



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103974934 B

(45)授权公告日 2019.07.23

(21)申请号 201280059788.2

(72)发明人 林合宁 何彬

(22)申请日 2012.10.05

(74)专利代理机构 北京市万慧达律师事务所

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 103974934 A

11111

代理人 戈晓美 杨颖

(43)申请公布日 2014.08.06

(51)Int.Cl.

(30)优先权数据

C07C 327/42(2006.01)

61/544,452 2011.10.07 US

A61K 31/16(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2014.06.05

A61P 25/28(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2012/058846 2012.10.05

(56)对比文件

US 2007/0021434 A1,2007.01.25,

US 2008/0171783 A1,2008.07.17,

(87)PCT国际申请的公布数据
W02013/052727 EN 2013.04.11

CN 1898227 A,2007.01.17,

(73)专利权人 康奈尔大学
地址 美国纽约州

审查员 刘红彦

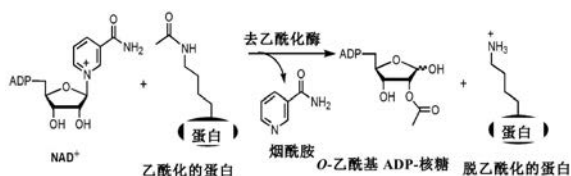
权利要求书1页 说明书19页 附图4页

(54)发明名称

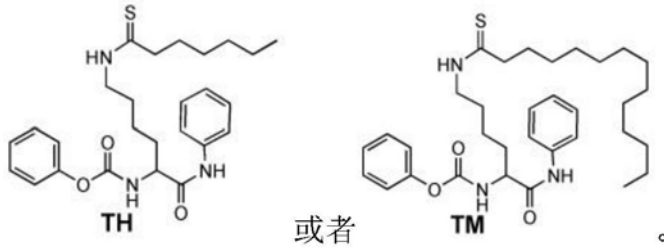
使用SIRT2调节剂的治疗方法

(57)摘要

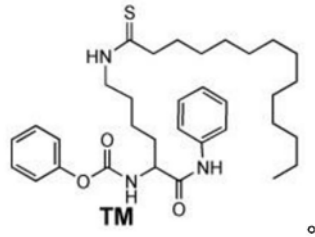
本申请描述了一种调节(特别地,抑制) Sirt2的新化合物,其具有根据本申请所述的式(1)和(2)的结构。本发明还涉及其药物组合物、通过给予调节化合物的治疗(即癌症和神经退行性疾病)方法、用于寻找Sirt2调节剂的检测方法以及用于实施所述检测方法的试剂盒。



1. 一种调节Sirt2活性的化合物,其具有下述化学结构:



2. 根据权利要求1所述的化合物,其中所述化合物具有下述化学结构:



3. 根据权利要求1或2所述的化合物在制备用于治疗患有神经退行性疾病的对象的药物中的用途。

4. 根据权利要求3所述的用途,其中所述神经退行性疾病选自帕金森氏病、亨廷顿氏病和阿尔茨海默氏症。

5. 根据权利要求3所述的用途,其中所述神经退行性疾病是帕金森氏病。

6. 根据权利要求3所述的用途,其中所述化合物是Sirt2抑制剂。

7. 根据权利要求6所述的用途,其中所述化合物是Sirt2选择性抑制剂。

8. 根据权利要求1或2所述的化合物在制备用于治疗患有癌症的对象的药物中的用途。

9. 根据权利要求8所述的用途,其中所述化合物是Sirt2抑制剂。

10. 根据权利要求9所述的用途,其中所述化合物是Sirt2选择性抑制剂。

11. 根据权利要求8所述的用途,其中所述癌症是乳腺癌。

12. 根据权利要求11所述的用途,其中所述乳腺癌是三阴性乳腺癌。

使用SIRT2调节剂的治疗方法

[0001] 交叉引用美国相关专利申请

[0002] 本申请要求2011年10月7日递交的美国临时专利申请号61/544,452的优先权,其整体内容通过引用并入本文。

[0003] 关于美国联邦资助研究或开发的说明

[0004] 本发明在合同号为GM086703的美国国立卫生研究院基金的政府支持下完成。美国政府对本发明拥有一定权利。

[0005] 发明背景

[0006] 去乙酰化酶(Sirtuin)是一类被称为烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)依赖性脱乙酰基酶的酶。人类有七种去乙酰化酶,Sirt1-7,其调控多种生物学过程,包括衰老、转录和代谢。因此,能够调节去乙酰化酶活性的小分子可以用于治疗若干人类疾病。

[0007] 若干蛋白(如用于乳腺癌治疗的表皮生长因子受体2或HER2,用于慢性髓性白血病治疗的BCR-ABL)已经被用作治疗人类癌症的药理学靶点。然而,由于癌症的异质性和耐药性的发生,因而持续需要鉴定治疗癌症的新蛋白靶点和新药理学试剂。

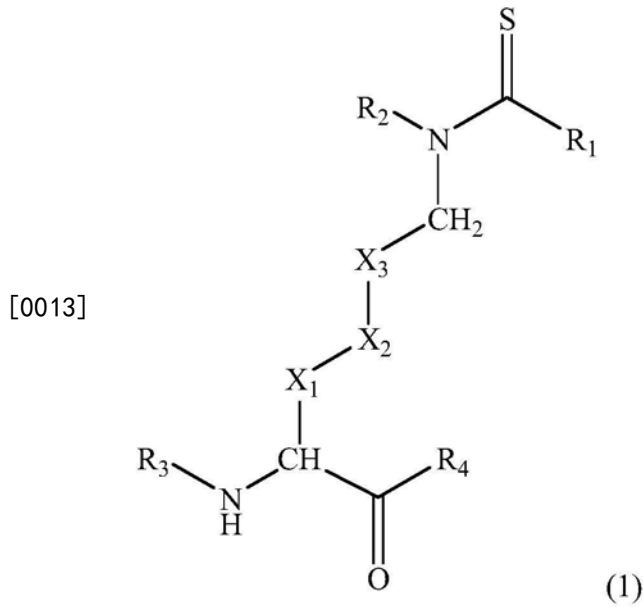
[0008] Sirt2是人类NAD⁺-依赖性脱乙酰基酶(或sirtuin)Sirt2家族的七种成员之一。去乙酰化酶催化NAD-依赖性蛋白赖氨酸脱乙酰基化过程的一般示意图见图1。去乙酰化酶在进化过程中是保守的并且参与多种生物学功能,可能其中最重要的是调节寿命(例如Haigis,M.C.等,Annu.Rev.Pathol.5,253-295,2010;和Imai,S.-i.等,Trends in Pharmacological Sciences31,212-220,2010)。在7种哺乳动物的去乙酰化酶中,Sirt2是仅在胞质中的一个(例如Michishita,E.等,Mol.Biol.Cell16,4623-4635,2005)。在细胞研究中已鉴定和确证了两个胞质Sirt2底物,即, α -微管蛋白和磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(PEPCK)(例如North,B.J.等,Mol.Cell11,437-444,2003;Jiang,W.等,Mol.Cell143,33-44,2011)。Sirt2通过将 α -微管蛋白Lys40脱乙酰基化使微管不稳定。通过将PEPCK脱乙酰基化和调节PEPCK的稳定性,Sirt2还调节糖异生作用。

[0009] 已对Sirt2小分子抑制剂的抗癌作用进行了描述,例如Heltweg,B.等,Cancer Res.66,4368-4377,2006;Zhang,Y.等,Biochem.Biophys.Res.Commun.386,729-733,2009。然而,已知的抑制剂针对Sirt2通常具有较高的最佳IC₅₀,并且还缺乏针对Sirt2的特异性。而且,实现这种针对Sirt2的特异性能够为特定类型癌症的治疗提供重要益处,如乳腺癌,并且更特别地为三阴性乳腺癌。还发现Sirt2参与了神经退行性疾病(例如Luthi-Carter,R.等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,107(17):7927-32,Apr.27,2010,和de Oliveira,R.M.等,Front Pharmacol.,3:82,2012)。因此,这种针对Sirt2的抑制剂还提供了对神经退行性疾病改进的治疗。

[0010] 发明概述

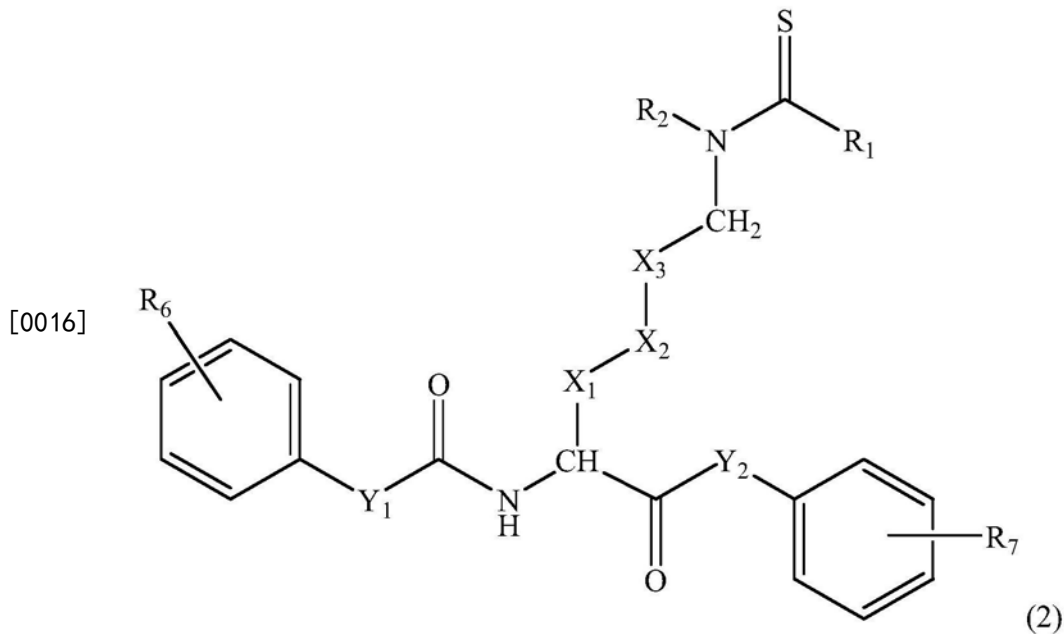
[0011] 在本申请中,描述了一种对人Sirt2蛋白具有改善的甚至是选择性活性的新型调节剂。这些调节剂用于治疗例如癌症如乳腺癌和神经退行性疾病。

[0012] 在特定实施方式中,本申请中的调节剂具有下述化学结构:



[0014] 在式(1)中, R_1 是具有通过碳碳键连接的至少五个碳原子的烃基,其中所述烃基任选地包括一个选自 $-O-$ 、 $-NR_5-$ 和 $-S-$ 的杂原子基团,其插入所述烃基的碳碳键,并且在所述烃基中的一个或多个氢原子任选地被氟原子取代,其中 R_5 是氢原子或烃基。 R_2 基团选自氢原子或烃基。 R_3 和 R_4 基团独立地选自氢原子和烃基R,其中烃基R任选地被一个或多个杂原子取代。连接部分 X_1 、 X_2 和 X_3 独立地选自 $-(CH_2)_n-$ 、 $-NR_5-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 或键,其中 n 表示1、2或3,并且 X_1 、 X_2 和 X_3 中的至少一个是 $-CH_2-$ 基团。

[0015] 在式(1)的特定实施方式中,本申请中的调节剂具有下述化学结构:



[0017] 在式(2)中,基团 R_1 、 R_2 、 X_1 、 X_2 和 X_3 如上文中的式(1)所述。基团 R_6 和 R_7 独立地选自氢原子、具有至多六个碳原子的未经取代的烃基、烷氧基 $-OR$ 、酰胺基 $-NR' C(O)R$ 或 $-C(O)NR' R$ 、酮基 $-C(O)R$ 、酯基 $-C(O)OR$ 或 $-OC(O)R$ 、氨基甲酸酯基 $-OC(O)NR' R$ 或 $-NR' C(O)OR$ 和脲基 $-NR' C(O)NR$,其中 R 是具有至多六个碳原子的烃基,且 R' 是氢原子或具有至多六个碳原子的烃基。连接部分 Y_1 和 Y_2 独立地选自 $-O-$ 、 $-NR_5-$ 和 $-S-$ 基团。

[0018] 本发明还涉及一种用于治疗患有可以通过调节Sirt2活性治疗的疾病的对象的方法。在这个方法中,给予患有这种疾病特别是癌症(例如乳腺癌)或神经退行性疾病(如帕金森氏病、亨廷顿氏病或阿尔茨海默氏症)的对象用于治疗这种疾病的药有效量的上文所述的调节化合物。本发明还涉及一种鉴定Sirt2调节化合物的检测方法以及实施所述检测方法的试剂盒。

[0019] 附图简述

[0020] 图1:显示去乙酰化酶催化NAD依赖性蛋白赖氨酸脱乙酰基化过程的一般示意图。

[0021] 图2:上图:显示硫代乙酰基赖氨酸化合物抑制去乙酰化酶的机制的一般示意图。下图:本申请发现的一些示例性Sirt2抑制剂的结构(TA、TB、TH和TM)。制备并检测了所显示的四个化合物针对Sirt2的活性。

[0022] 图3A,3B:图中显示了四个示例性Sirt2抑制化合物(TA、TB、TH和TM)的抑制能力,使用DMSO作为对照,图3(A)。(B)图中显示了TH和TM(25 μ M)对MCF7癌细胞系和MCF10a正常细胞系的抑制能力,图3(B)。

[0023] 图4A,4B:软琼脂检测的显微照片,其表明Sirt2特异性抑制剂TM能够抑制TNBC细胞系MDA-MB-231的锚定非依赖生长。

[0024] 图5A-5C:软琼脂检测的显微照片,其表明Sirt2KD而非Sirt1KD能够有效抑制MCF7细胞的集落形成。

[0025] 发明详述

[0026] 为方便起见,在对本发明进一步描述之前,先描述一下在本文说明书、实施例和所附的权利要求中使用的一些术语。应根据整个公开的内容和本领域技术人员的理解解读这些定义。

[0027] 本文所使用的术语“一”和“一个”指文章中一个或一个以上(即,至少一个)的语法对象。举例来说,除非另有明示,否则“一个元素”可以指一个或多个元素。

[0028] 术语“氨基酸”旨在包括所有分子,无论是天然的还是合成的,其包括一个氨基官能团和一个酸性官能团,并且能够包括在天然存在的氨基酸聚合物中。示例性的氨基酸包括天然存在的氨基酸;其类似物、衍生物和同源物;具有变体侧链的氨基酸类似物;和前述任意一项的所有立体异构体。在某些实施方式中,术语“氨基酸”仅指二十个已知的必需氨基酸,或其亚类,即甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、缬氨酸(V)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、半胱氨酸(C)、甲硫氨酸(M)、苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)、色氨酸(W)、脯氨酸(P)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q)、天冬氨酸(D)、谷氨酸(E)、组氨酸(H)、赖氨酸(K)和精氨酸(R)。在某些实施方式中,前述分类中的任意一种或多种或者特定类型的氨基酸被排除。

[0029] 术语“多肽”以及术语“蛋白”和“肽”,在本文中互换使用,指氨基酸的聚合物。示例性的多肽包括基因产物、天然存在的蛋白、同系物、直系同源物、旁系同源物、片段,以及前述的其他等价物、变体和类似物。其可以包括上文所述任意氨基酸残基中的一种或多种,或其修饰形式,并且一般包括至少10、20、30、40或50个和至多80、100、120、150、200、300、400、500或1,000个氨基酸残基。如本文所使用的,术语“寡肽”一般指具有至少4、5或6个和至多8、10、15或20个氨基酸残基的链。术语“二肽”和“三肽”分别指两个和三个连接的氨基酸残基。

[0030] 术语“高通量筛选”(HTS)指一种检测抑制特定酶活性或细胞过程的小分子抑制剂

的自动的、大规模的方法。HTS通常检测不同化合物的库以确定其活性。

[0031] 如本文所使用的,术语“调节剂”包括活化或抑制Sirt2脱酰基酶活性的任意物质。此外,“活化剂”指增加、增强或加快Sirt2脱酰基酶活性的物质,而“抑制剂”指降低、抑制或阻止Sirt2脱酰基酶活性的物质。

[0032] 如本文所使用的,术语“烃基”,即“烃基(R)”和“烃接头”在第一个实施方式中仅由碳和氢组成。在不同实施方式中,烃基或烃接头中的一个或多个可以精确地,或者最少或最多含有例如一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个、十二个、十三个、十四个、十五个、十六个、十七个、十八个、十九个、二十个、二十一个、二十二个或二十三个碳原子,或者以任意两个前述碳原子数作为边界的特定范围内的碳原子数。在本文所述的不同化合物中的烃基或烃接头,或者在化合物的不同位置中可以具有相同或不同数量(或其优选的范围)的碳原子数以独立地调整或优化所述化合物的活性或其他特性。

[0033] 烃基或烃接头可以是例如饱和的和直链的(即,直链烷基或烯基接头)。直链烷基(或烯基接头)的一些例子包括甲基(或亚甲基接头,即 $-\text{CH}_2-$,或次甲基接头)、乙基(或乙烯基或二亚甲基接头,即 $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 接头)、n-丙基、n-丁基、n-戊基、n-己基、n-庚基、n-辛基、n-壬基、n-癸基、n-十一烷基、n-十二烷基、n-十三烷基、n-十四烷基、n-十五烷基、n-十六烷基、n-十七烷基、n-十八烷基和n-二十烷基(或其各自的接头类似物)。

[0034] 或者,烃基或烃接头可以是饱和的和支链的(即,支链烷基或烯基接头)。支链烷基的一些例子包括异丙基、异丁基、仲丁基、叔丁基、异戊基、新戊基、2-甲基戊基、3-甲基戊基、以及许多 C_7 、 C_8 、 C_9 、 C_{10} 、 C_{11} 、 C_{12} 、 C_{13} 、 C_{14} 、 C_{15} 、 C_{16} 、 C_{17} 、 C_{18} 、 C_{19} 、 C_{20} 、 C_{21} 、 C_{22} 和 C_{23} 饱和的和支链的烃基。支链烯基接头的一些例子是通过从前述示例性支链烷基中的一个除去氢原子衍生得到的那些(例如,异丙烯, $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2-$)。

[0035] 或者,烃基或烃接头可以是饱和的和环状的(即,环烷基或环烯基接头)。环烷基的一些例子包括环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基和环辛基。环烷基还可以是在两个环基团(例如,二环己基)之间成键或共用(即,稠合)边(例如,萘烷和降莰烷)的多环(例如,双环)基团。环烯基接头的一些例子是通过从前述示例性环烷基中的一个除去氢原子衍生得到的那些。

[0036] 或者,烃基或烃接头可以是不饱和的和直链的(即,直链烯族或烯基或接头)。当存在一个或多个碳-碳双键和/或一个或多个碳-碳三键时产生不饱和。直链烯基的一些例子包括乙烯基、丙烯-1-基(烯丙基)、3-丁烯-1-基($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$)、2-丁烯-1-基($\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-$)、丁二烯、4-戊烯-1-基、3-戊烯-1-基、2-戊烯-1-基、2,4-戊二烯-1-基、5-己烯-1-基、4-己烯-1-基、3-己烯-1-基、3,5-己二烯-1-基、1,3,5-己三烯-1-基、6-庚烯-1-基、乙炔基、炔丙基(2-丙炔基)、以及许多 C_7 、 C_8 、 C_9 、 C_{10} 、 C_{11} 、 C_{12} 和以上的不饱和和直链烃基。直链烯基接头的一些例子是通过从前述示例性直链烯基中的一个除去氢原子衍生得到的那些(例如,次亚乙烯基、 $-\text{CH}=\text{CH}-$ 或亚乙烯基)。

[0037] 或者,烃基或烃接头可以是不饱和的和支链的(即,支链烯族或烯基或接头)。支链烯基的一些例子包括丙烯-2-基、3-丁烯-2-基($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}-\text{CH}_3$)、3-丁烯-3-基($\text{CH}_2=\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$)、4-戊烯-2-基、4-戊烯-3-基、3-戊烯-2-基、3-戊烯-3-基、2,4-戊二烯-3-基、以及许多 C_6 、 C_7 、 C_8 、 C_9 、 C_{10} 、 C_{11} 、 C_{12} 和以上的不饱和和支链烃基。支链烯基接头的一些例子是通过从前述示例性支链烯基中的一个除去氢原子衍生得到的那些。

[0038] 或者,烃基或连接物可以是不饱和的和环状的(即,环烯基或环亚烯基接头)。不饱和的和环状的基团可以是芳香族的或脂肪族的。不饱和的和环状的烃基的一些例子包括环丙烯基、环丁烯基、环戊烯基、环戊二烯基、环己烯基、环己二烯基、苯基、苜基、环庚烯基、环庚二烯基、环辛烯基、环辛二烯基和环辛四烯基。不饱和环烃基还可以是多环基团(如双环或三环多环芳基),通过在两个环基团(例如,联苯基)之间成键或共用(即,稠合)边形成,如萘、蒽、菲、菲烯或茚。环烯基接头的一些例子是通过从前述示例性环烯基中的一个除去氢原子衍生得到的那些(例如,亚苯基和亚联苯基)。

[0039] 烃基或烃接头中的一个或多个还可以包括一个或多个杂原子(即,非碳和非氢原子),如一个或多个选自氧(O)、氮(N)、硫(S)、磷(P)和卤原子的杂原子,以及含有一个或多个这些杂原子的基团(即,含有杂原子的基团)。含氧基团的一些例子包括羟基(OH)、含羰基基团(例如,羧酸、酮、醛、羧酸酯、酰胺和脲官能团)、硝基(NO_2)、碳-氧-碳(醚)、磺酰基和亚磺酰基(即,亚砷)和氧化胺基团。醚基还可以是聚烯化氧醚基,如聚环氧乙烷基。含氮基团的一些例子包括伯胺、仲胺、叔胺、季胺、氰(即,腈)、酰胺(即, $-\text{C}(\text{O})\text{NR}_2$ 或 $-\text{NRC}(\text{O})$,其中R独立地选自氢原子和烃基,如上文所述)、硝基、脲、亚胺基和氨基甲酸酯,其中应理解,季胺基团一定带有正电并需要抗衡离子。含硫基团的一些例子包括巯基(即, $-\text{SH}$)、硫醚(即,硫化物)、二硫化物、亚砷、砷、磺酸酯和硫酸酯基团。含磷基团的一些例子包括有机磷酸酯、有机亚磷酸酯和有机膦酸酯基团。本文中考虑的卤原子的一些例子包括氟、氯和溴。上文所述杂原子(例如,氧、氮和/或硫原子)中的一个或多个可以在上文所述的任意烃基中打断碳原子(例如, $-\text{O}-$ 、 $-\text{NR}-$ 或 $-\text{S}-$)或者取代碳原子(或亚甲基)以形成杂原子取代的烃基或接头。或者,或此外,一个或多个含杂原子的基团可以取代烃基或接头上一个或多个氢原子。

[0040] 在特定实施方式中,烃基为或包括环或多环基团,其包括至少一个环杂原子(例如,一个、两个、三个、四个或更多个杂原子)。此类环杂原子取代的环基团在本文中称为“杂环基团”。如本文所使用的,“环杂原子”是碳和氢以外的原子(典型地,选自氮、氧和硫),其在烃环结构中打断或取代环碳原子。在某些实施方式中,杂环基团是饱和的,而在其他实施方式中,杂环基团是不饱和的(即,脂肪族或芳香族杂环基团,其中所述芳香族杂环基团在本文中也称为“杂芳环”,或者当至少有两个稠合环,其中至少一个中含有至少一个环杂原子时称为“杂芳稠合环系”)。在某些实施方式中,杂环基团通过其环碳原子中的一个与另一个基团连接(即,不是氢原子和相邻的环原子),而一个或多个环杂原子不与另一个基团连接。在其他实施方式中,杂环基团通过其杂原子中的一个与另一个基团连接,而环碳原子可以或者可以不与另一个基团连接。

[0041] 饱和杂环基团的一些例子包括含有至少一个氧原子的那些基团(例如,氧杂环丁烷、四氢呋喃、四氢吡喃、1,4-二恶烷、1,3-二恶烷和1,3-二氧杂环庚烷环),至少含有一个氮原子的那些基团(例如,吡咯烷、哌啶、哌嗪、咪唑啉、氮杂环庚烷和十氢喹啉环),至少含有一个硫原子的那些基团(例如,四氢噻吩、四氢噻喃、1,4-二噻烷、1,3-二噻烷和1,3-二硫戊环),含有至少一个氧原子和至少一个氮原子的那些基团(例如,吗啉和恶唑烷环),含有至少一个氧原子和至少一个硫原子的那些基团(例如,1,4-噻恶烷)、以及含有至少一个氮原子和至少一个硫原子的那些基团(例如,噻唑烷和硫吗啉环)。

[0042] 不饱和杂环基团的一些例子包括含有至少一个氧原子的那些基团(例如,呋喃、吡喃、1,4-二恶英和二苯并二恶英环),含有至少一个氮原子的那些基团(例如,吡咯、咪唑、吡

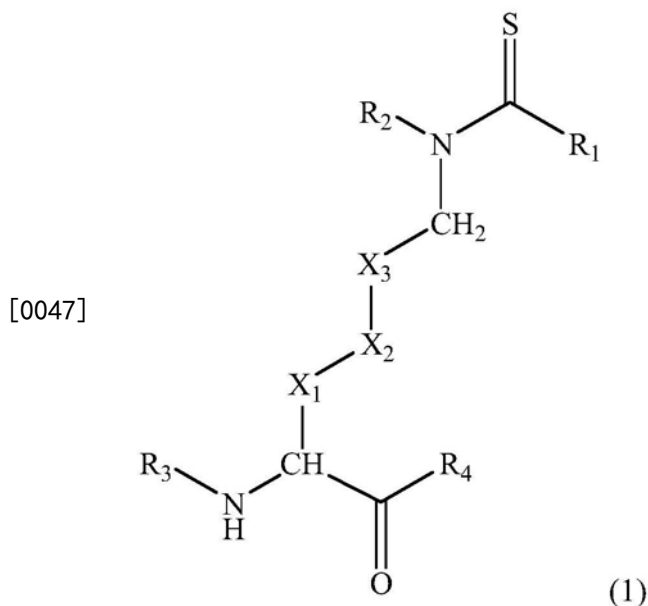
唑、吡啶、吡嗪、嘧啶、1,3,5-三嗪、吡啶、二吡啶、吡啶、嘧啶、苯并咪唑、吡啶、2,2'-联吡啶、喹啉、异喹啉、菲咯啉、1,4,5,6-四氢嘧啶、1,2,3,6-四氢吡啶、1,2,3,4-四氢喹啉、喹啉、喹唑啉、哒嗪、噌啉、5,6,7,8-四氢喹啉、1,8-二氮杂萘和4-氮杂苯并咪唑环),含有至少一个硫原子的那些基团(例如,噻吩、硫茛和苯并噻吩环),含有至少一个氧原子和至少一个氮原子的那些基团(例如,恶唑、异恶唑、苯恶唑、苯异恶唑、恶唑啉、1,2,5-恶二唑(咪唑)和1,3,4-恶二唑环),以及含有至少一个氮原子和至少一个硫原子的那些基团(例如,噻唑、异噻唑、苯并噻唑、苯并异噻唑、噻唑啉和1,3,4-噻二唑环)。

[0043] 在某些实施方式中,下文所述的任意通用取代基(例如,R、R₁、R₂等)可以独立地排除任意一种或多种类型、亚类或上文所述的特定烃基、或者可以独立地仅包括选自上文所述的烃基(R)的特定烃基。

[0044] 本文所使用的术语“酰基”指通式为-C(X)R的有机基团,其中X为氧(=O)、硫(=S)或氨基(=NR),并且R独立地代表烃基。在本发明中,与C(X)连接的烃基R具有至少三个通过碳-碳键连接的碳原子。在不同实施方式中,与C(X)连接的烃基R具有精确地或至少三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个、十二个、十三个、十四个、十五个、十六个、十七个、十八个、十九个或二十个碳原子,或者以任意两个前述碳原子数作为边界范围的碳原子数(例如,碳原子数的范围为3-20、3-18、3-16、3-14、3-12、3-10、3-8、4-20、4-18、4-16、4-14、4-12、4-10、4-8、5-20、5-18、5-16、5-14、5-12、5-10、5-8、6-20、6-18、6-16、6-14、6-12、6-10、6-8、7-20、7-18、7-16、7-14、7-12、7-10、8-20、8-18、8-16、8-14、8-12、9-20、9-18、9-16、9-14、9-12、10-20、10-18、10-16、10-14、10-12、11-20、11-18、11-16、11-14、12-20、12-18、12-16、12-14、13-20、13-18、13-16、14-20、14-18或14-16个碳原子)。

[0045] 在一组实施方式中,与C(X)连接的烃基R仅由碳原子和氢原子组成。在另一组实施方式中,与C(X)连接的烃基R由碳原子和氢原子组成,其中一个或多个氢原子可以被一个或多个氟(F)原子所取代。在另一组实施方式中,与C(X)连接的烃基R由碳原子和氢原子、以及任选地一个或多个氟原子,和选自O、N和S的一个杂原子组成,所述杂原子打断所述烃基(R)的碳-碳键或者取代所述烃基(R)中的碳原子(即,亚甲基或次甲基),除了所述杂原子不包括OH、SH或NH₂基团,或者任意带电基团如醇盐、硫化物、羧酸盐或铵基团之外,因为这些类型的基团会使酰基部分具有强亲水性(即,不具有足够的疏水性)。在某些实施方式中,与C(X)连接的烃基R选自一个或多个直链或者支链烷基、烯基或炔基,其可以包括或不包括一个或多个杂原子;环烷基;芳环;杂环烷基;杂芳基;或包括任意一个或多个前述取代基的烃基,如烷基-芳基、烷基-杂环基、或烷基-杂芳基。当杂原子取代碳原子时,与C(X)中的碳连接的杂原子包括多种可能,即为C(X)-O-R、C(X)-S-R、C(X)-NH-R或C(X)-NR-R,其中R基团各实例均是独立地选择。

[0046] 在特定实施方式中,本申请中的调节剂具有下述化学结构:



[0048] 在式(1)中, R_1 是精确地或者至少具有五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个、十二个、十三个、十四个、十五个、十六个、十七个、十八个、十九个、二十个、二十一个、二十二个或二十三个通过碳碳键连接的碳原子的烃基, 其中所述烃基任选地包括选自-0-、- NR_5 -和-S-的一个杂原子基团, 其插入所述烃基的碳碳键, 并且在所述烃基中的一个或多个氢原子任选地被氟原子取代。在一些实施方式中, R_1 具有通过碳碳键连接的至少五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个、十二个、十三个、十四个、十五个或十六个碳原子, 除了一个或多个氢原子可以任选地被氟原子取代以外其不具有杂原子取代。基团 R_5 通常是氢原子或烃基, 通常具有至多一个、两个、三个、四个、五个或六个碳原子。基团 R_2 也选自氢原子或烃基, 通常具有至多一个、两个、三个、四个、五个或六个碳原子。基团 R_3 和 R_4 独立地选自氢原子和烃基 R , 其中所述烃基 R 任选地被一个或多个杂原子取代。连接部分 X_1 、 X_2 和 X_3 独立地选自 $-(CH_2)_n-$ 、 $-NR_5-$ 、-0-、-S-或键, 其中 n 表示1、2或3, 并且至少一个 X_1 、 X_2 和 X_3 是 $-CH_2$ 基团。在一些实施方式中, 所有 X_1 、 X_2 和 X_3 均是 $-(CH_2)_n-$ 或 CH_2 基团。

[0049] 基团 R_3 和 R_4 独立地是氢原子或上文所述的任意取代的或未取代的烃基 R , 或其选择, 或者其中 R_4 可以是OH、 NH_2 或SH。在一些实施方式中, R_3 和 R_4 之一或二者是非生物的(即合成的)基团, 其含有至少1、2、3、4或5个以及至多10、15、20、25、30、40或50个非氢原子。在其他实施方式中, R_3 和 R_4 之一或二者包括至少一个生物相关基团, 如氨基酸、二肽、三肽、寡肽、多肽(例如, 蛋白, 包括酶、抗体或受体)、核碱基、核苷、核苷酸、二核苷酸、寡核苷酸、多核苷酸、单糖、二糖、低聚糖、多糖、生物素、亲和素、链霉亲和素或配体, 其中任意一个均可以是小分子, 或者含有数百个非氢原子的大分子。在又一个实施方式中, R_3 和 R_4 之一或二者是或者包括至少一个单环不饱和(或芳香)环, 其可以是碳单环不饱和环(例如苯、环己烯或环戊二烯环)或者杂单环不饱和环(例如o-、m-或p-吡啶、吡嗪或嘧啶环)。在一些实施方式中, 当将该调节化合物给予对象时, R_3 和 R_4 之一或二者均参与调节Sirt2, 或提供重要功能, 例如 R_3 和/或 R_4 可以使调节剂具有更高的生物利用度、使其功能更有效地靶向于Sirt2或具有辅助药物部分的功能。

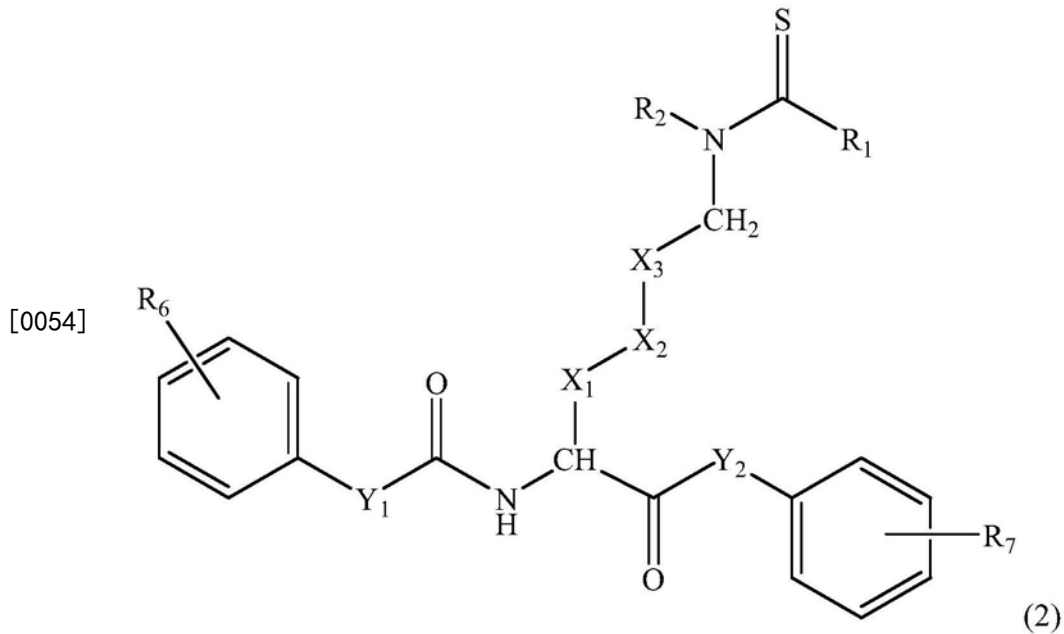
[0050] 在式(1)的其他实施方式中, R_4 可以是氨基基团 $-NRR'$, 其中 R 通常是具有至多一个、两个、三个、四个、五个或六个碳原子的烃基, 并且 R' 通常是氢原子或具有至多一个、两

个、三个、四个、五个或六个碳原子的烃基,其中所述烃基可以是或可以不是被一个或多个杂原子或杂原子基团取代,如-OH、-OR、-NHR、-NRR'。R₄这种基团的一些特定的例子包括-NH₂、-NH(CH₃)、-N(CH₃)₂、-NH(CH₂CH₃)、-NH(CH₂CH₂OH)、-NH(CH₂CH₂OCH₃)、-NH(CH₂CH₂NH₂)、-NH(CH₂CH₂NH(CH₃)和-NH(CH₂CH₂N(CH₃)₂)。

[0051] 在式(1)的不同实施方式中,R₁是烃基,或者更具体地,是直链或直链烷基,其具有精确地或至少五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个、十二个、十三个、十四个、十五个、十六个、十七个、十八个、十九个或二十个碳原子,或者以任意两个前述碳原子数作为边界的范围内的碳原子数(例如在5-20、5-18、5-16、5-14、5-12、5-10、5-8、6-20、6-18、6-16、6-14、6-12、6-10、6-8、7-20、7-18、7-16、7-14、7-12、7-10、8-20、8-18、8-16、8-14、8-12、9-20、9-18、9-16、9-14、9-12、10-20、10-18、10-16、10-14、10-12、11-20、11-18、11-16、11-14、12-20、12-18、12-16、12-14、13-20、13-18、13-16、14-20、14-18或14-16个碳原子范围内的碳原子数)。

[0052] 在式(1)的一组实施方式中,所述烃基R₁仅由碳和氢原子组成。在另一组实施方式中,所述烃基R₁由碳和氢原子组成,其中一个或多个氢原子可以被一个或多个氟(F)原子取代。在另一组实施方式中,所述烃基R₁由碳和氢原子、以及任选地一个或多个氟原子和选自O、N和S的一个杂原子组成,其插入烃基R₁的碳碳键或取代烃基R₁的碳原子(即亚甲基或次甲基),除了所述杂原子不包括OH、SH或NH₂基团,或者任意带电基团如醇盐、硫化物、羧酸盐或铵基团之外,因为这些类型的基团会使酰基部分具有强亲水性(即不具有足够的疏水性)。其结果可以是例如R₁中的醚(R-O-R)、硫醚(R-S-R)、仲胺(R-NH-R)或叔胺(R-NR-R),其中在各种情况下独立地选择R基团。在一些实施方式中,所述烃基R₁选自或包括一种或多种:直链或支链烷基、烯基或炔基,其可以包括或不包括一个或多个杂原子;环烷基;芳环;杂环烷基;杂芳基;或者包括任意一个或多个前述取代类型的烃基,如烷基-芳基、烷基-杂环基或烷基-杂芳基。当杂原子取代碳原子时,其可能性包括所述杂原子与C(=S)中的碳连接,即作为C(=S)-O-R₁、C(=S)-S-R₁、C(=S)-NH-R₁或C(=S)-NR-R₁。在一些实施方式中,一种或多种前述可能性被排除。

[0053] 在式(1)的特定实施方式中,本申请中的调节剂具有下述化学结构:



[0055] 在式(2)中,基团 R_1 、 R_2 、 X_1 、 X_2 和 X_3 如上述式(1)中所述。基团 R_6 和 R_7 独立地选自氢原子、具有至多一个、两个、三个、四个、五个或六个碳原子的未取代的烃基、烷氧基-OR(例如- OCH_3 、- OCH_2CH_3 或- $OCH(CH_3)_2$)、酰胺基- $NR' C(O)R$ 或- $C(O)NR'R$ (例如- $NHC(O)CH_3$ 、- $N(CH_3)C(O)CH_3$ 、- $C(O)NH(CH_3)$ 或- $C(O)N(CH_3)_2$)、酮基- $C(O)R$ (例如- $C(O)CH_3$ 、- $C(O)CH_2CH_3$ 或- $C(O)CH(CH_3)_2$)、酯基- $C(O)OR$ 或- $OC(O)R$ (例如- $C(O)OCH_3$ 、- $C(O)OCH_2CH_3$ 、- $OC(O)CH_3$ 或- $OC(O)CH_2CH_3$)、氨基甲酸酯基- $OC(O)NR'R$ 或- $NR' C(O)OR$ (例如- $OC(O)NH(CH_3)$ 、- $OC(O)N(CH_3)_2$ 、- $NHC(O)OCH_3$ 或- $N(CH_3)C(O)CH_3$)和脲基- $NR' C(O)NRR'$ (例如- $NHC(O)NH(CH_3)$ 或- $N(CH_3)C(O)NH(CH_3)$),其中 R 是具有至多一个、两个、三个、四个、五个或六个碳原子的烃基,并且 R' 是氢原子或具有至多一个、两个、三个、四个、五个或六个碳原子的烃基。连接部分 Y_1 和 Y_2 独立地选自-O-、- NR_5 -和-S-基团。

[0056] 在另一个方面,本发明涉及一种药物组合物,其包括分散在一种或多种生理学上可接受的载体或赋形剂中的一种或多种上文所述的Sirt2-调节化合物。所述药物组合物用于治疗或预防其病因是或表现为依赖于Sirt2脱乙酰基酶活性的疾病。如本文所使用的,短语“药学上可接受的赋形剂”或“药学上可接受的载体”指药学上可接受的材料、组分或溶剂,如液体或固体填充剂、稀释剂、载体、生产助剂(例如,润滑剂、滑石粉、硬脂酸镁、钙或锌或者硬脂酸)、溶剂或封装材料,其用于携带或转运给予对象的治疗组合物。在与制剂中的其他成分具有相容性和对对象具有生理安全性方面,各赋形剂应是“可接受的”。

[0057] 在药物组合物中的Sirt2调节化合物还可以是上文所述的任意调节剂化合物的生理学上可接受的盐或溶剂化物。可接受的盐和溶剂化物可以由本领域公知的任意技术制备。如本领域所公知的,可以通过将活性化合物的碱性部分(例如,氨基)与质子酸如HCl或 H_2SO_4 ,或者与路易斯酸如 CH_3Br 反应成盐。如有必要,可以将最初引入的阴离子或阳离子交换为另一种阴离子或阳离子。亦根据本领域所公知的,可以通过在保持一种、两种、或多种溶剂分子与活性成分的各分子接触的条件下,使用溶剂溶解或以其他方式处理溶剂化物的方式生产溶剂化物。

[0058] 药物组合物还包括一种或多种稳定剂、表面活性剂、盐、缓冲剂、添加剂或其组合。

稳定剂可以是例如寡糖(例如蔗糖、海藻糖、乳糖或葡聚糖)、糖醇(例如甘露醇)或其组合。表面活性剂可以是任意适宜的表面活性剂包括例如含有聚环氧烷烃单元的那些(例如吐温20、吐温80、普朗尼克F-68),其通常的含量为约0.001% (w/v) 至约10% (w/v)。盐或缓冲剂可以是任意适宜的盐或缓冲剂例如分别为氯化钠或者磷酸钠或钾。添加剂的一些例子包括例如甘油、苯甲醇和1,1,1-三氯-2-甲基-2-丙醇(例如氯苄酮或氯代丁醇)。如有需要,可以对溶液的pH进行适宜的调节和缓冲。

[0059] 药物组合物(包括化妆品)可以包括以重量计约0.00001至100%,如0.001至10%或0.1%至5%的一种或多种本申请所述的Sirt2调节化合物。在某些局部用制剂中,存在的活性剂的量占制剂约0.25wt%至75wt%的范围,或占制剂约0.25wt%至30wt%的范围,或占制剂约0.5wt%至15wt%的范围或占制剂约1.0wt%至10wt%的范围。

[0060] 在另一个方面,本发明涉及一种治疗或预防其病因是或表现为依赖于Sirt2脱酰基酶活性的疾病的方法。所述方法包括给予对象药理学有效量即以所需方式治疗或预防所述疾病的量的Sirt2调节剂。

[0061] 在一组实施方式中,所述疾病是癌症。所述癌症可以位于身体的任意部分。适用的含有癌细胞的体部分的一些例子包括乳房、肺、胃、肠、前列腺、卵巢、宫颈、胰腺、肾、肝、皮肤、淋巴结、骨、膀胱、子宫、结肠、直肠或脑。癌症或赘生物还可以包括存在一个或多个癌、肉瘤、淋巴瘤、胚细胞瘤或畸胎瘤(生殖细胞肿瘤)。所述癌症还可以是白血病形式。

[0062] 在另一组实施方式中,所述疾病是神经退行性疾病,其通常指表现为神经功能和结构进行性丧失的疾病。神经退行性疾病可以是例如帕金森氏症、阿尔茨海默氏症或亨廷顿氏病、肌萎缩性脊髓侧索硬化症(ALS)、周围神经病和特征为神经元包括外周、中枢或运动神经元损伤、坏死或丢失的其他状况。

[0063] 如本领域所公知的,活性成分的剂量依赖于此类因素,如所治疗的疾病或状况、疾病或状况的程度、给予方法、患者尺寸和潜在的副作用。在不同实施方式中,依据这些和其他因素,Sirt2调节剂和其他活性成分的适宜剂量可以是精确地、至少为或不超过例如1mg、10mg、50mg、100mg、200mg、300mg、400mg、500mg、600mg、700mg、800mg、900mg、1000mg、1200mg、或1500mg,或者以前述示例性剂量中的任意两个为边界的剂量范围。此外,可以以任意适宜的方案中所示的量给予所述组合物,例如每日或隔日一次、两次、三次,总治疗时间为一天、两天、三天、四天或五天,或者一周、两周、三周或四周,或者一个月、两个月、三个月、四个月、五个月或六个月,或者在这之间的时间范围。或者,或此外,给予所述组合物直至所述疾病或状况出现所需的改变,或者提供了预防作用。

[0064] 在某些实施方式中,本申请所述的Sirt2调节化合物可以单独使用,而在其他实施方式中,其可以与一种或多种其他化合物联合使用,所述其他化合物可以具有或不具有调节Sirt2的功能或者有利于增强或改善Sirt2调节化合物的活性。在一个实施方式中,可以给予需要的对象两种或多种Sirt2调节化合物的混合物。在另一个实施方式中,可以将一种或多种Sirt2调节化合物与一种或多种治疗剂联合给药,用于治疗或预防其病因是或表现为依赖于Sirt2脱酰基酶活性的疾病。在一些实施方式中,一种或多种治疗剂与Sirt2调节化合物同时给予(例如,作为含有一种或多种治疗剂和Sirt2调节化合物的药物组合物),而在另一个实施方式中,一种或多种治疗剂与Sirt2调节化合物分别给予。当使用单独的制剂时,Sirt2调节化合物可以与另一种治疗剂同时、先于、迟于、间歇、或交错给药。

[0065] 可以制备或修饰本文所述的任意一种Sirt2调节化合物,使其在给予哺乳动物对象时具有改善的性质,例如稳定性增加、细胞穿透能力增强、寿命延长等。例如,为增强底物的细胞穿透能力,可以在调节物中引入含有多个氨基酸的肽链,如8-10个精氨酸或与其具有化学相似性的残基,或聚环氧烷烃链,如(例如在R₃、R₄、R₆或R₇基团上)具有2、3、4、5、6、7、8、9、10、或更多个环氧乙烷单元的聚乙二醇(PEG)链。

[0066] Sirt2调节化合物及其生理学上可接受的盐和溶剂化物(及其适宜的制剂)可以通过,例如注射(例如,SubQ、IM、IP、IV)、吸入或喷入(通过口或鼻)或口服、口腔、舌下、透皮、鼻内、胃肠外或直肠给予。在一个实施方式中,可以将Sirt2调节化合物局部地给予存在靶细胞的部位,即在特定组织、器官、或体液(例如血液,脑脊液等)中。可以将Sirt2调节化合物制成多种给药模式,包括全身和局部或局限性给药。给药和制剂设计技术均是本领域公知的,如参见例如Remington's Pharmaceutical Sciences, Meade Publishing Co., Easton, Pa。

[0067] 可以通过在细胞培养物或实验动物上进行的标准药理学方法确定Sirt2调节化合物的毒性和治疗效能。LD₅₀是使群体产生50%死亡的剂量。毒性作用和治疗作用的剂量比(LD₅₀/ED₅₀)是治疗指数。优选具有较高治疗指数的Sirt2调节化合物。可以使用显示出毒副作用的Sirt2调节化合物,但是最好使用递送系统将此类化合物靶向至受累组织部位,以使得对未受累细胞的潜在损伤最小,进而降低副作用。

[0068] 可以使用从细胞培养物检测和动物研究中获得的数据确定其在人体内使用的剂量范围。此类化合物的剂量可以在包括ED₅₀且具有很少或不具有毒性的循环浓度的范围内。可以根据所使用的给药形式和给药途径在此范围内改变所述剂量。对于任意化合物而言,均可以在细胞培养物检测中初步估算其治疗有效剂量。可以在动物模型中确定给药剂量以获得循环血浆浓度范围,该范围包括在细胞培养物中确定的IC₅₀。这些信息可以用于更加准确地确定在人体内使用的剂量。可以通过例如高效液相色谱测定其在血浆中的水平。

[0069] 在一些实施方式中,Sirt2抑制剂是Sirt2选择性抑制剂。在通常情况下,作为选择性抑制剂,Sirt2抑制剂显示出对Sirt2的IC₅₀值低于一种或多种(或全部)其他的人类去乙酰化酶,如Sirt1、3、4、5和6。例如,Sirt2选择性抑制剂可以显示出高达或低于50、40、30、20、10、5、2或1 μ M的IC₅₀,而一种或多种(或全部)其他的人类去乙酰化酶的IC₅₀高于任意前述值,或者更特别地高于50、60、70、80、90或100 μ M。

[0070] 在另一个方面,本公开涉及一种鉴定Sirt2脱酰基酶(特别是脱乙酰基酶)活性调节剂的检测方法。在一个特定的实施方式中,所述方法在高通量筛选模式下实施。

[0071] 在所述检测方法的第一部分中,在存在候选化合物的条件下,将能够被Sirt2(例如通过基本上模拟酰基化赖氨酸残基)脱酰基的酰基化底物(即“底物”)与Sirt2接触。为了使酰基化底物是有效的,依据其已知有效地被Sirt2脱酰基化,依据通过任意适宜的实验方案均确证其针对特定底物具有可检测的Sirt2活性以及依据本领域通常所公知的,选择底物酰基-赖氨酸部分(即“酰基-赖氨酸模拟部分”)的酰基。典型地,所述底物的酰基部分包含具有至少一个、两个或三个碳原子的烷基。除了酰基-赖氨酸部分以外,还可以对其他结构特征(例如与赖氨酸部分或特定肽序列的氨基或羧基末端连接的那些基团)进行适当调整以提供更有效的底物,如果发现任意这些附加特征显著影响脱酰基化活性水平。

[0072] 可以以任意适宜的方式对所述底物的赖氨酸部分进行衍生化或修饰,但保留其碱

性氨基酸结构。具体地,可以对赖氨酸部分的侧链 ϵ -氨基丁基进行修饰。例如,所述赖氨酸部分可以形成 $-\text{NH}-\text{CH}(\text{R}^{\prime\prime})-\text{C}(\text{O})-$,其中 $\text{R}^{\prime\prime}$ 是侧链,其可以是例如一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个或十个碳原子的烷基或烯基链。酰基和 $\text{R}^{\prime\prime}$ 还可以独立地包括或不包括一个或多个选自N、O和S的杂原子,其中所述杂原子插入两个碳原子之间或取代碳原子(或亚甲基),或者以杂原子基团的形式存在,如 $\text{C}(\text{O})$ 。在一些实施方式中,所述杂原子不以 OH 、 SH 或 NH_2 基团的形式存在,并且在酰基或 $\text{R}^{\prime\prime}$ 中的一个或多个氢原子可以或可以不被氟原子取代。而且,如果所述赖氨酸部分不是寡肽或多肽结构的一部分,则骨架 NH (NH 末端)可以与烃基(R)连接,或 NH 的氢原子被烃基(R)取代,和/或骨架 $\text{C}(\text{O})$ 可以与烃基(R)、或基团 $-\text{OR}$ 、或基团 $-\text{SR}$ 、或基团 $-\text{NHR}$ 、或基团 $-\text{NR}_2$ 连接,其中独立地选择各 R 基。

[0073] 所述底物与指示剂部分连接。在所述底物的结构基本上与式(1)或(2)所示的任意结构相似的实施方式中,至少一个指示剂部分包括在这些式中所示的任意通式取代中。所述指示剂可以是例如一个或多个选自 R_3 、 R_4 、 R_6 和 R_7 的基团,或者所述指示剂可以插入任意一个或多个所述基团。所述连接是能够仅在赖氨酸上的酰基被除去后由裂解剂裂解的共价连接。在特定实施方式中,所述共价连接是在赖氨酸部分的羧基末端与指示剂化合物的氨基之间形成的酰胺键。所述指示剂部分优选地不与底物的酰基部分连接,因为这恰恰将有可能消除本申请所述的用于产生信号的机制。当在 $\text{Sirt}2$ 将底物脱酰基化的条件下将所述底物与 $\text{Sirt}2$ 接触时,除去酰基后,裂解剂能够裂解赖氨酸与指示剂部分之间的键,以释放指示剂部分。指示剂部分的释放将产生可检测信号。在特定实施方式中,所述酰基赖氨酸部分通过肽键与至少一个其他氨基酸残基连接,并且所述指示剂部分与携带酰基的赖氨酸连接(特别是如果携带酰基的赖氨酸在末端时)或者与另一个氨基酸连接,其可以是另一个未被或也被酰基化的赖氨酸,特别是如果携带酰基的赖氨酸在内部即不在末端时。

[0074] 裂解剂可以是能够裂解特定氨基酸残基之间的肽键(即蛋白水解裂解模式),但如果存在酰基化赖氨酸时不能裂解肽键的任意物质。根据一个实施方式,裂解剂是蛋白水解酶,即水解肽键的酶(也称为肽酶)。能够作为裂解剂的蛋白水解酶的例子包括但不限于胰酶、钙蛋白酶、赖氨酰内肽酶、内蛋白酶 $\text{Lys}-\text{C}$ 、金属内切蛋白酶、纤溶酶、羧肽酶、糜蛋白酶、 $\text{V}8$ 蛋白酶、胃蛋白酶、木瓜蛋白酶、枯草杆菌蛋白酶、凝血酶、弹性蛋白酶、 $\text{gluc}-\text{C}$ 、内 $\text{lys}-\text{C}$ 或蛋白酶 K 、半胱天冬酶-1、半胱天冬酶-2、半胱天冬酶-3、半胱天冬酶-4、半胱天冬酶-5、半胱天冬酶-6、半胱天冬酶-7、半胱天冬酶-8、 $\text{MetAP}-2$ 、腺病毒蛋白酶、 HIV 蛋白酶等。

[0075] 在一个特定实施方式中,所述裂解剂是胰酶。胰酶将裂解与所述底物赖氨酸残基的羧基末端连接的肽。另一个适宜的裂解剂是胃蛋白酶,其水解苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸残基的氨基末端的肽键;因此,胃蛋白酶将裂解赖氨酸残基与相邻的苯丙氨酸、色氨酸或酪氨酸残基之间的底物肽。

[0076] 指示剂部分是一旦从底物上裂解就可以检测的任意分子。在一个实施方式中,指示剂部分是荧光团。一些常见荧光团包括荧光素异硫氰酸酯(FITC)、罗丹明衍生物(TRITC)、香豆素、苝、青色素、马来酰亚胺衍生物染料、 CF 染料、 FluoProbes 染料、 DyLight Fluors 、 Oyster 染料、 Atto 染料、 HiLyte Fluors 、荧光素和 Alexa Fluors 。荧光素如萤火虫荧光素与萤火虫荧光素酶和 ATP 孵育时能够发光。在特定实施方式中,所述指示剂部分是氨基香豆素荧光团,或更特别地,氨基甲基香豆素荧光团,如7-氨基-4-甲基香豆素(AMC)。

[0077] 在一些实施方式中,荧光团的荧光强度或发射波长取决于在荧光团和底物之间是

否存在连接。通常使用荧光分光光度计检测荧光团的荧光强度或发射波长的改变(即对从底物上裂解前后进行比较)。

[0078] 在其他实施方式中,与所述底物连接的荧光团的荧光强度或发射波长并不一定随着在荧光团与底物之间是否存在连接而改变,但是还可以通过使用淬灭基团标记底物提供替代性的可检测信号。例如,可以将荧光团与酰基化的赖氨酸的羧基末端连接,而可以将淬灭基团与肽链上不同的氨基酸或含有酰基化赖氨酸的分子结构的其他部分连接。在荧光团或淬灭基团裂解前,这些底物的荧光强度较低,因为淬灭基团与荧光团紧邻。在荧光团或淬灭基团从底物上裂解后,荧光强度增强。这使得能够对裂解的底物肽进行定量检测。适于本申请中使用的淬灭基团的例子包括DNP、Black Hole QuencherTM部分和DABCYL。在一些实施方式中,淬灭剂也可以是荧光团。

[0079] 在一些实施方式中,所述底物含有荧光团的供体-受体对,其常用于荧光能量转移(FRET)实验中。在将供体或受体荧光团裂解前,供体和受体荧光团的距离足够近以至于在供体和受体之间发生能量转移,可以通过FRET对这种能量转移进行检测。可以将一个荧光团与例如酰基化赖氨酸的羧基末端连接,将紧邻的供体-受体对的另一个成员,例如与所述底物的另一部分连接如底物的另一个氨基酸残基,或者使其在所述赖氨酸残基的另一部分上如赖氨酸侧链上。当供体-受体对中的一个荧光团解离时,FRET信号强度显著降低,其能够与Sirt2的活性水平相关。

[0080] 候选化合物可以是检测其抑制、活化或以其他方式调节Sirt2脱酰基酶活性能力的任何分子或大分子(例如蛋白、多核苷酸或多糖)。在特定实施方式中,所述候选化合物含有疏水性酰基化赖氨酸模拟部分,如上文对底物的描述,除了所述候选化合物不需要包括指示剂部分(或不包括指示剂部分)以外。不被任何理论所束缚,据信有效的候选化合物与Sirt2形成了停滞的共价中间体。因此,能够促进与Sirt2的这种相互作用的任何结构特征均可以包括在所述候选化合物中,以争取使得该候选化合物成为更有效的调节剂。在另一个实施方式中,所述候选化合物是小分子。“小分子”指小的有机化合物,如杂环、肽、糖类、类固醇等。所述小分子调节剂的分子量优选地低于或高达约5000、3000、1500、1000、800或500道尔顿。可以对所述候选化合物进行修饰以增强例如其效能、稳定性或药学上的相容性。在其他实施方式中,所述候选化合物是具有式(1)或(2)所示结构的化合物。

[0081] 在酰基化底物的指示剂部分裂解后,检测通过裂解反应产生的信号强度。通过本领域公知的在信号强度与酶活性之间建立相关性的方法发现,通过裂解反应产生的信号强度与Sirt2脱酰基酶的活性之间具有相关性。将在存在候选化合物条件下观察到的脱酰基酶活性与在相同或基本相同条件下但不存在候选化合物时的Sirt2脱酰基酶活性(即对照脱酰基酶活性)进行比较。可以通过进行单独的实验获得对照脱酰基酶活性值,在实验中将酰基化底物与Sirt2接触,在不存在候选化合物且Sirt2使底物脱酰基的条件下,将脱酰基的底物与裂解剂接触并观察信号强度。可以直接将用于测定对照脱酰基酶活性值的实验作为本发明方法在包括候选化合物的上文所述方法进行之前或之后的另一个步骤。或者,可能已经从之前的实验中获知了对照脱酰基酶活性值,这样可以不需要在上述方法中重新建立。

[0082] 如果对照脱酰基酶活性值与存在候选化合物时观察到的脱酰基酶活性值之间不存在差异,则可以断定所述候选化合物不是Sirt2的调节剂。反之,如果对照脱酰基酶活性

值与存在候选化合物时观察到的脱酰基酶活性值之间存在差异,则可以断定所述候选化合物是Sirt2的调节剂。当与不存在候选化合物时Sirt2脱酰基酶的活性相比,存在候选化合物时Sirt2脱酰基酶的活性降低时,则将候选化合物鉴定为Sirt2的抑制剂。当与不存在候选化合物时Sirt2脱酰基酶的活性相比,存在候选化合物时Sirt2脱酰基酶的活性升高时,则将候选化合物鉴定为Sirt2的激活剂。

[0083] 为进行检测Sirt2活性的检测,首先将含有Sirt2的样品与本申请所述的适宜底物接触并在适宜的条件下孵育。术语“样品”指含有纯化、部分纯化或未经纯化的Sirt2的任何目标样品,其可以是来源于细胞或组织的裂解液,或者(由细胞或组织或重组表达系统纯化的)Sirt2蛋白制品。在将Sirt2样品与底物孵育一段时间后,将裂解剂与适宜的反应缓冲液加入反应物中。在该第二个孵育期后,可以使用水或其他中性pH的缓冲液稀释反应物,并且使用在所用荧光团的适宜激发和检测波长下检测荧光的荧光检测器记录荧光。然后建立信号强度与Sirt2活性之间的相关性。或者,在将酰基化底物加入Sirt2和候选化合物时加入裂解剂,这样就不需要进行裂解反应的第二个步骤了。

[0084] 在一些实施方式中,所述检测在微孔板中进行。例如,可以将底物肽加入反应缓冲液中,并将该溶液加入用于荧光计的微孔板的孔中,然后孵育板。如果要观察候选化合物的作用,则可以将候选化合物加入底物中。接下来,将等份的Sirt2样品加入各孔中,并且在规定长度的时间内进行脱酰基化反应。随后或同时,将等份的蛋白水解酶和适宜的反应缓冲液加入各孔中,然后使用荧光酶标仪定时检测溶液中的荧光强度。

[0085] 该检测可以是小型化和自动化的高通量分析。该检测还可以在一个或多个独立容器中进行;然而,所公开检测的益处之一就是能够在单一容器中进行检测,如微孔板,这使得其易于使用和自动化控制。在需要固定的情况下,可以任选地将底物固定在固体材料上,如通过生物素-链霉亲和素连接。

[0086] 本申请中提供的另一种检测方法是液相色谱-质谱(LCMS)检测。在这项检测中,通过确定在与Sirt2接触后底物肽和产物肽的量对Sirt2的活性进行鉴定。液相色谱(LC),特别是HPLC,具有从产物中分离底物的功能。可以通过使用LC色谱图中产物峰和底物峰紫外吸收(如在215nm或280nm)的面积,或者通过使用质谱图中产物离子和底物离子的离子强度实现定量。对底物(例如酰基化的肽)与产物(即脱酰基的肽)的量进行比较以建立与底物上Sirt2活性的量的相关性。在这项检测中,产物的量增加表明具有Sirt2活性,很少或无产物表明很少或无Sirt2活性。

[0087] 在使用质谱的检测中,可以将候选化合物鉴定为Sirt2抑制剂或激活剂,如下文所示。当与不存在候选化合物时生成的产物相比,存在候选化合物时生成的产物(例如脱酰基的肽)减少时,则将候选化合物鉴定为Sirt2抑制剂。当与不存在候选化合物时生成的产物相比,存在候选化合物时生成的产物(例如脱酰基的肽)增加时,则将候选化合物鉴定为Sirt2激活剂。优选地,为了将候选化合物认定为调节剂,则在存在和不存在候选化合物时的活性差异应至少为例如20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%、500%或以上。

[0088] 在一些实施方式中,为避免底物相对于预计的Sirt2酶活性不足,在检测中使用过量的底物。特别地,为了在一般生物样品例如细胞核提取物中确定Sirt2的活性,在反应中所使用的底物浓度通常为1至200 μ M,或更特别地为20至50 μ M。还可以依据所使用的底物量

调整裂解剂的浓度。通常,根据预计产生的底物肽的量调整裂解剂的用量以便在给定条件下实现底物的充分裂解。在特定实施方式中,当在反应中使用的底物浓度为约0.01至1mM时,所使用的胰酶量可以是例如0.2至5 μ g每60 μ L反应物,优选地1至2 μ g每60 μ L反应物。

[0089] 对于第一个反应(利用Sirt2脱酰基化),可以通过考虑Sirt2的最佳pH选择反应pH。通常将pH调节至pH6.0至8.5,或更特别地,pH6.8至8.5。优选提供上述pH的反应缓冲液。例如,Tris-HCl、HEPES-KOH和可以用于本发明方法中的其他这种缓冲剂。更特别地,例如可以使用pH7.4的20mM Tris-HCl。通常,NAD是Sirt2发挥功能的辅助底物,通常其使用浓度为约0.5mM。通常,还可以向反应溶液中加入盐和防腐剂。例如,可以将1mM二硫苏糖醇(DTT)加入反应物中。第一个反应(利用Sirt2脱酰基化)可以在例如35-40 $^{\circ}$ C下孵育例如2-20小时。特定的示例性孵育条件包括例如将底物与含有Sirt2的样品的液体混合物在含有NAD(约0.5mM)和DTT(约1mM)的Tris-HCl缓冲液(pH7.4,约20mM)中在大约37 $^{\circ}$ C下孵育约4小时。对于利用裂解剂的第二个反应而言,将裂解剂与适宜的反应缓冲液加入反应物中。例如,可以加入胰酶(1 μ g)和CaCl₂(1mM),并将反应物在约37 $^{\circ}$ C下孵育约3小时。

[0090] 胰酶孵育后,可以使用水或其他中性pH的缓冲液稀释反应物,并且使用在所用荧光团的适宜激发和检测波长下检测荧光的荧光检测器记录荧光。然后如上文所述建立信号强度与Sirt2活性之间的相关性。

[0091] 在一些实施方式中,底物、候选化合物或这两者均具有R₃和/或R₄,或者R₆和/或R₇,作为酰胺连接部分,通常是肽或肽模拟部分。在特定实施方式中,所述酰胺连接部分不包括一个或多个非酰胺连接或基团,如硫代酰胺、硫脲、磺酰胺、砒、硫酰胺、亚砒、有机酯(即-C(O)O-)、有机硫酯(即-C(S)O-)、脲、醚(即R-O-R)、硫醚(即R-S-R)、二硫化物、偶氮、氨基甲酸酯(即-OC(O)NH-)、碳酸酯(即-OC(O)O-)、亚胺、磷酸酯、膦酸酯、次膦酸酯和膦氧化物连接或基团。在其他特定实施方式中,所述基团不包括可水解的基团,或者当进入细胞组织时水解或裂解的基团。在一些实施方式中,如果需要这种水解,或者其赋予所述分子其他改善的性质,如改善的靶向能力、生物分布或生物利用度,可以包括一个或多个这种基团。

[0092] 合成本申请所述的底物和候选(或调节剂)化合物的方法是本领域所公知的,并且如在下述实施例中所描述的。例如,可以通过使用由胺和羧酸制备酰胺的公知反应条件实现将酰基与赖氨酸侧链偶联。而且,可以通过例如利用本领域公知的方法,使用Lawesson试剂的反应实现将羰基中的氧原子(即R₂或R₈)转化为硫代羰基。

[0093] 通常通过确定候选化合物的IC₅₀测定候选化合物抑制Sirt2活性的能力。如本申请所使用的,“IC₅₀”或“半数最大抑制浓度”指活性被抑制一半时需要的化合物的量。可以通过构建剂量应答曲线并检测不同浓度的化合物降低或阻止酶活性的作用确定化合物的IC₅₀。对于给定的抑制剂,可以通过确定抑制最大酶活性一半时所需的浓度计算IC₅₀值。推导IC₅₀值所使用的数学分析是本领域公知的。

[0094] 通过确定候选化合物的EC₅₀测定候选化合物激活Sirt2活性的能力。如本申请所使用的,“EC₅₀”或“半数最大有效浓度”指诱导基线值和最大值之间一半应答的化合物浓度。因此梯度剂量应答曲线的EC₅₀表示观察到其最大效应50%时的化合物浓度。推导EC₅₀值所使用的数学分析是本领域公知的。

[0095] 本发明的Sirt2抑制剂优选抑制Sirt2脱酰基酶活性的IC₅₀或EC₅₀小于或等于1 μ M、2 μ M、5 μ M、10 μ M、20 μ M、30 μ M、40 μ M、50 μ M、或者100 μ M,或者在以任意两个这些值为边界的范围

内的IC₅₀或EC₅₀值。

[0096] 在另一个方面,本发明涉及一种试剂盒,其用于检测样品中的Sirt2活性以及用于筛选抑制或增强上文所述的Sirt2活性的化合物。所述试剂盒至少含有如上文所述的包含酰基化赖氨酸或其模拟物的底物或底物前体。所述试剂盒还可以包括一种或多种下述组分:一个或多个Sirt2样品;如上文所述的裂解剂;一个或多个候选化合物或候选化合物前体;一个或多个指示剂化合物;淬灭剂;缓冲剂;蛋白稳定或蛋白变性组分,如BSA或多元醇,如蔗糖或果糖;以及一个或多个用于将制剂组合和/或检测脱酰基酶活性的装置,如在用于确定酶活性所进行的动力学检测中使用的任意装置或设备。

[0097] 下述实施例仅用于解释和描述现阶段本发明的最佳模式的目的。然而,本发明的范围不应以任何方式受限于本文所述的实施例。

[0098] 实施例1

[0099] 选定的Sirt2硫代酰基抑制剂的合成(TA、TB、TH和TM)

[0100] 合成四个化合物并对其抑制Sirt2的能力进行研究。所述化合物在本申请中表示为硫代乙酰基(TA)、硫代丁酰基(TB)、硫代庚酰基(TH)和硫代肉豆蔻酰基(TM),其对应于这些化合物中的硫代酰基。这四个化合物的结构如图2所示(下部)。图2(上部)为硫代乙酰基赖氨酸化合物抑制sirtuin机制的一般性示意图。

[0101] 试剂以可以获得和使用的最高纯度提供。¹HNMR在INOVA400分光光度计上进行。LCMS在具有Sprite® TARGA C18柱(40×2.1mm,5μm,Higgins Analytical,Inc.,Mountain View,CA)的SHIMADZU® LCMS-QP8000α上进行,在215和260nm下监测。在LCMS中使用的溶剂为含有0.1%甲酸的水和含有0.1%甲酸的乙腈。现有技术中已经报道了TA的合成(Suzuki,T.等,Bioorg.Med.Chem.Lett.19,5670-5672,2009)。

[0102] 在室温搅拌条件下,将含所需量羧酸(例如丁酸、庚酸或肉豆蔻酸,30mmol)的无水N,N'-二甲基甲酰胺(DMF,20mL)加入N-羟基琥珀酰亚胺(3.45g,30mmol)中。然后将含N,N'-二环己基碳二亚胺(6.19g,30mmol)的无水DMF(20mL)加入反应物中。搅拌2小时后,将反应混合物过滤。在室温下将滤液加入含Cbz-Lys-OH(5.6g,20mmol)和N,N-二异丙基乙胺(DIEA,5.2mL,30mmol)的无水DMF(50.0mL)溶液中(其中Cbz=羧基苄基,室温(RT)通常为18-28℃,或更通常为20-25℃)。将所得到的反应混合物搅拌过夜。然后向反应混合物中加入44mL水和26mL1M盐酸(HCl),将pH调整至约2至3。用200mL乙酸乙酯提取混合物三次,并用100mL盐水洗涤两次。使用无水硫酸钠干燥有机层。真空除去溶剂后,将含有Cbz-Lys(酰基)-OH的残留物直接用于下一步。

[0103] 在0℃下,将乙酰氯(14.2mL,200mmol)滴加至甲醇(150mL)中。在RT下搅拌溶液30分钟。随后,加入上一步获得的在甲醇(50mL)中的20mmol Cbz-Lys(酰基)-OH溶液,并将反应混合物再搅拌两小时或过夜。随后,真空浓缩溶液并使用20:1的二氯甲烷:甲醇作为洗脱剂,通过二氧化硅凝胶柱纯化残留物以获得产物Cbz-Lys(酰基)-OMe,收率~95%。

[0104] 将Cbz-Lys(酰基)-OMe(20mmol)混悬于无水甲苯(50mL)。然后将Lawesson试剂(8.0g,20mmol)加入混悬液中。在氮气环境下,将反应混合物在80℃下搅拌2小时(使用薄层色谱或TLC监测)。真空除去甲苯后,使用1:4的乙酸乙酯:己烷作为洗脱剂,通过二氧化硅凝胶柱纯化残留物以获得白色固体产物Cbz-Lys(硫代酰基)-OMe,收率~90%。

[0105] 将Cbz-Lys(硫代酰基)-OMe(10mmol)溶解在1:1THF:H₂O(100mL)中,并将混合物冷

却至0℃。加入氢氧化锂(95.8g, 40mmol), 将反应物升温至室温并搅拌3小时(使用TLC监测)。使用1M HCl水溶液酸化反应物并使用二氯甲烷提取(3x, 150mL)。使用盐水(200mL)洗涤混合有机相, 使用无水硫酸钠干燥并真空浓缩。将含有粗产物Cbz-Lys(硫代酰基)-OH的残留物直接用于下一步, 不需要进一步纯化。

[0106] 在0℃下, 将异丁基氯甲酸酯(1.3mL, 10mmol)滴加至含有Cbz-Lys(硫代酰基)-OH(10mmol)和N-甲基吗啉(1.1mL, 10mmol)的干燥二氯甲烷(50mL)溶液中。将反应混合物在0℃下搅拌30分钟。在0℃下加入苯胺(1.09mL, 12mmol), 并在RT下将反应混合物搅拌过夜。除去溶剂并将所得到的材料溶解在乙酸乙酯中。依次使用饱和碳酸氢钠溶液、0.1N HCl和盐水溶液洗涤有机层, 使用硫酸镁干燥并减压浓缩以提供预期的TB、TH或TM化合物(~90%收率), 使用4:1的己烷:乙酸乙酯在二氧化硅凝胶上通过闪氏柱层析纯化。

[0107] ^1H NMR (400MHz, CD_3OD): δ 7.54-7.50 (m, 2H), 7.33-7.21 (m, 7H), 7.07-7.04 (m, 1H), 5.05 (q, 2H, $J=12\text{Hz}$), 4.27-4.23 (m, 1H), 3.55 (t, 2H, $J=12\text{Hz}$), 2.51 (t, 2H, $J=8.0\text{Hz}$), 1.72-1.68 (m, 8H), 0.86 (t, 3H, $J=8.0\text{Hz}$)。LCMS (ESI) $\text{C}_{24}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}[\text{M}+\text{H}]^+$ 的计算值为442.2, 观测值为442.3;

[0108] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ 8.92 (s, 1H), 8.01 (s, 1H), 7.47-7.06 (m, 10H), 6, 12 (s, 1H), 5.09-5.00 (m, 2H), 4.43 (s, 1H), 3.58 (s, 2H), 2.56 (t, 2H, $J=8\text{Hz}$), 1.87-1.23 (m, 14H), 0.84 (s, 3H)。LCMS (ESI) $\text{C}_{27}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}[\text{M}+\text{H}]^+$ 的计算值为484.3, 观测值为484.3;

[0109] ^1H NMR (400MHz, CD_3OD): δ 7.54-7.52 (m, 2H), 7.36-7.26 (m, 7H), 7.10-7.06 (m, 1H), 5.12-5.04 (m, 2H), 4.23-4.20 (m, 1H), 3.57 (t, 2H, $J=8.0\text{Hz}$), 2.54 (t, 2H, $J=8.0\text{Hz}$), 1.84-1.26 (m, 28H), 0.87 (t, 3H, $J=8.0\text{Hz}$)。LCMS (ESI) $\text{C}_{34}\text{H}_{51}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}[\text{M}+\text{H}]^+$ 的计算值为582.4, 观测值为582.5。

[0110] 实施例2

[0111] TA、TB、TH和TM抑制剂的Sirt2抑制能力的阐述

[0112] 对研究的各抑制剂发现了不同的选择性性质。已研究的各抑制剂化合物的 IC_{50} 值(μM)见下表1。将不同浓度的TA、TB、TH或TM与 $1\mu\text{M}$ sirtuin和 1mM NAD在含 1mM 二硫苏糖醇(DTT)的 20mM Tris-HCl缓冲液(pH8.0)中在 37°C 下预孵育30分钟。然后再加入 0.05mM 酰基肽(对于Sirt1、Sirt2和Sirt3为H3K9Ac;对于Sirt5为H3K9Su;对于Sirt6和Sirt7为H3K9Myr)启动反应。总反应体积为 60mL 。将反应物在 37°C 下孵育一段时间(针对Sirt1为2分钟, 针对Sirt2和Sirt5为10分钟, 针对Sirt3为30分钟, 针对Sirt6和Sirt7为1小时)。加入 60mL 含有 200mM HCl和 320mM 乙酸的水溶液终止反应。离心除去沉淀的蛋白后, 使用反相C18柱($250\times 4.6\text{mm}$, 90A, 10mm , GraceVydac, Southborough, MA)通过HPLC分析上清液, 线性梯度为0%至20%B进行10分钟($1\text{mL}/\text{min}$)。基于在 215nm 下监测的吸光度面积对产物进行定量, 假设酰基的水解不影响吸光度。所有反应均重复两次。

[0113] 特别地, 如表1所示, TB和TH能够有效地抑制Sirt1, 而TH和TM能够有效地抑制Sirt2。亦如表1中的数据所示, 这些化合物均不能有效地抑制Sirt3、Sirt5或Sirt6。TM的 IC_{50} 值具有特殊的显著性, 其显示TM是Sirt2选择性抑制剂, 其抑制Sirt2的效能比所检测的其他sirtuin高50倍以上。针对Sirt2的这个显著的选择性是特别预料不到的。而且, 观察到随着酰基链长度的增加Sirt2的选择性增加的趋势, 其为含有的酰基链长度高于TH并且低于TM(即多于6个且少于13个碳原子)以及酰基链长度高于TM(例如多于13个并且至多16、

17、18、19或20个碳原子)的抑制性化合物也将显示出对Sirt2具有较高的选择性提供了证据。

[0114] 表1:不同化合物针对Sirt1、2、3、5、6和7的IC₅₀值(μM)

	TA	TB	TH	TM
Sirt1	30	2.4	0.31	>205
Sirt2	105	3.0	0.12	0.05
[0115] Sirt3	>205	113	105	124
Sirt5	>205	>205	>205	>205
Sirt6	>205	>205	>205	>205
Sirt7	>205	>205	>205	>205

[0116] 实施例3

[0117] TA、TB、TH和TM抑制剂的体外癌症抑制能力

[0118] 接下来,检测了这些抑制性化合物抑制癌细胞增殖的能力。将MCF-7和MDA-MB-231细胞(ATCC)均在添加了10%热灭活胎牛血清(FBS)的RPMI1640培养基(Invitrogen®)中培养。将MCF-10A(ATCC)细胞在添加了10%马血清(Invitrogen®)的Dulbecco改良的Eagle培养基:营养混合物F-12(DMEM/F12)(Invitrogen®)中培养。

[0119] 软琼脂检测的一般程序

[0120] 在RPMI1640培养基中加入0.6%的VII型琼脂糖(Sigma)、10%FBS和1%青霉素-链霉素(Invitrogen®),并加入6孔培养板(2mL/孔)中。将培养板在4℃下放置20分钟使琼脂凝固。然后将培养板在37℃下孵育5分钟,随后加入1mL软琼脂/细胞溶液,其由将0.3%的VII琼脂、10%FBS、1%青霉素-链霉素以及~3000个细胞在RPMI1640培养基中混合制备。再次将培养板在4℃下放置20分钟使琼脂凝固。将培养板在37℃下孵育7天后,将含0.3%的VII琼脂、10%FBS和1%青霉素-链霉素的1mL RPMI1640培养基加入板中,并将培养板在4℃下放置20分钟使琼脂凝固。再将培养板在37℃下孵育7天后,在显微镜下检查集落形成情况。所有实验均重复两次。对于检测抑制剂而言,将含所示浓度抑制剂的二甲亚砜(DMSO)或仅DMSO(阴性对照)加入软琼脂/细胞溶液中,对于检测敲落细胞而言,将所示的敲落细胞加入软琼脂/细胞溶液中。

[0121] 低血清存活检测的一般程序

[0122] 对于MCF-7和MDA-MB-231细胞系而言,将含~6000个细胞的2mL含3%FBS(或者对于MCF-10A细胞系为含3%马血清的2mL DMEM/F12)的RPMI1640培养基接种至6孔培养板中。待细胞附着于培养板上后,将含所示浓度抑制剂的DMSO或仅DMSO(阴性对照)加入板中。使用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤后,在第0天、第1天、第3天和第5天计数活细胞数。检测重复两次。

[0123] 图3(A)是显示四个示例性Sirt2抑制化合物(TA、TB、TH和TM)抑制能力的图,使用DMSO作为对照。如图所示,Sirt2抑制剂(TH和TM)能够有效地抑制癌细胞增殖,TB,其仅能够有效抑制Sirt1,对癌细胞增殖仅具有较小影响。图3(B)是显示TH和TM(25μM)对MCF7乳腺癌

细胞系和MCF10a正常细胞系抑制能力的图。如图所示,TH和TM对癌细胞具有更高的毒性,因为其在MCF10a(正常无致瘤性的人乳腺上皮细胞系)中的作用远低于在MCF7癌细胞系中的。而且,图3(B)还显示,在浓度为25 μ M时,Sirt2-选择性抑制剂TM完全抑制MCF7细胞的增殖,Sirt1-选择性抑制剂TB仅显示出轻微的作用。而相反的是,能够抑制Sirt1和Sirt2的TH的作用与TM近似。这些数据表明,抑制Sirt2而非Sirt1能够抑制癌细胞增殖。这样,因为Sirt2抑制剂能够有效地抑制MCF7癌细胞增殖,所以已显示出本申请所述的Sirt2抑制剂在治疗癌症特别是乳腺癌中是有用的。

[0124] 亦如图3(A)和3(B)所示,生长抑制/毒性对癌细胞具有选择性,因为被认为是非癌细胞的MCF10a细胞在存在25 μ M TH或TM时仍能够生长,该浓度完全抑制癌细胞系MCF7的生长。

[0125] 如图4(A)和4(B)中的检测显微照片所示,本申请中还发现Sirt2特异性抑制剂TM在25 μ M的浓度下能够抑制三阴性乳腺癌细胞系MDA-MB-231的锚定非依赖生长。三阴性乳腺癌缺乏雌激素受体(ER)和孕激素受体(PR)表达,以及人表皮生长因子受体2(HER2)扩增。三阴性乳腺癌在临床上更加难以治疗,因此需要付出更多努力以鉴定新靶点和开发新的治疗剂。TM的Sirt2特异性抑制作用显示出Sirt2选择性抑制剂能够用于治疗三阴性乳腺癌。

[0126] 为验证抑制Sirt2导致了癌细胞锚定非依赖生长的抑制,另一项实验使用siRNA敲落了Sirt1和Sirt2。如图5(A)、5(B)和5(C)中的检测显微照片所示,Sirt2KD而非Sirt1KD几乎完全抑制了MCF7细胞的锚定非依赖生长。KD数据与小分子抑制数据完全一致,这表明Sirt2是用于乳腺癌的新治疗靶点。

[0127] 虽然已经显示和描述了目前认为的本发明的优选实施方式,但是本领域技术人员可以对其作出多种改变和修饰,其仍在由所附权利要求所定义的本发明的范围内。

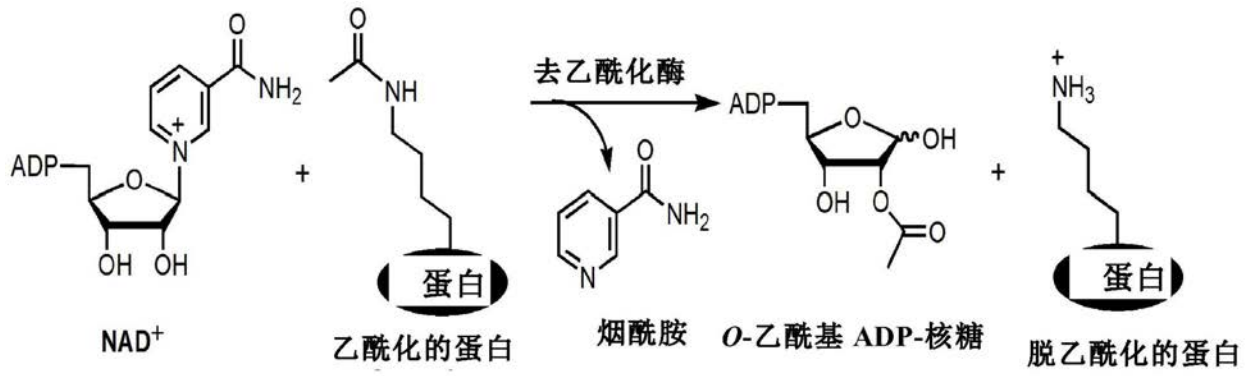


图1

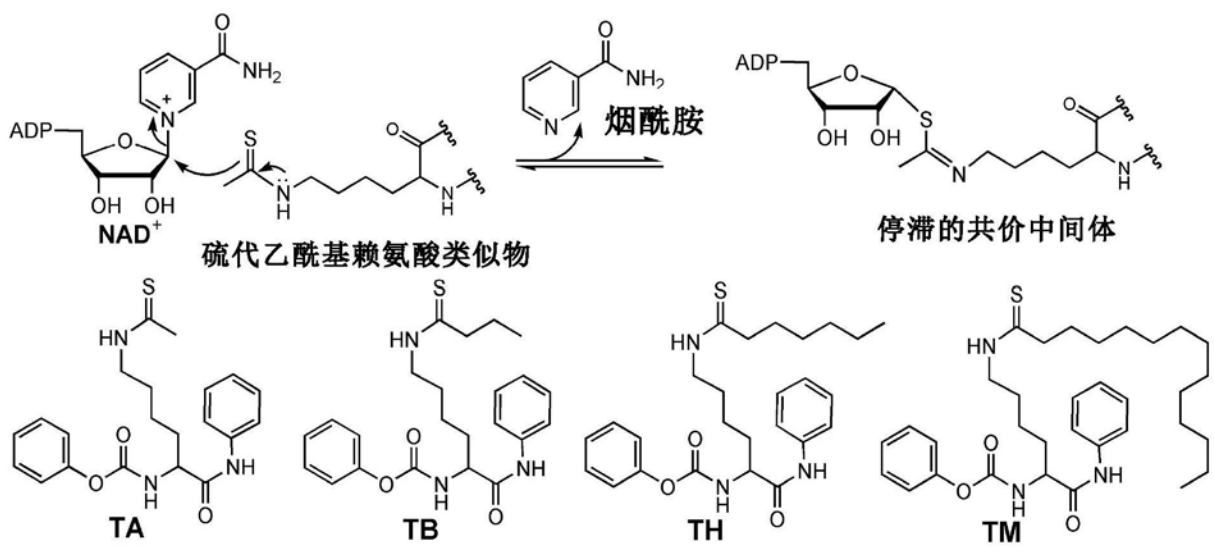


图2

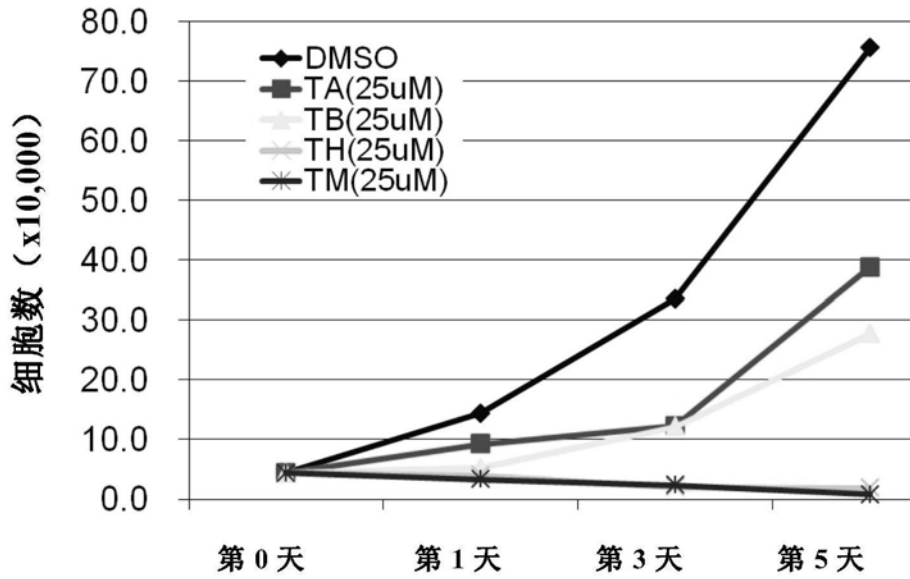


图3A

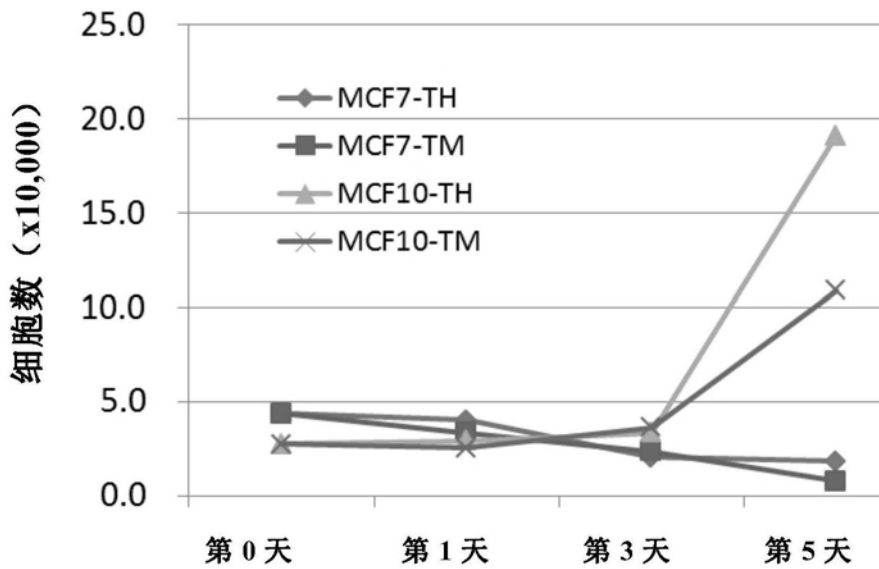


图3B

DMSO 对照

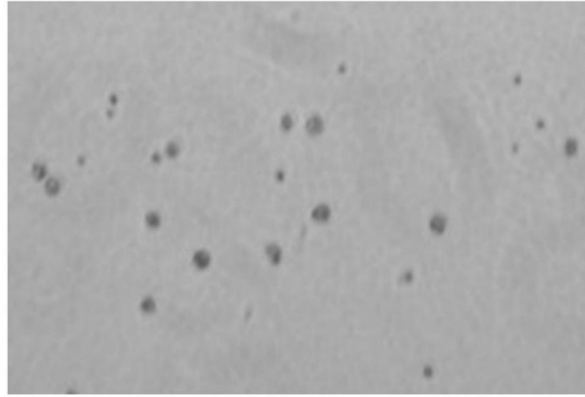


图4A

25 μ M TM

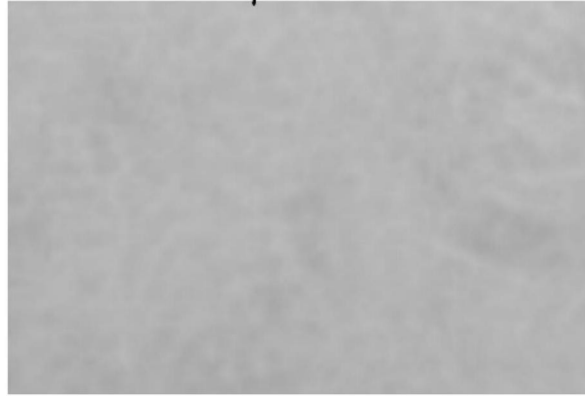
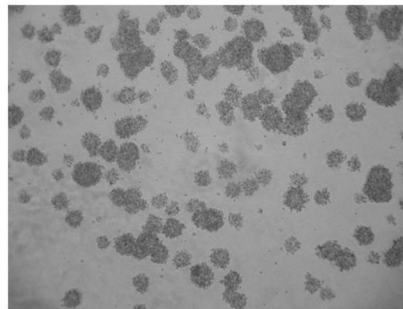
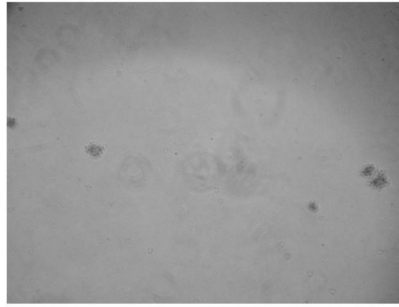


图4B



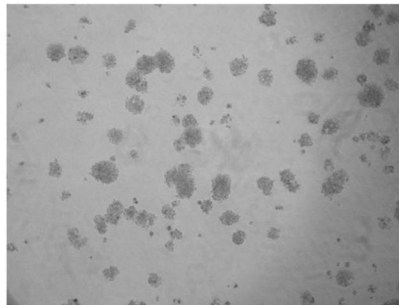
对照 siRNA

图5A



Sirt2 siRNA

图5B



Sirt1 siRNA

图5C