)的化合物



(Ic)

其中

含有 Z_1 的环为芳族或非芳族，所述非芳族环为饱和或不饱和，

Z_1 为 O、S 或 N-R_{20}；

R_{18} 为 H；卤素；C_1-C_6烷基(甲基、乙基、叔丁基)；C_3-C_7环烷基；芳基，例如未取代的苯基或被 4-OCH_3 或 4-CF_3 取代的苯基；或杂芳基，如 2-呋喃基、2-噻吩基或 2-、3-或 4-吡啶基；

R_{20} 为 H；C_1-C_6烷基；C_1-C_6烷基-C_3-C_9环烷基，例如环丙基甲基；芳基；杂芳基；芳基烷基，例如苄基；杂芳基烷基，例如吡啶基甲基；酰基，例如乙酰基、丙酰基和苯甲酰基；或磺酰基，例如甲磺酰基、乙磺酰基、苯磺酰基和甲苯磺酰基；

A_1 为 1、2 或 3 个取代基，其独立地为 H；C_1-C_6烷基；-OR_{19}；卤素；烷基氨基；氨基烷基；卤素；或杂芳基烷基，例如吡啶基甲基；

R_{19}选自 H；C_1-C_6烷基；C_4-C_9环烷基；C_4-C_9杂环烷基；芳基；杂芳基；芳基烷基，例如苄基；杂芳基烷基，例如吡啶基甲基和-$(CH_2CH=CH(CH_3)(CH_2))_{1-3}H$；

R_2选自 H、C_1-C_6烷基、C_4-C_9环烷基、C_4-C_9杂环烷基、环烷基烷基、芳基、杂芳基、芳基烷基、杂芳基烷基、-$(CH_2)_nC(O)R_6$、氨基酰基和

$-(CH_2)_nR_7$;

v 为 0、1 或 2;

p 为 0-3; 且

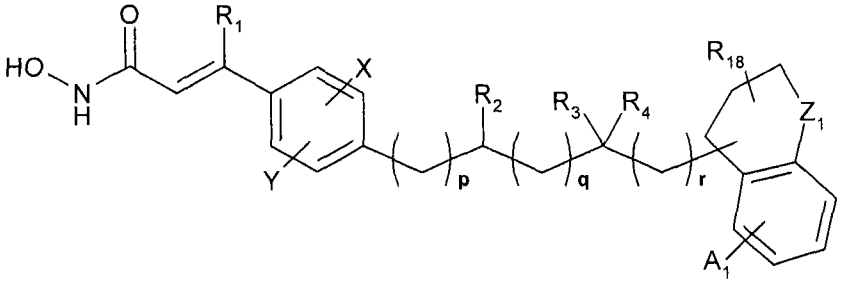
q 为 1-5 且 r 为 0; 或

q 为 0 且 r 为 1-5;

或其药学可接受盐。其他可变取代基如上所定义。

特别有用的式(Ic)化合物为其中 R_2 为 H 或$-(CH_2)_pCH_2OH$、其中 p 为 1-3 的那些，特别是其中 R_1 为 H 的那些; 如其中 R_1 为 H 且 X 和 Y 各自为 H，且其中 q 为 1-3 且 r 为 0 或其中 q 为 0 且 r 为 1-3 的那些，特别是其中 Z_1 为 $N-R_{20}$ 的那些。在这些化合物中 R_2 优选为 H 或$-CH_2-CH_2-OH$ 且 q 和 r 之和优选为 1。

另一类令人感兴趣的异羟肟酸盐化合物为式(Id)的化合物:



(Id)

其中

Z_1 为 O、S 或 $N-R_{20}$;

R_{18} 为 H; 卤素; C_1-C_6 烷基(甲基、乙基、叔丁基); C_3-C_7 环烷基; 芳基，例如未取代的苯基或被 $4-OCH_3$ 或 $4-CF_3$ 取代的苯基; 或杂芳基;

R_{20} 为 H; C_1-C_6 烷基、C_1-C_6 烷基-C_3-C_9 环烷基，例如环丙基甲基; 芳基; 杂芳基; 芳基烷基，例如苄基; 杂芳基烷基，例如吡啶基甲基; 酰基，例如乙酰基、丙酰基和苯甲酰基; 或磺酰基，例如甲磺酰基、乙磺酰基、苯磺酰基、甲苯磺酰基;

A_1 为 1、2 或 3 个取代基，其独立地为 H、C_1-C_6 烷基、$-OR_{19}$ 或卤素;

R_{19} 选自 H; C_1-C_6 烷基; C_4-C_9 环烷基; C_4-C_9 杂环烷基; 芳基; 杂芳基; 芳基烷基，例如苄基; 和杂芳基烷基，例如吡啶基甲基;

p 为 0-3; 且

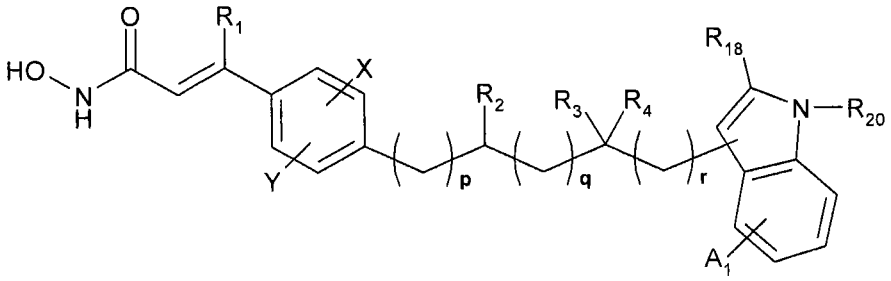
q 为 1-5 且 r 为 0；或

q 为 0 且 r 为 1-5；

或其药学可接受盐。其他可变取代基如以所定义。

特别有用的式(Id)化合物为其中 R_2 为 H 或-$(CH_2)_pCH_2OH$、其中 p 为 1-3 的那些，特别是其中 R_1 为 H 的那些；如其中 R_1 为 H 且 X 和 Y 各自为 H，且其中 q 为 1-3 且 r 为 0 或其中 q 为 0 且 r 为 1-3 的那些。在这些化合物中 R_2 优选为 H 或-CH_2-CH_2-OH 且 q 和 r 之和优选为 1。

本发明进一步涉及式(Ie)的化合物



(Ie)

或其药学可接受盐。可变取代基如上所定义。

特别有用的式(Ie)化合物为其中 R_{18} 为 H、氟、氯、溴、C_1-C_4 烷基、取代的 C_1-C_4 烷基、C_3-C_7 环烷基、未取代的苯基、在对位上取代的苯基、或杂芳基、例如吡啶基环的那些。

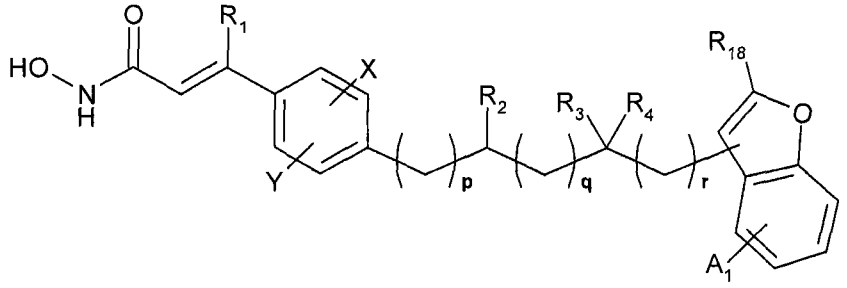
另一组有用的式(Ie)化合物为其中 R_2 为 H 或-$(CH_2)_pCH_2OH$，其中 p 为 1-3 的那些，特别是其中 R_1 为 H 的那些；如其中 R_1 为 H 且 X 和 Y 各自为 H，且其中 q 为 1-3 且 r 为 0 或其中 q 为 0 且 r 为 1-3 的那些。在这些化合物中 R_2 优选为 H 或-CH_2-CH_2-OH 且 q 和 r 之和优选为 1。在这些化合物中 p 优选为 1 且 R_3 和 R_4 优选为 H。

另一组有用的式(Ie)化合物为其中 R_{18} 为 H、甲基、乙基、叔丁基、三氟甲基、环己基、苯基、4-甲氧基苯基、4-三氟甲基苯基、2-呋喃基、2-噻吩基或 2-、3-或 4-吡啶基，其中 2-呋喃基、2-噻吩基、2-、3-或 4-吡啶基取代基为未取代的或如以上对于杂芳基环所描述的那样被取代；R_2 为 H 或-$(CH_2)_pCH_2OH$，其中 p 为 1-3；特别是其中 R_1 为 H 且 X 和 Y 各自为 H，且其中 q 为 1-3 且 r 为 0 或其中 q 为 0 且 r 为 1-3 的那些。在这些化合物中，R_2 优选为 H 或-CH_2-CH_2-OH 且 q 和 r 之和优选为 1。

其中 R_{20} 为 H 或 C_1-C_6 烷基、特别是 H 的式(Ie)化合物是以上描述的式(Ie)化合物的每个亚类的重要成员。

N-羟基-3-[4-[[(2-羟基乙基)[2-(1H-吲哚-3-基)乙基]-氨基]甲基]苯基]-2E-2-丙烯酰胺、N-羟基-3-[4-[[[2-(1H-吲哚-3-基)乙基]-氨基]甲基]苯基]-2E-2-丙烯酰胺和 N-羟基-3-[4-[[[2-(2-甲基-1H-吲哚-3-基)-乙基]-氨基]甲基]苯基]-2E-2-丙烯酰胺或其药学可接受盐是式(Ie)的重要化合物。

本发明进一步涉及式(If)的化合物:



(If)

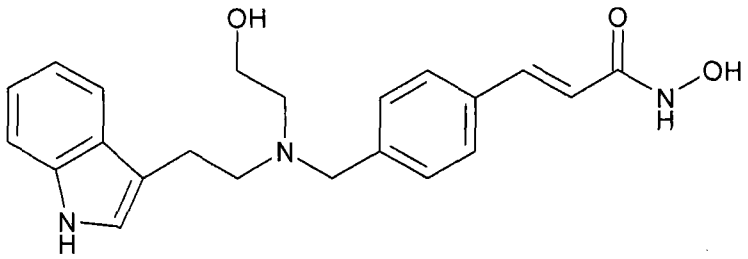
或其药学可接受盐。可变取代基如上所定义。

有用的式(If)化合物包括其中 R_2 为 H 或-$(CH_2)_pCH_2OH$，其中 p 为 1-3 的那些，特别是其中 R_1 为 H 的那些；如其中 R_1 为 H 且 X 和 Y 各自为 H，且其中 q 为 1-3 且 r 为 0 或其中 q 为 0 且 r 为 1-3 的那些。在这些化合物中 R_2 优选为 H 或-CH_2-CH_2-OH 且 q 和 r 之和优选为 1。

N-羟基-3-[4-[[[2-(苯并呋喃-3-基)-乙基]-氨基]甲基]苯基]-2E-2-丙烯酰胺或其药学可接受盐是重要的式(If)化合物。

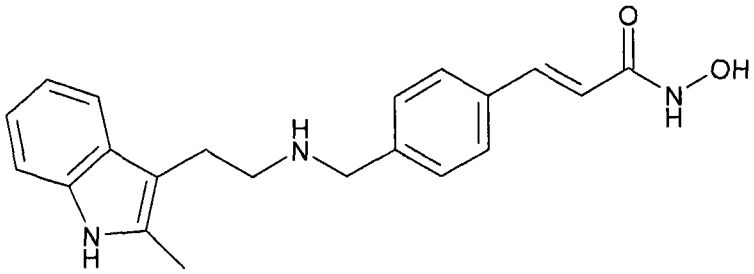
以上描述的化合物常常以药学可接受盐形式应用。药学可接受盐酌情包括药学可接受碱加成盐和酸加成盐，例如金属盐，如碱和碱土金属盐、铵盐、有机胺加成盐和氨基酸加成盐和磺酸盐。酸加成盐包括无机酸加成盐，如盐酸盐、硫酸盐和磷酸盐；以及有机酸加成盐，如烷基磺酸盐、芳基磺酸盐、醋酸盐、马来酸盐、延胡索酸盐、酒石酸盐、柠檬酸盐和乳酸盐。金属盐的实例为碱金属盐，如锂盐、钠盐和钾盐；碱土金属盐，如镁盐和钙盐、铝盐和锌盐。铵盐的实例为铵盐和四甲基铵盐。有机胺加成盐的实例为与吗啉和哌啶形成的盐。氨基酸加成盐的实例为与甘氨酸、苯丙氨酸、谷氨酸和赖氨酸形成的盐。磺酸盐包括甲磺酸盐、甲苯磺酸盐和苯磺酸盐。

其他式(I)范围内的 HDAI 化合物和它们的合成在 WO 02/22577 中公开。在 WO02/22577 范围内的两个优选化合物是



(II)

N-羟基-3-[4-[(2-羟基乙基){2-(1*H*-吲哚-3-基)乙基}-氨基]甲基]苯基]-2*E*-2-丙烯酰胺，或其药学可接受盐：和



(III)

N-羟基-3-[4-[[[(2-(2-甲基-1*H*-吲哚-3-基)-乙基)-氨基]甲基]苯基]-2*E*-2-丙烯酰胺，或其药学可接受盐。

用于本发明的 HDAC 抑制剂在上述测定法中显示优选 50 至 2500nM、更优选 250 至 2000nM、最优选 500 至 1250nM 的 IC_{50} 值。

本文所用的术语“治疗”包含治疗具有黑素瘤或处于所述癌症前期的患者，实现在所述患者中的疾病进展延迟。

本发明涉及治疗具有黑素瘤的温血动物的方法，包括对需要该治疗的所述动物以对黑素瘤治疗有效的量施用 *N*-羟基-3-[4-[[[2-(2-甲基-1*H*-吲哚-3-基)-乙基]-氨基]甲基]苯基]-2*E*-2-丙烯酰胺或其药学可接受盐。

本发明涉及对患有黑素瘤的人类对象施用 *N*-羟基-3-[4-[[[2-(2-甲基-1*H*-吲哚-3-基)-乙基]-氨基]甲基]苯基]-2*E*-2-丙烯酰胺的酸加成盐，优选乳酸加成盐。

相关领域的技术人员完全能够选择相关的试验模型以证明本文所述对黑素瘤的有益效果。这类化合物的药理学活性可例如借助以下所述实施例、通过体外试验和体内试验或在适合的临床研究中证明。适合的临床研究是例如黑素瘤患者的开放、非随机、剂量渐进研究。治疗的功效在这些

研究中例如通过每四周评价肿瘤大小与安慰剂所获得的对照来确定。

HDAC 抑制剂的有效剂量可能随着所使用的具体化合物或药物组合物、施用方式、所治疗的黑素瘤类型或其严重性而变化。剂量方案根据多种其他因素选择，包括患者的肾和肝功能。普通技能的内科医生、临床医生或兽医可容易地确定并处方预防、逆转或阻滞病症进展所需的化合物的有效量。

实施例 1：对黑素瘤细胞系的单层细胞生长抑制测定法

MTT 是一种测定细胞增殖速率的比色测定法。黄色的四唑鎓 MTT (3-(4,5-二甲基噻唑基-2)-2,5-二苯基溴化四唑鎓)被代谢活性细胞还原，部分通过脱氢酶的作用，生成还原性等价物如 NADH 和 NADPH。所得细胞内紫色甲臜可溶解并通过分光光度法定量。所产生的信号与细胞数目成正比。MTT 测定法详细而言，使用六点和九点药物滴定、在多孔组织培养皿中进行试验，保持外侧排空置。将细胞以 10^3 至 10^4 细胞/mL 的密度悬浮于完全培养基中，并加至每孔。然后加入适当的培养基(200μL)。24 小时后，向一块板加入 10μL MTS 溶液，测定化合物加入时(T_0)的活性。将该板在 37°C 孵育 4 小时，在 Molecular Devices Thermomax 上于 490nm 使用 Softmax 程序测量光密度。T_0 板用作试验开始时初始活性的参考值。

接种后 24 小时开始加入化合物，与 T_0 测定同时。在 96-深孔板中制备先前测定的每种化合物 IC_{50} 值的 4-倍、2-倍、1-倍、0.5-倍、0.25-倍和 0.125-倍的系列稀释液，在板的边缘为最高浓度。六份稀释液的每一份以一式三份加入，将完全培养基加至不含细胞的空置的外侧排。将化合物单独或与 *N*-羟基-3-[4-[[[2-(2-甲基-1*H*-吲哚-3-基)-乙基]-氨基]甲基]苯基]-2*E*-2-丙烯酰胺(LBH589)组合加至各板。自接种起将各板在 37°C 孵育 72 小时。加入 MTS 溶液(如同对于 T_0 板)，4 小时后读数。为分析数据，从各个试验孔减去单独介质的平均值(背景)，将每一化合物稀释液的一式三份的数值平均。以下公式用于计算生长百分比：

$$\text{如果 } X > T_0，\ \%\text{生长} = 100 \times ((X-T_0)/(GC-T_0))$$

$$\text{如果 } X < T_0，\ \%\text{生长} = 100 \times (X-T_0)/T_0)$$

$T_0 = T_0$ 平均值 - 背景

GC = 未处理细胞的平均值(一式三份) - 背景

X = 处理细胞的平均值(一式三份) - 背景

确定了抑制细胞生长 50％所需的 LBH589 浓度即 IC_{50} 和减少细胞数量(杀灭细胞)至最初接种的 50％所需的浓度即 LD_{50}。将“%生长”对化合物浓度作图，用于计算 IC_{50} 和 LD_{50}，使用 Microsoft Excel 中用户定义的样条功能。所附的表显示 LBH589 在一组黑素瘤细胞系中的抗增殖和细胞毒性作用。

黑素瘤细胞系	IC_{50} [nM] 胞生长抑制的量度	LD_{50} (nM) 细胞杀灭的量度
A375	32.66	77.83
A2058	17.81	58.96
SK-MEL-28	43.1	129.33
WM-266-4	26.36	73.05
RPMI-7951	27.6	71.63
SK-MEL-5	6.15	54.95
MeWo	34.5	157.64
G-361	8.09	51.44

将一组黑素瘤细胞系用 DMSO 媒介对照或不同浓度的 LBH589 处理 3 天。在细胞铺板当天以及处理后第 3 天测量细胞增殖。如上所述计算 IC_{50} 和 LD_{50} 值。LBH589 对所有 8 种所检测的黑素瘤细胞系均显示强抗增殖作用，如低纳摩尔浓度的 IC_{50} 值所证明。LBH589 在所测试的细胞系中还显示强细胞毒性作用，LD_{50} <160nM。