(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 102548551 A
(43)申请公布日 2012.07.04

(21)申请号 201080045481.8

(22)申请日 2010.09.14

(30)优先权数据
MI2009A001837 2009.10.23 IT

(85)PCT申请进入国家阶段日
2012.04.09

(86)PCT申请的申请数据
PCT/IB2010/054139 2010.09.14

(87)PCT申请的公布数据
WO2011/048514 EN 2011.04.28

(71)申请人 意大发马克股份公司
地址 意大利米兰

(72)发明人 C·迪纳雷洛 G·波萨蒂
P·马斯卡尼

(74)专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司 11314
代理人 程伟

(51)Int.Cl.
A61K 31/167(2006.01)
A61K 31/36(2006.01)
A61K 31/496(2006.01)
A61K 31/536(2006.01)
A61K 31/4245(2006.01)
A61K 45/06(2006.01)
A61P 31/18(2006.01)

权利要求书 2 页 说明书 7 页

(54)发明名称

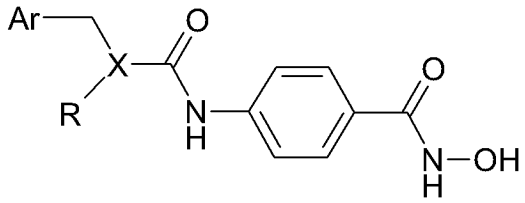
治疗HIV感染的N-羟基-苯甲酰胺衍生物

(57)摘要

本发明公开了治疗受HIV感染的病人的方法，所述方法包括给与N-羟基-苯甲酰胺-为基础的组蛋白脱乙酰酶抑制剂，例如：·二乙基-[6-(4-羟基氨甲酰基-苯基-氨甲酰氧甲基)-萘-2-基-甲基]-氯化铵；·4-(2(S)-苯甲酰氨基-3-萘-2-基-丙酰氨基)-N-羟基-苯甲酰胺；和/或·苯并[1,3]二氧杂环戊烯-5-羧酸[1(S)-(4-羟基氨甲酰基-苯氨基甲酰基)-2-萘-2-基-乙基]-酰胺。这些组蛋白脱乙酰酶抑制剂的使用剂量为50到200mg/天，优选为100到200mg/天，以得到125和250nM之间的血液浓度。

CN 102548551 A

1. 用于治疗 HIV 感染的通式 I 的化合物



(I)

其中：

X 为 O、CH 或其为空缺；

Ar 为芳基或饱和、不饱和或部分不饱和的单 -、二 -、三环碳环残基、或饱和、不饱和或部分不饱和的单 -、二 -、三环的包括一个或更多个选自 N、S 和 O 的杂原子的杂环残基；所述碳环或杂环芳基残基任选地用一个或更多个相同或不同的卤素、C_1-C_4 烷基、C_1-C_4 烷氧基、C_1-C_4 卤烷基、烷基磺酰基、环烷基、(环烷基) 烷基、酰基、氨基、(C_1-C_4) 单 - 或二烷氨基、用 C_1-C_4 烷基单 - 或二取代的 (C_1-C_4) 氨烷基、羧基、C_1-C_4 烷氧羧基、巯基烷氧基、巯基苯氧基、硝基、氰基、氧基、全氟烃氧基、全氟烃基、苯基、苯氧基、苯基烷氧基、苯甲酸基、苯基烷基、苯甲酰基、苯磺酸基和羟基取代；

R 为空缺或其为 R^1-CO-NH- 残基；

其中 R^1 是芳基、芳烷基、直链或支链 C_1-C_4 烷基、或饱和、不饱或部分不饱和单 -、二 -、三环碳环残基、或饱和、不饱和或部分不饱和的单 -、二 -、三环的包括一个或更多个选自 N、S 和 O 的杂原子的杂环残基；所述芳基、芳烷基、直链或支链 C_1-C_4 烷基、碳环或杂环残基中的一个或更多个残基任选地，彼此相同或不同地选自：卤素、C_1-C_4 烷基、C_1-C_4 烷氧基、C_1-C_4 卤烷基、烷基磺酰基、环烷基、(环烷基) 烷基、酰基、氨基、(C_1-C_4) 单 - 或二烷氨基、用 C_1-C_4 烷基单 - 或二取代的 (C_1-C_4) 氨烷基、羧基、C_1-C_4 烷氧羧基、巯基烷氧基、巯基苯氧基、硝基、氰基、氧基、全氟烃氧基、全氟烃基、苯基、苯氧基、苯基烷氧基、苯甲酸基、苯基烷基、苯甲酰基、苯磺酸基和羟基。

2. 根据权利要求 1 所述的化合物，其中：

X 是 O 或 CH，

Ar 是 6- 二乙基氨基甲基 - 萘 -2- 基或萘 -2- 基。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的化合物，其为组蛋白脱乙酰酶抑制剂。

4. 根据权利要求 1-3 所述的化合物，其为二乙基 -[6-(4- 羟基氨甲酰基 - 苯基 - 氨甲酰氧甲基)- 萘 -2- 基 - 甲基]- 氯化铵。

5. 根据权利要求 4 所述的化合物，其为一水合物形式，优选一水合物结晶形式。

6. 根据权利要求 1-3 所述的化合物，其为 4-(2(S)- 苯甲酰氨基 -3- 萘 -2- 基 - 丙酰氨基)-N- 羟基 - 苯甲酰胺。

7. 根据权利要求 1-3 所述的化合物，其为苯并 [1,3] 二氧杂环戊烯 -5- 羧酸 [1(S)-(4- 羟基氨甲酰基 - 苯氨基甲酰基)-2- 萘 -2- 基 - 乙基]- 酰胺。

8. 根据权利要求 1-7 所述的化合物，其特征在于所述的 HIV 感染为 HIV-1 感染。

9. 根据权利要求 1-7 所述的化合物，其特征在于为人类用药。

10. 根据权利要求 9 所述的化合物，其特征在于其用药剂量为 50 到 200mg/ 天，优选 100

到 200mg/ 天。

11. 根据权利要求 9 所述的化合物，其特征在于其用药剂量为每天两次，50mg，到每天一次 200mg。

12. 根据权利要求 9 所述的化合物，其特征在于其人血液浓度在 125 和 250nM 之间。

13. 根据权利要求 1-7 所述的化合物，其特征在于其与至少一种抗逆转录病毒剂联合和 / 或时间接近用药。

14. 根据权利要求 13 所述的化合物，其特征在于所述的至少一种抗逆转录病毒剂选自核苷逆转录酶抑制剂、非核苷逆转录酶抑制剂、蛋白酶抑制剂、融合抑制剂、进入抑制剂、整合酶抑制剂、辅助受体拮抗剂、病毒吸附抑制剂、病毒特异性转录抑制剂和 / 或细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂。

15. 根据权利要求 14 所述的化合物，其特征在于所述的抗逆转录病毒剂选自依法韦仑、硫酸茚地那韦和 / 或拉替拉韦钾。

治疗 HIV 感染的 N- 羟基 - 苯甲酰胺衍生物

技术领域

[0001] 本发明涉及 N- 羟基 - 苯甲酰胺 - 为基础的组蛋白脱乙酰酶抑制剂治疗受人体免疫缺陷病毒 (HIV) 感染的人类的应用。特别是与高效抗逆转录病毒疗法 (HAART) 相联合，用于治疗由于持久的、潜伏的 HIV 而使 T $CD4^+$ 细胞感染的病人，旨在消除 HIV 感染。

背景技术

[0002] 由于十多年前高效抗逆转录病毒疗法 (HAART) 的引进，故可以有效地控制 HIV-1 的感染，使 HIV-1 病毒血症维持在低于检测值。但是，通过扩展的 HAART 疗法来消除 HIV-1 感染还是不可能。一旦 HAART 中断，通常在两周后，还会发生病毒血症的反弹 [Imamichi H. 等人 J Infect.Dis.183,36(2001)]。

[0003] 病毒反弹的来源是长期的细胞池，最可能是更缓慢受感染的记忆 T- 细胞储器 (reservoir)，其接纳了 HIV-1 整合的前病毒 DNA。量化潜伏的细胞池的固定技术是可行的，并且可以计算 HIV-1 阳性病人的一百万个中的一个记忆细胞携带的具有复制能力整合的前病毒。

[0004] 在静止细胞中维持前病毒 DNA 转录无活性的机制为众所周知的。但是，人们长期相信该机制包括染色质 - 相关调控 [Quivy V. 等人 Subcell Biochem.41,371(2007)]。在潜伏的细胞中，整合的前病毒 DNA 在核小体中密集地组成。包含了启动子和增强子元件的 HIV-1 的 5' 长末端重复序列 (LTR)，是大量转录因子结合的目标并且其被组成为两个核小体 (nuc-0 和 nuc-1)。NF κ B p50 同源二聚体，以及 AP-4、YY1 和 LSF1，募集组蛋白脱乙酰酶 (HDAC) 到 LTR，该酶依次造成在染色质致密处的局部的组蛋白的脱乙酰，并且防止 RNA- 聚合酶 II 的组成。

[0005] 组蛋白脱乙酰酶抑制剂 (HDACi)，一种新型的合成化合物，可以灭活 HDACs 的酶活性以及相对抑制 HIV-1 基因表达。而且与 NF κ B 细胞激活剂相反，在没有 T- 细胞常规的活化下，像 IL-2、OKT3 或 TNF α，HDACi 可以促进基因表达。

[0006] 组蛋白脱乙酰酶 (HDACs) 为有能力移除连接在组蛋白 N- 末端部分或其他蛋白中的赖氨酸残基的乙酰基基团的酶。

[0007] 根据结构同源性，HDACs 可以分为四个类型。类型 I HDACs(HDAC 1、2、3 和 8) 与 RPD3 酵母蛋白相似，并且在细胞核中发现它们。类型 II HDACs(HDAC 4、5、6、7、9 和 10) 与 HDA1 酵母蛋白相似，并且在细胞核和细胞质中都发现它们。类型 III HDACs 为与 SIR2 酵母蛋白相关同 NAD- 依赖酶在结构上不同的形式。类型 IV(HDAC 11) 一般由具有特定结构特征的单一的酶组成。类型 I、II 和 IV HDACs 为含锌的酶，并且可以通过不同的分子类型抑制它们：异羟肟酸衍生物、环状四肽、短链脂肪酸、氨基苯甲酰胺、亲电子酮衍生物等。不能通过异羟肟酸抑制类型 III HDACs，其抑制剂结构特征不同于其它类型的抑制剂。

[0008] 为了实现本发明的目的，“组蛋白脱乙酰酶抑制剂”的表述意思是指天然来源、重组或合成、能够抑制至少一种酶（分为类型 I、II 或 IV 组蛋白脱乙酰酶）活性的任意分子。

[0009] 组蛋白脱乙酰酶抑制剂是一种具有抗肿瘤和抗炎活性的分子。

[0010] 在肿瘤细胞中，组蛋白脱乙酰酶抑制剂抑制细胞增殖并且诱导细胞死亡和分化[Gaofeng Bi 和 Guosheng Jiang 在 Cellular&Molecular Immunology 3,285-290(2006)]。

[0011] 组蛋白脱乙酰酶抑制剂也能够通过免疫活性细胞调整细胞因子和其它促炎因子的产物，并且它们已经证明了在体内的抗炎性质[Frédéric Blanchard 和 Céline Chipoy 在 Drug Discovery Today 10,197-204(2005)；IM Adcock 在 British Journal ofPharmacology 150,829-831(2007)]。

[0012] 使用不同的用于肿瘤疾病和炎症疾病抑制剂的大量临床研究目前正在进行中，并且它们处在进程的不同阶段[Marielle Paris 等人在 Journal of Medicinal Chemistry 51,1505-1529(2008)]。

[0013] 在 WO 97/43251（无水形式）和 WO 2004/065355（水合物结晶形式）中描述的二乙基 -[6-(4- 羟基氨甲酰基 - 苯氨甲酰氧甲基)- 萘 -2- 基 - 甲基]- 氯化铵，都并入此处作为参考，它是具有良好抗炎活性的 HDACs 抑制剂；已知这种有效成分的一水合物结晶形式为 ITF2357 和 / 或吉维司他 (Givinostat)。

[0014] WO 2004/063146 和 WO 2006/003068 中公开其它能够抑制 HDAC 酶的 4- 氨基 -N- 羟基 - 羟基苯甲酰胺衍生物，都一并引入此处作为参考。

[0015] 不同的 HDAC 抑制剂被证明能够诱导 HIV-1 基因自潜伏的感染细胞株中表达；但是，在进行诱导所需的浓度下，越来越担心抑制剂可能的毒性作用[Shehu-Xhilaga, M. 等人 AIDS 23,2047(2009)]；对此，最近已经提议[Archin, NM 等人 AIDS 23,1799(2009)]挑选的类型 IHDAC 抑制剂能够成为有效的且较低细胞毒性的 HIV 诱导物。

[0016] 丙戊酸 (VPA)，一种羧酸 HDACi，用于给抽搐和精神病开处方，在某些临床研究中与 HAART 联合但并没有导致潜伏的储器 (reservior) 有任何相当大的减少[Lehrman G 等人 Lancet 366(9485),549(2005)]。因此，这些 VPA 的研究并没有化解 HDACi 消除病毒的可能。

[0017] WO 2008/097654 公开了 SAHA 用于治疗 HIV 感染的应用；SAHA 是不具有 N- 羟基 - 苯甲酰胺结构的 HDACi，其市售为伏立诺他 (Vorinostat) 或佐里扎 (Zolinza)。在 WO 2008/097654（例子 2 和图 1）中提到，在 0.632M 的 EC_{50} 下，SAHA 诱导 HIV-1 在 ACH-2 细胞系中表达。

[0018] 佐里扎包装说明书指出，用 400mg/ 天的剂量就可达到治疗受皮肤 T- 细胞淋巴瘤影响的病人的 SAHA 的可能有效循环浓度。但是，这个剂量下的 SAHA 会造成大量严重的不良反应，例如腹泻、疲倦、恶心、血小板减少、厌食和味觉障碍。而且，根据佐里扎包装说明书上的信息，在体外的细菌回复突变检测（埃姆斯试验）中 SAHA 是诱变性的，在体外的中国仓鼠卵巢细胞 (CHO) 中它会造成染色体畸形，且当对小鼠给药时（老鼠体内微核检测），其提升了微核化红细胞的发生率。

[0019] 因此，很明显需要新的 HIV-1 表达诱导剂，可能是 HDAC 抑制剂，它们有更强的活性和更低的毒性，与公知的有效诱导 HIV-1 基因表达的 HDAC 抑制剂相比，优选地都有更强活性和更低毒性。

发明内容

[0020] 现在已经发现，且其构成了本发明的第一方面，二乙基 -[6-(4- 羟基氨甲酰基 - 苯

氨甲酰氧甲基)-萘-2-基-甲基]-氯化铵，优选一水合物形式，更优选一水合物结晶形式(ITF2357，吉维司他)，在ACH-2细胞系中，在优选125和250nM之间的浓度下，能够诱导HIV-1基因表达。

[0021] ITF2357显示出无诱变性[Monzani，VM等人出席EUROTOX 2007，第44届毒理学大会，海报G33]；在临床治疗中，通过给与50-200mg的ITF2357，可以轻易得到125和250nM之间的治疗循环浓度。该范围的剂量应用于大量的临床研究，并且检测到的毒性作用非常低；1.5mg/kg/天的等价剂量给药于幼年特发性关节炎全身型(SOJIA)的儿童，有令人鼓舞的结果并且没有检测到任何毒性作用。[Vojinovic，J.等人出席第72届美国风湿病年会，圣弗朗西斯科，加利福尼亚，2008年10月29日]。

[0022] 因此发现，本发明第二个方面，某些4-氨基-N-羟基-苯甲酰胺衍生物(包括ITF2357)的HDAC抑制剂，在并没有显示出任何相当大毒性的浓度下，可非常有效地诱导HIV基因表达；这看起来与之前的观点相反[Shehu-Xhilaga，M.等人AIDS 23，2047(2009)]，所述之前观点提出两个作用，HIV基因诱导和毒性，可以取决于相同的结构和/或机械学原因。

[0023] 也已经发现，本发明的第三个方面，在ACH-2细胞系中，于125和250nM之间的浓度下，一些能够抑制HDAC酶的该4-氨基-N-羟基-苯甲酰胺衍生物，在诱导HIV-1基因表达时甚至比ITF2357更加有效。

[0024] 仅仅凭借实施例的方法，如上述WO 2006/003068的实施例2中所述，在ACH-2细胞中，于250nM下，4-(2(S)-苯甲酰氨基-3-萘-2-基-丙酰氨基)-N-羟基-苯甲酰胺(化合物g)和苯并[1,3]二氧杂环戊烯-5-羧酸[1(S)-(4-羟基氨甲酰基-苯氨基甲酰基)-2-萘-2-基-乙基]-酰胺(化合物t)，诱导HIV表达提升30倍，高于用相同浓度的ITF2357得到的15倍的提升。

[0025] 以下的化学结构：

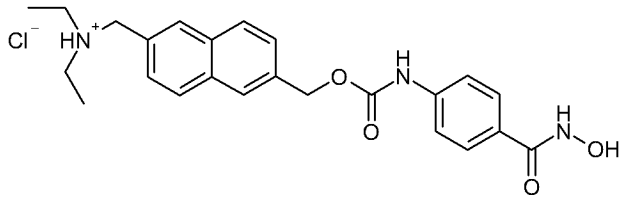
[0026] •二乙基-[6-(4-羟基氨甲酰基-苯氨甲酰氧甲基)-萘-2-基-甲基]-氯化铵；

[0027] •4-(2-(S)-苯甲酰氨基-3-萘-2-基-丙酰氨基)-N-羟基-苯甲酰胺(化合物g)；和

[0028] •苯并[1,3]二氧杂环戊烯-5-羧酸[1(S)-(4-羟基氨甲酰基-苯氨基甲酰基)-2-萘-2-基-乙基]-酰胺(化合物t)；

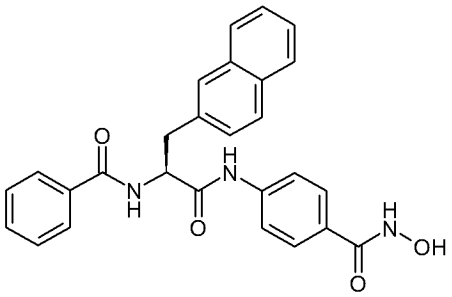
[0029] 在下文示出。

[0030]



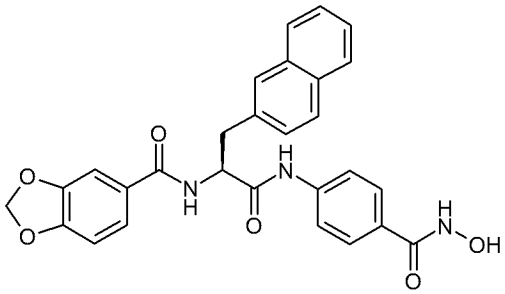
[0031] 二乙基-[6-(4-羟基氨甲酰基-苯氨甲酰氧甲基)-萘-2-基-甲基]-氯化铵；

[0032]



[0033] 化合物 g

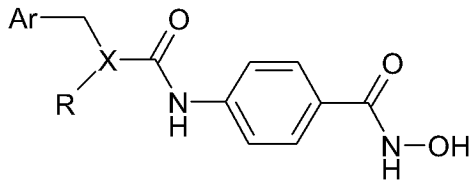
[0034]



[0035] 化合物 t

[0036] 因此，本发明的目的在于提供用于治疗 HIV 感染，优选 HIV-1 感染的通式 I 化合物。

[0037]



[0038] (I)

[0039] 其中：

[0040] X 为 O、CH 或其空缺；

[0041] Ar 为芳基或饱和、不饱和或部分不饱和的单 -、二 -、三环碳环残基、或饱和、不饱和或部分不饱和的单 -、二 -、三环杂环残基，所述杂环残基包括一个或更多个选自 N、S 和 O 的杂原子；所述碳环或杂环芳基残基任选地用一个或更多个相同或不同的卤素、C_1-C_4 烷基、C_1-C_4 烷氧基、C_1-C_4 卤烷基、烷基磺酰基、环烷基、(环烷基)烷基、酰基、氨基、(C_1-C_4) 单 - 或二烷氨基、用 C_1-C_4 烷基单 - 或二取代的 (C_1-C_4) 氨烷基、羧基、C_1-C_4 烷氧羧基、巯基烷氧基、巯基苯氧基、硝基、氰基、氧基、全氟烃氧基、全氟烃基、苯基、苯氧基、苯基烷氧基、苯甲酸基、苯基烷基、苯甲酰基、苯磺酸基和羟基取代；

[0042] R 为空缺或其为 R^1-CO-NH- 残基；

[0043] 其中 R^1 是芳基、芳烷基、直链或支链 C_1-C_4 烷基、或饱和、不饱或部分不饱和单 -、二 -、三环碳环残基、或饱和、不饱和或部分不饱和的单 -、二 -、三环杂环残基，所述杂环残基包括一个或更多个选自 N、S 和 O 的杂原子；所述芳基、芳烷基、直链或支链 C_1-C_4 烷基、碳环或杂环残基中的一个或更多个残基任选地，彼此相同或不同地选自：卤素、C_1-C_4 烷基、C_1-C_4 烷氧基、C_1-C_4 卤烷基、烷基磺酰基、环烷基、(环烷基)烷基、酰基、氨基、(C_1-C_4) 单 - 或二烷氨基、用 C_1-C_4 烷基单 - 或二取代的 (C_1-C_4) 氨烷基、羧基、C_1-C_4 烷氧羧基、巯基烷氧基、

巯基苯氧基、硝基、氰基、氧基、全氟烃氧基、全氟烃基、苯基、苯氧基、苯基烷氧基、苯甲酸基、苯基烷基、苯甲酰基、苯磺酸基和羟基。

[0044] 根据本发明优选的实施方式，

[0045] X 为 O 或 CH，

[0046] Ar 为 6- 二乙基氨基甲基 - 萘 -2- 基或萘 -2- 基。

[0047] 最优选化合物为 ：

[0048] • 二乙基 -[6-(4- 羟基氨甲酰基 - 苯基 - 氨甲酰氧甲基)- 萘 -2- 基 - 甲基]- 氯化铵，优选为一水合物形式，更优选为一水合物结晶形式 ；

[0049] • 4-(2-(S)- 苯甲酰氨基 -3- 萘 -2- 基 - 丙酰氨基)-N- 羟基 - 苯甲酰胺 ；和 / 或

[0050] • 苯并 [1,3] 二氧杂环戊烯 -5- 羧酸 [1(S)-(4- 羟基氨甲酰基 - 苯氨基甲酰基)-2- 萘 -2 基 - 乙基]- 酰胺。

[0051] 通式 I 化合物主要旨在于人用药，优选以得到 125 和 250nM 之间的血液浓度 ；优选地，该化合物用药剂量为 50 到 200mg/ 天，更加优选为 100 到 200mg/ 天。

[0052] 根据实施方式，其在每天两次，50mg，到每天一次 200mg 范围内的剂量给药。

[0053] 根据另一个实施方式，其与至少一种抗逆转录病毒剂联合和 / 或时间接近给药 ；优选的抗逆转录病毒剂包括核苷逆转录酶抑制剂、非核苷逆转录酶抑制剂、蛋白酶抑制剂、融合抑制剂、进入抑制剂、整合酶抑制剂、辅助受体拮抗剂、病毒吸附抑制剂、病毒特异性转录抑制剂和 / 或细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂 ；最优选的抗逆转录病毒剂是依法韦仑 (efavirenz)、硫酸茚地那韦 (indinavir sulfate) 和 / 或拉替拉韦钾 (raltegravir potassium)。

具体实施方式

[0054] 实施例 1

[0055] 在 ACH-2 细胞系中诱导 HIV-1 表达

[0056] ACH2 细胞是通过美国国立卫生研究院 AIDS 研究与参考试剂计划 (AIDS Research and Reference Reagent Program)，AIDS 分部，美国国家过敏症与传染病研究所，贝塞斯达，马里兰州获得的。细胞在烧瓶中培养，在 RPMI 中冲洗并在浓度为 2×10^6 细胞 /mL 的 RPMI/10％ FCS 中再次悬浮。250μL 的细胞、200μL 的培养基和 50μL 的不同浓度 (从 0 到 250nM) 的 HDAC 抑制剂溶液，包含 0.01％ DMSO，等量分在 48 孔聚苯乙烯组织培养板 (Falcon，Lincoln Park，NJ) 中。在 37℃ /5％ CO_2 中孵育 24 小时后，移除 50μL 的上清液用于乳酸脱氢酶 (LDH) 的细胞毒性检测，并且 Triton-X-100(0.5％ vol/vol 最终浓度) 加入到每个培养物中。裂解物的 p24 检测立即进行。

[0057] 24 小时后通过 LDH 的活性确认细胞死亡，与相对于未处理的细胞而暴露在 HDAC 抑制剂的细胞没有相当大的不同。

[0058] 使用之前描述 [Nold M.F. 等人 J. Immunol.181,557(2008)] 的固定在磁性玻璃粉的特异性抗体来测定 p24。将没有 HDAC 抑制剂的每个实验的 p24 水平固定在 1.0，并且计算每个实验和每个类似物的倍数量的增长值。结果在下表中示出。

[0059] 表 1 ：相对于对照试验所得水平，存在抑制剂下 p24 水平表达的倍数量的增长

[0060]

对照 (nM)	ITF2357	化合物 g	化合物 t
31	1	2	1
63	1	3	2
125	2	10	10
250	15	27	33

[0061]

[0062] 实施例 2

[0063] 组蛋白脱乙酰酶亚型的抑制作用

[0064] 从 BPS Biosciences(CA, USA) 获取重组人酶。使用 Fluor-de-Lys 荧光合成底物 (Enzo Life Sciences, Plymouth Meeting, PA) 检测类型 I 的 HDAC1、2、3 的亚型 ;类型 IIb 的 HDAC6、10 和类型 IV 的 HDAC11。用 Boc-L-Lys(Tfa)-MCA(TFAL) 衍生物 (描述为这些酶的特殊底物 [Jones P. 等人 Bioorg Med Chem Lett. 18, 3456(2008)]) 检测类型 IIa 的 HDAC4、7、9 的亚型。根据制造商的指示, 使用 HDAC8 荧光药物发现仪 (Fluorimetric Drug Discovery Kit)(Enzo) 进行重组人 HDAC8 检测。每个抑制剂溶解在 DMSO 中并且然后进一步在检测缓冲液中稀释。DMSO 浓度低于 0.5％不会影响检测的活性。检测是通过在 37℃下用抑制剂预孵育每个酶 15 分钟来进行。通过在 37℃下加入底物开始反应并且反应允许进行 60 分钟。通过加入 50μL 的包含曲古抑菌素 A4μM 的二倍浓缩显影液 2(Enzo) 以产生荧光标记。在 355nm(激发光) 和 460nm(散射光) 波长下检测生成的荧光。

[0065] 结果, 表示成 IC_{50}(降低酶活性 50％所需的浓度), 在下表中示出 (SAHA 值也测定并在表中示出)。

[0066] 表 2 :对于每个 HDAC 亚型的抑制剂的 IC_{50}(nM) 值

[0067]

ITF	hHD1	hHD2	hHD3	hHD4	hHD6	hHD7	hHD8	hHD9	hHD10	hHD11
ITF2357	116.7	119.3	124.0	724	411.0	612.8	940.0	518.0	351.0	307.0
化合物 g	54.7	12.0	245.8	3,107	3,622	2,021	491.9	4,153	132.1	441.4
化合物 t	71.5	29.5	107.2	> 10,000	618.2	8,621	161.6	> 10,000	275.8	336.3
SAHA	77.9	287.4	166.9	> 10,000	471.0	> 10,000	1,676	> 10,000	152.0	187.8