

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

A61K 31/42 (2006.01)

A61K 31/335 (2006.01)



# [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680017728.9

[43] 公开日 2009年7月29日

[11] 公开号 CN 101495116A

[22] 申请日 2006.3.22

[21] 申请号 200680017728.9

[30] 优先权

[32] 2005.3.22 [33] US [31] 60/664,470

[86] 国际申请 PCT/US2006/010676 2006.3.22

[87] 国际公布 WO2006/102557 英 2006.9.28

[85] 进入国家阶段日期 2007.11.22

[71] 申请人 哈佛大学校长及研究员协会

地址 美国马萨诸塞州

共同申请人 达纳-法伯癌症研究所有限公司

[72] 发明人 肯尼思·C·安德森

詹姆斯·埃利奥特·布拉德纳

爱德华·富兰克林·格林伯格

秀岛辉

尼古拉斯·保罗·克维亚特科夫斯基

拉尔夫·马齐切克

斯图尔特·L·施赖伯 贾里德·肖

[74] 专利代理机构 北京律盟知识产权代理有限公司

代理人 刘国伟

权利要求书 20 页 说明书 89 页 附图 62 页

[54] 发明名称

蛋白降解病症的治疗

[57] 摘要

本发明涉及治疗诸如细胞增殖病症(例如癌症)和蛋白沉积病症(例如神经退化性病症)等蛋白降解病症的方法。本发明提供使用聚集体抑制剂或聚集体抑制剂与蛋白酶体抑制剂的组合治疗这些疾病的方法和医药组合物。本发明此外涉及治疗多发性骨髓瘤的方法和医药组合物。还提供了新颖 HDAC/TDAC 抑制剂和聚集体抑制剂以及制备这些化合物的合成方法。

1. 一种治疗罹患或容易罹患蛋白降解病症的个体的方法,其包含向有需要的个体投与治疗有效量的蛋白降解抑制剂。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述蛋白降解病症为细胞增殖病症或蛋白沉积病症。
3. 根据权利要求2所述的方法,其中所述细胞增殖病症为癌症。
4. 根据权利要求3所述的方法,其中所述癌症为多发性骨髓瘤、白血病、淋巴瘤、乳腺癌、肺癌和肝癌中的一种或一种以上。
5. 根据权利要求3所述的方法,其中所述癌症为多发性骨髓瘤。
6. 根据权利要求2所述的方法,其中所述蛋白沉积病症为威尔逊病(Wilson's disease)、脊髓小脑运动失调、朊病毒疾病、帕金森氏病(Parkinson's disease)、亨廷顿氏病(Huntington's disease)、家族性肌萎缩侧索硬化、淀粉样变性、阿兹海默氏病(Alzheimer's disease)、亚历山大氏病(Alexander's disease)、酒精性肝病、囊性纤维化、匹克氏病(Pick's disease)或路易体痴呆(Lewy body dementia)。
7. 根据权利要求1所述的方法,其中所述蛋白降解抑制剂为蛋白酶体抑制剂与聚集体抑制剂的组合。
8. 根据权利要求7所述的方法,其中所述蛋白酶体抑制剂为硼替佐米(bortezomib)(万珂(VELCADE))。
9. 一种治疗表现蛋白降解病症症状的细胞的方法,其包含向所述细胞投与治疗有效量的蛋白降解抑制剂。
10. 根据权利要求9所述的方法,其中所述细胞为一种或一种以上来自个体的细胞或培养细胞。
11. 根据权利要求10所述的方法,其中所述来自个体的细胞为骨髓基质细胞(BMSC)、周边血液单核细胞(PBMC)、淋巴细胞、毛囊、血球、其他上皮细胞、骨髓浆细胞、原发癌细胞、患者源肿瘤细胞、正常或癌性造血干细胞、神经干细胞、实体肿瘤细胞或星形细胞中的一种或一种以上。
12. 根据权利要求10所述的方法,所述培养细胞为MM.1S、U266、RPMI8226、DOX40、MM.1R、INA-6、LR5、原发和确立癌细胞系、原发和确立正常细胞系中的一种或一种以上。
13. 一种治疗罹患或容易罹患多发性骨髓瘤的个体的方法,其包含向有需要的个体投与

治疗有效量的蛋白降解抑制剂，从而治疗罹患或容易罹患多发性骨髓瘤的个体。

14. 一种评定个体的蛋白降解病症治疗功效的方法，其包含：

测定一种或一种以上治疗前表型；

向所述个体投与治疗有效量的蛋白降解抑制剂；和

在用所述蛋白降解抑制剂治疗的初始时期后测定所述一种或一种以上表型，

其中所述一种或一种以上表型的调节指示蛋白降解抑制剂的治疗功效。

15. 一种监控正用聚集体抑制剂治疗的个体的进展的方法，其包含：

测定一种或一种以上治疗前表型；

向所述个体投与治疗有效量的聚集体抑制剂；和

在用所述聚集体抑制剂治疗的初始时期后测定一种或一种以上表型，

其中一种或一种以上表型的调节指示聚集体抑制的治疗功效。

16. 一种选择用蛋白降解抑制剂治疗的患有蛋白降解病症的个体的方法，其包含：

测定一种或一种以上治疗前表型；

向所述个体投与治疗有效量的蛋白降解抑制剂；

在用所述蛋白降解抑制剂治疗的初始时期后测定所述一种或一种以上表型，

其中所述一种或一种以上表型的调节指示所述病症可能对用蛋白降解抑制剂治疗具有有利的临床反应。

17. 根据权利要求 1-16 中任一权利要求所述的方法，其中所述蛋白降解抑制剂选自由

以下各物组成的群组：突巴新（tubacin）、硼替佐米、SAHA、R115777 FTI、

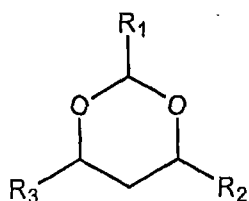
<sup>166</sup>Holminun-DOTMP、三氧化二砷、17-AAG、MG132、sapojargon 和 NPI-0052。

18. 根据权利要求 1-16 中任一权利要求所述的方法，其中所述蛋白降解抑制剂抑制

HDAC6。

19. 根据权利要求 1-16 中任一权利要求所述的方法，其中所述蛋白降解抑制剂具有下

式：



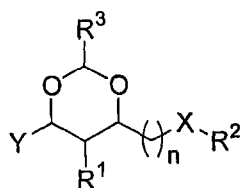
其中

$R_1$  为环状或非环状、经取代或未经取代、分支或未分支的脂肪族部分；环状或非环状、经取代或未经取代、分支或未分支的杂脂肪族部分；经取代或未经取代、分支或未分支的酰基；经取代或未经取代、分支或未分支的芳基；经取代或未经取代、分支或未分支的杂芳基； $-OR_A$ ； $-C(=O)R_A$ ； $-CO_2R_A$ ； $-SR_A$ ； $-SOR_A$ ； $-SO_2R_A$ ； $-N(R_A)_2$ ； $-NHC(O)R_A$  或  $-C(R_A)_3$ ；其中  $R_B$  每次出现时独立为氢、保护基、脂肪族部分、杂脂肪族部分、酰基部分、芳基部分、杂芳基部分、烷氧基、芳氧基、烷硫基、芳硫基、氨基、烷基氨基、二烷基氨基、杂芳氧基或杂芳硫基部分；

$R_2$  为氢；卤素；环状或非环状、经取代或未经取代、分支或未分支的脂肪族部分；环状或非环状、经取代或未经取代、分支或未分支的杂脂肪族部分；经取代或未经取代、分支或未分支的酰基；经取代或未经取代、分支或未分支的芳基；经取代或未经取代、分支或未分支的杂芳基； $-OR_B$ ； $-C(=O)R_B$ ； $-CO_2R_B$ ； $-CN$ ； $-SCN$ ； $-SR_B$ ； $-SOR_B$ ； $-SO_2R_B$ ； $-NO_2$ ； $-N(R_B)_2$ ； $-NHC(O)R_B$  或  $-C(R_B)_3$ ；其中  $R_B$  每次出现时独立为氢、保护基、脂肪族部分、杂脂肪族部分、酰基部分、芳基部分、杂芳基部分、烷氧基、芳氧基、烷硫基、芳硫基、氨基、烷基氨基、二烷基氨基、杂芳氧基或杂芳硫基部分；且

$R_3$  为氢；卤素；环状或非环状、经取代或未经取代、分支或未分支的脂肪族部分；环状或非环状、经取代或未经取代、分支或未分支的杂脂肪族部分；经取代或未经取代、分支或未分支的酰基；经取代或未经取代、分支或未分支的芳基；经取代或未经取代、分支或未分支的杂芳基； $-OR_C$ ； $-C(=O)R_C$ ； $-CO_2R_C$ ； $-CN$ ； $-SCN$ ； $-SR_C$ ； $-SOR_C$ ； $-SO_2R_C$ ； $-NO_2$ ； $-N(R_C)_2$ ； $-NHC(O)R_C$  或  $-C(R_C)_3$ ；其中  $R_C$  每次出现时独立为氢、保护基、脂肪族部分、杂脂肪族部分、酰基部分、芳基部分、杂芳基部分、烷氧基、芳氧基、烷硫基、芳硫基、氨基、烷基氨基、二烷基氨基、杂芳氧基或杂芳硫基部分；以及其医药学上可接受的盐和衍生物。

20. 根据权利要求 1-16 中任一权利要求所述的方法，其中所述蛋白降解抑制剂具有下式：



以及其医药学上可接受的衍生物；

其中  $R^1$  为氢或脂肪族、脂环族、杂脂肪族、杂环、芳香族或杂芳香族部分；

$n$  为 1-5；

$R^2$  为氢、保护基或脂肪族、脂环族、杂脂肪族、杂环、芳香族或杂芳香族部分；

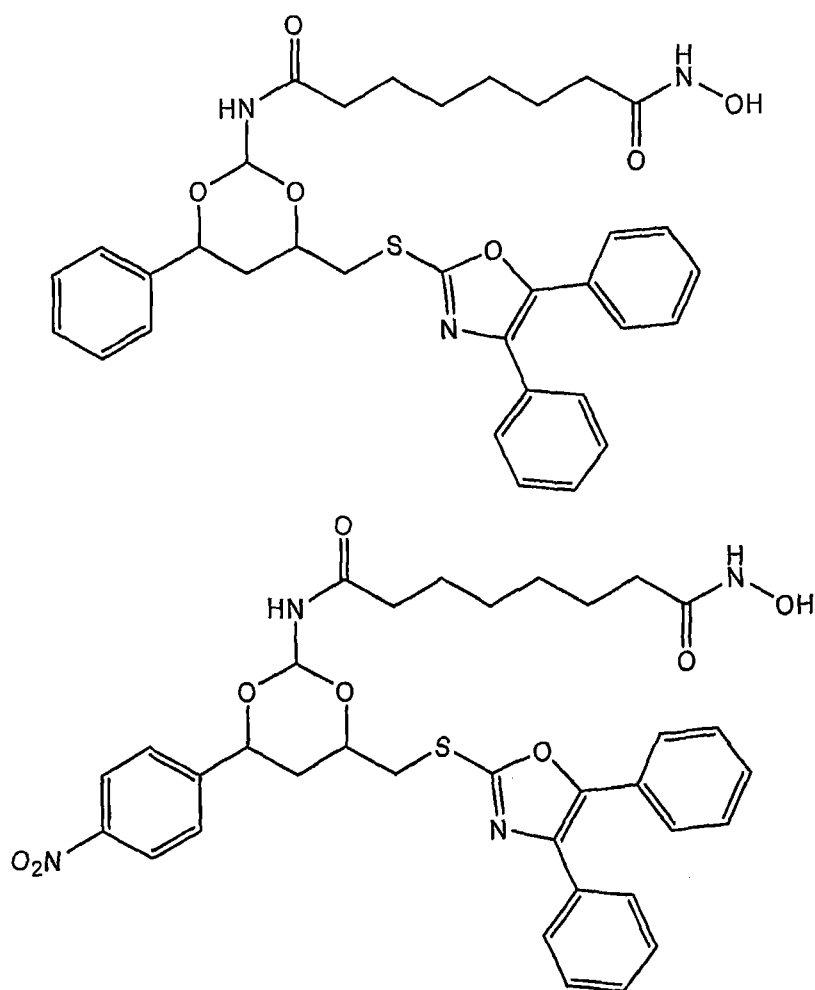
$X$  为  $-O-$ 、 $-C(R^{2A})_2-$ 、 $-S-$  或  $-NR^{2A}-$ ，其中  $R^{2A}$  为氢、保护基或脂肪族、脂环族、杂脂肪族、杂环、芳香族或杂芳香族部分；

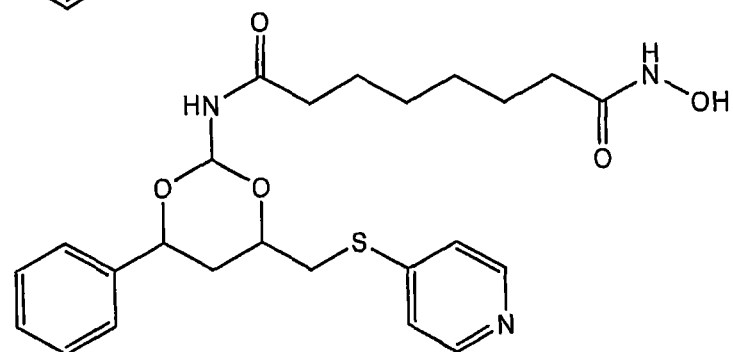
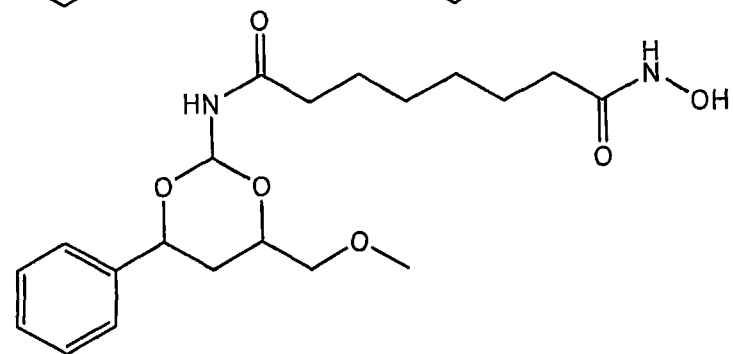
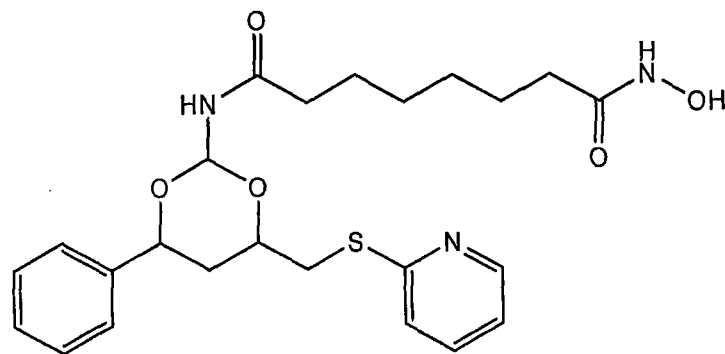
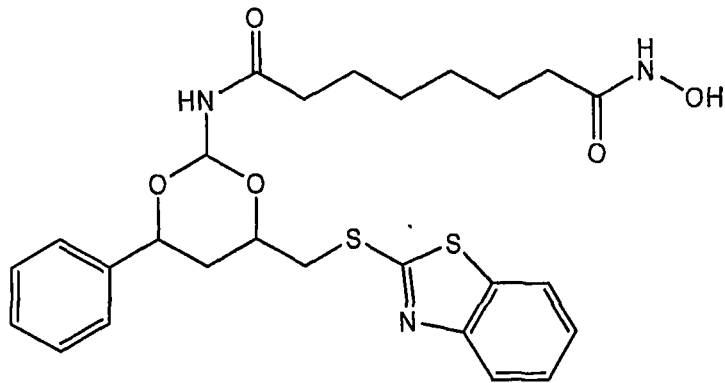
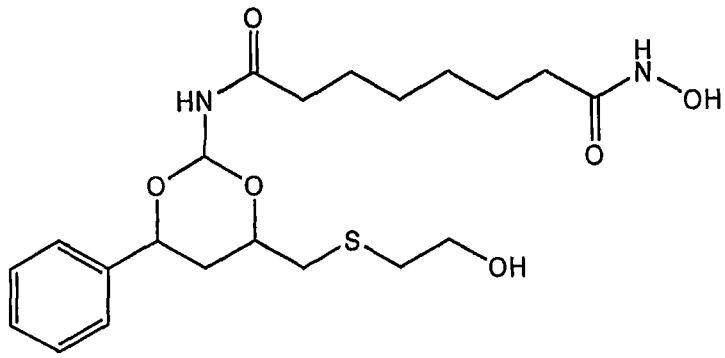
或其中两个或两个以上出现的  $R^2$  和  $R^{2A}$  一起形成脂环族或杂环部分、或芳基或杂芳基部分；

$R^3$  为脂肪族、脂环族、杂脂肪族、杂环、芳香族或杂芳香族部分；且

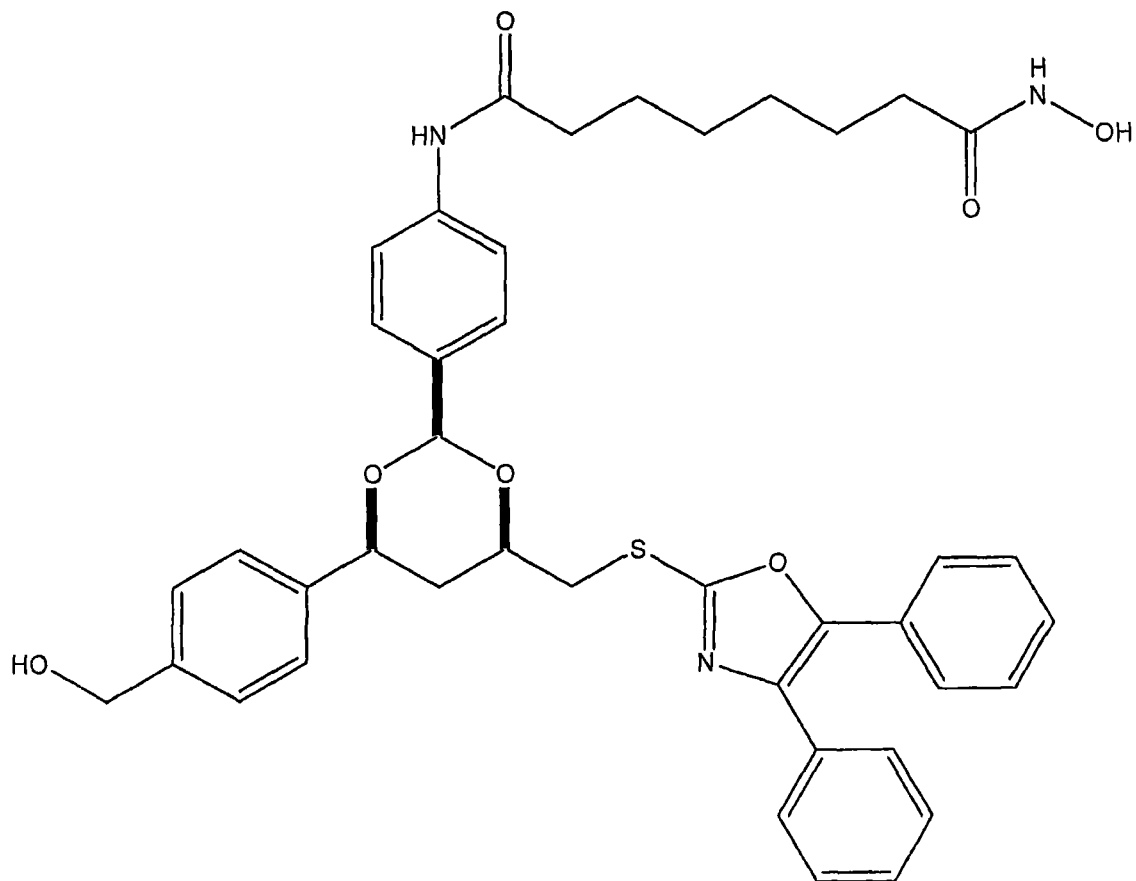
$Y$  为氢或脂肪族、脂环族、杂脂肪族、杂环、芳香族或杂芳香族部分。

21. 根据权利要求 1-16 中任一权利要求所述的方法，其中所述蛋白降解抑制剂为具有下式中的一个：

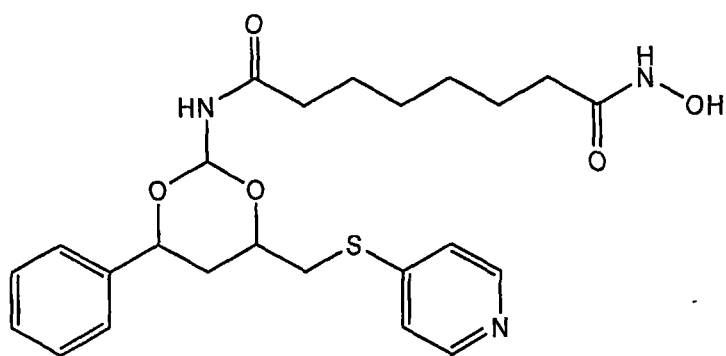




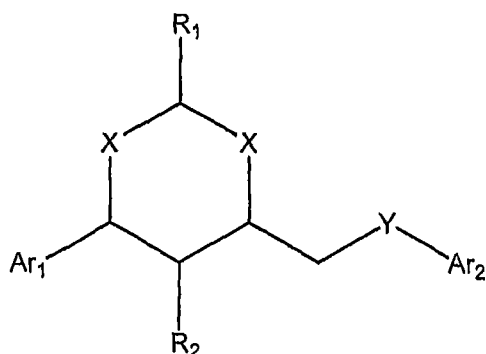
22. 根据权利要求 1-16 中任一权利要求所述的方法, 其中所述蛋白降解抑制剂为下式的化合物:



23. 根据权利要求 1-16 中任一权利要求所述的方法, 其中所述蛋白降解抑制剂具有下式:



24. 根据权利要求 1-16 中任一权利要求所述的方法, 其中所述蛋白降解抑制剂为下式的化合物:



其中，

X 各自独立为 O、S、CH<sub>2</sub> 或 NR<sub>3</sub>；

Y 为 O、S、CH<sub>2</sub> 或 NR<sub>4</sub>；

Ar<sub>1</sub> 和 Ar<sub>2</sub> 各自独立为芳基；

R<sub>1</sub> 为低碳烷基或芳基；

R<sub>2</sub> 为氢、低碳烷基或芳基；且

R<sub>3</sub> 为氢、低碳烷基、芳基、烷基羰基、烷氧羰基或氨基羰基。

25. 根据权利要求 24 所述的方法，

其中，

X 两次出现均为 O；

Y 为 S；

Ar<sub>1</sub> 为苯基或经取代的苯基；

Ar<sub>2</sub> 为杂芳基，更优选为经视情况取代的噁唑基；

R<sub>1</sub> 为苯基或经取代的苯基，更优选为 4-氨基取代的苯基；

R<sub>2</sub> 为氢。

26. 根据权利要求 1-16 中任一权利要求所述的方法，其中所述蛋白降解抑制剂抑制 HDAC6 酶活性，从而抑制聚集体介导的蛋白降解。

27. 根据权利要求 26 所述的方法，其中所述蛋白降解抑制剂抑制 HDAC6 的 C 端乙酰化活性，从而抑制聚集体介导的蛋白降解。

28. 根据权利要求 1-16 所述的方法，其中所述蛋白降解抑制剂为聚集体抑制剂。

29. 根据权利要求 1-16 所述的方法，其中所述蛋白降解抑制剂为蛋白酶体抑制剂。

30. 根据权利要求 29 所述的方法，其中所述蛋白酶体抑制剂为硼替佐米、MG132、sajojargon 或 NPI-0052 中的一种或一种以上。

31. 根据权利要求 1-16 中任一权利要求所述的方法，其中所述蛋白降解抑制剂为来源于 HDAC6、动力蛋白的肽、HDAC6 的 N 端肽或 HDAC6 的 C 端肽。
32. 根据权利要求 31 所述的方法，其中所述 C 端 HDAC6 肽足以调节细胞的表型。
33. 根据权利要求 14-16 中任一权利要求所述的方法，其中所述表型可为响应特定治疗或化合物的生物或临床结果，其包括贫血、血小板减少、中性粒细胞减少、溶骨病变、骨痛、免疫机能缺陷、肾机能不全、血钙过多、成熟浆细胞异倍性、恶性细胞百分数、微管蛋白的乙酰化状态、成熟浆细胞的细胞凋亡、成熟浆细胞中聚集体的含量、成熟浆细胞中 HDAC6 泛素化、与成熟浆细胞中动力蛋白有关的 HDAC6、成熟浆细胞中细胞的泛素化蛋白含量、成熟浆细胞中卡斯蛋白酶-8 含量、成熟浆细胞中 PARP 含量、成熟浆细胞中胸苷吸收量、膨胀的 ER 池、成熟浆细胞凝集、成熟浆细胞中免疫球蛋白沉淀、非组蛋白蛋白质的乙酰化状态、细胞蛋白的整体泛素化状态、细胞周期调控状态、坏疽、细胞凋亡标示物、细胞凋亡状态、罗氏小体形成 (Russell body formation)、囊性纤维化跨膜蛋白受体状态和细胞蛋白沉淀的调节或细胞或细胞外蛋白的整体乙酰化状态。
34. 根据权利要求 33 所述的方法，其中聚集体含量、血小板减少、中性粒细胞减少、溶骨病变、骨痛、免疫机能缺陷、肾机能不全、血钙过多、成熟浆细胞异倍性、恶性细胞百分数、成熟浆细胞中胸苷吸收量、成熟浆细胞中全长卡斯蛋白酶-8 含量、成熟浆细胞中全长 PARP 含量或成熟浆细胞凝集中的一种或一种以上的减少指示所述治疗为有效的。
35. 根据权利要求 33 所述的方法，其中微管蛋白的乙酰化状态、成熟浆细胞中的 HDAC6 泛素化、裂解形式卡斯蛋白酶-8 的含量、裂解形式 PARP 的含量、坏疽、非组蛋白蛋白质的乙酰化状态、细胞泛素化水平、细胞凋亡、细胞凋亡标示物、细胞周期调控异常或成熟浆细胞中免疫球蛋白沉淀的增加指示所述治疗为有效的。
36. 根据权利要求 1-16 所述的方法，其进一步包含自个体获得生物样品。
37. 根据权利要求 1-16 所述的方法，其进一步包含在用所述蛋白降解抑制剂治疗的第二时期后测定所述个体的表型。
38. 根据权利要求 1-16 所述的方法，其进一步包含自所述个体获得第二生物样品。
39. 根据权利要求 1-16 中任一权利要求所述的方法，其进一步包含向所述个体或细胞投与治疗有效量的一种或一种以上的其他蛋白降解抑制剂。
40. 根据权利要求 39 所述的方法，其中所述其他蛋白降解抑制剂中的至少一种为聚集体抑制剂。

41. 根据权利要求 39 所述的方法，其中所述其他蛋白降解抑制剂中的至少一种为蛋白酶体抑制剂。
42. 根据权利要求 39 所述的方法，其中所述其他蛋白降解抑制剂为硼替佐米、突巴新、MG132、saporin 或 NPI-0052 中的一种或一种以上。
43. 根据权利要求 1-16 中任一权利要求所述的方法，其进一步包含监控所述细胞或个体的治疗或进展。
44. 根据权利要求 1-16 中任一权利要求所述的方法，其进一步包含获得所述蛋白降解抑制剂。
45. 根据权利要求 1-16 中任一权利要求所述的方法，其进一步包含向所述个体共同投与化学治疗剂、辐射剂、激素剂、生物制剂或消炎剂中的一种或一种以上。
46. 根据权利要求 45 所述的方法，其中所述化学治疗剂为他莫昔芬 (tamoxifen)、曲妥珠单抗 (trastuzumab)、拉洛昔芬 (raloxifene)、阿霉素 (doxorubicin)、氟尿嘧啶/5-FU、帕米膦酸二钠 (pamidronate disodium)、阿纳托唑 (anastrozole)、依西美坦 (exemestane)、环磷酰胺、表阿比星 (epirubicin)、雷曲唑 (letrozole)、托瑞米芬 (toremifene)、氟维司群 (fulvestrant)、氟甲睾酮 (flouxymesterone)、曲妥珠单抗 (trastuzumab)、甲胺喋呤 (methotrexate)、醋酸甲地孕酮 (megastrol acetate)、多烯紫杉醇 (docetaxel)、太平洋紫杉醇 (paclitaxel)、睾内酪 (testolactone)、氮丙啶 (aziridine)、长春花碱 (vinblastine)、卡培他滨 (capecitabine)、醋酸高塞勒瑞 (goselerin acetate)、唑来膦酸 (zoledronic acid)、紫杉醇 (taxol)、长春花碱或长春新碱。
47. 根据权利要求 1-16 中任一权利要求所述的方法，其进一步包含将一种或一种以上治疗前或治疗后表型与标准表型进行比较。
48. 根据权利要求 47 所述的方法，其中所述标准表型为参考细胞或细胞群体中的相应表型。
49. 根据权利要求 48 所述的方法，其中所述参考细胞为一种或一种以上的以下细胞：来自个体的细胞、培养细胞、来自个体的培养细胞或来自治疗前个体的细胞。
50. 根据权利要求 49 所述的方法，其中所述来自个体的细胞为骨髓基质细胞 (BMSC)、周边血液单核细胞 (PBMC)、淋巴细胞、毛囊、血球、其他上皮细胞、骨髓浆细胞、原发癌细胞、患者源肿瘤细胞、正常或癌性造血干细胞、神经干细胞、实体肿瘤细胞或星形细胞。
51. 一种抑制细胞中聚集体介导的蛋白降解的方法，其包含使所述细胞与聚集体抑制剂

接触。

52. 根据权利要求 51 所述的方法，其中所述聚集体蛋白降解是由 HDAC6 介导。
53. 根据权利要求 51 所述的方法，其进一步包含抑制所述细胞中的蛋白酶体蛋白降解。
54. 根据权利要求 51 所述的方法，其中所述聚集体抑制剂为突巴新、根据权利要求 16 所述的化合物或通过根据权利要求 47 所述的方法识别的化合物。
55. 一种识别抑制细胞中蛋白降解的候选化合物的方法，其包含：  
使表现聚集体形成的细胞与候选化合物接触，和  
测定所述细胞的表型，其中所述表型的调节指示所述化合物的功效。
56. 根据权利要求 55 所述的方法，其中所述候选分子为小分子、肽或核酸中的一种或一种以上。
57. 根据权利要求 56 所述的方法，其中所述核酸为 RNA、mRNA、RNAi、siRNA 或 DNA。
58. 根据权利要求 55 所述的方法，其中所述肽为来源于 HDAC6、HDAC6 的动力蛋白结合结构域、HDAC6 的 TDAC 结构域、HDAC6 的 N 端或 HDAC6 的 C 端的肽。
59. 根据权利要求 55 所述的方法，其中所述小分子包含于多通道阵列库中。
60. 根据权利要求 55 所述的方法，其中所述测定所述表型的步骤是通过基于影像的多维筛选进行。
61. 一种评价测试化合物的方法，其包含：  
使表现聚集体形成的细胞与测试化合物接触，和  
在接触后评价所述细胞，其中一种或一种以上表型的调节与参考值的相关性指示所述测试化合物可用作蛋白降解病症治疗。
62. 根据权利要求 51-61 中任一权利要求所述的方法，其进一步包含用所述蛋白降解抑制剂治疗的初始时期后测定所述细胞的表型。
63. 根据权利要求 51-61 所述的方法，其中所述表型为响应特定治疗或化合物的生物或临床结果，其包括贫血、血小板减少、中性粒细胞减少、溶骨病变、骨痛、免疫功能缺陷、肾机能不全、血钙过多、成熟浆细胞异倍性、恶性细胞百分数、微管蛋白的乙酰化状态、成熟浆细胞的细胞凋亡、聚集体含量、成熟浆细胞中聚集体含量、HDAC6 泛素化、成熟浆细胞中 HDAC6 泛素化、与成熟浆细胞中动力蛋白有关的 HDAC6、成熟浆细胞中细胞的泛素化蛋白含量、成熟浆细胞中卡斯蛋白酶-8 含量、成熟浆细胞中 PARP 含量、成熟浆细胞中胸苷吸收量、膨胀的 ER 池、成熟浆细胞凝集、成熟浆细胞中免疫球蛋白沉淀、非组蛋白蛋白质的乙酰化状态、细胞蛋白的

整体泛素化状态、细胞周期调控状态、坏疽、细胞凋亡标示物、细胞凋亡状态、罗氏小体形成、囊性纤维化跨膜蛋白受体状态和细胞蛋白沉淀的调节或细胞和细胞外蛋白的整体乙酰化状态。

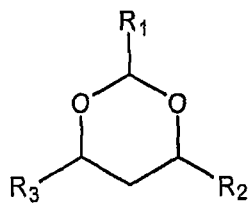
64. 根据权利要求 63 所述的方法，其中贫血、聚集体含量、血小板减少、中性粒细胞减少、溶骨病变、骨痛、免疫机能缺陷、肾机能不全、血钙过多、成熟浆细胞异倍性、恶性细胞百分数、成熟浆细胞中胸苷吸收量、成熟浆细胞中全长卡斯蛋白酶-8 含量、成熟浆细胞中全长 PARP 含量或成熟浆细胞凝集中的一种或一种以上的减少指示所述治疗为有效的。
65. 根据权利要求 63 所述的方法，其中微管蛋白的乙酰化状态、整体乙酰化状态、非组蛋白蛋白质的乙酰化状态、成熟浆细胞中 HDAC6 泛素化、裂解形式卡斯蛋白酶-8 的含量、裂解形式 PARP 的含量、坏疽、非组蛋白蛋白质的乙酰化状态、细胞泛素化水平、细胞凋亡、细胞凋亡标示物、细胞周期调控异常或成熟浆细胞中免疫球蛋白沉淀的增加指示所述治疗为有效的。
66. 根据权利要求 63 所述的方法，其中所述评价是通过基于影像的多维筛选进行。
67. 根据权利要求 61 所述的方法，其中所述测试化合物为小分子、肽或核酸中的一种或一种以上。
68. 根据权利要求 1-61 中任一权利要求所述的方法，其中所述个体或所述细胞为人类。
69. 一种用于治疗个体的蛋白降解病症的试剂盒，其包含：

根据权利要求 91 所述的化合物或其医药学上可接受的酯、盐和前药；和  
使用说明书。
70. 根据权利要求 69 所述的试剂盒，其中所述化合物是以包含治疗有效量的所述化合物和医药学上可接受的载剂的医药组合物形式存在。
71. 一种包装组合物，其包含治疗有效量的蛋白降解抑制剂和医药学上可接受的载剂或稀释剂，其中所述组合物经调配以治疗罹患或容易罹患蛋白降解病症的个体且所述组合物与治疗罹患或容易罹患蛋白降解病症的个体的说明书一起包装。
72. 一种分离核酸分子，其编码来源于 HDAC6 的多肽，其中所述多肽在表现聚集体的细胞中表达时产生蛋白降解的抑制作用。
73. 根据权利要求 72 所述的分离核酸，其中所述核酸来源于编码 HDAC6 的 C 端、HDAC6 的氨基酸 439-503、HDAC6 的氨基酸 500-790、HDAC6 的氨基酸 781-931 或氨基酸 1-460 的核酸。
74. 根据权利要求 72 或 73 所述的分离核酸，其与 HDAC6 的 C 端、HDAC6 的氨基酸

- 439-503、HDAC6 的氨基酸 500-790、HDAC6 的氨基酸 781-931 或氨基酸 1-460 至少约 60%一致。
75. 根据权利要求 72 或 73 所述的分离核酸，其与 HDAC6 的 C 端、HDAC6 的氨基酸 439-503、HDAC6 的氨基酸 500-790、HDAC6 的氨基酸 781-931 或氨基酸 1-460 至少约 80%一致。
76. 根据权利要求 72 所述的分离核酸，其与 HDAC6 的 C 端、HDAC6 的氨基酸 439-503、HDAC6 的氨基酸 500-790、HDAC6 的氨基酸 781-931 或氨基酸 1-460 至少约 90%一致。
77. 根据权利要求 72 所述的分离核酸，其与 HDAC6 的 C 端、HDAC6 的氨基酸 439-503、HDAC6 的氨基酸 500-790、HDAC6 的氨基酸 781-931 或氨基酸 1-460 至少约 99.9%一致。
78. 一种来源于 HDAC6 的分离多肽，其中所述多肽抑制聚集体介导的蛋白降解。
79. 根据权利要求 78 所述的分离多肽，其包含通过 HDAC6 的 C 端、HDAC6 的氨基酸 439-503、HDAC6 的氨基酸 500-790、HDAC6 的氨基酸 781-931 或氨基酸 1-460 识别的氨基酸序列。
80. 根据权利要求 78 所述的分离多肽，其中所述肽与 HDAC6 的 C 端、HDAC6 的氨基酸 439-503、HDAC6 的氨基酸 500-790、HDAC6 的氨基酸 781-931 或氨基酸 1-460 中的任何一个或一个以上至少约 60%一致。
81. 根据权利要求 78 所述的分离多肽，其中所述肽与 HDAC6 的 C 端、HDAC6 的氨基酸 439-503、HDAC6 的氨基酸 500-790、HDAC6 的氨基酸 781-931 或氨基酸 1-460 中的任何一个或一个以上至少约 80%一致。
82. 根据权利要求 78 所述的分离多肽，其中所述肽与 HDAC6 的 C 端、HDAC6 的氨基酸 439-503、HDAC6 的氨基酸 500-790、HDAC6 的氨基酸 781-931 或氨基酸 1-460 中的任何一个或一个以上至少约 90%一致。
83. 根据权利要求 78 所述的分离多肽，其中所述肽与 HDAC6 的 C 端、HDAC6 的氨基酸 439-503、HDAC6 的氨基酸 500-790、HDAC6 的氨基酸 781-931 或氨基酸 1-460 中的任何一个或一个以上至少约 99.9%一致。
84. 一种载体，其含有能够编码与 HDAC6 的 C 端、HDAC6 的氨基酸 439-503、HDAC6 的氨基酸 500-790、HDAC6 的氨基酸 781-931 或氨基酸 1-460 具有至少约 80%序列一致性、且其特征在于能够抑制蛋白降解的多肽的多核苷酸。
85. 一种治疗蛋白降解病症或细胞增殖病症的方法，其包含向有需要的个体投与有效量

的 RNA 以特异性结合且钝化 HDAC6。

86. 根据权利要求 85 所述的方法，其中所述 RNA 为 RNAi、siRNA、反义 RNA 或核糖酶。
87. 一种识别 HDAC 或 TDAC 抑制剂的方法，所述方法包含以下步骤：  
提供细胞；  
提供测试剂；  
使所述细胞与测试剂接触；  
用对乙酰化微管蛋白具有特异性的第一一次抗体处理所述细胞；  
用对乙酰化赖氨酸具有特异性的第二一次抗体处理所述细胞；  
用对所述第一一次抗体具有特异性且用独特荧光团标记的第一二次抗体处理所述细胞；  
用对所述第二一次抗体具有特异性且用独特荧光团标记的第二二次抗体处理所述细胞，其中所述荧光团与所述第一二次抗体的荧光团不同；  
基于所述两种荧光团使所述细胞成像；和  
定量 TDAC 与 HDAC 两者的抑制程度。
88. 根据权利要求 87 所述的方法，其中所述细胞来源于人类癌细胞系。
89. 根据权利要求 87 所述的方法，其中所述细胞来源于人类多发性骨髓瘤细胞系。
90. 一种识别为 HDAC 或 TDAC 抑制剂的化合物，其是使用根据权利要求 78 所述的方法识别。
91. 一种化合物，其具有下式：



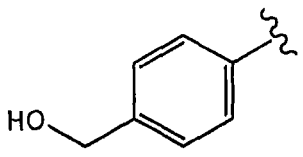
其中

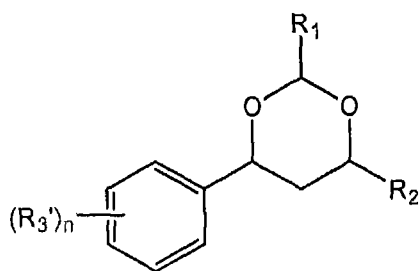
R<sub>1</sub> 为环状或非环状、经取代或未经取代、分支或未分支的脂肪族部分；环状或非环状、经取代或未经取代、分支或未分支的杂脂肪族部分；经取代或未经取代、分支或未分支的酰基；经取代或未经取代、分支或未分支的芳基；经取代或未经取代、分支或未分支的杂芳基；-OR<sub>A</sub>；-C(=O)R<sub>A</sub>；-CO<sub>2</sub>R<sub>A</sub>；-SR<sub>A</sub>；-SOR<sub>A</sub>；

$-\text{SO}_2\text{R}_A$ ;  $-\text{N}(\text{R}_A)_2$ ;  $-\text{NHC}(\text{O})\text{R}_A$  或  $-\text{C}(\text{R}_A)_3$ ; 其中  $\text{R}_B$  每次出现时独立为氢、保护基、脂肪族部分、杂脂肪族部分、酰基部分、芳基部分、杂芳基部分、烷氧基、芳氧基、烷硫基、芳硫基、氨基、烷基氨基、二烷基氨基、杂芳氧基或杂芳硫基部分;

$\text{R}_2$  为氢; 卤素; 环状或非环状、经取代或未经取代、分支或未分支的脂肪族部分; 环状或非环状、经取代或未经取代、分支或未分支的杂脂肪族部分; 经取代或未经取代、分支或未分支的酰基; 经取代或未经取代、分支或未分支的芳基; 经取代或未经取代、分支或未分支的杂芳基;  $-\text{OR}_B$ ;  $-\text{C}(=\text{O})\text{R}_B$ ;  $-\text{CO}_2\text{R}_B$ ;  $-\text{CN}$ ;  $-\text{SCN}$ ;  $-\text{SR}_B$ ;  $-\text{SOR}_B$ ;  $-\text{SO}_2\text{R}_B$ ;  $-\text{NO}_2$ ;  $-\text{N}(\text{R}_B)_2$ ;  $-\text{NHC}(\text{O})\text{R}_B$  或  $-\text{C}(\text{R}_B)_3$ ; 其中  $\text{R}_B$  每次出现时独立为氢、保护基、脂肪族部分、杂脂肪族部分、酰基部分、芳基部分、杂芳基部分、烷氧基、芳氧基、烷硫基、芳硫基、氨基、烷基氨基、二烷基氨基、杂芳氧基或杂芳硫基部分; 且

$\text{R}_3$  为氢; 卤素; 环状或非环状、经取代或未经取代、分支或未分支的脂肪族部分; 环状或非环状、经取代或未经取代、分支或未分支的杂脂肪族部分; 经取代或未经取代、分支或未分支的酰基; 经取代或未经取代、分支或未分支的芳基; 经取代或未经取代、分支或未分支的杂芳基;  $-\text{OR}_C$ ;  $-\text{C}(=\text{O})\text{R}_C$ ;  $-\text{CO}_2\text{R}_C$ ;  $-\text{CN}$ ;  $-\text{SCN}$ ;  $-\text{SR}_C$ ;  $-\text{SOR}_C$ ;  $-\text{SO}_2\text{R}_C$ ;  $-\text{NO}_2$ ;  $-\text{N}(\text{R}_C)_2$ ;  $-\text{NHC}(\text{O})\text{R}_C$  或  $-\text{C}(\text{R}_C)_3$ ; 其中  $\text{R}_C$  每次出现时独立为氢、保护基、脂肪族部分、杂脂肪族部分、酰基部分、芳基部分、杂芳基部分、烷氧基、芳氧基、烷硫基、芳硫基、氨基、烷基氨基、二烷基氨基、杂芳氧基或杂芳硫基部分; 以及其医药学上可接受的盐及衍生物。

92. 根据权利要求 91 所述的化合物, 其中  $\text{R}_3$  为 。
93. 根据权利要求 91 所述的化合物, 其具有下式:

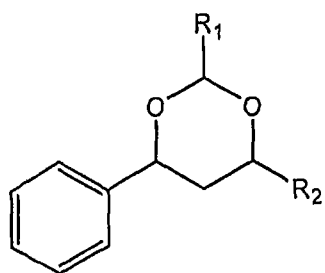


其中

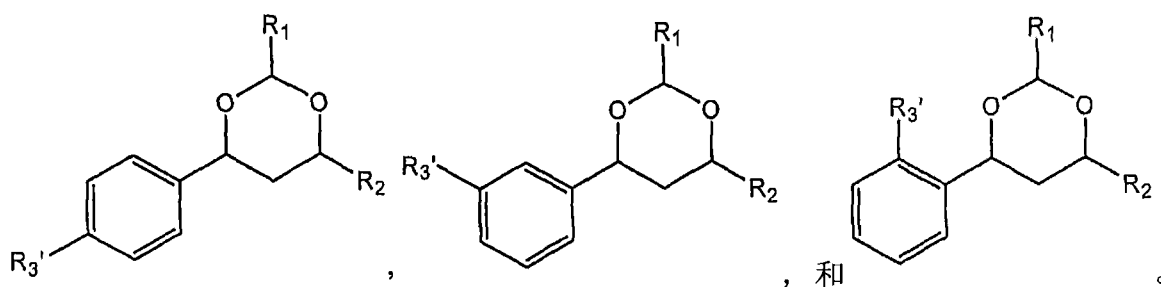
$n$  为 1 与 5 之间的整数，包括 1 和 5；且

$R_3'$  每次出现时独立为氢；卤素；环状或非环状、经取代或未经取代、分支或未分支的脂肪族部分；环状或非环状、经取代或未经取代、分支或未分支的杂脂肪族部分；经取代或未经取代、分支或未分支的酰基；经取代或未经取代、分支或未分支的芳基；经取代或未经取代、分支或未分支的杂芳基； $-OR_C$ ； $-C(=O)R_C$ ； $-CO_2R_C$ ； $-CN$ ； $-SCN$ ； $-SR_C$ ； $-SOR_C$ ； $-SO_2R_C$ ； $-NO_2$ ； $-N(R_C)_2$ ； $-NHC(O)R_C$  或  $-C(R_C)_3$ ；其中  $R_C$  每次出现时独立为氢、保护基、脂肪族部分、杂脂肪族部分、酰基部分、芳基部分、杂芳基部分、烷氧基、芳氧基、烷硫基、芳硫基、氨基、烷基氨基、二烷基氨基、杂芳氧基或杂芳硫基部分。

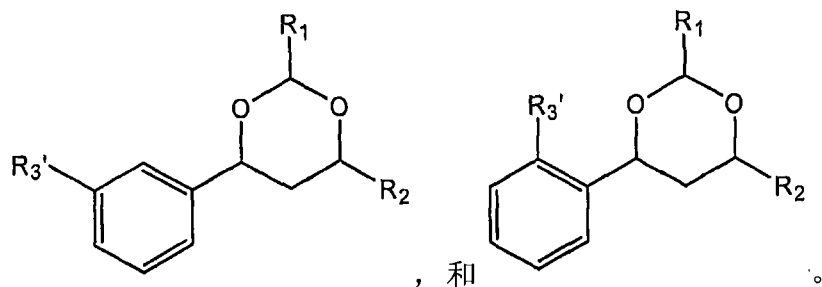
94. 根据权利要求 91 所述的化合物，其具有下式：



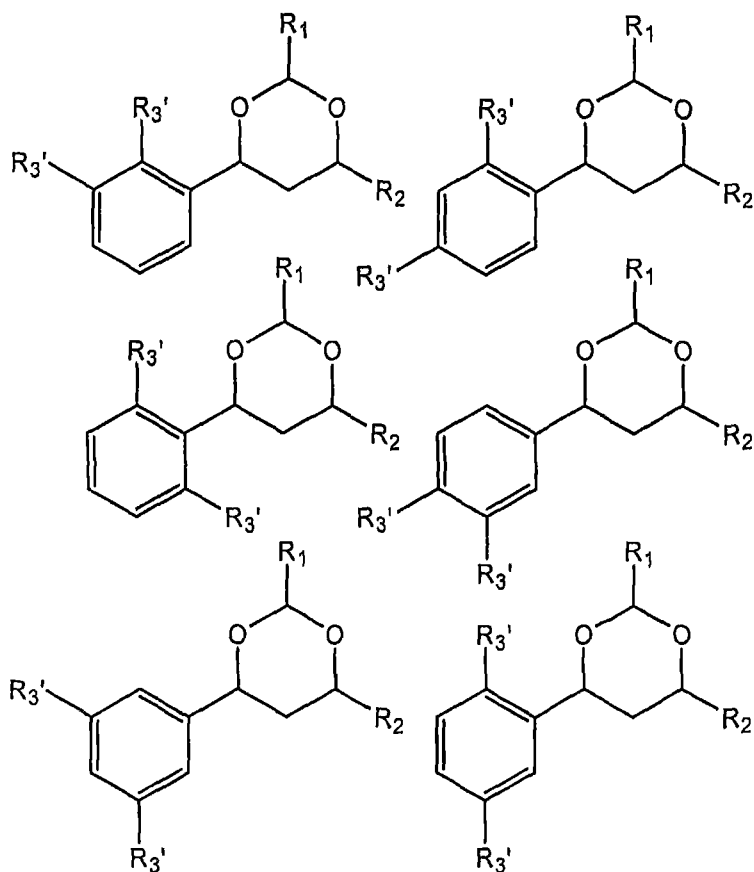
95. 根据权利要求 94 所述的化合物，其具有以下式中的一个：



96. 根据权利要求 95 所述的化合物，其具有以下式中的一个：

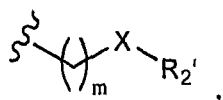


97. 根据权利要求 94 所述的化合物，其具有以下式中的一个：



98. 根据权利要求 93、95、96 或 97 所述的化合物，其中 R<sub>3</sub>'各自独立为卤素、羟基、经保护的羟基、烷氧基、硫氧基、氨基、烷基氨基、二烷基氨基、-NO<sub>2</sub>、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 烷基、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 烯基、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 炔基或酰基。

99. 根据权利要求 91 所述的化合物，其中 R<sub>2</sub> 具有下式：



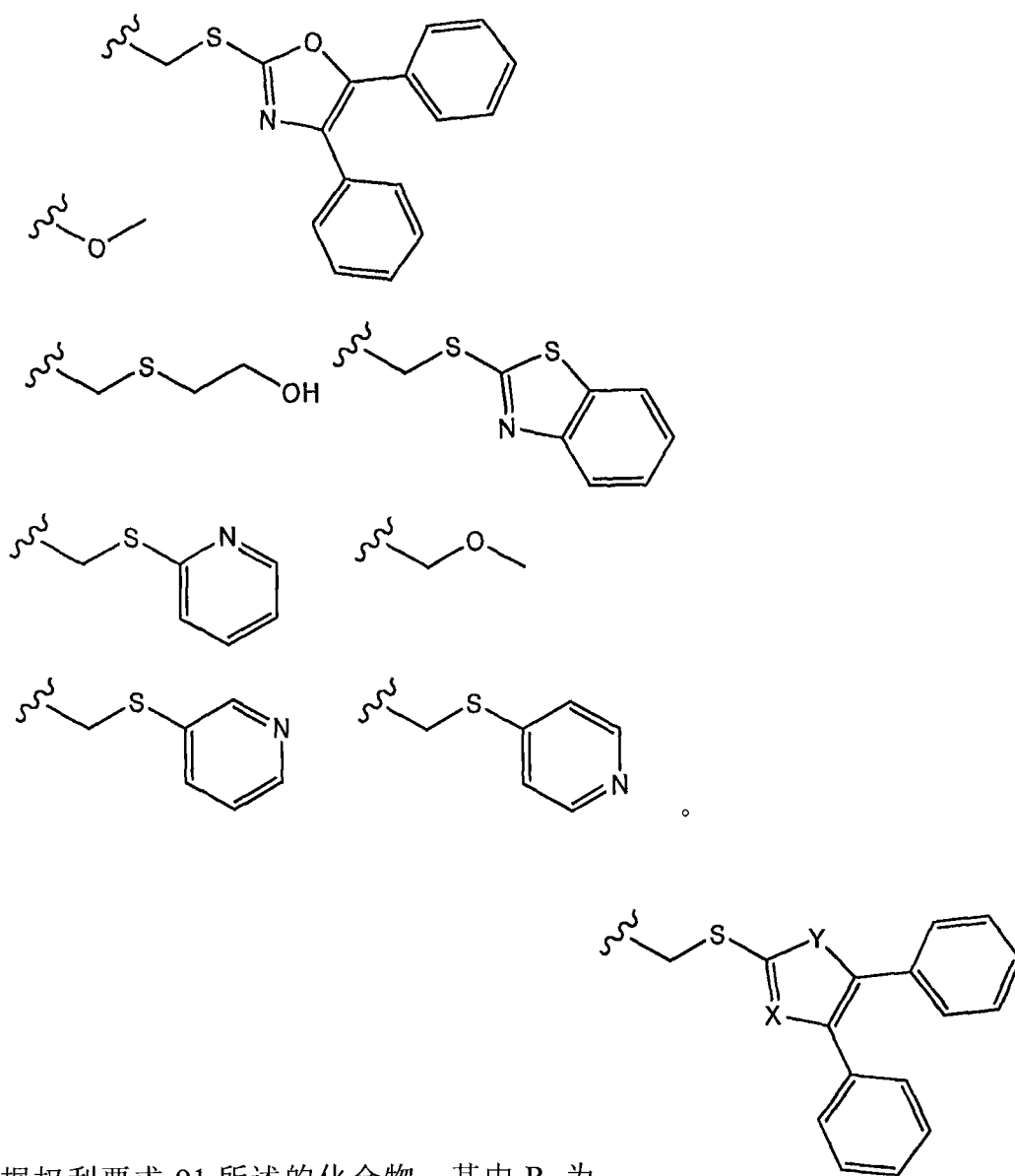
其中 m 为 0 与 8 之间的整数，包括 0 和 8；优选 1 与 6 之间的整数，包括 1 和 6；

X 为 O、S、CH<sub>2</sub>、NH 或 NR<sub>2</sub>'；且

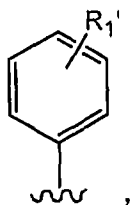
R<sub>2</sub>'为脂肪族部分、杂脂肪族部分、酰基、经取代或未经取代的芳基或经取代或未经取代的杂芳基。

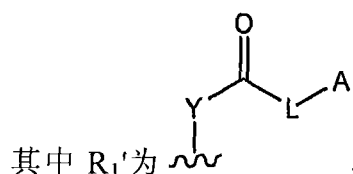
100. 根据权利要求 99 所述的化合物，其中 X 为 O。


101. 根据权利要求 99 所述的化合物，其中 X 为 S。
102. 根据权利要求 99 所述的化合物，其中 m 为 1。
103. 根据权利要求 99 所述的化合物，其中 R<sub>2</sub>' 为经取代或未经取代的杂芳基。
104. 根据权利要求 99 所述的化合物，其中 R<sub>2</sub> 选自以下各基团中的一个：



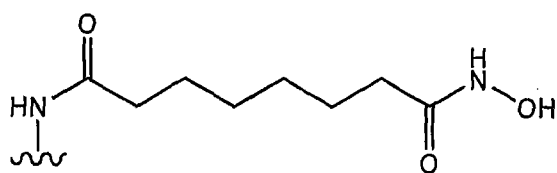
105. 根据权利要求 91 所述的化合物，其中 R<sub>2</sub> 为
106. 根据权利要求 91 所述的化合物，其中 R<sub>1</sub> 具有下式：



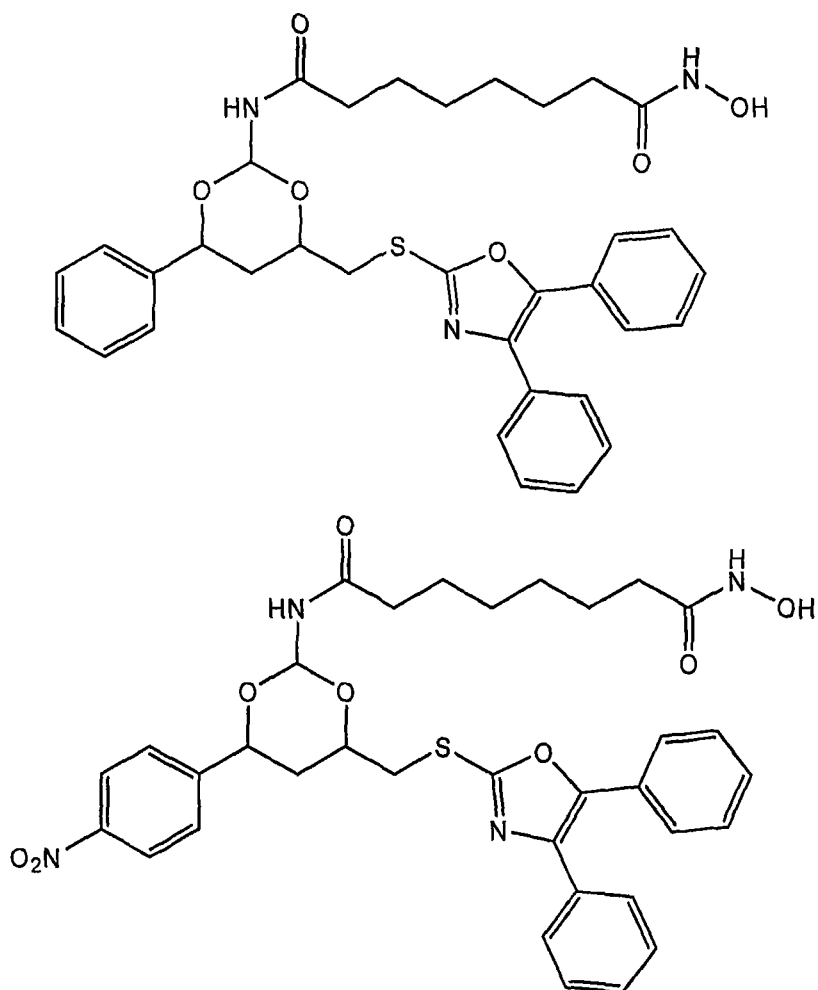


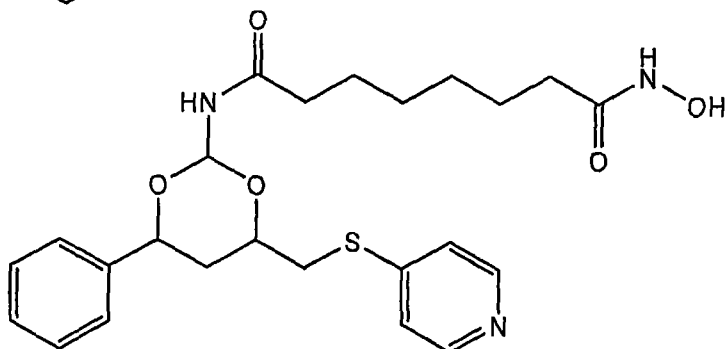
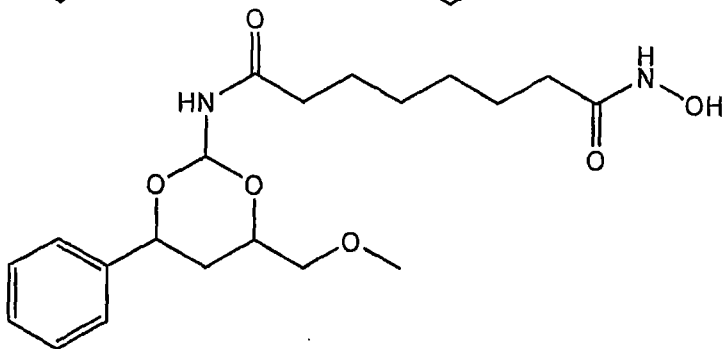
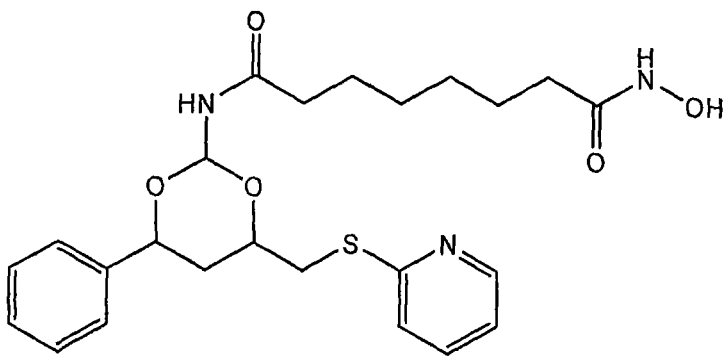
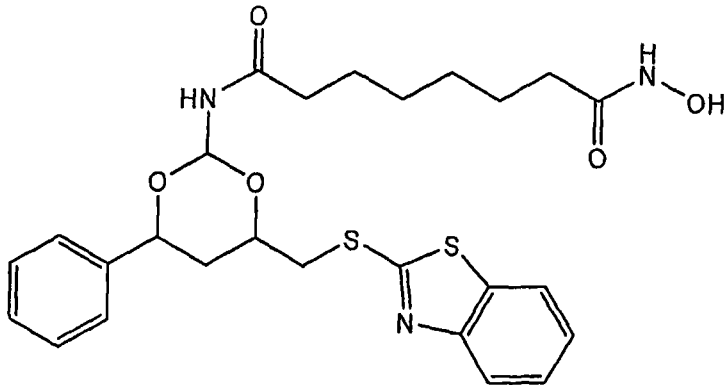
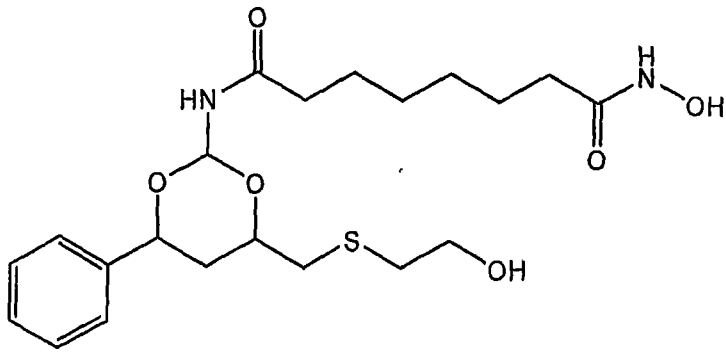
其中  $R_1'$  为 ，其中 Y 为 NH 或 O；L 为连接体部分；且 A 包含抑制组蛋白脱乙酰基酶的官能团。

107. 根据权利要求 106 所述的化合物，其中  $R_1'$  为

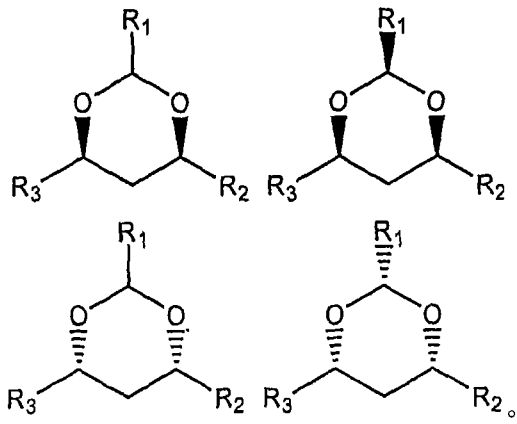


108. 根据权利要求 91 所述的化合物，其具有以下式中的一个：





109. 根据权利要求 91 所述的化合物，其具有以下式中的一个：



## 蛋白降解病症的治疗

### 相关申请案

根据美国法典第 35 卷第 119 条，本申请主张 2005 年 3 月 22 日申请的美国临时专利申请 USSN 60/664,470 的优先权，其以引用的方式并入本文中。

### 政府支持

本文所述的工作在某种程度上受美国国立卫生研究院（CA078048，GM076262）专用拨款支持。美国政府对本发明可具有必然的权利。

### 技术领域

无

### 背景技术

动态细胞状态需要蛋白代谢的快速有效机制。癌细胞高度依赖于蛋白降解，这归因于连续细胞循环、高频突变和染色体重排（Adams J. The proteasome: a suitable antineoplastic target. Nat Rev Cancer. 2004;4:349-360；以引用的方式并入本文中）。蛋白酶体和聚集体是两种涉及细胞内蛋白代谢的主要细胞结构。蛋白酶体的生物学在正常和赘生性细胞中充分特征化。蛋白酶体复合物存在于例如内质网（ER）、细胞核和细胞质的遍及细胞的多个部位中。蛋白酶体的主要作用是靶向降解泛素化蛋白。所述聚集体为错误折叠蛋白、伴侣蛋白和蛋白酶体组分的近核状复合物，其响应与某些病理状态有关的蛋白酶体抑制作用或蛋白应激而扩展（Kopito RR. Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. Trends Cell Biol. 2000;10:524-530；以引用的方式并入本文中）。不存在以这些病理状态为目标的已知治疗。

异常蛋白代谢为癌症的标志且牵涉致癌蛋白的稳定和肿瘤抑制基因的降解（Adams J. The proteasome: a suitable antineoplastic target. Nat Rev Cancer. 2004;4:349-360；以引用的方式并入本文中）。因此，此项技术中对于涉及异常蛋白代谢的疾病的的治疗以及开发通过靶向蛋白降解途径和组分来治疗疾病（例如癌症）的新颖治疗剂的筛选方法存在需要。

### 发明内容

一方面，本发明提供一种治疗罹患或容易罹患蛋白降解病症的个体的方法。所述方

法包括向有需要的个体投与治疗有效量的至少一种蛋白降解抑制剂的步骤。在某些实施例中，蛋白酶体的抑制剂是与聚集体的抑制剂组合投与。在某些实施例中，所述蛋白降解病症为细胞增殖病症或蛋白沉积病症。详细来说，所述细胞增殖病症为癌症。在优选实施例中，其中所述癌症为以下中的一种或一种以上：多发性骨髓瘤、白血病、淋巴瘤、乳腺癌、肺癌、卵巢癌、前列腺癌和肝癌。在其他实施例中，所述蛋白沉积病症为威尔逊病（Wilson's disease）、脊髓小脑运动失调、朊病毒疾病、帕金森氏病（Parkinson's disease）、亨廷顿氏病（Huntington's disease）、家族性肌萎缩侧索硬化、淀粉样变性、阿兹海默氏病（Alzheimer's disease）、亚历山大氏病（Alexander's disease）、酒精性肝病、囊性纤维化、匹克氏病（Pick's disease）或路易体痴呆（Lewy body dementia）。

另一方面，本发明提供一种治疗表现蛋白降解病症的症状的细胞的方法。所述方法包括向所述细胞投与治疗有效量的蛋白降解抑制剂的步骤。在某些实施例中，所述细胞为一种或一种以上来自个体的细胞或培养细胞。在某些实施例中，来自个体的细胞为以下中的一种或一种以上：骨髓基质细胞（BMSC）、周边血液单核细胞（PBMC）、淋巴细胞、毛囊、造血球、血球、上皮细胞、骨髓浆细胞、原发癌细胞、患者源肿瘤细胞、正常或癌性造血干细胞、神经干细胞、实体肿瘤细胞或星形细胞。在某些实施例中，所述培养细胞为以下中的一种或一种以上：MM.1S、U266、RPMI8226、DOX40、MM.1R、INA-6、LR5、原发和确立癌细胞系、原发和确立正常细胞系。抑制处于蛋白应激下的细胞中的蛋白降解途径会导致细胞死亡；因此使用蛋白降解抑制剂治疗疾病（例如癌症，其中癌细胞处于蛋白应激下）提供了一种杀死癌细胞的新颖方法。

另一方面，本发明提供一种治疗罹患或容易罹患多发性骨髓瘤的个体的方法。所述方法包括向有需要的个体投与治疗有效量的蛋白降解抑制剂从而治疗罹患或容易罹患多发性骨髓瘤的个体的步骤。由于产生免疫球蛋白，所以细胞处于蛋白应激下且在抑制蛋白降解后易于死亡。

另一方面，本发明提供一种治疗罹患或容易罹患乳腺癌或卵巢癌的个体的方法。所述方法包括向有需要的个体投与治疗有效量的蛋白降解抑制剂从而治疗罹患或容易罹患乳腺癌或卵巢癌的个体的步骤。

另一方面，本发明提供一种评定个体的蛋白降解病症治疗功效的方法。所述方法包括以下步骤：测定一种或一种以上治疗前表型；向所述个体投与治疗有效量的蛋白降解抑制剂；和在用所述蛋白降解抑制剂治疗的初始时期后测定所述一种或一种以上表型；其中所述一种或一种以上表型的调节指示蛋白降解抑制剂的治疗功效。

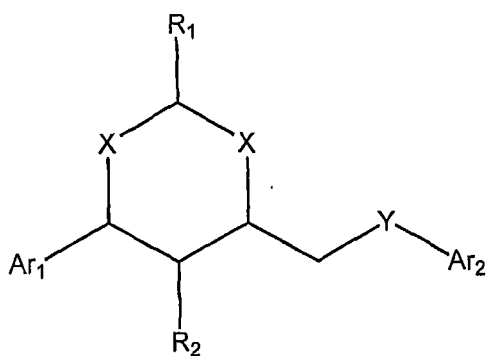
另一方面，本发明提供一种监控用聚集体抑制剂治疗的个体的进展的方法。所述方

法包括以下步骤：测定一种或一种以上治疗前表型；向所述个体投与治疗有效量的聚集体抑制剂；和在用所述聚集体抑制剂治疗的初始时期后测定一种或一种以上表型；其中一种或一种以上表型的调节指示聚集体抑制的治疗功效。

另一方面，本发明提供一种选择用蛋白降解抑制剂治疗的患有蛋白降解病症的个体的方法。所述方法包括以下步骤：测定一种或一种以上治疗前表型；向所述个体投与治疗有效量的蛋白降解抑制剂；和在用所述蛋白降解抑制剂治疗的初始时期后测定所述一种或一种以上表型；其中所述一种或一种以上表型的调节指示所述病症可能对用蛋白降解抑制剂治疗具有有利的临床反应。

在任何上述方面中，所述蛋白降解抑制剂优选选自突巴新 (tubacin)、突巴新类化合物、突巴新衍生物、硼替佐米 (bortezomib, VELCADE<sup>®</sup>)、SAHA、R115777 FTI、<sup>166</sup>Holmiurn-DOTMP、三氧化二砷、17-AAG、MG132、sapojargon、NPI-0052 或本文所述的其他化合物中的一种或一种以上。突巴新、突巴新类化合物和突巴新衍生物描述在以下美国专利申请中：2001年5月9日申请的 U.S.S.N. 60/289,850；2002年5月9日申请的 U.S.S.N. 10/144,316 和 2003年7月17日申请的 U.S.S.N. 10/621,276；各申请均以引用的方式并入本文中。

在上述方面的某些优选的实施例中，所述蛋白降解抑制剂为下式的化合物：



其中

X 各自独立为 O、S、CH<sub>2</sub> 或 NR<sub>3</sub>；

Y 为 O、S、CH<sub>2</sub> 或 NR<sub>4</sub>；

Ar<sub>1</sub> 和 Ar<sub>2</sub> 各自独立为芳基；

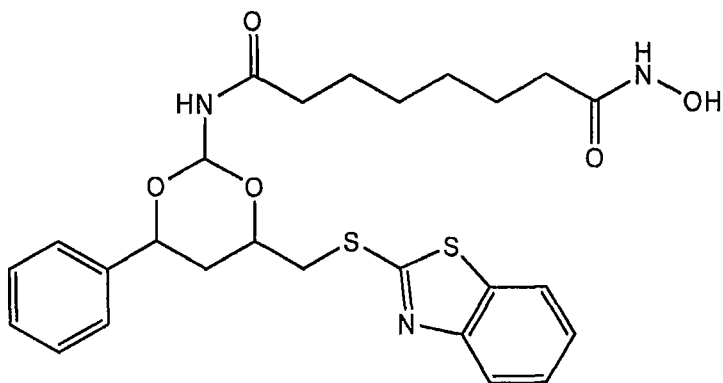
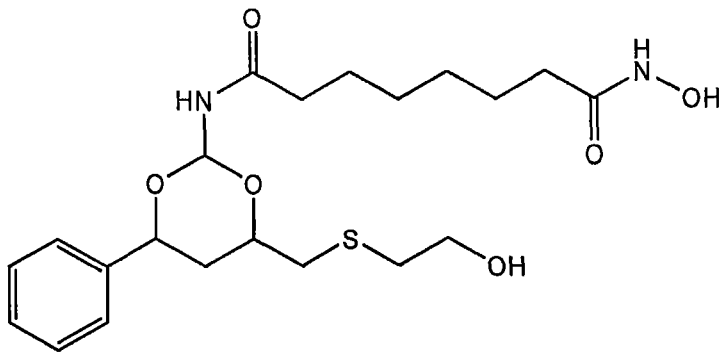
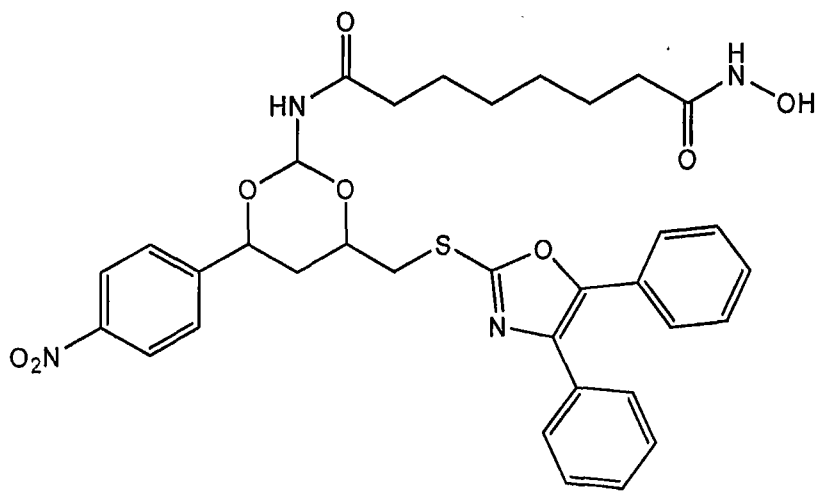
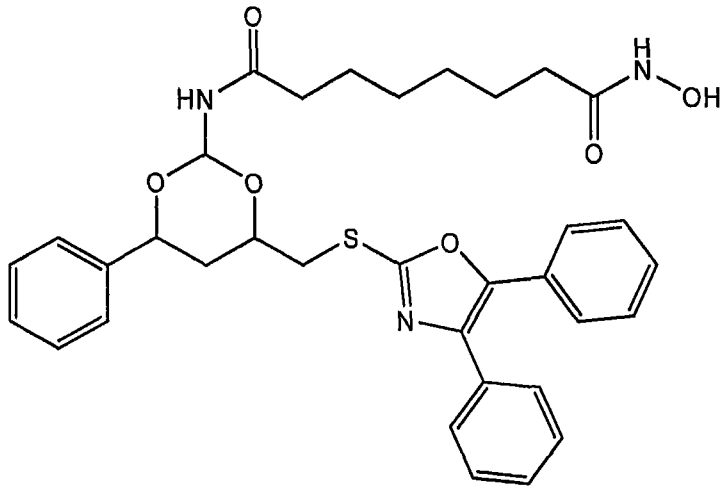
R<sub>1</sub> 为低碳烷基或芳基；

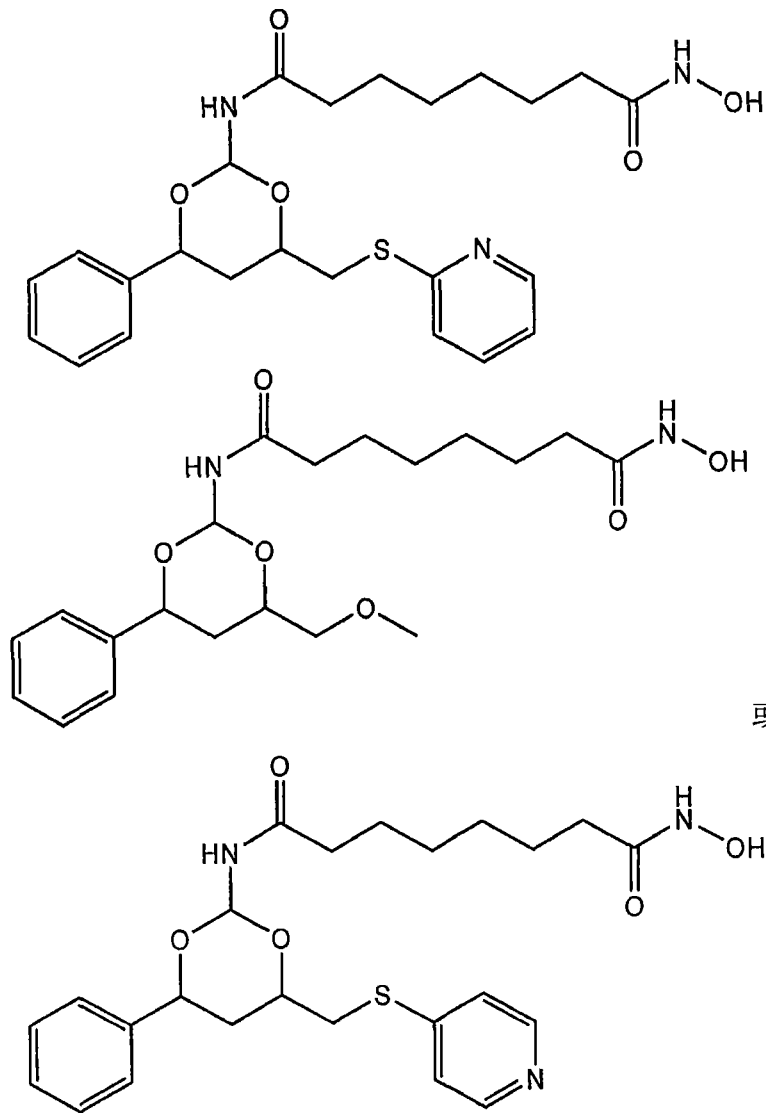
R<sub>2</sub> 为氢、低碳烷基或芳基；且

R<sub>3</sub> 为氢、低碳烷基、芳基、烷基羰基、烷氧羰基或氨基羰基。在某些优选的实施例

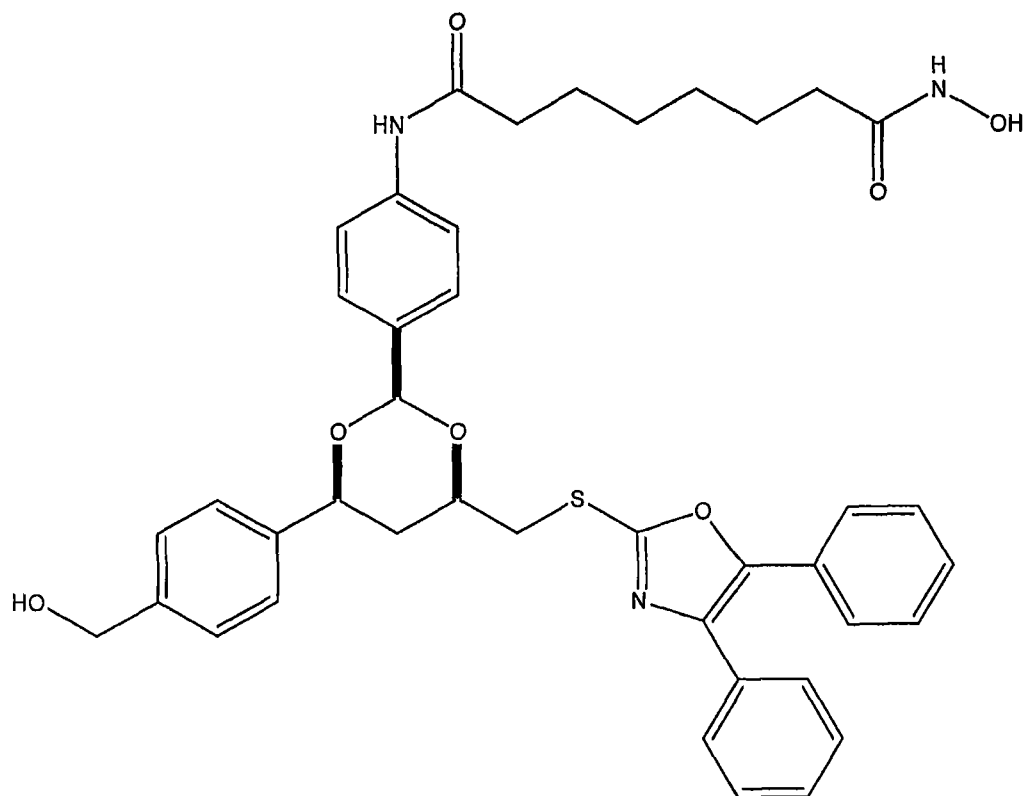
中，X 两次出现均为 O。在某些优选的实施例中，Y 为 S。在某些优选的实施例中，Ar<sub>1</sub> 为苯基或经取代的苯基。在某些优选的实施例中，Ar<sub>2</sub> 为杂芳基，更优选为经视情况取代的噁唑基。在某些优选的实施例中，R<sub>1</sub> 为苯基或经取代的苯基，更优选为 4-氨基取代的苯基。在某些优选的实施例中，R<sub>2</sub> 为氢。

在某些实施例中，所述蛋白降解抑制剂具有以下式中的一个：





在某些优选的实施例中，所述蛋白降解抑制剂为具有所示立体化学的下式的化合物：



本发明的这些化合物尤其可用于本发明的方法、医药组合物和试剂盒中。

在任何上述方面中，所述蛋白降解抑制剂为 HDAC 抑制剂。已知抑制 HDAC 的化合物描述在以下美国专利申请中：2006 年 2 月 14 日申请的 U.S.S.N. 60/773,510；2006 年 2 月 14 日申请的 U.S.S.N. 60/773,172；2001 年 5 月 9 日申请的 U.S.S.N. 60/289,850；2002 年 5 月 9 日申请的 U.S.S.N. 10/144,316 和 2003 年 7 月 17 日申请的 U.S.S.N. 10/621,276；各申请均以引用的方式并入本文中。在某些实施例中，所述蛋白降解抑制剂优选抑制 HDAC6。在某些实施例中，所述蛋白降解抑制剂对 HDAC6 具有特异性。

在任何上述方面中，所述蛋白降解抑制剂优选抑制 HDAC6 酶活性，从而抑制聚集体介导的蛋白降解。在优选实施例中，所述蛋白降解抑制剂优选抑制 HDAC6 的 C 端乙酰化活性，从而抑制聚集体介导的蛋白降解。

在某些实施例中，所述 HDAC6 抑制剂导致 Hsp90 乙酰化。所述 Hsp90 的乙酰化致使这种蛋白对许多 Hsp90 服务蛋白具有较少活性，从而增加细胞中的蛋白应激。详细来说，对于前列腺癌和乳腺癌，HDAC6 的抑制和 Hsp90 的随后乙酰化导致类固醇结合受体的活性减小，这归因于糖皮质激素受体需要 Hsp90 功能以接合糖皮质激素。因此，HDAC6 抑制导致对乳腺癌中雌激素和前列腺癌中雄激素的敏感性减小。

在任何上述方面中，在某些优选的实施例中，所述蛋白降解抑制剂为聚集体抑制剂。

在某些优选的实施例中，所述聚集体抑制剂为以下中的一种或一种以上：突巴新、斯瑞泰德（scriptade）或本文所述的化合物。在某些其他实施例中，所述聚集体抑制剂为一种或一种以上在以下美国专利申请中描述的化合物：2006年2月14日申请的 U.S.S.N. 60/773,510；2006年2月14日申请的 U.S.S.N. 60/773,172；2001年5月9日申请的 U.S.S.N. 60/289,850；2002年5月9日申请的 U.S.S.N. 10/144,316 和 2003年7月17日申请的 U.S.S.N. 10/621,276；各申请均以引用的方式并入本文中。

在任何上述方面中，在某些优选的实施例中，所述蛋白降解抑制剂为蛋白酶体抑制剂。在某些优选的实施例中，所述蛋白酶体抑制剂为以下中的一种或一种以上：硼替佐米、MG132、saporjargon 和 NPI-0052。在某些实施例中，所述蛋白酶体抑制剂为本文所述的化合物。

在任何上述方面中，在某些优选的实施例中，所述蛋白降解抑制剂为来源于 HDAC6、动力蛋白的肽、HDAC6 的 N 端肽或 HDAC6 的 C 端肽。在某些优选的实施例中，C 端 HDAC6 肽足以调节细胞的表型。

在任何上述方面中，在某些优选的实施例中，所述表型可为对特定治疗或化合物反应的生物或临床结果，贫血、血小板减少、中性粒细胞减少、溶骨病变、骨痛、免疫功能缺陷、肾机能不全、血钙过多、成熟浆细胞异倍性、恶性细胞百分数、微管蛋白的乙酰化状态、成熟浆细胞的细胞凋亡、成熟浆细胞中聚集体含量、成熟浆细胞中的 HDAC6 泛素化、与成熟浆细胞中动力蛋白有关的 HDAC6、成熟浆细胞中细胞的泛素化蛋白含量、成熟浆细胞中卡斯蛋白酶-8 含量、成熟浆细胞中 PARP 含量、成熟浆细胞中胸苷吸收量、膨胀的 ER 池、成熟浆细胞凝集、成熟浆细胞中免疫球蛋白沉淀、非组蛋白蛋白质的乙酰化状态、组蛋白的乙酰化、细胞蛋白的整体泛素化状态、细胞周期调控状态、坏疽、细胞凋亡标示物、细胞凋亡状态、罗氏小体形成（Russell body formation）、囊性纤维化跨膜蛋白受体状态和细胞蛋白沉淀的调节或细胞或细胞外蛋白的整体乙酰化状态。

在优选实施例中，聚集体含量、血小板减少、中性粒细胞减少、溶骨病变、骨痛、免疫功能缺陷、肾机能不全、血钙过多、成熟浆细胞异倍性、恶性细胞百分数、成熟浆细胞中胸苷吸收量、成熟浆细胞中全长卡斯蛋白酶-8 含量、成熟浆细胞中全长 PARP 含量或成熟浆细胞凝集中的一种或一种以上的减少指示所述治疗为有效的。

在优选实施例中，微管蛋白的乙酰化状态、成熟浆细胞中的 HDAC6 泛素化、裂解形式卡斯蛋白酶-8 的含量、裂解形式 PARP 的含量、坏疽、非组蛋白蛋白质的乙酰化状态、细胞泛素化水平、细胞凋亡、细胞凋亡标示物、细胞周期调控异常或成熟浆细胞中

免疫球蛋白的沉淀的增加指示所述治疗为有效的。

在任何上述方面中，在某些优选的实施例中，所述方法进一步包括自个体获得生物样品的步骤，且在某些实施例中，可进一步包括自所述个体获得第二生物样品的步骤。

在任何上述方面中，在某些优选的实施例中，所述方法进一步包括在用所述蛋白降解抑制剂的第二疗程后测定个体的表型。

在任何上述方面中，在某些优选的实施例中，所述方法进一步包括向所述个体或细胞投与治疗有效量的一种或一种以上其他蛋白降解抑制剂的步骤。在某些优选的实施例中，所述其他蛋白降解抑制剂中的至少一种为聚集体抑制剂。在某些优选的实施例中，所述其他蛋白降解抑制剂中的至少一种为蛋白酶体抑制剂。在优选实施例中，所述其他蛋白降解抑制剂为以下中的一种或一种以上：硼替佐米、突巴新、MG132、saporjargon、NPI-0052 或本文所述的化合物。在某些其他实施例中，所述蛋白降解抑制剂为一种或一种以上在以下美国专利申请中描述的化合物：2006年2月14日申请的 U.S.S.N. 60/773,510; 2006年2月14日申请的 U.S.S.N. 60/773,172; 2001年5月9日申请的 U.S.S.N. 60/289,850; 2002年5月9日申请的 U.S.S.N. 10/144,316 和 2003年7月17日申请的 U.S.S.N. 10/621,276; 各申请均以引用的方式并入本文中。

在任何上述方面中，在某些优选的实施例中，所述方法进一步包括监控所述细胞或个体的治疗或进展。

在任何上述方面中，在某些优选的实施例中，所述方法进一步包括获得蛋白降解抑制剂。

在任何上述方面中，在某些优选的实施例中，所述方法进一步包括向所述个体共同投与以下中的一种或一种以上：化学治疗剂、辐射剂、激素剂、生物制剂或消炎剂。在某些实施例中，所述化学治疗剂为他莫昔芬 (tamoxifen)、曲妥珠单抗 (trastuzumab)、拉洛昔芬 (raloxifene)、阿霉素 (doxorubicin)、氟尿嘧啶/5-FU、帕米膦酸二钠 (pamidronate disodium)、阿纳托唑 (anastrozole)、依西美坦 (exemestane)、环磷酰胺、表阿比星 (epirubicin)、雷曲唑 (letrozole)、托瑞米芬 (toremifene)、氟维司群 (fulvestrant)、氟甲睾酮 (fluoxymesterone)、曲妥珠单抗 (trastuzumab)、甲胺喋呤 (methotrexate)、醋酸甲地孕酮 (megastrol acetate)、多烯紫杉醇 (docetaxel)、太平洋紫杉醇 (paclitaxel)、睾内酯 (testolactone)、氮丙啶 (aziridine)、长春花碱 (vinblastine)、卡培他滨 (capecitabine)、醋酸高塞勒瑞 (goselerin acetate)、唑来膦酸 (zoledronic acid)、紫杉醇 (taxol)、长春花碱或长春新碱。

在任何上述方面中，在某些优选的实施例中，所述方法进一步包括比较一种或一种

以上治疗前或治疗后表型与标准表型。在优选实施例中，所述标准表型为参考细胞或细胞群体中的相应表型。在优选实施例中，所述参考细胞为一种或一种以上的以下细胞：来自个体的细胞、培养细胞、来自个体的培养细胞或来自治疗前个体的细胞。在某些实施例中，来自个体的细胞为骨髓基质细胞（BMSC）、周边血液单核细胞（PBMC）、淋巴细胞、毛囊、血球、其他上皮细胞、骨髓浆细胞、原发癌细胞、患者源肿瘤细胞、正常或癌性造血干细胞、神经干细胞、实体肿瘤细胞或星形细胞。

另一方面，本发明提供一种抑制所述细胞中聚集体介导的蛋白降解的方法。所述方法包括使所述细胞与聚集体抑制剂接触的步骤。在优选实施例中，所述聚集体蛋白降解是由 HDAC6 介导。在某些优选的实施例中，所述方法进一步包括抑制所述细胞中蛋白酶体蛋白降解的步骤。在某些优选的实施例中，聚集体抑制剂为突巴新、本文所述的化合物或通过如下文所述的识别候选化合物的方法识别出的化合物。在某些其他实施例中，所述聚集体抑制剂为一种或一种以上在以下美国专利申请中描述的化合物：2006年2月14日申请的 U.S.S.N. 60/773,510；2006年2月14日申请的 U.S.S.N. 60/773,172；2001年5月9日申请的 U.S.S.N. 60/289,850；2002年5月9日申请的 U.S.S.N. 10/144,316 和 2003年7月17日申请的 U.S.S.N. 10/621,276；各申请均以引用的方式并入本文中。

另一方面，本发明提供一种识别抑制细胞中蛋白降解的候选化合物或分子的方法。所述方法包括使表现聚集体形成的细胞与候选化合物接触和测定所述细胞的表型的步骤，其中所述表型的调节指示所述化合物的功效。在某些实施例中，候选分子为以下中的一种或一种以上：小分子、肽（或肽模拟物）或核酸（其模拟物（包括（例如）肽核酸（PNA））。在某些优选的实施例中，所述核酸为 RNA、mRNA、RNAi、siRNA 或 DNA。在某些优选的实施例中，所述肽为来源于 HDAC6、HDAC6 的动力蛋白结合结构域、HDAC6 的 TDAC 结构域、HDAC6 的 N 端或 HDAC6 的 C 端的肽。在某些优选的实施例中，所述小分子包含于或来源于化合物库。在某些优选的实施例中，测定所述表型的步骤包含使用基于影像的多维筛选。

另一方面，本发明提供一种评价测试化合物的方法。所述方法包括使表现聚集体形成的细胞与测试化合物接触和评价接触后的细胞的步骤，其中一种或一种以上表型的调节与参考值的相关性指示测试化合物可用作蛋白降解病症治疗。在某些优选的实施例中，测试化合物为小分子、肽或核酸中的一种或一种以上。

在上述方法的某些优选的实施例中，所述方法进一步包括在用所述蛋白降解抑制剂治疗的初始时期后测定所述细胞的表型的步骤。在上述方法的某些优选的实施例中，所述表型为响应特定治疗或化合物的生物或临床结果。表型包括贫血、血小板减少、中性

粒细胞减少、溶骨病变、骨痛、免疫机能缺陷、肾机能不全、血钙过多、成熟浆细胞异倍性、恶性细胞百分数、微管蛋白的乙酰化状态、成熟浆细胞的细胞凋亡、聚集体含量、成熟浆细胞中聚集体含量、HDAC6 泛素化、成熟浆细胞中的 HDAC6 泛素化、与成熟浆细胞中动力蛋白有关的 HDAC6、成熟浆细胞中细胞的泛素化蛋白含量、成熟浆细胞中卡斯蛋白酶-8 含量、成熟浆细胞中 PARP 含量、成熟浆细胞中胸苷吸收量、膨胀的 ER 池、成熟浆细胞凝集、成熟浆细胞中免疫球蛋白沉淀、非组蛋白蛋白质的乙酰化状态、细胞蛋白的整体泛素化状态、细胞周期调控状态、坏疽、细胞凋亡标示物、细胞凋亡状态、罗氏小体形成、囊性纤维化跨膜蛋白受体状态和细胞蛋白沉淀的调节或细胞和细胞外蛋白的整体乙酰化状态。在某些优选的实施例中，贫血、聚集体含量、血小板减少、中性粒细胞减少、溶骨病变、骨痛、免疫机能缺陷、肾机能不全、血钙过多、成熟浆细胞异倍性、恶性细胞百分数、成熟浆细胞中胸苷吸收量、成熟浆细胞中全长卡斯蛋白酶-8 含量、成熟浆细胞中全长 PARP 含量或成熟浆细胞凝集中的一种或一种以上的减少指示所述治疗为有效的。在某些优选的实施例中，微管蛋白的乙酰化状态、整体乙酰化状态、非组蛋白蛋白质的乙酰化状态、成熟浆细胞中 HDAC6 泛素化、裂解形式卡斯蛋白酶-8 的含量、裂解形式 PARP 的含量、坏疽、非组蛋白蛋白质的乙酰化状态、细胞泛素化水平、细胞凋亡、细胞凋亡标示物、细胞周期调控异常或成熟浆细胞中免疫球蛋白沉淀的增加指示所述治疗为有效的。

在任何上述方法的某些实施例中，所述个体或所述细胞为人类。在任何上述方法的某些实施例中，所述个体或所述细胞为哺乳动物。在任何上述方法的某些实施例中，所述个体或所述细胞来源于家养动物（例如狗、猫、啮齿动物、奶牛、猪、山羊、绵羊等等）。在任何上述方法的其他实施例中，所述个体或所述细胞来源于实验动物（例如小鼠、大鼠、猪、狗、灵长类动物、猴、黑猩猩等等）。

另一方面，本发明提供一种用于治疗个体的蛋白降解病症的试剂盒。所述试剂盒包括本文所述的化合物或其医药学上可接受的酯、盐和前药和使用说明书。在某些优选的实施例中，所述化合物是以包含治疗有效量的所述化合物和医药学上可接受的载剂的医药组合物形式存在。

另一方面，本发明提供一种包装组合物。所述包装组合物包括治疗有效量的蛋白降解抑制剂和医药学上可接受的载剂或稀释剂，其中所述组合物经调配用于治疗罹患或容易罹患蛋白降解病症的个体且所述组合物与治疗罹患或容易罹患蛋白降解病症的个体的说明书一起包装。

另一方面，本发明提供一种分离核酸分子，其编码来源于 HDAC6 的多肽，其中所

述多肽在表现聚集体的细胞中表达时产生蛋白降解的抑制作用。在某些优选的实施例中，所述核酸来源于编码 HDAC6 的 C 端、HDAC6 的氨基酸 439-503、HDAC6 的氨基酸 500-790、HDAC6 的氨基酸 781-931 或氨基酸 1-460 的核酸。在某些优选的实施例中，所述核酸与 HDAC6 的 C 端、HDAC6 的氨基酸 439-503、HDAC6 的氨基酸 500-790、HDAC6 的氨基酸 781-931 或氨基酸 1-460 至少约 60%一致。在某些优选的实施例中，所述核酸与 HDAC6 的 C 端、HDAC6 的氨基酸 439-503、HDAC6 的氨基酸 500-790、HDAC6 的氨基酸 781-931 或氨基酸 1-460 至少约 80%一致。在某些优选的实施例中，所述核酸与 HDAC6 的 C 端、HDAC6 的氨基酸 439-503、HDAC6 的氨基酸 500-790、HDAC6 的氨基酸 781-931 或氨基酸 1-460 至少约 90%一致。在某些优选的实施例中，所述核酸与 HDAC6 的 C 端、HDAC6 的氨基酸 439-503、HDAC6 的氨基酸 500-790、HDAC6 的氨基酸 781-931 或氨基酸 1-460 至少约 99.9%一致。

另一方面，本发明提供一种来源于 HDAC6 的分离多肽，其中所述多肽抑制聚集体介导的蛋白降解。在某些优选的实施例中，所述分离多肽包含通过 HDAC6 的 C 端、HDAC6 的氨基酸 439-503、HDAC6 的氨基酸 500-790、HDAC6 的氨基酸 781-931 或氨基酸 1-460 识别的氨基酸序列。在某些优选的实施例中，所述肽与 HDAC6 的 C 端、HDAC6 的氨基酸 439-503、HDAC6 的氨基酸 500-790、HDAC6 的氨基酸 781-931 或氨基酸 1-460 中的任何一个或一个以上至少约 60%一致。在某些优选的实施例中，所述肽与 HDAC6 的 C 端、HDAC6 的氨基酸 439-503、HDAC6 的氨基酸 500-790、HDAC6 的氨基酸 781-931 或氨基酸 1-460 中的任何一个或一个以上至少约 80%一致。在某些优选的实施例中，所述肽与 HDAC6 的 C 端、HDAC6 的氨基酸 439-503、HDAC6 的氨基酸 500-790、HDAC6 的氨基酸 781-931 或氨基酸 1-460 中的任何一个或一个以上至少约 90%一致。在某些优选的实施例中，所述肽与 HDAC6 的 C 端、HDAC6 的氨基酸 439-503、HDAC6 的氨基酸 500-790、HDAC6 的氨基酸 781-931 或氨基酸 1-460 中的任何一个或一个以上至少约 99.9%一致。

另一方面，本发明提供一种载体，其含有能够编码与 HDAC6 的 C 端、HDAC6 的氨基酸 439-503、HDAC6 的氨基酸 500-790、HDAC6 的氨基酸 781-931 或氨基酸 1-460 具有至少约 80%序列一致性且特征在于能够抑制蛋白降解的多肽的多核苷酸。

另一方面，本发明提供一种治疗蛋白降解病症或细胞增殖病症的方法。所述方法包括向有需要的个体投与有效量的 RNA 以特异性结合且钝化 HDAC6 的步骤。在某些优选的实施例中，所述 RNA 为 RNAi、siRNA、反义 RNA 或核糖酶。活性 siRNA 试剂的实例包括（但不限于）与核苷酸 211-231 或 217-237 处的 HDAC6 的氨基酸相当的双链或

发夹序列（参见，例如 Hubbert 等人，Nature (2002)417(6887): 455-8）。

## 附图说明

图 1 展示 HDAC6 在多发性骨髓瘤（MM）细胞系中的表达。MM 细胞系溶解且全细胞溶胞物均经受西方印迹（Western blotting）以评定 HDAC6 的蛋白表达。图 1 表明 MM 细胞系（通道 1-7）构成性表达 HDAC6 蛋白。

图 2 展示 MM 细胞系中由突巴新诱导乙酰化 $\alpha$ -微管蛋白。将 MM.1S、RPMI8226 和 INA-6 细胞用突巴新（0-5  $\mu\text{M}$ ）培育 24 h。使用抗-乙酰化赖氨酸抗体由西方印迹来评定 $\alpha$ -微管蛋白的乙酰化。图 2 表明突巴新以剂量依赖方式特异性诱导 $\alpha$ -微管蛋白的乙酰化。

图 3 展示突巴新在 MM 细胞系中的生长抑制效应。将 MM 细胞系用突巴新（1.25-20  $\mu\text{M}$ ）培养 48 h。突巴新的生长抑制效应由 MTT 分析（图 3A）和  $^3\text{H}$ -胸苷吸收（图 3B）评定。图 3 表明呈单一药剂形式的突巴新在 MM 细胞系中的剂量依赖性生长抑制效应。

图 4 表明 IL-6 不克服突巴新的效应。将 MM.1S 细胞在存在 IL-6（5-20 ng/ml）的情况下或不存在 IL-6 的情况下用突巴新（1.25-5  $\mu\text{M}$ ）培养 48 h。DNA 合成由  $^3\text{H}$ -胸苷吸收测量。图 4 表明 IL-6（其为 MM 中的主要生长因子）不克服突巴新的生长抑制效应。

图 5 图解描述蛋白降解途径和在治疗蛋白降解病症过程中组合万珂（VELCADE）与突巴新的科学原理。存在两种降解错误折叠/打开蛋白（其为泛素化的）的途径。前者为蛋白酶体途径，且后者为聚集体途径，其需要 HDAC6 活性。因此，特异性抑制剂硼替佐米（VELCADE<sup>®</sup>）和突巴新的两种途径的抑制作用诱导细胞毒性错误折叠/打开蛋白的累积。

图 6 展示突巴新显著增强 MM 细胞系中万珂诱导的细胞毒性。将 MM.1S (A)和 RPMI8226 (B)细胞在存在突巴新（5 和 10  $\mu\text{M}$ ）或不存在突巴新的情况下用万珂（5 和 10 nM）培养 24 h。由 MTT 分析评定细胞毒性。图 6 表明突巴新显著（ $p < 0.01$ ）增加两种细胞系中由万珂触发的细胞毒性。

图 7 展示突巴新抑制 MM 细胞中由万珂触发的 G2/M 停滞。将 MM.1S 细胞在存在突巴新（5  $\mu\text{M}$ ）或不存在突巴新的情况下用万珂（5 nM）培育 24 h。使用碘化丙啶着色由流式细胞分析检验细胞周期。突巴新显著抑制 MM.1S 细胞中与 p21<sup>Cip1</sup> 的下调有关、由万珂触发且诱导亚 G0/G1 相（细胞凋亡）的 G2/M 停滞。

图 8 表明卡斯蛋白酶和 PARP 裂解是由万珂与突巴新的组合诱导。将 MM.1S 和 RPMI8226 细胞在存在突巴新（5  $\mu\text{M}$ ）或不存在突巴新的情况下用万珂（5 nM）培养 24 h。使用特异性抗体由西方印迹来评定卡斯蛋白酶-8/9/3 和 PARP 裂解。图 8 表明万珂与

突巴新的组合明显增加（诱导）两种细胞系中卡斯蛋白酶/PARP 的裂解。

图 9 展示突巴新显著增强 MM 患者肿瘤细胞中万珂诱导的细胞毒性。将来自 MM 患者的纯化肿瘤细胞在存在突巴新(5  $\mu\text{M}$ )或不存在突巴新的情况下用万珂(5 和 10 nM)培养 24 h。由 MTT 分析评定细胞毒性。图 9 表明突巴新显著 ( $p < 0.01$ ) 增加患者肿瘤细胞中由万珂触发的细胞毒性。

图 10 表明万珂与突巴新的组合治疗不触发正常周边血液单核细胞 (PBMC) 中的细胞毒性。将来自 3 个正常志愿者的 PBMC 在存在突巴新 (5  $\mu\text{M}$ ) 或不存在突巴新的情况下用万珂 (5-20 nM) 培养 24 h。由 MTT 分析评定细胞毒性。图 10 表明万珂与突巴新的组合治疗不触发 PBMC 中的细胞毒性。

图 11 展示突巴新抑制骨髓微环境中的 MM.1S 细胞生长。将 MM.1S 细胞在存在万珂 (2.5 和 5 nM) 或不存在万珂的情况下在有或没有骨髓基质细胞 (BMSC) 的情况下用突巴新 (1.25-5  $\mu\text{M}$ ) 培养 24 h。细胞生长藉由  $^3\text{H}$ -胸苷吸收评定。图 11 表明即使存在 BMSC, 突巴新也显著抑制 MM.1S 细胞生长。此外, 突巴新进一步增加万珂的细胞毒性。

图 12 表明突巴新特异性诱导 MM 细胞中 $\alpha$ -微管蛋白的乙酰化。(A) 突巴新和非活性类似物尼尔突巴新 (niltubacin) 的化学结构。(B) MM 细胞系中 HDAC6 的基线表达的西方印迹。(C) 将 MM.1S 和 RPMI8226 细胞在存在 (2.5 和 5  $\mu\text{M}$ ) 突巴新或不存在突巴新的情况下培养 24 h。(D) 将 RPMI8226 细胞在存在突巴新 (5  $\mu\text{M}$ ) 的情况下培养所指示的时间。使全细胞溶胞物经受使用抗-Ac 赖氨酸抗体的西方印迹。使用抗- $\alpha$ -微管蛋白的免疫印迹用以证实相等蛋白质样品加样。(E) 将 MM.1S 和 RPMI8226 细胞在存在 SAHA (2.5 和 5  $\mu\text{M}$ ) 或不存在 SAHA 的情况下培养 24 h。使全细胞溶胞物经受使用抗-Ac 赖氨酸抗体的西方印迹。与突巴新形成对比, SAHA 明显触发组蛋白 H3 和 H4 的乙酰化。

图 13 表明突巴新经由活化卡斯蛋白酶诱导细胞毒性。将 MM.1S (•)、MM.1R (•)、U266 (▲)、RPMI8226 (▲)、RPMI-LR5 (■) 和 RPMI-Dox40 (■) 细胞在存在突巴新 (1.25-20  $\mu\text{M}$ ) 的情况下培养 48 h (A) 和 72 h (B)。(C) 将来自正常志愿者 ( $n = 3$ ) 的 PBMC 在存在突巴新 (2.5-20  $\mu\text{M}$ ) 的情况下培养 48 h。细胞生长由 MTT 分析评定, 且数据代表重复四次培养的平均值 ( $\pm\text{SD}$ )。(D) 将 MM.1S 和 RPMI8226 细胞用突巴新 (10  $\mu\text{M}$ ) 培养所指示的时间。使全细胞溶胞物经受使用抗-卡斯蛋白酶-8 和 PARP 抗体的西方印迹。

图 14 表明突巴新抑制 HDAC6 与动力蛋白的结合, 且当与硼替佐米组合时, 其诱导

聚泛素化蛋白的显著累积。(A) 突巴新增强由硼替佐米诱导的细胞毒性的假设理论 (kawaguchi 等人改编 (17))。(B) 将 MM.1S 细胞用突巴新 (2.5 和 5  $\mu\text{M}$ ) 培养 8 h。将全细胞溶胞物用抗-Ub 抗体免疫沉淀。使免疫沉淀物经受使用抗-HDAC6 抗体的西方印迹。(C) 将 MM.1S 细胞用突巴新 (2.5 和 5  $\mu\text{M}$ ) 培养 8 h。将全细胞溶胞物用抗-动力蛋白抗体免疫沉淀。随后使免疫沉淀物经受使用抗-HDAC6 和动力蛋白抗体的西方印迹。(D) 将 MM.1S 和 RPMI8226 细胞用突巴新 (2.5 和 5  $\mu\text{M}$ ) 培养 24 h。使全细胞溶胞物经受使用抗-Ub 抗体的西方印迹。(E) 将 MM.1S 和 RPMI8226 用突巴新 (T: 5  $\mu\text{M}$ ) 和/或硼替佐米 (B: 5 nM) 培养 12 h。使全细胞溶胞物经受使用抗-Ub 抗体的西方印迹。

图 15 表明在 MM 细胞系中突巴新和硼替佐米诱导协同抗肿瘤活性。(A) 将 MM.1S 和 RPMI8226 MM 细胞在存在 (5  $\mu\text{M}$ ) 突巴新或不存在突巴新的情况下在对照培养基 ( $\square$ ) 中培养 24 h 以及用 5 nM ( $\blacksquare$ ) 或 10 nM ( $\blacksquare$ ) 硼替佐米培养 24 h; 由 MTT 分析评定细胞毒性。(B) 将 MM.1S 细胞在存在突巴新 (5  $\mu\text{M}$ ) 和/或硼替佐米 (5 nM) 或不存在突巴新和/或硼替佐米的情况下培养 24 h; 使用 PI 着色由流式细胞计评定细胞周期概况。(C) 将 MM.1S 细胞在存在突巴新 (T: 5  $\mu\text{M}$ ) 和/或硼替佐米 (B: 5 nM) 或不存在突巴新和/或硼替佐米的情况下培养 24 h; 使全细胞溶胞物经受使用抗-p21<sup>Cip1</sup>、p-JNK (SAPK)、卡斯蛋白酶-9、卡斯蛋白酶-8、卡斯蛋白酶-3 和 PARP 抗体的西方印迹。将 MM.1S 细胞用 HDAC6 siRNA 瞬时转染。随后使细胞经受 (D) 使用抗-HDAC6 抗体的西方印迹或 (E) 使细胞在存在 5 nM 硼替佐米或不存在硼替佐米 ( $\blacksquare$ ) 的情况下经受 MTT 分析。将 MM.1S 细胞用尼尔突巴新 (2.5 和 5  $\mu\text{M}$ ) 或突巴新 (2.5 和 5  $\mu\text{M}$ ) 培养 24 h。随后使细胞经受 (F) 使用 Ac-Lys 抗体的西方印迹或 (G) 使细胞在存在 5 nM 硼替佐米或不存在硼替佐米 ( $\blacksquare$ ) 的情况下经受 MTT 分析。数据代表重复四次培养的平均值 ( $\pm\text{SD}$ )。

图 16 表明突巴新在患者 MM 细胞中协同增强硼替佐米诱导的细胞毒性而对 PBMC 不具有细胞毒性。将 BMPC (A、B、C) 和来自 3 个 MM 患者的 PBMC (D) 在存在突巴新 (5  $\mu\text{M}$ ) 或不存在突巴新的情况下在对照培养基 ( $\square$ ) 中培养 24 h 以及用 10 nM ( $\blacksquare$ ) 或 20 nM ( $\blacksquare$ ) 硼替佐米培养 24 h; 由 MTT 分析评定细胞毒性。(E) 将 MM 患者 PBMC 在存在突巴新 (5  $\mu\text{M}$ ) 或不存在突巴新的情况下培养。使全细胞溶胞物经受使用抗-HDAC6、Ac-Lys 或  $\alpha$ -微管蛋白抗体的西方印迹。

图 17 表明突巴新抑制副分泌 MM 细胞生长。将 MM.1S (A) 和 RPMI8226 (B) 细胞在 BMSC-涂布或未涂布的板中在对照培养基中 ( $\square$ ) 培养 24 h; 以及用 1.25  $\mu\text{M}$  ( $\blacksquare$ )、2.5  $\mu\text{M}$  ( $\blacksquare$ ) 或 5  $\mu\text{M}$  ( $\blacksquare$ ) 突巴新在存在硼替佐米 (2.5 nM、5 nM) 或不存在硼替佐米的情况下培养 24 h。DNA 合成由 [<sup>3</sup>H]-胸苷吸收评定; 数据代表重复四次培养的平均值

( $\pm$ SD)。

图 18 表明仅突巴新、仅硼替佐米和突巴新与硼替佐米的组合为 MM.1S 细胞和 RPMI 细胞中蛋白代谢的有效抑制剂。

图 19 展示用所得影像对乙酰化微管蛋白进行高产量免疫荧光定量分析的简图。

图 20 展示突巴新和 LBH589 与硼替佐米在 MM.1S 细胞中的毒性和协同作用。

图 21 展示突巴新和 LBH589 与硼替佐米在 RPMI-8226 细胞中的毒性和协同作用。

图 22 展示使用细胞印迹分析，LBH589 和突巴新对于乙酰化微管蛋白的效应对比 LBH589 和突巴新对于乙酰化赖氨酸的效应。

图 23 展示突巴新的化学结构。

图 24 展示在骨髓瘤细胞系 (A) MM.1S 和 (B) RPMI 细胞中突巴新与万珂间的协同作用。

图 25 表明突巴新对于微管蛋白乙酰化对比突巴新对于赖氨酸乙酰化的特异性。

图 26 展示脱(羟甲基)-突巴新 (DHM-突巴新) 的化学结构。突巴新中苯环上的羟甲基取代基已被除去。

图 27 展示在骨髓瘤细胞系 (A) MM.1S 和 (B) RPMI 细胞中 DHM-突巴新与万珂间的协同作用。

图 28 表明 DHM-突巴新对于微管蛋白乙酰化对比 DHM-突巴新对于赖氨酸乙酰化的特异性。

图 29 展示 NKI-81-1 的化学结构。

图 30 展示在骨髓瘤细胞系 (A) MM.1S 和 (B) RPMI 细胞中 NKI-81-1 与万珂间的协同作用。

图 31 表明 NKI-81-1 对于微管蛋白乙酰化对比 NKI-81-1 对于赖氨酸乙酰化的特异性。

图 32 展示 NKI-94-1 的化学结构。

图 33 展示在骨髓瘤细胞系 (A) MM.1S 和 (B) RPMI 细胞中 NKI-94-1 与万珂间的协同作用。

图 34 表明 NKI-94-1 对于微管蛋白乙酰化对比 NKI-94-1 对于赖氨酸乙酰化的特异性。

图 35 展示 NKI-59-1 的化学结构。

图 36 展示在骨髓瘤细胞系 (A) MM.1S 和 (B) RPMI 细胞中 NKI-59-1 与万珂间的协同作用。

图 37 表明 NKI-59-1 对于微管蛋白乙酰化对比 NKI-59-1 对于赖氨酸乙酰化的特异性。

图 38 展示 NKI-60-1 的化学结构。

图 39 展示在骨髓瘤细胞系 (A) MM.1S 和 (B) RPMI 细胞中 NKI-60-1 与万珂间的协同作用。

图 40 表明 NKI-60-1 对于微管蛋白乙酰化对比 NKI-60-1 对于赖氨酸乙酰化的特异性。

图 41 展示 NKI-82-1 的化学结构。

图 42 展示在骨髓瘤细胞系 (A) MM.1S 和 (B) RPMI 细胞中 NKI-82-1 与万珂间的协同作用。

图 43 表明 NKI-82-1 对于微管蛋白乙酰化对比 NKI-82-1 对于赖氨酸乙酰化的特异性。

图 44 展示 NKI-84-1 的化学结构。

图 45 展示在骨髓瘤细胞系 (A) MM.1S 和 (B) RPMI 细胞中 NKI-84-1 与万珂间的协同作用。

图 46 表明在 293T 细胞中 NKI-84-1 对于微管蛋白乙酰化对比 NKI-84-1 对于赖氨酸乙酰化的特异性。

图 47 展示在 RPMI-8226 细胞中突巴新和 NKI-84-1 对于微管蛋白乙酰化的影响。

图 48 表明在 A549 细胞中 NKI-84-1 对于微管蛋白乙酰化对比 NKI-84-1 对于赖氨酸乙酰化的特异性。

图 49 表明在 A549 细胞中突巴新对于微管蛋白乙酰化对比突巴新对于赖氨酸乙酰化的特异性。

图 50 展示在 A549 细胞中突巴新和 NKI-84-1 对于微管蛋白乙酰化的影响。

图 51 展示化合物：突巴新、NKI-82-1、NKI-81-1、NKI-93-1、NKI-94-1、NKI-59-1、NKI-60-1、DHM-突巴新和 MAZ-1428 的 TDAC 抑制活性。

图 52 为展示化合物：突巴新、DHM-突巴新、NKI-59-1、NKI-60-1、NKI-82-1、NKI-84-1、NKI-94-1 和 NKI-81-1 的 HDAC 抑制作用和 TDAC 抑制作用的图表。

图 53A 展示多种化合物对 HSA 的结合。图 53B 展示图 53A 中所列的多种化合物的结构，其没有包括在上述图中。

图 54 展示对于小鼠多发性骨髓瘤模型和药物动力学来说突巴新在多种溶液中的溶解性。

图 55 展示突巴新的总合成。

图 56 为制备可用于合成脱(羟甲基)-突巴新的中间物的合成方案。其他醛可用于开始所述合成，从而使在这个位点有许多多样性。

图 57 展示突巴新的另一示范性合成。

图 58 展示可用于制备本发明化合物的多种类似物的示范性环氧化物开环反应。所述方案说明使用多种亲核试剂来打开环氧基团以产生二醇官能团，随后被盖帽以产生突巴新结构。

图 59 表明在乳腺癌中硼替佐米 (VELCADE<sup>®</sup>) 与突巴新闻的协同作用。使用例如突巴新的 HDAC6 抑制剂致使乳腺癌细胞对蛋白酶体抑制作用 (例如硼替佐米) 敏感。

### 具体实施方式

本发明提供新颖 HDAC 和 TDAC 抑制剂。这些化合物中的一些为聚集体的抑制剂。本发明还提供治疗由聚集体和/或蛋白酶体介导的细胞内蛋白降解病症的方法。所述聚集体为靶向聚集体与蛋白酶体的治疗策略的新颖治疗标靶。本发明的新颖治疗策略克服了从前治疗剂的问题，例如耐药性和毒性。

所述蛋白酶体在癌细胞生物学中得以充分特征化。聚集体为近核状蛋白水解复合物，其响应蛋白酶体抑制作用或错误折叠蛋白应激而形成。其直接牵涉以蛋白沉积为特征的囊性纤维化和某些神经退化性疾病的病理生理学。聚集体在癌症中的具体作用未曾描述。

近来，识别出胞浆组蛋白脱乙酰基酶蛋白 HDAC6 为聚集体形成和泛素化错误折叠蛋白应激后细胞存活所必需。聚集体为存活于癌细胞中的整体组分。HDAC6 介导聚集体形成的机制为靶向不特殊非组蛋白标靶的羧基端的脱乙酰基酶结构域的催化活性的结果。本发明还提供 HDAC6 的小分子抑制剂。在某些实施例中，这些新颖化合物为 HDAC6 的有效且具选择性的抑制剂。

所述聚集体首先描述在 1998 年，那时报导了在过度表达囊性纤维化跨膜传导受体 (CFTR) 的病态  $\Delta F508$  等位基因的细胞中存在微管相关的核周内含体的显现。随后的报导识别出具有过度表达的以下各物的聚集体的病态显现：早老素 (presenilin)-1 (Johnston JA, Ward CL, Kopito RR. Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J Cell Biol.* 1998; 143:1883-1898; 以引用的方式并入本文中)、帕金森 (parkin) (Junn E, Lee SS, Suhr UT, Mouradian MM. Parkin accumulation in aggresomes due to proteasome impairment. *J Biol Chem.* 2002; 277:47870-47877; 以引用的方式并入本文中)、周边髓鞘蛋白 PMP22 (Notterpek L, Ryan MC, Tobler AR, Shooter EM. PMP22 accumulation in aggresomes:

implications for CMT1A pathology. *Neurobiol Dis.* 1999; 6:450-460; 以引用的方式并入本文中)、流感病毒核蛋白 (Anton LC, Schubert U, Bacik I, Princiotta MF, Wearsch PA, Gibbs J, Day PM, Realini C, Rechsteiner MC, Bennink JR, Yewdell JW. Intracellular localization of proteasomal degradation of a viral antigen. *J Cell Biol.* 1999; 146:113-124; 以引用的方式并入本文中)、GFP 和膜转运蛋白 p115 的嵌合体 (Garcia-Mata R, Bebok Z, Sorscher EJ, Sztul ES. Characterization and dynamics of aggresome formation by a cytosolic GFP-chimera. *J Cell Biol.* 1999; 146:1239-1254; 以引用的方式并入本文中) 和显著淀粉样轻链 (Dul JL, Davis DP, Williamson EK, Stevens FJ, Argon Y. Hsp70 and antifibrillogenic peptides promote degradation and inhibit intracellular aggregation of amyloidogenic light chains. *J Cell Biol.* 2001; 152:705-716; 以引用的方式并入本文中)。已经建立模型系统来研究集合运输至聚集体的泛素化蛋白 ( $\Delta F508$  CFTR) (Johnston JA, Ward CL, Kopito RR. Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J Cell Biol.* 1998; 143:1883-1898; 以引用的方式并入本文中) 和非泛素化蛋白 (GFP-250) (Garcia-Mata R, Bebok Z, Sorscher EJ, Sztul ES. Characterization and dynamics of aggresome formation by a cytosolic GFP-chimera. *J Cell Biol.* 1999; 146:1239-1254; 以引用的方式并入本文中)。分泌、突变和野生型蛋白可假定为产生不能经由 26S 蛋白酶体的狭窄通道降解的稳定聚集体的不稳定运动中间物。这些复合物经受某种程度上由胞浆组蛋白脱乙酰基酶 HDAC6 介导的由动力蛋白活性、倒退转运至中心粒周聚集体 (Kawaguchi Y, Kovacs JJ, McLaurin A, Vance JM, Ito A, Yao TP. The deacetylase HDAC6 regulates aggresome formation and cell viability in response to misfolded protein stress. *Cell.* 2003; 115:727-738; 以引用的方式并入本文中)。

组蛋白脱乙酰基酶 (HDAC) 为至少 11 个锌结合的水解酶的家族, 其催化组蛋白蛋白上赖氨酸残基的脱乙酰作用。HDAC 的抑制会引起癌细胞系中染色质的高度乙酰化、转录改变、生长停滞和细胞凋亡。用可利用的非选择性 HDAC 抑制剂的早期临床试验表明包括在多发性骨髓瘤的血液学恶性肿瘤中的反应, 不过有显著的毒性。值得注意的是, 在骨髓瘤细胞系中已报导常规化学治疗剂 (例如美法仑 (melphalan)) 与硼替佐米的活体外协同作用, 但是没有提出双重蛋白酶体-聚集体抑制作用。直到最近, 仍未获得选择性 HDAC 抑制剂。

HDAC6 为聚集体形成与泛素化蛋白应激所需且在这方面对于细胞活力为必不可少。认为 HDAC6 经由锌指结构域结合泛素化蛋白且经由另一离散结合基元与动力蛋白运动原复合物相互作用。HDAC6 具有两个催化脱乙酰基酶结构域。目前不知道是氨基

端的组蛋白脱乙酰基酶还是羧基端的微管蛋白脱乙酰基酶 (TDAC) 结构域介导聚集体形成。

异常蛋白代谢为癌症的标志且牵涉致癌蛋白的稳定和肿瘤抑制基因的降解 (Adams J. The proteasome: a suitable antineoplastic target. *Nat Rev Cancer*. 2004; 4:349-360; 以引用的方式并入本文中)。肿瘤坏死因子  $\alpha$  诱导的核因子  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) 的活化为在恶性浆细胞中由 NF $\kappa$ B 抑制剂  $\beta$  (I $\kappa$ B) 蛋白水解降解介导的相关实例。由蛋白酶体抑制剂引起的 I $\kappa$ B 代谢的抑制作用在某种程度上解释受治疗骨髓瘤细胞的凋亡生长停滞 (Hideshima T, Richardson P, Chauhan D, Palombella VJ, Elliott PJ, Adams J, Anderson KC. The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. *Cancer Res*. 2001; 61:3071-3076; 以引用的方式并入本文中)。多发性骨髓瘤为研究癌症中蛋白降解机制的理想系统。自 1890 年 William Russell 以来, 已认为胞浆内含体为恶性浆细胞的确定组织特征。尽管不知道罗塞尔体 (Russell body) 的精确组成, 但已认为其为单型免疫球蛋白的含 ER 源泡囊的集合体 (Kopito RR, Sitia R. Aggresomes and Russell bodies. Symptoms of cellular indigestion? *EMBO Rep*. 2000; 1:225-231 以引用的方式并入本文中) 和对于泛素的阳性着色 (Manetto V, Abdul-Karim FW, Perry G, Tabaton M, Autilio-Gambetti L, Gambetti P. Selective presence of ubiquitin in intracellular inclusions. *Am J Pathol*. 1989; 134:505-513 以引用的方式并入本文中)。罗塞尔体基于酵母中 CFTR 过度表达而描述 (Sullivan ML, Youker RT, Watkins SC, Brodsky JL. Localization of the BiP molecular chaperone with respect to endoplasmic reticulum foci containing the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in yeast. *J. Histochem. Cytochem*. 2003; 51:545-548; 以引用的方式并入本文中), 因此产生如下猜疑, 即对于这些结构可能与压倒性蛋白代谢及潜在地与聚集体有关系。聚集体在癌症中的作用仍不明确。

多发性骨髓瘤 (MM) 为不管常规治疗 (Gregory, W. M., Richards, M. A. & Malpas, J. S. (1992) *J Clin Oncol* **10**, 334-342; 以引用的方式并入本文中) 还是大剂量疗法和干细胞移植 (Attal, M., Harousseau, J. L., Facon, T., Guilhot, F., Doyen, C, Fuzibet, J. G., Monconduit, M., Hulin, C., Caillot, D., Bouabdallah, R., Voillat, L., Sotto, J. J., Grosbois, B. & Bataille, R. (2003) *N Engl J Med* **349**, 2495-2502; 以引用的方式并入本文中) 都仍然不可医治的浆细胞恶性肿瘤。近来已揭示新颖药剂, 其不但靶向 MM 细胞, 而且靶向骨髓 (BM) 微环境, 且可克服常规的耐药性 (Hideshima, T. & Anderson, K. C. (2002) *Nat Rev Cancer* **2**, 927-937; 以引用的方式并入本文中)。例如, 蛋白酶体抑制剂硼替佐米 (形式

上为 PS-341) 诱导人类 MM 细胞系和新鲜分离的患者 MM 细胞中显著的抗肿瘤活性 (Hideshima, T. & Anderson, K. C. (2002) *Nat Rev Cancer* 2, 927-937; Hideshima, T., Richardson, P., Chauhan, D., Palombella, V., Elliott, P., Adams, J. & Anderson, K. C. (2001) *Cancer Res.* 61, 3071-3076; Mitsiades, N., Mitsiades, C. S., Poulaki, V., Chauhan, D., Gu, X., Bailey, C, Joseph, M., Libermann, T. A., Treon, S. P., Munshi, N. C., Richardson, P. G., Hideshima, T. & Anderson, K. C. (2002) *Proc Natl AcadSci USA* 99, 14374-14379; Hideshima, T., Chauhan, D., Richardson, P., Mitsiades, C, Mitsiades, N., Hayashi, T., Munshi, N., Dang, L., Castro, A., Palombella, V., Adams, J. & Anderson, K. C. (2002) *J Biol Chem* 277, 16639-47; Mitsiades, N., Mitsiades, C. S., Richardson, P. G., Poulaki, V., Tai, Y. T., Chauhan, D., Fanourakis, G., Gu, X., Bailey, C, Joseph, M., Libermann, T. A., Schlossman, R., Munshi, N. C, Hideshima, T. & Anderson, K. C. (2003) *Blood* 101, 2377-80; Chauhan, D., Li, G., Shringarpure, R., Podar, K., Ohtake, Y., Hideshima, T. & Anderson, K. C. (2003) *Cancer Res* 63, 6174-6177; Hideshima, T., Mitsiades, C, Akiyama, M., Hayashi, T., Chauhan, D., Richardson, P., Schlossman, R., Podar, K., Munshi, N. C, Mitsiades, N. & Anderson, K. C. (2003) *Blood* 101, 1530-1534; Hideshima, T., Chauhan, D., Hayashi, T., Akiyama, M., Mitsiades, N., Mitsiades, C, Podar, K., Munshi, N. C, Richardson, P. G. & Anderson, K. C. (2003) *Oncogene* 22, 8386-8393; Hideshima, T., Podar, K., Chauhan, D., Ishitsuka, K., Mitsiades, C, Tai, Y.-Z., Hamasaki, M., Raje, N., Hideshima, H., Schreiner, G., Nguyen, A. N., Navas, T., Munshi, N. C, Richardson, P. G, Higgins, L. S. & Anderson, K. C. (2004) *Oncogene* 23, 8766-8776; 各自以引用的方式并入本文中), 此与 c-Jun NH<sub>2</sub> 端的激酶 (JNK) (也称为应激活化的蛋白激酶)和卡斯蛋白酶活化有关, 然后细胞凋亡 (Hideshima, T., Richardson, P., Chauhan, D., Palombella, V., Elliott, P., Adams, J. & Anderson, K. C. (2001) *Cancer Res.* 61,3071-3076; Mitsiades, N., Mitsiades, C. S., Poulaki, V., Chauhan, D., Gu, X., Bailey, C, Joseph, M., Libermann, T. A., Treon, S. P., Munshi, N. C, Richardson, P. G., Hideshima, T. & Anderson, K. C. (2002) *Proc Natl Acad Sci USA* 99,14374-14379; Hideshima, T., Mitsiades, C, Akiyama, M., Hayashi, T., Chauhan, D., Richardson, P., Schlossman, R., Podar, K., Munshi, N. C, Mitsiades, N. & Anderson, K. C. (2003) *Blood* 101,1530-1534; 各自以引用的方式并入本文中)。硼替佐米还通过下调粘附分子 (ICAM-1 和 VCAM-1) 抑制 MM 细胞对骨髓基质细胞 (BMSC) 的粘附 (Hideshima, T., Chauhan, D., Schlossman, R. L., Richardson, P. R. & Anderson, K. C. (2001) *Oncogene* 20, 4519-4527; 以引用的方式并入本文中); 以及诱导 DNA-蛋白激酶催化亚单位的裂解和运动失调性毛细血管扩张突变, 提出硼替佐米还抑制 DNA 修复。IL-6 或 MM 细胞对 BMSC 的粘附都不会使得免受硼替佐米诱导的细胞凋亡影响。在不受限于任何科学理论

的情况下，硼替佐米增强敏感性且可克服 MM 细胞中对常规化学治疗剂，尤其对 DNA 杀伤剂的抵抗性 (Mitsiades, N., Mitsiades, C. S., Richardson, P. G., Poulaki, V., Tai, Y. T., Chauhan, D., Fanourakis, G., Gu, X., Bailey, C., Joseph, M., Libermann, T. A., Schlossman, R., Munshi, N. C., Hideshima, T. & Anderson, K. C. (2003) *Blood* **101**,2377-80; 以引用的方式并入本文中)。支持这种观点，202 名患有难治性复发 MM 的患者用硼替佐米治疗的 II 期试验表明有 35% 反应，包括 10% 完全且接近完全的反应 (Richardson, P. G., Barlogie, B., Berenson, J., Singhal, S., Jagannath, S., Irwin, D., Rajkumar, S. V., Srkalovic, G., Alsina, M., Alexanian, R., Siegel, D., Orłowski, R. Z., Kuter, D., Limentani, S. A., Lee, S., Hideshima, T., Esseltine, D. L., Kauffman, M., Adams, J., Schenkein, D. P. & Anderson, K. C. (2003) *N Engl J Med* **348**, 2609-2617; 以引用的方式并入本文中); 然而，65% 的患者没有反应。热休克蛋白 (hsp) -27 介导硼替佐米抵抗性; 相反，使用反义 hsp-27、p38 促分裂素原活化蛋白激酶 (MAPK) siRNA 或 p38 MAPK 抑制剂抑制 hsp-27 表达以下调 hsp-27 可恢复 MM 细胞对硼替佐米的敏感性 (Chauhan, D., Li, G., Shringarpure, R., Podar, K., Ohtake, Y., Hideshima, T. & Anderson, K. C. (2003) *Cancer Res* **63**, 6174-6177; Hideshima, T., Podar, K., Chauhan, D., Ishitsuka, K., Mitsiades, C., Tai, Y.-Z., Hamasaki, M., Raje, N., Hideshima, H., Schreiner, G., Nguyen, A. N., Navas, T., Munshi, N. C., Richardson, P. G., Higgins, L. S. & Anderson, K. C. (2004) *Oncogene* **23**, 8766-8776; 各自以引用的方式并入本文中)。

聚集体为降解聚泛素化错误折叠/打开蛋白的蛋白酶体的替代性系统 (Kopito, R. R. (2000) *Trends Cell Biol* **10**, 524-530; Bennett, E. J., Bence, N. F., Jayakumar, R. & Kopito, R. R. (2005) *Mol Cell* **17**, 351-365; 各自以引用的方式并入本文中)。聚集体形成诱导自噬性清除，其造成溶酶体降解。因此，聚集体途径可能提供自细胞质传递聚集蛋白到溶酶体用于降解的新颖系统 (Garcia-Mata, R., Gao, Y. S. & Sztul, E. (2002) *Traffic* **3**, 388-396; 以引用的方式并入本文中)。在聚集体蛋白降解中，组蛋白脱乙酰基酶 6 (HDAC6) 结合聚泛素化蛋白与动力蛋白运动原，从而用以募集蛋白货物 (protein cargo) 至动力蛋白运动原以转运至聚集体 (Kawaguchi, Y., Kovacs, J. J., McLaurin, A., Vance, J. M., Ito, A. & Yao, T. P. (2003) *Cell* **115**,727-738; 以引用的方式并入本文中)。本发明的方法包括蛋白酶体与聚集体蛋白降解系统的抑制作用。在不受限于任何理论的情况下，所述抑制作用诱导聚泛素化蛋白的累积和显著的细胞应激，然后是细胞凋亡级联反应的活化。例如，利用硼替佐米以抑制所述蛋白酶体且利用特异性抑制 HDAC6 的突巴新 (Haggarty, S. J., Koeller, K. M., Wong, J. C., Grozinger, C. M. & Schreiber, S. L. (2003) *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 4389-4394; Haggarty, S. J., Koeller, K. M., Wong, J. C., Butcher, R. A. &

Schreiber, S. L. (2003) *Chem Biol* **10**, 383-396; Wong, J. C, Hong, R. & Schreiber, S. L. (2003) *J Am Chem Soc* **125**, 5586-5587; 以引用的方式并入本文中) 以阻断聚集体。在本发明的方法中, 与硼替佐米组合的突巴新或其他 HDAC6 抑制剂诱导多发性骨髓瘤细胞系以及来自多发性骨髓瘤患者的新鲜分离的骨髓浆细胞中的协同细胞毒性。

### 定义

在进一步描述本发明之前且为了使本发明可以更容易地理解, 为了方便起见在此首先定义且收集某些术语。

本发明的某些化合物和具体官能团的定义也在下文更详细地描述。对本发明的目的来说, 化学元素根据元素周期表, CAS 版本, *Handbook of Chemistry and Physics*, 第 75 版识别, 且具体官能团通常如其中所描述来定义。另外, 有机化学通则以及具体官能性部分和反应性在 “Organic Chemistry”, Thomas Sorrell, University Science Books, Sausalito: 1999 中描述, 其全部内容均以引用的方式并入本文中。此外, 所属领域的技术人员应了解如本文所述的合成方法利用多种保护基。本文使用的术语 “保护基” 意谓特定官能性部分 (例如 C、O、S 或 N) 被暂时性阻断以使反应可在多官能性化合物中的另一反应性位点选择性地进行。在优选实施例中, 保护基以高产率选择性地反应以得到经保护的基质, 其对所计划的反应稳定; 所述保护基必须由不攻击另一官能团的容易得到的优选无毒试剂以高产率选择性除去; 所述保护基形成可易于分离的衍生物 (更优选不产生新的立体中心); 并且所述保护基具有最少的其他官能团以避免另外的反应位点。如本文详述, 可利用氧、硫、氮和碳保护基。在本文详述了示范性保护基, 然而, 应了解本发明并不是想要限于这些保护基; 相反, 使用上述标准可易于识别多种其他等价保护基且将其用在本发明的方法中。另外, 多种保护基描述在 “Protective Groups in Organic Synthesis” 第 3 版, Greene, T.W.和 Wuts, P.G.编, John Wiley & Sons, New York: 1999 中, 其全部内容以引用的方式并入本文中。此外, 多种碳保护基描述在 Myers, A.; Kung, D.W.; Zhong, B.; Movassaghi, M.; Kwon, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 8401-8402 中, 其全部内容以引用的方式并入本文中。

应了解本文所述的化合物可经许多取代基或官能性部分取代。通常, 包含于本发明的式中的术语 “经取代” (无论之前是否有术语 “视情况”) 和取代基是指在既定结构中的氢基团经指定取代基的基团置换。当任何既定结构中的一个以上位置可经一个以上选自指定基团的取代基取代时, 在每一位置上所述取代基可相同或不同。如本文所用, 术语 “经取代” 预期包括有机化合物的所有容许的取代基。在广泛方面中, 容许的取代基包括有机化合物的非环状和环状、分支和未分支、碳环和杂环、芳香族和非芳香族取

代基。对于本发明目的来说，例如氮的杂原子可具有氢取代基和/或本文所述的有机化合物的任何容许的取代基，其使所述杂原子的原子价饱和。此外，本发明并不是想要以任何方式限制有机化合物的容许的取代基。取代基与本发明所预想的变体的组合优选为形成可用于治疗（例如）增殖病症（包括（但不限于）癌症）的稳定化合物的那些取代基。如本文所用的术语“稳定”优选是指具有足以允许制造的安全性且经一段足以检测的时间，优选足以用于本文详述的目的的时间维持化合物的完整性的化合物。

如本文所用的术语“酰基”是指含羰基的官能团，例如 $-C(=O)R'$ ，其中R为脂肪族部分、脂环族部分、杂脂肪族部分、杂环部分、芳基、杂芳基、(脂肪族)芳基、(杂脂肪族)芳基、杂脂肪族(芳基)或杂脂肪族(杂芳基)部分，其中脂肪族、杂脂肪族、芳基或杂芳基部分经取代或未经取代，或为经取代的（例如氢或脂肪族、杂脂肪族、芳基或杂芳基部分）含氧或含氮官能团（例如形成羧酸、酯或酰胺的官能团）。

如本文所用的术语“脂肪族部分”包括饱和与不饱和、直链（即，未分支）或分支脂肪族烃，其视情况经一个或一个以上官能团取代。所属领域的技术人员应了解“脂肪族部分”在本文中意欲包括（但不限于）烷基、烯基、炔基部分。因此，如本文所用，术语“烷基”包括直链和分支烷基。类似约定适合其他通称，例如“烯基”、“炔基”等。此外，如本文所用，术语“烷基”、“烯基”、“炔基”等涵盖经取代的基团与未经取代的基团。在某些实施例中，如本文所用，“低碳烷基”用以指示那些烷基（经取代、未经取代、分支或未分支）具有1-6个碳原子。

在某些实施例中，用于本发明的烷基、烯基和炔基含有1-20个脂肪族碳原子。在某些其他实施例中，用于本发明的烷基、烯基和炔基含有1-10个脂肪族碳原子。在其他实施例中，用于本发明的烷基、烯基和炔基含有1-8个脂肪族碳原子。在其他实施例中，用于本发明的烷基、烯基和炔基含有1-6个脂肪族碳原子。在其他实施例中，用于本发明的烷基、烯基和炔基含有1-4个脂肪族碳原子。因此，说明性脂肪族基团包括（但不限于）（例如）甲基、乙基、正丙基、异丙基、烯丙基、正丁基、仲丁基、异丁基、叔丁基、正戊基、仲戊基、异戊基、叔戊基、正己基、仲己基部分等，其又可能带有一个或一个以上取代基。烯基包括（但不限于）（例如）乙烯基、丙烯基、丁烯基、1-甲基-2-丁烯-1-基等。代表性炔基包括（但不限于）乙炔基、2-丙炔基（炔丙基）、1-丙炔基等。

如本文所用的术语“脂环族部分”是指组合有脂肪族化合物和环状化合物的性质的化合物且包括（但不限于）环状或多环脂肪族烃和桥接环烷基化合物，其视情况经一个或一个以上官能团取代。所属领域的技术人员应了解，“脂环族部分”在本文中意欲包括（但不限于）环烷基、环烯基和环炔基部分，其视情况经一个或一个以上官能团取

代。因此，说明性脂环基团包括（但不限于）（例如）环丙基、-CH<sub>2</sub>-环丙基、环丁基、-CH<sub>2</sub>-环丁基、环戊基、-CH<sub>2</sub>-环戊基-n、环己基、-CH<sub>2</sub>-环己基、环己烯基乙基、环己烷基乙基、降冰片基部分等，其又可能带有一个或一个以上取代基。

如本文所用的术语“烷氧基”（或“烷基氧基”）或“硫代烷基”是指经由氧原子或经由硫原子连接于母分子或部分上的如先前定义的烷基。在某些实施例中，所述烷基含有 1-20 个脂肪族碳原子。在某些其他实施例中，所述烷基含有 1-10 个脂肪族碳原子。在其他实施例中，用于本发明的烷基、烯基和炔基含有 1-8 个脂肪族碳原子。在其他实施例中，所述烷基含有 1-6 个脂肪族碳原子。在其他实施例中，所述烷基含有 1-4 个脂肪族碳原子。烷氧基的实例包括（但不限于）甲氧基、乙氧基、丙氧基、异丙氧基、正丁氧基、叔丁氧基、新戊氧基和正己氧基。硫代烷基的实例包括（但不限于）甲硫基、乙硫基、丙硫基、异丙硫基、正丁硫基等。

术语“烷基氨基”是指具有结构-NHR'的基团，其中 R'为本文所定义的烷基。术语“氨基烷基”是指具有结构 NH<sub>2</sub>R'的基团，其中 R'为本文所定义的烷基。在某些实施例中，所述烷基含有 1-20 个脂肪族碳原子。在某些其他实施例中，所述烷基含有 1-10 个脂肪族碳原子。在其他实施例中，用于本发明的烷基、烯基和炔基含有 1-8 个脂肪族碳原子。在其他实施例中，所述烷基含有 1-6 个脂肪族碳原子。在其他实施例中，所述烷基含有 1-4 个脂肪族碳原子。烷基氨基的实例包括（但不限于）甲基氨基、乙基氨基、异丙基氨基等。

本发明化合物的上述脂肪族（和其他）部分的取代基的一些实例包括（但不限于）脂肪族部分；杂脂肪族部分；芳基；杂芳基；烷基芳基；烷基杂芳基；烷氧基；芳氧基；杂烷氧基；杂芳氧基；烷硫基；芳硫基；杂烷硫基；杂芳硫基；F；Cl；Br；I；-OH；-NO<sub>2</sub>；-CN；-CF<sub>3</sub>；-CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>；-CHCl<sub>2</sub>；-CH<sub>2</sub>OH；-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH；-CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>；-CH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>；-C(O)R<sub>x</sub>；-CO<sub>2</sub>(R<sub>x</sub>)；-CON(R<sub>x</sub>)<sub>2</sub>；-OC(O)R<sub>x</sub>；-OCO<sub>2</sub>R<sub>x</sub>；-OCON(R<sub>x</sub>)<sub>2</sub>；-N(R<sub>x</sub>)<sub>2</sub>；-S(O)<sub>2</sub>R<sub>x</sub>；-NR<sub>x</sub>(CO)R<sub>x</sub>，其中 R<sub>x</sub> 每次出现时独立包括（但不限于）脂肪族部分、脂环族部分、杂脂肪族部分、杂环部分、芳基、杂芳基、烷基芳基或烷基杂芳基，其中任何如上所述及本文中的脂肪族、杂脂肪族、烷基芳基或烷基杂芳基取代基可为经取代或未经取代的，分支或未分支的，环状或非环状的，且其中任何如上所述及本文中的芳基或杂芳基取代基可经取代或未经取代。通常适用的取代基的其他实例由本文所述的实例中展示的具体实施例来说明。

通常，如本文所用的术语“芳香族部分”是指具有优选 3-14 个碳原子（其各自可经取代或未经取代）的稳定单环或多环不饱和部分。在某些实施例中，术语“芳香族部分”

是指具有垂直于各环原子所在的环平面的 p 轨道且符合 Huckel 规则的平面环，其中所述环中  $\pi$  电子数为  $(4n+2)$ ，其中 n 为整数。不符合芳香性的这些标准中的一个或所有的单环或多环不饱和部分在本文中定义为“非芳香族部分”且由术语“脂环族部分”所涵盖。

通常，如本文所用的术语“杂芳香族部分”是指具有优选 3-14 个碳原子（其各自可经取代或未经取代）且在环内包含至少一个选自 O、S 和 N 的杂原子（即，替代环碳原子）的稳定单环或多环不饱和部分。在某些实施例中，术语“杂芳香族部分”是指包含至少一个杂原子、具有垂直于各环原子所在的环平面的 p 轨道且符合 Huckel 规则的平面环，其中所述环中  $\pi$  电子数为  $(4n+2)$ ，其中 n 为整数。

也应了解本文所定义的芳香族和杂芳香族部分可经由烷基或杂烷基部分连接且因此包括-(烷基)芳香族部分、-(杂烷基)芳香族部分、-(杂烷基)杂芳香族部分和-(杂烷基)杂芳香族部分。因此，如本文所用，短语“芳香族或杂芳香族部分”与“芳香族、杂芳香族、-(烷基)芳香族、-(杂烷基)芳香族、-(杂烷基)杂芳香族和-(杂烷基)杂芳香族部分”可互换。取代基包括（但不限于）任何先前提到的取代基，即对于脂肪族部分或对于本文所揭示的其他部分叙述的导致形成稳定化合物的取代基。

如本文所用的术语“芳基”与此项技术中所述术语的普通意义没有很大差别且是指包含至少一个芳环的不饱和环状部分。在某些实施例中，“芳基”是指具有一个或两个芳环的单环或双环碳环系统，包括（但不限于）苯基、萘基、四氢萘基、二氢茛基、茛基等。

如本文所用的术语“杂芳基”与此项技术中所述术语的普通意义没有很大差别，且是指具有 5 至 10 个环原子的环状芳香族基团，其中一个环原子是选自 S、O 和 N；零、一或两个环原子是独立选自 S、O 和 N 的其他杂原子；且剩余环原子为碳，所述基团经由任何所述环原子与分子的其余部分相连，例如吡啶基、吡嗪基、嘧啶基、吡咯基、吡唑基、咪唑基、噁唑基、噁唑基、异噁唑基、噻二唑基、噁二唑基、噻吩基、呋喃基、喹啉基、异喹啉基等。

应了解芳基和杂芳基（包括双环芳基）可未经取代或经取代，其中取代包括其上的一个或一个以上氢原子独立地经以下部分中的任何一个或一个以上置换：包括（但不限于）脂肪族部分；脂环族部分；杂脂肪族部分；杂环部分；芳香族部分；杂芳香族部分；芳基；杂芳基；烷基芳基；杂烷基芳基；烷基杂芳基；杂烷基杂芳基；烷氧基；芳氧基；杂烷氧基；杂芳氧基；烷硫基；芳硫基；杂烷硫基；杂芳硫基；F；Cl；Br；I；-OH；-NO<sub>2</sub>；-CN；-CF<sub>3</sub>；-CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>；-CHCl<sub>2</sub>；-CH<sub>2</sub>OH；-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH；-CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>；-CH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>；

-C(O)R<sub>x</sub>; -CO<sub>2</sub>(R<sub>x</sub>); -CON(R<sub>x</sub>)<sub>2</sub>; -OC(O)R<sub>x</sub>; -OCO<sub>2</sub>R<sub>x</sub>; -OCON(R<sub>x</sub>)<sub>2</sub>; -N(R<sub>x</sub>)<sub>2</sub>; -S(O)R<sub>x</sub>; -S(O)<sub>2</sub>R<sub>x</sub>; -NR<sub>x</sub>(CO)R<sub>x</sub>, 其中 R<sub>x</sub> 每次出现时独立地包括 (但不限于) 脂肪族部分、脂环族部分、杂脂肪族部分、杂环部分、芳香族部分、杂芳香族部分、芳基、杂芳基、烷基芳基、烷基杂芳基、杂烷基芳基或杂烷基杂芳基, 其中任何如上所述及本文中的脂肪族、脂环族、杂脂肪族、杂环、烷基芳基或烷基杂芳基取代基可为经取代或未经取代的, 分支或未分支的, 饱和或不饱和的, 且其中任何如上所述及本文中的芳香族、杂芳香族、芳基、杂芳基、-(烷基)芳基或-(烷基)杂芳基取代基可经取代或未经取代。另外, 应了解任何两个邻近基团可一同代表 4、5、6 或 7 元经取代或未经取代的脂环族或杂环部分。通常适用的取代基的其他实例由本文所述的实例中展示的具体实施例来说明。

如本文所用的术语“环烷基”具体提及具有 3 至 7 个, 优选 3 至 10 个碳原子的基团。合适的环烷基包括 (但不限于) 环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基等, 如在脂肪族、脂环族、杂脂肪族或杂环部分的情况下, 其可视情况经包括 (但不限于) 以下部分的取代基取代: 脂肪族部分; 脂环族部分; 杂脂肪族部分; 杂环部分; 芳香族部分; 杂芳香族部分; 芳基; 杂芳基; 烷基芳基; 杂烷基芳基; 烷基杂芳基; 杂烷基杂芳基; 烷氧基; 芳氧基; 杂烷氧基; 杂芳氧基; 烷硫基; 芳硫基; 杂烷硫基; 杂芳硫基; F; Cl; Br; I; -OH; -NO<sub>2</sub>; -CN; -CF<sub>3</sub>; -CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>; -CHCl<sub>2</sub>; -CH<sub>2</sub>OH; -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH; -CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>; -CH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>; -C(O)R<sub>x</sub>; -CO<sub>2</sub>(R<sub>x</sub>); -CON(R<sub>x</sub>)<sub>2</sub>; -OC(O)R<sub>x</sub>; -OCO<sub>2</sub>R<sub>x</sub>; -OCON(R<sub>x</sub>)<sub>2</sub>; -N(R<sub>x</sub>)<sub>2</sub>; -S(O)<sub>2</sub>R<sub>x</sub>; -NR<sub>x</sub>(CO)R<sub>x</sub>, 其中 R<sub>x</sub> 每次出现独立地包括 (但不限于) 脂肪族部分、脂环族部分、杂脂肪族部分、杂环部分、芳香族部分、杂芳香族部分、芳基、杂芳基、烷基芳基、烷基杂芳基、杂烷基芳基或杂烷基杂芳基, 其中任何如上所述及本文中的脂肪族、脂环族、杂脂肪族、杂环、烷基芳基或烷基杂芳基取代基可为经取代或未经取代的, 分支或未分支的, 饱和或不饱和的, 且其中任何如上所述及本文中的芳香族、杂芳香族、芳基或杂芳基取代基可经取代或未经取代。通常适用的取代基的其他实例由本文所述的实例中展示的具体实施例来说明。

如本文所用的术语“杂脂肪族部分”是指在主链上一个或一个以上碳原子已被杂原子取代的脂肪族部分。因此, 杂脂肪族基团是指含有一个或一个以上氧、硫、氮、磷或硅原子例如替代碳原子的脂肪族链。杂脂肪族部分可为线性或分支, 且可饱和或不饱和。在某些实施例中, 杂脂肪族部分通过用一个或一个以上包括 (但不限于) 以下部分的部分独立地置换其上一个或一个以上氢原子而被取代: 脂肪族部分; 脂环族部分; 杂脂肪族部分; 杂环部分; 芳香族部分; 杂芳香族部分; 芳基; 杂芳基; 烷基芳基; 烷基杂芳基; 烷氧基; 芳氧基; 杂烷氧基; 杂芳氧基; 烷硫基; 芳硫基; 杂烷硫基; 杂芳硫

基; F; Cl; Br; I; -OH; -NO<sub>2</sub>; -CN; -CF<sub>3</sub>; -CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>; -CHCl<sub>2</sub>; -CH<sub>2</sub>OH; -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH; -CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>; -CH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>; -C(O)R<sub>x</sub>; -CO<sub>2</sub>(R<sub>x</sub>); -CON(R<sub>x</sub>)<sub>2</sub>; -OC(O)R<sub>x</sub>; -OCO<sub>2</sub>R<sub>x</sub>; -OCON(R<sub>x</sub>)<sub>2</sub>; -N(R<sub>x</sub>)<sub>2</sub>; -S(O)<sub>2</sub>R<sub>x</sub>; -NR<sub>x</sub>(CO)R<sub>x</sub>, 其中 R<sub>x</sub> 每次出现时独立地包括 (但不限于) 脂肪族部分、脂环族部分、杂脂肪族部分、杂环部分、芳香族部分、杂芳香族部分、芳基、杂芳基、烷基芳基、烷基杂芳基、杂烷基芳基或杂烷基杂芳基, 其中任何如上所述及本文中的脂肪族、脂环族、杂脂肪族、杂环、烷基芳基或烷基杂芳基取代基可为经取代或未经取代、分支或未分支、饱和或不饱和, 且其中任何如上所述及本文中的芳香族、杂芳香族、芳基或杂芳基取代基可经取代或未经取代。通常适用的取代基的其他实例由本文所述的实例中展示的具体实施例来说明。

如本文所用的术语“杂环烷基”、“杂环”或“杂环状”是指组合有杂脂肪族和环状化合物的性质且包括 (但不限于) 具有 5-16 个原子的饱和和不饱和单环或多环环状环系统的化合物, 其中至少一个环原子为选自 O、S 和 N 的杂原子 (其中所述氮和硫杂原子可视情况经氧化), 其中所述环系统视情况经一个或一个本文所定义的官能团取代。在某些实施例中, 所述术语“杂环烷基”、“杂环”或“杂环状”是指非芳香族 5、6 或 7 元环或多环基团, 其中至少一个环原子为选自 O、S 和 N 的杂原子 (其中所述氮和硫杂原子可视情况经氧化), 其包括 (但不限于) 双或三环基团, 其包含具有介于 1 个与 3 个之间独立地选自氧、硫和氮杂原子的稠合六元环, 其中 (i) 各 5 元环具有 0 至 2 个双键, 各 6 元环具有 0 至 2 个双键且各 7 元环具有 0 至 3 个双键, (ii) 所述氮和硫杂原子可视情况经氧化, (iii) 所述氮杂原子可视情况经季铵化, 和 (iv) 任何上述杂环可与芳基或杂芳基环稠合。代表性杂环包括 (但不限于) 诸如以下的杂环: 呋喃基、硫代呋喃基、吡喃基、吡咯基、噻吩基、吡咯烷基、吡啶基、吡啶烷基、咪唑基、咪唑烷基、哌啶基、哌嗪基、噁唑基、噁唑烷基、异噁唑基、异噁唑烷基、二噁唑基、噻二唑基、噁二唑基、四唑基、三唑基、噻三唑基、噁三唑基、噻二唑基、噁二唑基、吗啉基、噻唑基、噻唑烷基、异噻唑基、异噻唑烷基、二噻唑基、二噻唑烷基、四氢呋喃基及其苯并稠合的衍生物。在某些实施例中, 利用“经取代杂环或杂环烷基或杂环状”基团且如本文所用, “经取代杂环或杂环烷基或杂环状”基团是指通过用以下各部分 (但不限于) 独立置换其上的一个、两个或三个氢原子而被取代的如上所定义的杂环或杂环烷基或杂环基团: 脂肪族部分; 脂环族部分; 杂脂肪族部分; 杂环部分; 芳香族部分; 杂芳香族部分; 芳基; 杂芳基; 烷基芳基; 杂烷基芳基; 烷基杂芳基; 杂烷基杂芳基; 烷氧基; 芳氧基; 杂烷氧基; 杂芳氧基; 烷硫基; 芳硫基; 杂烷硫基; 杂芳硫基; F; F; Cl; Br; I; -OH; -NO<sub>2</sub>; -CN; -CF<sub>3</sub>; -CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>; -CHCl<sub>2</sub>; -CH<sub>2</sub>OH; -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH;

$-\text{CH}_2\text{NH}_2$ ;  $-\text{CH}_2\text{SO}_2\text{CH}_3$ ;  $-\text{C}(\text{O})\text{R}_x$ ;  $-\text{CO}_2(\text{R}_x)$ ;  $-\text{CON}(\text{R}_x)_2$ ;  $-\text{OC}(\text{O})\text{R}_x$ ;  $-\text{OCO}_2\text{R}_x$ ;  $-\text{OCON}(\text{R}_x)_2$ ;  $-\text{N}(\text{R}_x)_2$ ;  $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}_x$ ;  $-\text{NR}_x(\text{CO})\text{R}_x$ , 其中  $\text{R}_x$  每次出现时独立地包括(但不限于)脂肪族部分、脂环族部分、杂脂肪族部分、杂环部分、芳香族部分、杂芳香族部分、芳基、杂芳基、烷基芳基、烷基杂芳基、杂烷基芳基或杂烷基杂芳基, 其中任何如上所述及本文中的脂肪族、脂环族、杂脂肪族、杂环、烷基芳基或烷基杂芳基取代基可为经取代或未经取代的, 分支或未分支的, 饱和或不饱和的, 且其中任何如上所述及本文中的芳香族、杂芳香族、芳基或杂芳基取代基可经取代或未经取代。通常适用的取代基的其他实例由本文所述的实例中展示的具体实施例来说明。

另外, 应了解任何如上所述及本文中的脂环族或杂环部分可包含与其稠合的芳基或杂芳基部分。通常适用的取代基的其他实例由本文所述的实例中展示的具体实施例来说明。如本文所用的术语“卤基”和“卤素”是指选自氟、氯、溴和碘的原子。

如本文所用的术语“卤基”和“卤素”是指选自氟、氯、溴和碘的原子。

如上文所定义的术语“卤烷基”表示具有 1、2 或 3 个卤素原子与其连接的烷基, 且实例为诸如氯甲基、溴乙基、三氟甲基等的基团。

如本文所用的术语“氨基”是指伯胺( $-\text{NH}_2$ )、仲胺( $-\text{NHR}_x$ )、叔胺( $-\text{NR}_x\text{R}_y$ )或季胺( $-\text{N}^+\text{R}_x\text{R}_y\text{R}_z$ ), 其中  $\text{R}_x$ 、 $\text{R}_y$  和  $\text{R}_z$  独立为如本文所定义的脂肪族、脂环族、杂脂肪族、杂环、芳香族或杂芳香族部分。氨基的实例包括(但不限于)甲氨基、二甲氨基、乙氨基、二乙氨基、二乙氨基羰基、甲基乙氨基、异丙基氨基、N-哌啶基、三甲氨基和丙氨基。

如本文所用的术语“亚烷基”是指仅由碳和氢原子组成, 具有 1 至  $n$  个碳原子, 在基团的两端具有自由价“-”的经取代或未经取代的线性或分支的饱和二价基团。

如本文所用的术语“亚烯基”是指仅由碳和氢原子组成, 具有 2 至  $n$  个碳原子, 在基团的两端具有自由价“-”的经取代或未经取代的线性或分支的不饱和二价基团, 且其中所述不饱和度仅以双键形式存在且其中双键可存在于链的第一个碳和分子的其余碳之间。

如本文所用的术语“亚炔基”是指仅由碳和氢原子组成, 具有 2 至  $n$  个碳原子, 在基团的两端具有自由价“-”的经取代或未经取代的线性或分支的不饱和二价基团, 且其中所述不饱和度仅以三键形式存在且其中三键可存在于链的第一个碳和分子的其余碳之间。

除非另有陈述, 否则如本文所用的术语“烷基”、“烯基”、“炔基”、“杂烷基”、“杂烯基”、“杂炔基”、“亚烷基”、“亚烯基”、-(烷基)芳基、-(杂烷基)芳基、-(杂烷基)芳基、-(杂烷基)杂芳基等涵盖经取代和未经取代以及线性和分支的基团。类似

地，术语“脂肪族部分”、“杂脂肪族部分”等涵盖经取代和未经取代以及线性和分支的基团。类似地，术语“环烷基”、“杂环”、“杂环状”等涵盖经取代和未经取代以及饱和和不饱和的基团。另外，术语“环烯基”、“环炔基”、“杂环烯基”、“杂环炔基”、“芳香族部分”、“杂芳香族部分”、“芳基”、“杂芳基”等涵盖经取代和未经取代的基团。

如本文所用的短语“医药学上可接受的衍生物”表示所述化合物的任何医药学上可接受的盐、酯或所述酯的盐，或任何其他加合物或衍生物，在投与患者后，其能够（直接或间接）提供如本文另外所述的化合物或其代谢物或残余物。因此，医药学上可接受的衍生物尤其包括前药。前药为化合物的衍生物，通常具有显著降低的药理学活性，其含有另一容许活体内除去而产生作为医药学活性物质的母分子的部分。前药的实例为酯，其活体内裂解以产生所关注的化合物。多种化合物的前药和使母化合物衍生化以产生前药的物质以及方法是已知的且可适于本发明。医药学上可接受的衍生物还包括“逆前药”。逆前药在吸收后被钝化而不是被活化。例如，如本文所论述，本发明许多含酯化合物具生物活性，但在暴露于某些含有酯酶活性的生理环境（例如血液、淋巴液、血清、细胞外液等等）后被钝化。逆前药和前药的生物活性也可由在化合物上侧接官能团而改变，其可由酶来催化。同样，包括氧化和还原反应，包括酶催化氧化和还原反应。某些示范性医药组合物和医药学上可接受的衍生物将在下文更详细地论述。

如本文所用的术语“连接体”是指用以连接所关注化合物的一部分与所述化合物的另一部分的化学部分。示范性连接体在本文中描述。

除非另外指明，否则下文定义的术语具有以下含义：

“化合物”：如本文所用的术语“化合物”或“化学化合物”可包括有机金属化合物、有机化合物、金属、过渡金属络合物和小分子。在某些优选的实施例中，多核苷酸从化合物的定义中排除。在其他优选实施例中，多核苷酸和肽从化合物的定义中排除。在尤其优选的实施例中，术语化合物是指小分子（例如，优选非肽和非寡聚小分子）且排除肽、多核苷酸、过渡金属络合物、金属和有机金属化合物。

“小分子”：如本文所用的术语“小分子”是指实验室合成或自然界中发现的非肽、非寡聚有机化合物。如本文所用的小分子可指“天然产物类”化合物，然而，术语“小分子”不限于“天然产物类”化合物。更确切地说，小分子的特征通常在于其含有若干碳-碳键且具有小于 1500 的分子量，但这种特征并不是想要限制本发明的目的。天然存在的“小分子”的实例包括（但不限于）紫杉醇、达尼米辛（dynemicin）和雷帕霉素（rapamycin）。实验室合成的“小分子”的实例包括（但不限于）在 Tan 等人

("Stereoselective Synthesis of over Two Million Compounds Having Structural Features Both Reminiscent of Natural Products and Compatible with Miniaturized Cell-Based Assays" *J. Am. Chem. Soc.* 120:8565, 1998; 以引用的方式并入本文中) 中描述的化合物。在某些其他优选实施例中, 利用天然产物类小分子。

“天然产物类化合物”: 如本文所用的术语“天然产物类化合物”是指类似于本质经进化选择的复杂天然产物的化合物。通常, 这些化合物具有一个或一个以上立构中心、高密度和多样性的官能团以及在一种结构内的原子的多样选择性。在这方面, 多样性的官能团可定义为改变化合物中存在的官能团的(例如)拓扑结构、电荷、大小、亲水性、疏水性和反应性。如本文所用的术语“高密度的官能团”可优选用于定义任何优选含有3个或3个以上潜在或活性多样化官能部分的分子。这些结构特性另外可使得本发明化合物官能上令人联想到复杂天然产物, 因为其可与特定生物受体特异性相互作用且因此也可官能上类似天然产物。

“金属螯合剂”: 如本文所用的术语“金属螯合剂”是指任何能够与金属离子形成络合物(即“螯合物”)的分子或部分。在某些示范性实施例中, 金属螯合剂是指任何在溶液中“结合”金属离子, 使其不可用于化学/酶促反应的分子或部分。在某些实施例中, 所述溶液包含生理条件下的水性环境。金属离子的实例包括(但不限于)  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Na}^{+}$ 等等。在某些实施例中, 所述金属螯合剂结合  $\text{Zn}^{2+}$ 。在某些实施例中, 不将使金属离子沉淀的分子或部分视为金属螯合剂。

如本文所用的术语“生物样品”包括(但不限于)细胞培养物或其提取物; 从动物(例如哺乳动物)获得的活组织检查物质或其提取物; 和血液、唾液、尿液、粪便、精液、泪液或其他体液或其提取物。例如术语“生物样品”是指从任何活有机体获得、由其排泄或由其分泌的任何固体或流体样品, 所述活有机体包括单细胞微生物(例如细菌和酵母)和多细胞有机体(例如植物和动物, 例如脊椎动物或哺乳动物, 且尤其为健康或表面上健康的人类个体或患有待诊断或探查的病状或疾病的人类患者)。所述生物样品可呈任何形式, 包括固体物质, 例如组织、细胞、细胞小球、细胞提取物、细胞匀浆或细胞馏份; 或活组织检查物或生物流体。所述生物流体可从任何位点(例如血液、唾液(或含有颊细胞的漱口液)、泪液、血浆、血清、尿液、胆汁、脑脊髓液、羊膜水、腹膜液和胸膜液, 或由此而来的细胞、水性或玻璃体液或任何身体分泌物)、渗出液、分泌液(例如从脓肿或任何其他感染或炎症的位点获得的流体)或从关节(例如正常关节或患有例如类风湿性关节炎、骨关节炎、痛风或脓毒性关节炎的关节)获得的流体来获得。生物样品可从任何器官或组织(包括活组织检查或尸体解剖样本)获得或可包含

细胞（初级细胞或培养细胞）或以任何细胞、组织或器官为条件的培养基。生物样品也可包括组织切片，例如出于组织学目的而获得的冷冻切片。生物样品也包括生物分子的混合物，包括由细胞或组织匀浆的分级或完全分馏产生的蛋白质、脂质、碳水化合物和核酸。尽管样品优选从人类个体获得，但生物样品可来自任何动物、植物、细菌、病毒、酵母等等。如本文所用的术语*动物*是指处于任何发育阶段的人类以及非人类动物，包括（例如）哺乳动物、鸟类、爬行动物、两栖动物、鱼、蠕虫和单细胞。细胞培养物和活组织样品被视为多种动物。在某些示范性实施例中，非人类动物为哺乳动物（例如啮齿动物、小鼠、大鼠、兔、猴、狗、猫、绵羊、牛、灵长类动物或猪）。动物可为转基因动物或人类克隆体。如果需要，生物样品可经受初步加工，包括初步分离技术。

术语“投与”或“投与”包括向个体引入本发明化合物以执行其预定功能的路径。可使用的投与路径的实例包括注射（皮下、静脉内、非经肠、腹膜内、鞘内）、口服、吸入、直肠和经皮。药物制剂可以适于各投与路径的形式提供。例如，这些制剂以锭剂或胶囊剂形式、经注射、吸入投与，以洗眼液、软膏剂、栓剂等等投与，经注射、输注或吸入投与；以洗液或软膏剂形式经局部投与；和以栓剂形式经直肠投与。优选口服投与。注射可为大丸剂或可连续输注。根据投与路径，本发明的化合物可用所选物质包衣或安放于所选物质中以保护其使得免受可不利影响其执行其预定功能的能力的自然条件的影响。本发明的化合物可单独投与或连同如上所述的另一药剂或医药学上可接受的载剂或两者一起投与。本发明的化合物可在投与其他药剂之前，或与所述药剂同时，或在投与所述药剂之后投与。此外，本发明的化合物也可以在活体内转变为其活性代谢物或更具活性的代谢物的前体形式投与。

措辞本发明化合物的“生物活性”包括在反应细胞中由本发明化合物引起的所有活性。其包括由这些化合物引起的基因和非基因活性。

“生物组合物”、“生物样品”或“样品”是指含有或来源于细胞或生物聚合物的组合物。含细胞的组合物包括（例如）哺乳动物血液、红血球浓缩物、血小板浓缩物、白血球浓缩物、血球蛋白、血浆、富含血小板的血浆、血浆浓缩物、来自任何血浆分馏的沉淀物、来自任何血浆分馏的上清液、血浆蛋白馏份、纯化或部分纯化的血液蛋白或其他组分、血清、精液、哺乳动物初乳、乳汁、唾液、胎盘提取物、冷凝蛋白、冷冻沉淀血品（cryosupernatant）、细胞溶胞物、哺乳动物细胞培养物或培养基、发酵产物、腹水液、血液细胞中诱导的蛋白质和细胞培养物中由正常或转型细胞（例如经由重组 DNA 或单克隆抗体技术）产生的产物。生物组合物可不含细胞。在优选实施例中，合适的生物组合物或生物样品为红血球悬浮液。在一些实施例中，所述血球悬浮液包括哺乳动物

血球。所述血球优选自人类、非人类灵长类动物、狗、猫、马、奶牛、山羊、绵羊或猪获得。在优选实施例中，所述血球悬浮液包括红血球和/或血小板和/或白血球和/或骨髓细胞。

术语“有效量”包括在剂量和所需时段下有效获得所要结果（例如足以治疗蛋白降解病症）的量。本发明化合物的有效量可根据例如个体的疾病状态、年龄和体重和本发明化合物引起个体中所要反应的能力的因素而变化。给药方案可经调整以提供最佳治疗反应。有效量还为本发明化合物的任何毒性或有害效应（例如副作用）超过治疗有益效应的量。

本发明化合物的治疗有效量（即有效剂量）可在约 0.001 至 30 mg/kg 体重范围内，优选为约 0.01 至 25 mg/kg 体重，更优选为约 0.1 至 20 mg/kg 体重范围内，并且甚至更优选为约 1 至 10 mg/kg、2 至 9 mg/kg、3 至 8 mg/kg、4 至 7 mg/kg 或 5 至 6 mg/kg 体重。本领域的技术人员应了解某些因素可影响有效治疗个体所需的剂量，包括（但不限于）疾病或病症的严重性、先前的治疗、个体的一般健康状况和/或年龄和存在的其他疾病。此外，用治疗有效量的本发明化合物治疗个体可包括单一治疗或优选可包括一系列治疗。在一个实例中，个体是用约 0.1 至 20 mg/kg 体重范围内的本发明化合物每周一次历时约 1 至 10 周，优选 2 至 8 周，更优选约 3 至 7 周且甚至更优选约 4、5 或 6 周来治疗。还应了解用于治疗的本发明化合物的有效剂量可在特定治疗过程中增加或减少。

术语“体内平衡”为技术公认是指维持内部环境中的静态或恒定条件。

措辞“改善的生物性质”是指任何增强本发明化合物的活体内有效性的本发明化合物所固有的活性。在优选实施例中，所述术语是指本发明化合物的任何定性或定量改善的治疗性质，例如降低的毒性，例如降低的高钙活性。

如本文所用的“钝化（Inactivating、inactivation 或 inactivate）”、“抗癌”和“治疗蛋白降解病症”是指减小或除去受疾病侵袭的细胞（例如每毫升治疗生物组合物）。另外，这些术语包括降低或消除蛋白降解病症或蛋白降解病症。上述在以下实例中详细说明。本发明的方法优选引起除去治疗制剂中至少 50% 的受疾病侵袭细胞，优选除去至少 70% 的所述细胞，更优选除去至少 80%，更优选至少 90%，更加优选至少 95%，更优选至少 99% 且甚至更优选 100% 的所述受疾病侵袭细胞。制剂中受疾病侵袭细胞的数目可由计算每毫升制剂的细胞数来测量。这种测量可由所属领域的技术人员熟知的多种众所周知的分析完成。

如本文所用的“治疗的初始时期”和“治疗期”可为建立本发明的治疗化合物的稳定和/或治疗有效血清含量所花费的时间，或个体清除治疗剂的实质部分所花费的时间

或由个体或与治疗有关的护理专家选择的任何时段。

如本文所用的“治疗剂”是指有效治疗或相信会有效治疗蛋白降解病症的小分子、肽、蛋白质、酶抗体、核酸等等。

术语“调节”是指增加或降低响应暴露于本发明化合物的细胞的活性，例如抑制动物中细胞的至少一个子群的增殖和/或蛋白降解以便获得所需最终结果，例如治疗结果。在优选实施例中，这个短语意欲包括蛋白降解病症和/或细胞的蛋白降解病症。

术语“获得”意欲包括购买、合成或以其他方式获得本发明的化合物。

如本文所用的短语“非经肠投与”和“非经肠投与”意谓除了肠内和局部投与之外的投与方式，通常通过注射投与，且包括（不限于）静脉内、肌肉内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、心内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、包囊下、蛛网膜下、脊柱内和胸骨内注射和输注。

术语“前药”包括具有可活体内代谢部分的化合物。通常，所述前药在活体内通过酯酶或通过其他机制代谢为活性药物。前药仅可在生物条件下在所述反应后变得具有活性，或其可在呈其未反应形式时具有活性。前药的实例以及其用途在此项技术中众所周知（参见，例如 Berge 等人(1977) "Pharmaceutical Salts", *J. Pharm. Sci.* 66:1-19)。所述前药可在化合物的最终分离和纯化期间就地制备或通过使呈其游离酸形式的经纯化化合物或羟基分别与合适酯化剂反应来独立制备。羟基可经由用羧酸处理转变为酯。前药部分的实例包括经取代和未经取代的，分支或未分支的低碳烷基酯部分（例如丙酸酯）、低碳烯基酯、二低碳烷基-氨基低碳烷基酯（例如二甲氨基乙基酯）酰胺基低碳烷基酯（例如乙酰基氧基甲基酯）、酰氧基低碳烷基酯（例如特戊酰氧甲基酯）芳基酯（苯酯）、芳基低碳烷基酯（例如苯甲基酯）、经取代（例如经甲基、卤基或甲氧基取代基取代）的芳基和芳基低碳烷基酯、酰胺、低碳烷基酰胺、二低碳烷基酰胺和羟基酰胺。前药的其他实例包括任何本文所揭示的式的化合物的衍生物，其包含-NO、-NO<sub>2</sub>、-ONO 或-ONO<sub>2</sub>部分。优选前药部分为酰基酯。经由其他机制活体内转化为活性形式的前药同样包括在内。本发明的化合物可以由个体代谢为本发明化合物的前药形式合成。

措辞化合物的“预防有效量”是指在单一或多次剂量投与患者时有效预防或治疗蛋白降解病症的式(I)或本文所述的其他式的本发明化合物的量。

措辞“降低的毒性”意欲包括在活体内投与时由本发明化合物引起的任何不当副作用的减少，例如高钙活性的减少。

术语“个体”和“患者”在本文可互换使用且包括能够罹患蛋白降解病症或可另外受益于本发明化合物的投与的有机体，例如人类和非人类动物。优选的人类动物包括

罹患或容易罹患如本文所述的蛋白降解病症或相关病态的人类患者。术语本发明的“非人类动物”包括所有脊椎动物，例如哺乳动物，例如啮齿动物，例如小鼠；和非哺乳动物，例如非人类灵长类动物，例如绵羊、狗、奶牛、小鸡、两栖动物、爬行动物等等。容易罹患蛋白降解病症意欲包括处于感染蛋白降解病症的风险中的个体，即罹患骨髓瘤的个体、具有蛋白降解病症家族史的个体等等。

如本文所用的短语“全身性投与”、“经全身投与”、“周边投与”和“经周边投与”包括投与本发明化合物、药物或其他物质以便其进入患者全身，且因此进行新陈代谢和其他类似过程，例如皮下投与。

措辞“蛋白降解病症”为可通过投与一种或一种以上本发明的化合物来预防、治疗或另外改善的病状或疾病（例如以个体的细胞或身体内存在聚集体为病因，因其而恶化或以其为特征）。蛋白降解病症包括细胞增殖病症和蛋白沉积病症。细胞增殖病症包括癌症，例如骨髓瘤。其他癌症包括源于上皮的癌症。同样包括实体肿瘤，例如乳、肺和肝肿瘤。蛋白沉积病症包括威尔逊病、脊髓小脑运动失调、朊病毒疾病、帕金森氏病、亨廷顿氏病、家族性肌萎缩侧索硬化、淀粉样变性、阿兹海默氏病、亚历山大氏病、酒精性肝病、囊性纤维化或路易体痴呆。

蛋白降解病症包括癌症。癌症包括（例如）上皮细胞源癌症和实体肿瘤和涉及蛋白调节失常的癌症。其他癌症包括多发性骨髓瘤、白血病、淋巴瘤、乳腺癌、肺癌和肝癌。

蛋白降解病症包括（例如）威尔逊病、脊髓小脑运动失调、朊病毒疾病、帕金森氏病、亨廷顿氏病、家族性肌萎缩侧索硬化、淀粉样变性、阿兹海默氏病、亚历山大氏病、酒精性肝病、囊性纤维化、匹克氏病或路易体痴呆。

如本文所用“罹患或容易罹患蛋白降解病症”是指具有所述病症或处于患有所述病症的风险中的个体。

本发明的化合物或其他治疗剂可直接或间接地抑制蛋白降解。本发明的化合物或其他治疗剂可直接或间接地抑制聚集体形成或活性。本发明的化合物或其他治疗剂可直接或间接地抑制蛋白酶体活性。或者，本发明的化合物或其他治疗剂可直接或间接地抑制聚集体和蛋白酶体活性。本发明的化合物或其他治疗剂可直接或间接地抑制 HDAC6 活性。接触细胞或向个体投与本发明的化合物或其他治疗剂是一种治疗容易罹患蛋白降解病症的细胞或个体或抑制蛋白降解病症出现的方法。

如本文所用“来自个体的细胞”包括骨髓基质细胞（BMSC）、周边血液单核细胞（PBMC）、淋巴细胞、毛囊、血球、其他上皮细胞、骨髓浆细胞、原发癌细胞、患者源肿瘤细胞、正常或癌性造血干细胞、神经干细胞、实体肿瘤细胞、星形细胞以及其类似

细胞。“培养细胞”可包括 MM.1S、U266、RPMI8226、DOX40、MM.1R、INA-6、LR5、原发和确立癌细胞系、原发和确立正常细胞系中的一种或一种以上。

如本文所用“细胞的表型”、“个体的表型”或“个体的症状”是指细胞或个体的外在、身体表现或特征，例如可观察到的表现或可观察到的特征。所述特征或表现可为结构性、生物化学、生理学和/或行为学的。所述表型可为响应特定治疗或化合物的生物或临床结果。表型包括贫血、血小板减少、中性粒细胞减少、溶骨病变、骨痛、免疫功能缺陷、肾机能不全、血钙过多、成熟浆细胞异倍性、恶性细胞百分数、微管蛋白的乙酰化状态、成熟浆细胞的细胞凋亡、成熟浆细胞中聚集体含量、成熟浆细胞中 HDAC6 泛素化、与成熟浆细胞中动力蛋白有关的 HDAC6、成熟浆细胞中细胞的泛素化蛋白含量、成熟浆细胞中卡斯蛋白酶-8 含量、成熟浆细胞中 PARP 含量、成熟浆细胞中胸苷吸收量、膨胀的 ER 池、成熟浆细胞凝集、成熟浆细胞中免疫球蛋白沉淀、非组蛋白蛋白质的乙酰化状态、细胞蛋白的整体泛素化状态、细胞周期调控状态、坏疽、细胞凋亡标示物、细胞凋亡状态、罗氏小体形成、囊性纤维化跨膜蛋白受体状态和细胞蛋白沉淀的调节或细胞和细胞外蛋白的整体乙酰化状态。

“表型的调节”是指可观察到的表型的变化或改变。所述调节可为（例如）特定表型的特征的增加或减少，或其的出现或消失。

“有利临床反应”是指个体的表型的任何有利或有益的变化。例如，疾病的症状或可测量的指示物减少。有利临床反应也可为疾病状态的总体改善。

“蛋白降解抑制剂”为能够降低细胞或个体中蛋白降解的化合物或其他治疗剂。蛋白降解抑制剂可（例如）抑制 HDAC6。实例包括组蛋白乙酰基转移酶抑制剂（14, 15）、突巴新、硼替佐米、万珂、SAHA、R115777 FTI、<sup>166</sup>Holminun-DOTMP、三氧化二砷、17-AAG 或本文所述的化合物。蛋白降解抑制剂可直接或间接地抑制 HDAC6 酶活性，且在不希望受任何特定科学理论限制的情况下从而抑制聚集体介导的蛋白降解。蛋白降解抑制剂也可抑制 HSP90、转录因子或其他伴侣蛋白。蛋白降解抑制剂或者可抑制 HDAC6 的 C 端乙酰化活性，从而抑制聚集体介导的蛋白降解。蛋白降解抑制剂也可为聚集体抑制剂。聚集体抑制剂的实例包括突巴新、斯瑞泰德或本文所述的其他化合物。蛋白降解抑制剂也可直接或间接地抑制蛋白酶体。蛋白酶体抑制剂的实例包括硼替佐米、MG132、sapojargon 和 NPI-0052。

其他蛋白降解抑制剂包括足以调节细胞的表型来源于 HDAC6 的肽。例如，来源于 HDAC6 的 C 端肽的肽。组蛋白脱乙酰基酶抑制剂（HDI）包括非选择性靶向几乎所有人类 HDAC 酶（14, 15）的化合物，例如异羟肟酸盐。

本发明化合物的治疗有效抗增殖量或预防有效抗增殖量的确定可易于由作为所属领域的技术人员的医生或兽医（“主治医师”）通过使用已知技术且通过观察在类似情况下获得的结果来得到。剂量可在主治医师的判断内视个体的需求；所治疗病状的严重性和所使用的特定化合物而变化。在确定治疗有效抗增殖量或剂量和预防有效抗增殖量或剂量时，主治医师需考虑许多因素，其包括（但不限于）：具体疾病状态、特定药剂的药效特征以及其投与方式和路径；期望的治疗时程；哺乳动物的种类；其大小、年龄和一般健康情况；所涉及的具体疾病；涉及程度或疾病的严重性；个别患者的反应；所投与的特定化合物；投与方式；所投与制剂的生物可利用特征；所选的给药方案；并行治疗的种类（即本发明化合物与其他共同投与治疗剂的相互作用）；和其他相关情况。

治疗可用较小剂量起始，所述剂量小于化合物的最佳剂量。此后，可使剂量以小的增量增加，直至达到所述情况下的最佳效果为止。为了方便起见，必要时可将总日剂量分开且在日间分多次投与。预期本发明化合物的治疗有效量和预防有效抗增殖量在 0.1 毫克/公斤体重/日（mg/kg/day）至约 100 mg/kg/day 变化。

经确定有效预防或治疗例如狗、鸡和啮齿动物的动物的蛋白降解病症的化合物也可用于治疗人类的所述病症。治疗人类所述病症领域的技术人员应了解，基于动物研究中获得的资料，将所述化合物的剂量和投与路径用于人类。通常，预期人类的剂量和投与路径与动物的剂量和投与路径类似。

需要预防性治疗增殖疾病状态的那些患者的识别完全在所属领域的技术人员的能力和知识之内。用于识别处于感染可由本发明方法治疗的增殖疾病状态的风险中的患者的某些方法在医学技术中已了解，例如与在个体患者中感染本发明所述疾病状态有关的家族史、风险系数的存在。所属领域的临床医师可易于通过利用（例如）临床试验、身体检查和医学/家族史识别这样的候选患者。

评定个体的抗增殖治疗功效的方法包括通过此项技术中众所周知的方法测定治疗前表型且随后投与治疗有效量的蛋白降解抑制剂。在投与所述化合物之后经适当时段，例如 2 小时、4 小时、8 小时、12 小时或 72 小时，再次测定所述表型。所述表型的调节指示治疗功效。所述表型可在整个治疗中周期性地测定。例如，所述表型可每隔数小时、数天或数周检查以评定治疗的进一步功效。表型和测定表型的方法在下文论述。所述方法可用来筛选或选择可受益于用蛋白降解抑制剂的治疗的患者。

如本文所用“自个体获得生物样品”包括获得供本文所述的方法使用的样品。生物样品在本文中描述。

另一方面，本发明的化合物或其他治疗剂是以治疗有效剂量与医药学上可接受的载

剂或稀释剂一起包装。所述组合物可经调配以治疗罹患或容易罹患蛋白降解病症的个体且与用于治疗罹患或容易罹患蛋白降解病症的个体的说明书一起包装。

另一方面，治疗罹患或容易罹患蛋白降解病症的个体的方法包含向有需要的个体投与治疗有效量的蛋白降解抑制剂，从而治疗罹患或容易罹患蛋白降解病症的个体。在识别罹患或容易罹患例如骨髓瘤的蛋白降解病症的个体之后，投与蛋白降解抑制剂。

抑制蛋白降解病症中的蛋白降解的方法包含使细胞或个体与蛋白降解抑制剂接触。所述接触可通过添加所述抑制剂至包围细胞的流体中，例如至所述细胞于其中生存或存在的生长培养基中进行。所述接触也可通过使所述抑制剂与所述细胞直接接触来进行。或者，所述接触可通过使所述抑制剂通过个体来进行，例如在投与后，根据投与路径，所述抑制剂可穿过消化道或血流或可直接施加或投与需要抑制作用的细胞。

另一方面，抑制个体的蛋白降解病症的方法包括向个体投与有效量的抑制剂。所述投与可通过药学技术中已知的任何投与路径来进行。所述个体可已患有蛋白降解病症，可处于感染蛋白降解病症的风险中或可需要预防性治疗。

一方面中，治疗患有或容易罹患蛋白降解病症的个体的方法包含使细胞与蛋白降解抑制剂接触。所述接触可通过添加所述抑制剂至包围细胞的流体中，例如至所述细胞于其中生存或存在的生长培养基中进行。所述接触也可通过使所述抑制剂与所述细胞直接接触来进行。或者，所述接触可通过使所述抑制剂通过个体来进行，例如在投与后，根据投与路径，所述抑制剂可穿过消化道或血流或可直接施加或投与需要治疗的细胞。

一方面中，评定个体中抗增殖治疗功效的方法包含测定一种或一种以上治疗前表型，向所述个体投与治疗有效量的蛋白降解抑制剂，和在用抑制剂治疗的初始时期后测定所述一种或一种以上表型，其中所述表型的调节指示治疗功效。

治疗功效可（例如）以表型的增加、减少、出现或消失而测量。功效也可根据与蛋白降解病症有关的症状的减少、症状的稳定或与蛋白降解病症有关的症状的终止来测量。

表型包括响应特定治疗或化合物的生物或临床结果。例如，贫血、血小板减少、中性粒细胞减少、溶骨病变、骨痛、免疫机能缺陷、肾机能不全、血钙过多、成熟浆细胞异倍性、恶性细胞百分数、微管蛋白的乙酰化状态、成熟浆细胞的细胞凋亡、成熟浆细胞中聚集体含量、成熟浆细胞中 HDAC6 泛素化、与成熟浆细胞中动力蛋白有关的 HDAC6、成熟浆细胞中细胞的泛素化蛋白含量、成熟浆细胞中卡斯蛋白酶-8 含量、成熟浆细胞中 PARP 含量、成熟浆细胞中胸苷吸收量、膨胀的 ER 池、成熟浆细胞凝集、成熟浆细胞中免疫球蛋白沉淀、非组蛋白蛋白质的乙酰化状态、细胞蛋白的整体泛素化状

态、细胞周期调控状态、坏疽、细胞凋亡标示物、细胞凋亡状态、罗氏小体形成、囊性纤维化跨膜蛋白受体状态和细胞蛋白沉淀的调节或细胞和细胞外蛋白的整体乙酰化状态。表型可观察或测量到，例如通过诊断或通过本文所述的分析可见。

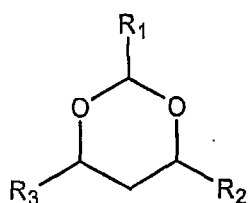
在某些实施例中，本文所述的某些表型的减少指示功效。然而，根据抑制剂的作用机制，表型可在一段时间之后变得更严重，然后减少。这也将指示治疗功效。

在一实施例中，所述表型可在治疗之前测定一次或一次以上以建立基线表型。表型也可在治疗期间和/或治疗之后测定一次或一次以上。或者，表型可在治疗之间测定一次或一次以上。

### 本发明的化合物

另一方面，本发明提供化合物，例如可用于本发明方法、医药组合物、试剂盒和包装组合物中的化合物。可用于本发明的化合物为抑制剂组蛋白脱乙酰基酶和/或微管蛋白脱乙酰基酶。有用化合物描述在以下美国专利申请中：2006年2月14日申请的 U.S.S.N. 60/773,510；2006年2月14日申请的 U.S.S.N. 60/773,172；2001年5月9日申请的 U.S.S.N. 60/289,850；2002年5月9日申请的 U.S.S.N. 10/144,316 和 2003年7月17日申请的 U.S.S.N. 10/621,276；各申请均以引用的方式并入本文中。

可用于本发明的化合物包括下式的化合物：



其中

R<sub>1</sub> 为环状或非环状、经取代或未经取代、分支或未分支的脂肪族部分；环状或非环状、经取代或未经取代、分支或未分支的杂脂肪族部分；经取代或未经取代、分支或未分支的酰基；经取代或未经取代、分支或未分支的芳基；经取代或未经取代、分支或未分支的杂芳基；-OR<sub>A</sub>；-C(=O)R<sub>A</sub>；-CO<sub>2</sub>R<sub>A</sub>；-SR<sub>A</sub>；-SOR<sub>A</sub>；-SO<sub>2</sub>R<sub>A</sub>；-N(R<sub>A</sub>)<sub>2</sub>；-NHC(O)R<sub>A</sub> 或 -C(R<sub>A</sub>)<sub>3</sub>；其中 R<sub>A</sub> 每次出现时独立为氢、保护基、脂肪族部分、杂脂肪族部分、酰基部分、芳基部分、杂芳基部分、烷氧基、芳氧基、烷硫基、芳硫基、氨基、烷基氨基、二烷基氨基、杂芳氧基或杂芳硫基部分；

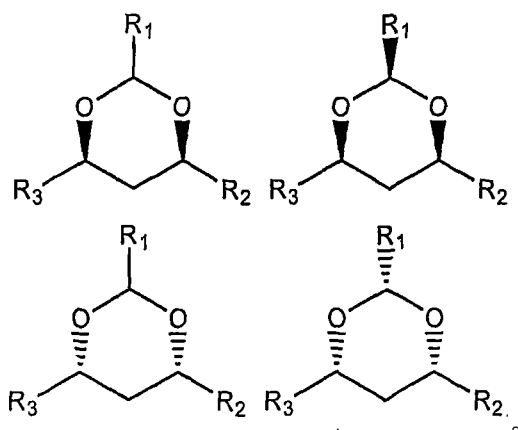
R<sub>2</sub> 为氢；卤素；环状或非环状、经取代或未经取代、分支或未分支的脂肪族部分；

环状或非环状、经取代或未经取代、分支或未分支的杂脂肪族部分；经取代或未经取代、分支或未分支的酰基；经取代或未经取代、分支或未分支的芳基；经取代或未经取代、分支或未分支的杂芳基； $-OR_B$ ； $-C(=O)R_B$ ； $-CO_2R_B$ ； $-CN$ ； $-SCN$ ； $-SR_B$ ； $-SOR_B$ ； $-SO_2R_B$ ； $-NO_2$ ； $-N(R_B)_2$ ； $-NHC(O)R_B$  或  $-C(R_B)_3$ ；其中  $R_B$  每次出现时独立为氢、保护基、脂肪族部分、杂脂肪族部分、酰基部分、芳基部分、杂芳基部分、烷氧基、芳氧基、烷硫基、芳硫基、氨基、烷基氨基、二烷基氨基、杂芳氧基或杂芳硫基部分；且

$R_3$  为氢；卤素；环状或非环状、经取代或未经取代、分支或未分支的脂肪族部分；环状或非环状、经取代或未经取代、分支或未分支的杂脂肪族部分；经取代或未经取代、分支或未分支的酰基；经取代或未经取代、分支或未分支的芳基；经取代或未经取代、分支或未分支的杂芳基； $-OR_C$ ； $-C(=O)R_C$ ； $-CO_2R_C$ ； $-CN$ ； $-SCN$ ； $-SR_C$ ； $-SOR_C$ ； $-SO_2R_C$ ； $-NO_2$ ； $-N(R_C)_2$ ； $-NHC(O)R_C$  或  $-C(R_C)_3$ ；其中  $R_C$  每次出现时独立为氢、保护基、脂肪族部分、杂脂肪族部分、酰基部分、芳基部分、杂芳基部分、烷氧基、芳氧基、烷硫基、芳硫基、氨基、烷基氨基、二烷基氨基、杂芳氧基或杂芳硫基部分；以及其医药学上可接受的盐及衍生物。通常， $R_1$  包含金属螯合官能团（例如羟基酰胺酸、硫醇、羧酸、邻氨基苯胺等等）。认为所述金属螯合基团结合脱乙酰基酶的活性部位  $Zn^{+2}$  离子。在某些实施例中， $R_2$  为经取代或未经取代的杂脂肪族部分（例如经杂芳基环取代的杂脂肪族部分，所述杂芳基环视情况可经取代）。在某些实施例中， $R_3$  为经取代或未经取代的芳环系统（例如经取代或未经取代的苯基）。

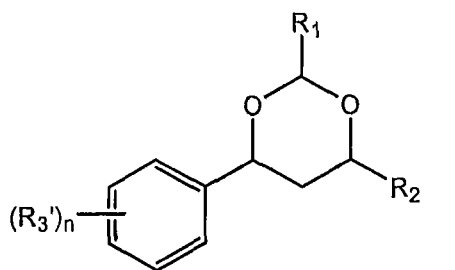
如上所述的许多化合物先前已揭示于以下美国专利申请中：2001年5月9日申请的 U.S.S.N. 60/289,850；2002年5月9日申请的 U.S.S.N. 10/144,316 和 2003年7月17日申请的 U.S.S.N. 10/621,276；各申请均以引用的方式并入本文中。本发明包括具体化合物和在这类之内的化合物的子类。已发现这些子类和所述类之内的具体化合物通过抑制已知在因聚集体使蛋白降解中起作用的 HDAC6 而尤其可用于治疗多发性骨髓瘤。还提供使用本发明的化合物治疗癌症（例如多发性骨髓瘤、乳腺癌、非霍奇金氏淋巴瘤（non-Hodgkin's lymphoma）、卵巢癌、急性髓性白血病）、蛋白降解病症（例如多发性骨髓瘤、神经退化性病症）、蛋白沉积病症（例如神经退化性病症）和增殖病症（例如糖尿病性视网膜病、发炎性疾病、血管生成、感染性疾病）的方法以及治疗这些病症的医药组合物和试剂盒。本发明还提供用于制备本发明化合物的新合成方法。

在某些实施例中，所述化合物为具有所示立体化学的下式中之一者的化合物：



在某些实施例中， $R_3$  为经取代或未经取代的芳基部分。在某些实施例中， $R_3$  为经取代或未经取代的杂芳香族部分。在某些实施例中， $R_3$  为单环部分。在其他实施例中， $R_3$  为双环部分。在其他实施例中， $R_3$  为三环部分。在其他实施例中， $R_3$  为多环部分。在某些实施例中， $R_3$  为经取代或未经取代的 5 或 6 元芳香族或杂芳香族部分。在某些实施例中， $R_3$  为经取代或未经取代的 6 元芳香族或杂芳香族部分。在某些实施例中， $R_3$  为经取代或未经取代的 6 元芳香族部分。在某些实施例中， $R_3$  为经取代或未经取代的 6 元杂芳香族部分。在某些实施例中， $R_3$  为经取代或未经取代的非芳香族碳环或杂环部分。

在某些实施例中，本发明提供下式的化合物：



其中  $R_1$  和  $R_2$  如上文所定义；

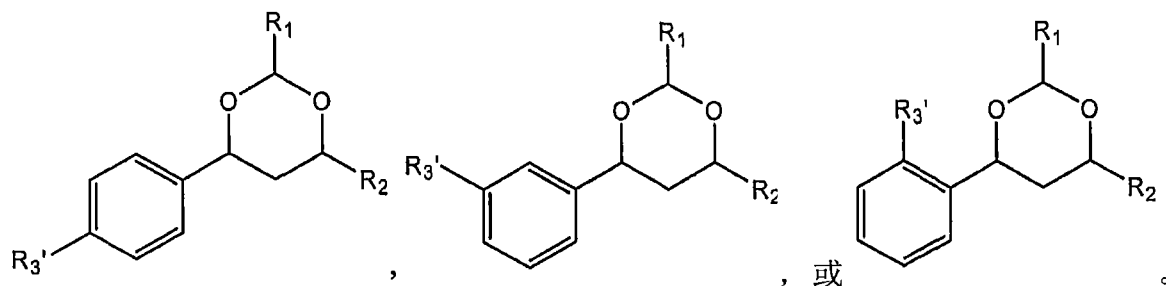
$n$  为 1 与 5 之间的整数，包括 1 和 5；且

$R_3'$  每次出现时独立为氢；卤素；环状或非环状、经取代或未经取代、分支或未分支的脂肪族部分；环状或非环状、经取代或未经取代、分支或未分支的杂脂肪族部分；经取代或未经取代、分支或未分支的酰基；经取代或未经取代、分支或未分支的芳基；经取代或未经取代、分支或未分支的杂芳基； $-OR_C$ ； $-C(=O)R_C$ ； $-CO_2R_C$ ； $-CN$ ； $-SCN$ ； $-SR_C$ ； $-SOR_C$ ； $-SO_2R_C$ ； $-NO_2$ ； $-N(R_C)_2$ ； $-NHC(O)R_C$  或  $-C(R_C)_3$ ；其中  $R_C$  每次出现时独立为氢、保护基、脂肪族部分、杂脂肪族部分、酰基部分、芳基部分、杂芳基部分、烷氧基、芳

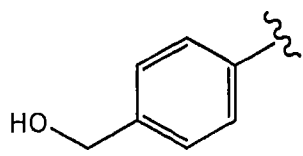
氧基、烷硫基、芳硫基、氨基、烷基氨基、二烷基氨基、杂芳氧基或杂芳硫基部分。

在某些实施例中， $n$  为 0，且所述苯环未经取代。

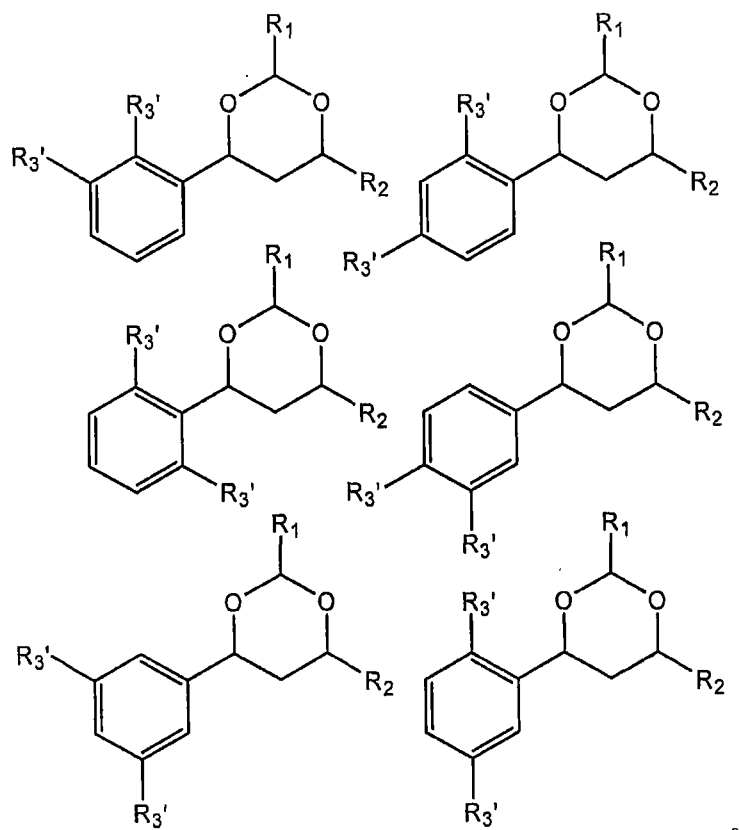
在其他实施例中， $n$  为 1 且所述化合物为下式的化合物中的一个：



在某些实施例中，对位取代型式为优选。在其他实施例中，间位取代型式为优选。且在其他实施例中，邻位取代型式为优选。在某些实施例中， $R_3$  不为



在其他实施例中， $n$  为 2。本发明的化合物包括具有下式中的一个的化合物：

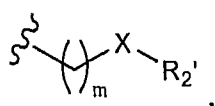


在其他实施例中， $n$  为 3。在其他实施例中， $n$  为 4，且在其他实施例中， $n$  为 5。

在某些实施例中， $R_3'$  为卤素、羟基、经保护的羟基、烷氧基、氨基、烷基氨基、二烷基氨基、 $-NO_2$ 、 $C_1$ - $C_6$  烷基、 $C_1$ - $C_6$  烯基、 $C_1$ - $C_6$  炔基或酰基。在某些实施例中， $R_3'$  为  $-NO_2$ 。在某些实施例中， $R_3'$  为  $-CH_2OH$ 。在某些实施例中， $R_3'$  为  $-NH_2$ 。在其他实施例中， $R_3'$  为  $-H$ 。在其他实施例中， $R_3'$  为  $-OH$ 。在其他实施例中， $R_3'$  为  $-CN$ 。在其他实施例中， $R_3'$  为  $-SCN$ 。在其他实施例中， $R_3'$  为酰基。在某些实施例中， $R_3'$  为乙酰基。在其他实施例中， $R_3'$  为  $-F$ 。在其他实施例中， $R_3'$  为  $-Cl$ 。在其他实施例中， $R_3'$  为  $-Br$ 。在其他实施例中， $R_3'$  为  $-I$ 。在其他实施例中， $R_3'$  为甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、叔丁基或异丁基。在某些实施例中， $R_3'$  为乙烯基。在某些实施例中， $R_3'$  为经卤素取代的烷基（例如三氟甲基）。在某些实施例中， $R_3'$  为甲氧基、乙氧基、丙氧基、丁氧基或戊氧基。

在这类的某些化合物中， $R_2$  为经取代或未经取代的脂肪族基团。在其他实施例中， $R_2$  为经取代或未经取代的杂脂肪族基团。在某些实施例中， $R_2$  为经芳基或杂芳基取代的杂脂肪族基团，所述芳基或杂芳基视情况可经取代。在某些实施例中， $R_2$  为经杂芳基取代的杂脂肪族基团，所述杂芳基视情况经取代。在某些实施例中， $R_2$  为经杂芳基取代的杂脂肪族基团，所述杂芳基经取代。

在某些实施例中， $R_2$  具有下式：

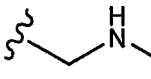
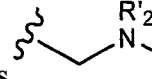
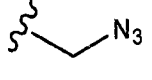
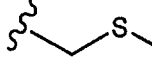
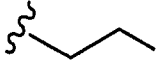


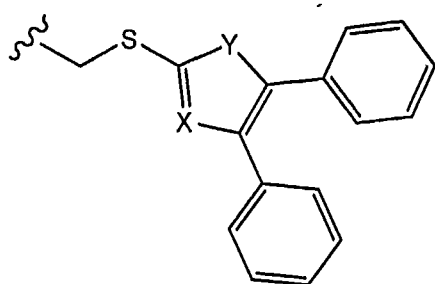
其中  $m$  为 0 与 8 之间的整数，包括 0 和 8；优选 1 与 6 之间的整数，包括 1 和 6；

$X$  为  $O$ 、 $S$ 、 $CH_2$ 、 $NH$  或  $NR_2'$ ；且

$R_2'$  为脂肪族部分、杂脂肪族部分、酰基、经取代或未经取代的芳基或经取代或未经取代的杂芳基。在某些实施例中， $m$  为 1、2 或 3。在某些实施例中， $m$  为 1。在某些实施例中， $X$  为  $O$ 。在其他实施例中， $X$  为  $S$ 。在某些实施例中， $X$  为  $NH$ 。在其他实施例中， $X$  为  $CH_2$ 。在某些实施例中， $R_2'$  为  $C_1$ - $C_6$  烷基。在某些实施例中， $R_2'$  为经取代的杂芳基部分。在其他实施例中， $R_2'$  为未经取代的杂芳基部分。在某些特定的实施例中， $R_2'$  为经取代的噁唑基部分。在其他实施例中， $R_2'$  为经取代的噻唑基部分。在其他实施例中， $R_2'$  为经取代的咪唑基部分。在某些实施例中， $R_2$  为

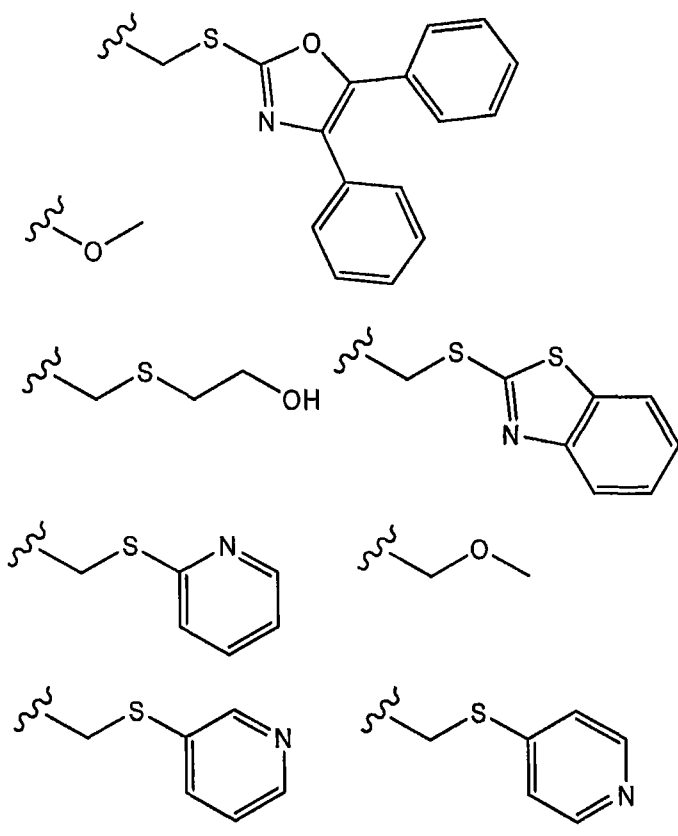
为 。在其他实施例中

中,  $R_2$  为 。在其他实施例中,  $R_2$  为 , 其中所述 2 个  $R_2'$  部分可一起形成杂环基团。在其他实施例中,  $R_2$  为 。在其他实施例中,  $R_2$  为 。在其他实施例中,  $R_2$  为 。在某些实施例中,  $R_2$  为

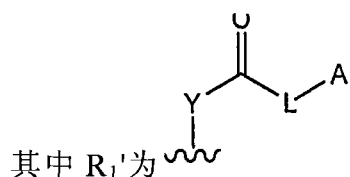
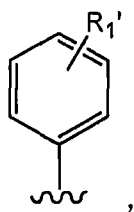



, 其中 X 为 N 且 Y 为 NH、S 或 O。

在某些实施例中,  $R_2$  为选自以下各基团中的一个:

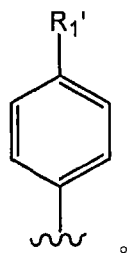


在某些实施例中,  $R_1$  为经取代的苯环。在某些特定的实施例中,  $R_1$  具有下式:

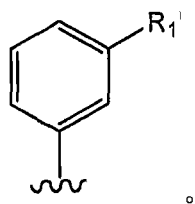


其中  $R_1'$  为 ，其中 Y 为 NH 或 O；L 为连接体部分；且 A 包含抑制组蛋白或微管蛋白脱乙酰基酶的官能团。

在某些实施例中， $R_1$  具有下式：



在其他实施例中， $R_1$  具有下式：

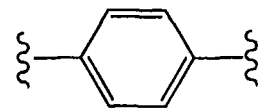


在某些实施例中，Y 为 NH。在其他实施例中，Y 为 O。在某些实施例中，L 为经取代或未经取代、环状或非环状、分支或未分支的脂肪族部分；经取代或未经取代、环状或非环状、分支或未分支的杂脂肪族部分；经取代或未经取代的芳基部分；经取代或未经取代的杂芳基部分。在某些实施例中，L 为经取代或未经取代、环状或非环状、分支或未分支的脂肪族部分。在某些实施例中，L 为  $C_1$ - $C_{20}$  亚烷基，优选  $C_1$ - $C_{12}$  亚烷基，更优选  $C_4$ - $C_7$  亚烷基。在某些实施例中，L 为  $C_1$ - $C_{20}$  亚烯基，优选  $C_1$ - $C_{12}$  亚烯基，更优选  $C_4$ - $C_7$  亚烯基。在某些实施例中，L 为  $C_1$ - $C_{20}$  亚炔基，优选  $C_1$ - $C_{12}$  亚炔基，更优选  $C_4$ - $C_7$  亚炔基。在某些实施例中，L 为经取代或未经取代、环状或非环状、分支或未分支的杂

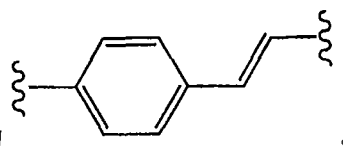
脂肪族部分。在某些实施例中，L 包含环状环系统，其中所述环可为芳基、杂芳基、非芳香族碳环或非芳香族杂环。在其他实施例中，L 包含经取代或未经取代的杂芳基部分。在某些特定的实施例中，L 包含苯环。在某些实施例中，L 包含多个苯环（例如 1、2、3 或 4 个苯环）。



在某些实施例中，L 为 ，其中 n 为 1 与 4 之间的整数，包括 1 和 4；优选 1 与 3 之间的整数，包括 1 和 3；更优选为 1 或 2；且 R<sub>1</sub> 为氢；卤素；环状或非环状、经取代或未经取代、分支或未分支的脂肪族部分；环状或非环状、经取代或未经取代、分支或未分支的杂脂肪族部分；经取代或未经取代、分支或未分支的酰基；经取代或未经取代、分支或未分支的芳基；经取代或未经取代、分支或未分支的杂芳基；-OR<sub>A</sub>；-C(=O)R<sub>A</sub>；-CO<sub>2</sub>R<sub>A</sub>；-CN；-SCN；-SR<sub>A</sub>；-SOR<sub>A</sub>；-SO<sub>2</sub>R<sub>A</sub>；-NO<sub>2</sub>；-N(R<sub>A</sub>)<sub>2</sub>；-NHR<sub>A</sub>；-NHC(O)R<sub>A</sub> 或 -C(R<sub>A</sub>)<sub>3</sub>；其中 R<sub>A</sub> 每次出现时独立为氢、保护基、脂肪族部分、杂脂肪族部分、酰基部分、芳基部分、杂芳基部分、烷氧基、芳氧基、烷硫基、芳硫基、氨基、烷基氨基、

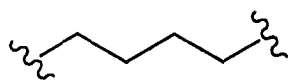


二烷基氨基、杂芳氧基或杂芳硫基部分。在某些实施例中，L 为

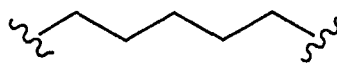


在某些实施例中，L 为

在某些实施例中，L 为未分支、未经取代的非环状烷基链。在某些实施例中，L 为

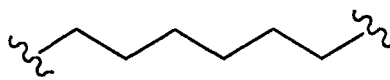


在其他实施例中，L 为

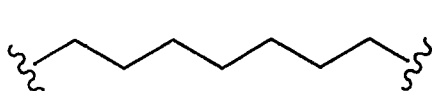


在某些其他实施

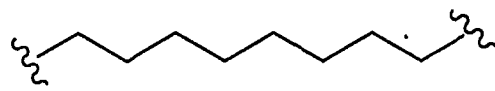
例中，L 为



在其他实施例中，L 为

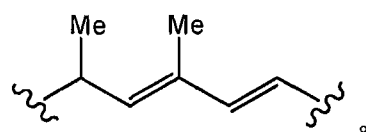


在其他实施例中，L 为

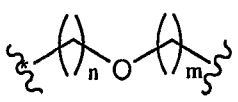


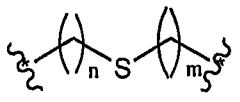
。

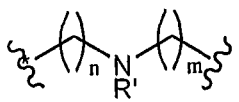
在某些实施例中，L 为经取代的非环状脂肪族链。在某些实施例中，L 为

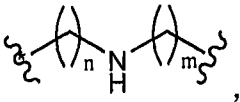


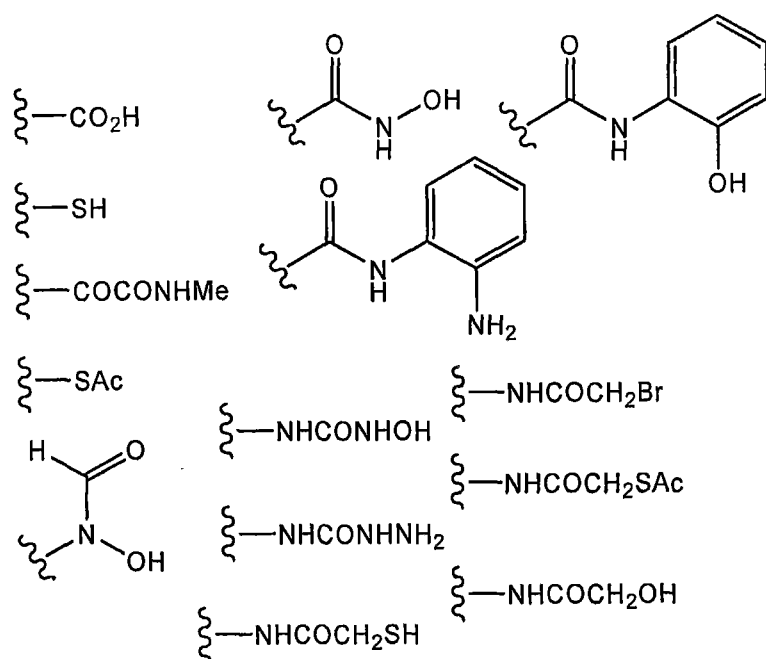
在某些实施例中，L 为未分支、未经取代的非环状杂脂肪族链。在某些特定的实施

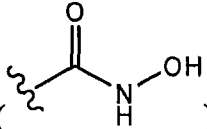
例中, L 为  , 其中 n 为 0 与 10 之间的整数, 包括 0 和 10; 优选 0 与 5 之间的整数, 包括 0 和 5; 且 m 为 0 与 10 之间的整数, 包括 0 和 10; 优选 0 与 5 之间

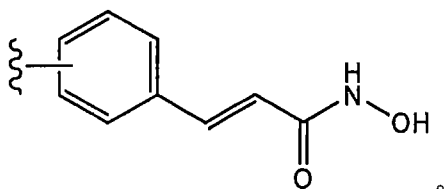
的整数, 包括 0 和 5。在某些特定的实施例中, L 为  , 其中 n 为 0 与 10 之间的整数, 包括 0 和 10; 优选 0 与 5 之间的整数, 包括 0 和 5; 且 m 为 0 与 10 之间的整数, 包括 0 和 10; 优选 0 与 5 之间的整数, 包括 0 和 5。在某些特定的实施例中,

L 为  , 其中 n 为 0 与 10 之间的整数, 包括 0 和 10; 优选 0 与 5 之间的整数, 包括 0 和 5; m 为 0 与 10 之间的整数, 包括 0 和 10; 优选 0 与 5 之间的整数, 包括 0 和 5; 且 R' 为氢、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 脂肪族部分、杂脂肪族部分、芳基、杂芳基或酰基。在某些

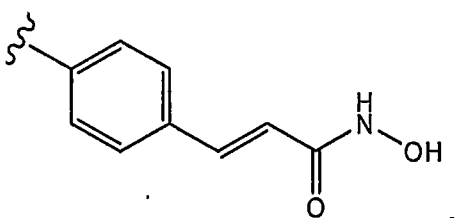
些特定的实施例中, L 为  , 其中 n 为 0 与 10 之间的整数, 包括 0 和 10; 优选 0 与 5 之间的整数, 包括 0 和 5; 且 m 为 0 与 10 之间的整数, 包括 0 和 10; 优选 0 与 5 之间的整数, 包括 0 和 5。在某些实施例中, A 包含金属螯合官能团。例如, A 包含 Zn<sup>2+</sup> 螯合官能团。在某些实施例中, A 包含选自由以下基团组成的群组的官能团:



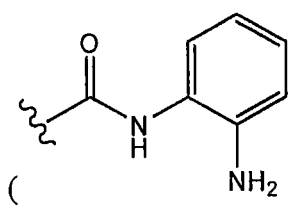
在某些实施例中，A 包含异羟肟酸 () 或其盐。在其他实施例中，A 包含式：



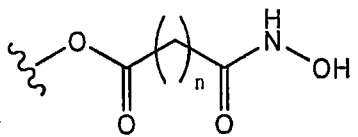
在某些特定的实施例中，A 包含式：

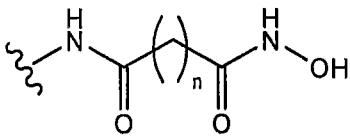


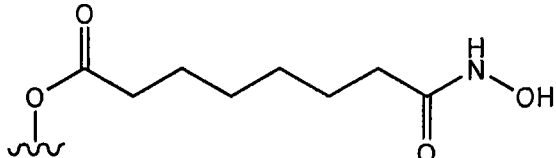
在其他实施例中，A 包含羧酸 (-CO<sub>2</sub>H)。在其他实施例中，A 包含邻氨基苯胺

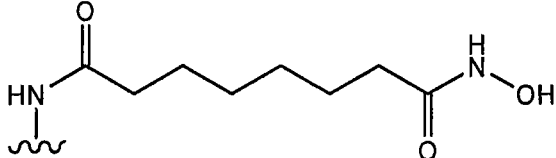


()。在其他实施例中，A 包含邻羟基苯胺 ()。在其

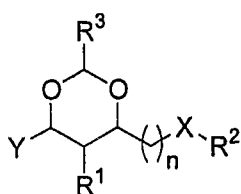
他实施例中，A 包含硫醇 (-SH)。在某些实施例中，R<sub>1</sub>'为 ，其中 n 为 0 与 15 之间的整数，包括 0 和 15；优选 0 与 10 之间的整数，包括 0 和 10；更优选 1 与 8 之间的整数，包括 1 和 8；甚至更优选为 4、5、6、7 或 8。在某些实施例中，

R<sub>1</sub>'为 ，其中 n 为 0 与 15 之间的整数。包括 0 和 15；优选 0 与 10 之间的整数，包括 0 和 10；更优选 1 与 8 之间的整数，包括 1 和 8；甚至更优选为 4、

5、6、7 或 8。在某些实施例中， $R_1'$ 为 。在其他特

定的实施例中， $R_1'$ 为 。

可用于本发明的某些化合物包括下式的化合物：



以及其医药学上可接受的衍生物；

其中  $R^1$  为氢或脂肪族、脂环族、杂脂肪族、杂环、芳香族或杂芳香族部分；

$n$  为 1-5；

$R^2$  为氢、保护基或脂肪族、脂环族、杂脂肪族、杂环、芳香族或杂芳香族部分；

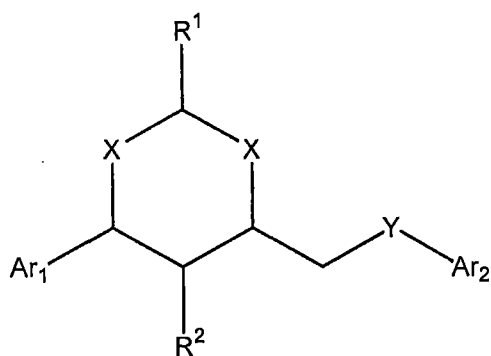
$X$  为  $-O-$ 、 $-C(R^{2A})_2-$ 、 $-S-$  或  $-NR^{2A}-$ ，其中  $R^{2A}$  为氢、保护基或脂肪族、脂环族、杂脂肪族、杂环、芳香族或杂芳香族部分；

或其中两个或两个以上出现的  $R^2$  和  $R^{2A}$  一起形成脂环族或杂环部分、或芳基或杂芳基部分；

$R^3$  为脂肪族、脂环族、杂脂肪族、杂环、芳香族或杂芳香族部分；且

$Y$  为氢或脂肪族、脂环族、杂脂肪族、杂环、芳香族或杂芳香族部分。

在某些实施例中，根据本发明的化合物可由下式表示：



其中

X 各自独立为 O、S、CH<sub>2</sub> 或 NR<sup>3</sup>;

Y 为 O、S、CH<sub>2</sub> 或 NR<sup>4</sup>;

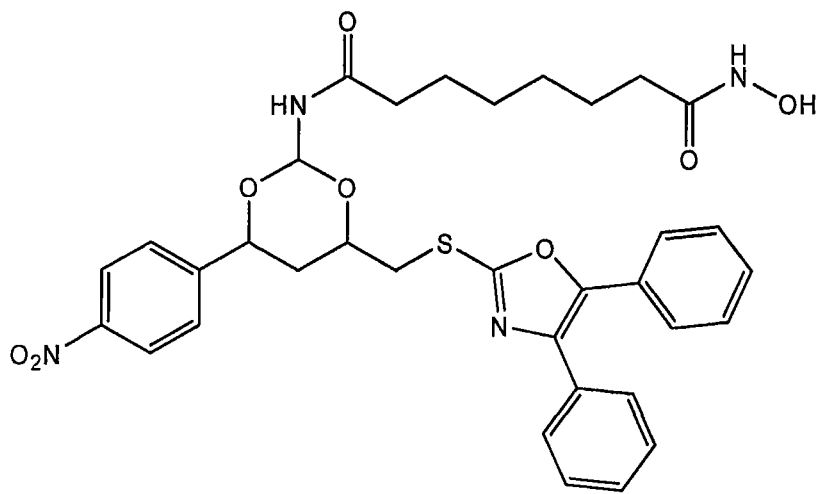
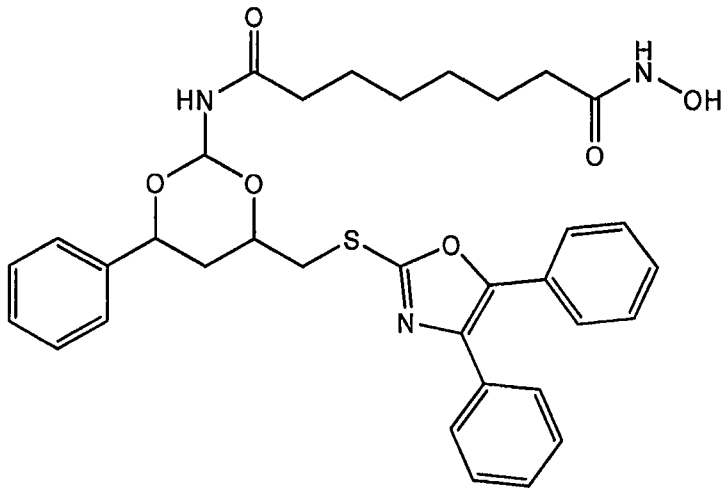
Ar<sub>1</sub> 和 Ar<sub>2</sub> 各自独立为芳基;

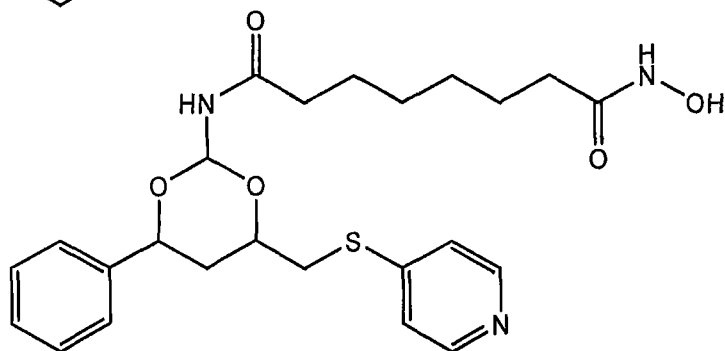
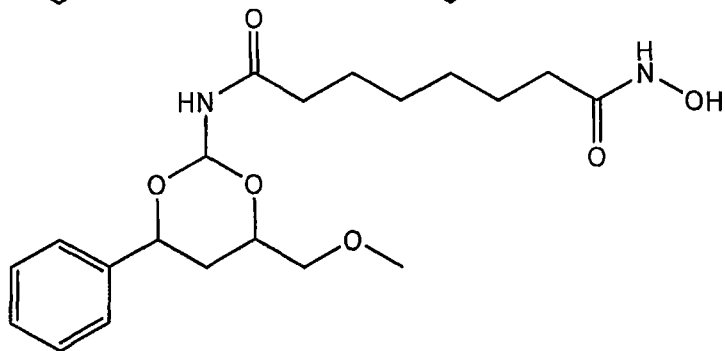
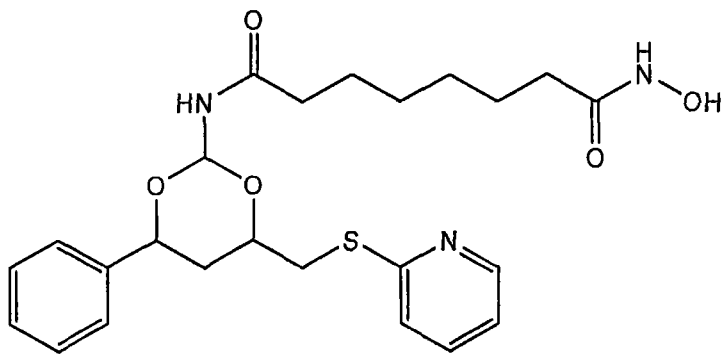
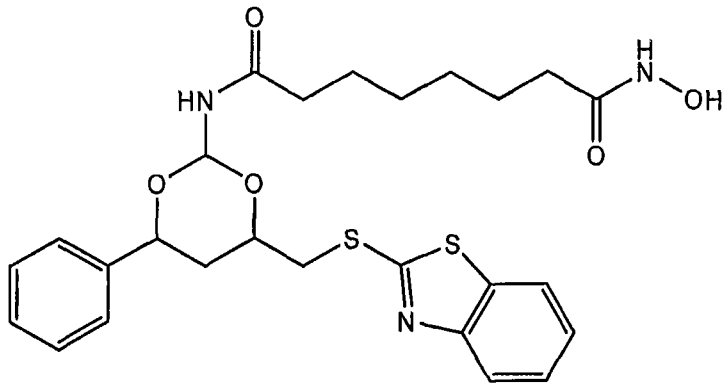
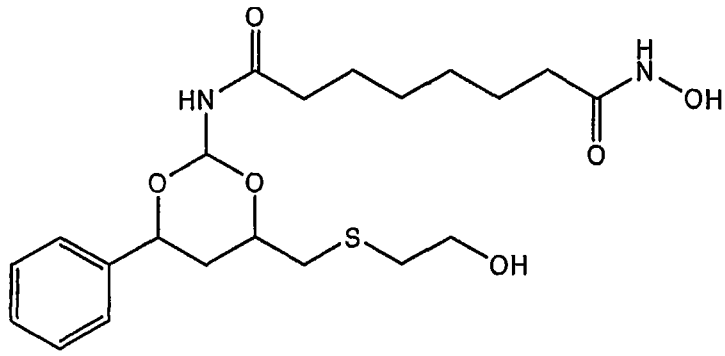
R<sup>1</sup> 为低碳烷基或芳基;

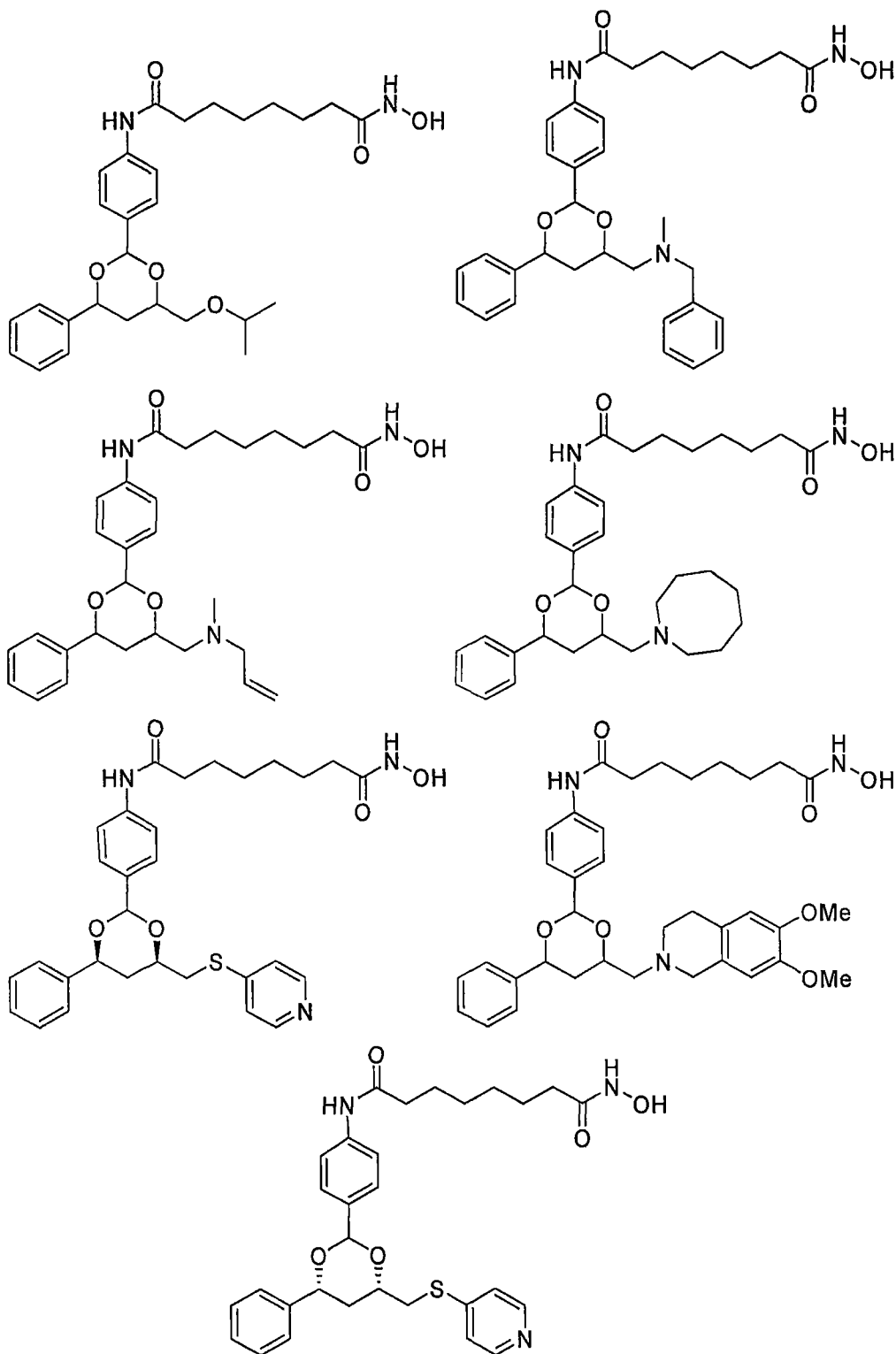
R<sup>2</sup> 为氢、低碳烷基或芳基; 且

R<sup>3</sup> 和 R<sup>4</sup> 各自独立为氢、低碳烷基、芳基、烷基羰基、烷氧羰基或氨基羰基。在某些优选的实施例中, X 每次出现时为 O、S 或 CH<sub>2</sub>, 更优选为 O 或 S, 且更优选为 O。在某些优选的实施例中, Y 为 S。在某些优选的实施例中, Ar<sub>1</sub> 为苯基或经取代的苯基, 尤其是 4-羟甲基苯基。在某些优选的实施例中, Ar<sub>2</sub> 为杂芳基, 更优选为视情况经取代的噁唑基, 更优选为经苯基取代的噁唑基, 且最优选为 4,5-二苯基-噁唑-2-基。在某些优选的实施例中, R<sup>1</sup> 为苯基或经取代的苯基, 更优选为 4-氨基取代的苯基或 4-酰胺基取代的苯基, 在更优选的实施例中, R 为在 4 位经带有亚烷基部分的酰胺基取代的苯基, 其中所述亚烷基链在亚烷基链中具有 4 至 8 个碳原子 (更优选 6 个碳原子), 且所述亚烷基链优选带有末端异羟肟酸根基团 (-NHOH)。在某些优选的实施例中, R<sub>2</sub> 为氢。

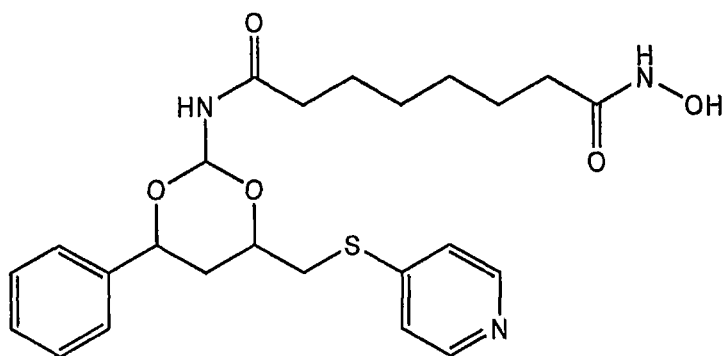
示范性化合物包括下式的化合物:



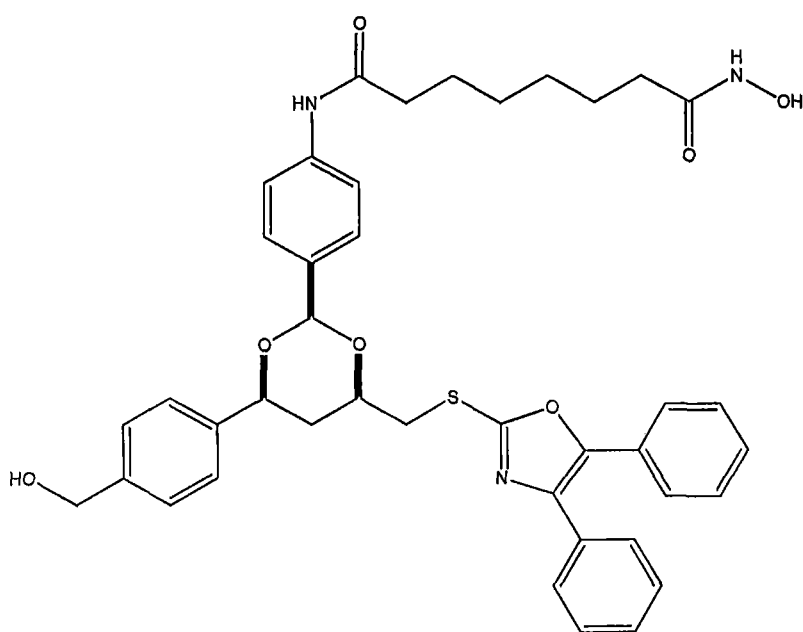




在某些实施例中，所述化合物具有式：



在某些实施例中，所述化合物为突巴新：



在优选实施例中，可用于本发明的化合物具有以下性质中的一种或一种以上：所述化合物为蛋白降解抑制剂；所述化合物能够抑制至少一种组蛋白脱乙酰基酶；所述化合物能够抑制 HDAC6；所述化合物为选择性 HDAC6 抑制剂；所述化合物结合 HDAC6 的多个泛素化结合结构域；所述化合物能够诱导癌细胞（尤其多发性骨髓瘤细胞、非霍奇金氏淋巴瘤（NML）细胞、乳腺癌细胞、急性骨髓性白血病（AML）细胞）中的细胞凋亡；和/或所述化合物能够抑制聚集体形成。

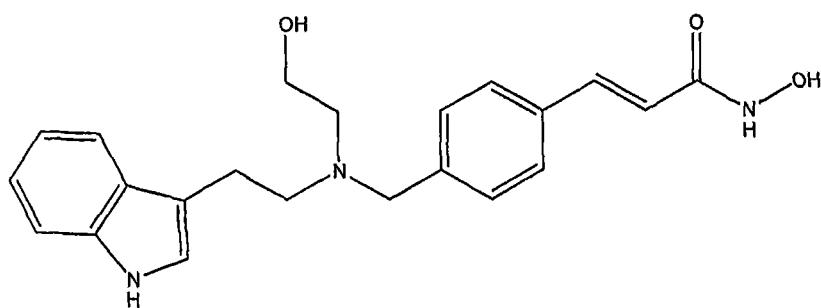
可用于本发明的方法、医药组合物、试剂盒和包装组合物中的至少一些中的化合物可例如根据本文所述的任何筛选法来识别。

在某些优选的实施例中，本发明的化合物包含金属结合部分，优选锌-结合部分，例如异羟肟酸盐。如上文所指出，某些异羟肟酸盐为 HDAC6 活性的有效抑制剂；在不希

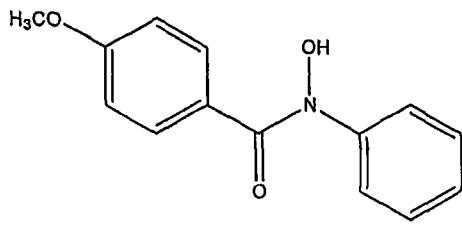
望受理论限制的情况下，相信这些异羟肟酸盐的效力至少部分是归因于化合物结合锌的能力。在优选实施例中，本发明的化合物包括至少一个可赋予牵涉聚集体途径的生物靶（例如具有微管蛋白脱乙酰基酶（TDAC）或 HDAC 活性的生物靶，例如 HDAC6）选择性的部分或区域。因此，在某些优选的实施例中，化合物包括与负责结合生物靶的分子的其他部分间隔开的锌-结合部分。例如，本发明的化合物可包括当分子的另外部分与例如 HDAC6 的生物靶结合时能够在有利方向上提供锌-结合部分的连接体臂或其他间隔部分。在不受理理论限制的情况下，相信在化合物的封端区域中的空间“体积”可有助于 TDAC 特异性，尽管在任何场合下这样的体积可能都不需要。另外，在不受理理论限制的情况下，相信变构位点抑制作用有助于本发明化合物的 TDAC 活性。

在某些实施例中，可用于本发明的方法、医药组合物、试剂盒和包装组合物中的至少一些中的化合物为美国专利公开案第 US2004/0072849 号中揭示的 1,3-二噁烷 HDAC 抑制剂化合物，其以引用的方式全文并入本文中。相关化合物描述在 Sternson SM 等人，*Org Lett.* 2001 Dec 27;3(26):4239-42；Haggarty SJ 等人，*Chem Biol.* 2003 May; 10(5):383-96；Haggarty SJ 等人，*Proc Natl Acad Sci USA.* 2003 Apr 15; 100(8):4389-94. Epub 2003 Apr 03；和 Haggarty SJ 等人，*Comb Chem High Throughput Screen.* 2004 Nov; 7(7):669-76 中；这些参考文献中的每一个的内容均以引用的方式全文并入本文中。

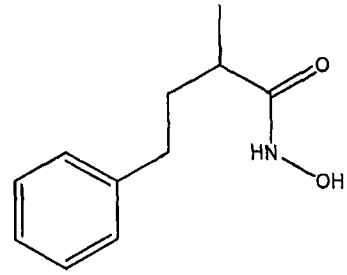
可用于本发明的方法、医药组合物、试剂盒和包装组合物中的至少一些中的其他化合物包括 NVP-LAQ824（具有以下所示结构的肉桂异羟肟酸盐）：



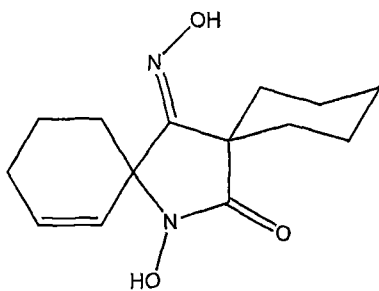
可用于本发明的方法、组合物、试剂盒和包装组合物中的至少一些中的其他化合物包括以下所示的那些化合物。每一化合物包括异羟肟酸盐部分（包括异羟肟酸盐和环状异羟肟酸盐的 O-醚）。



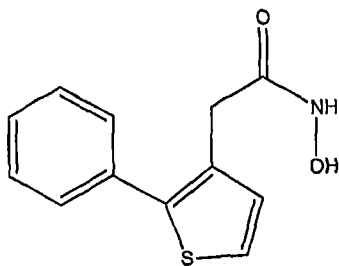
N-羟基-4-甲氧基-N-苯基-苯甲酰胺



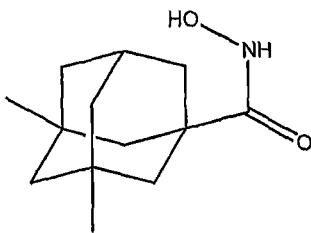
N-羟基-2-甲基-4-苯基-丁酰胺



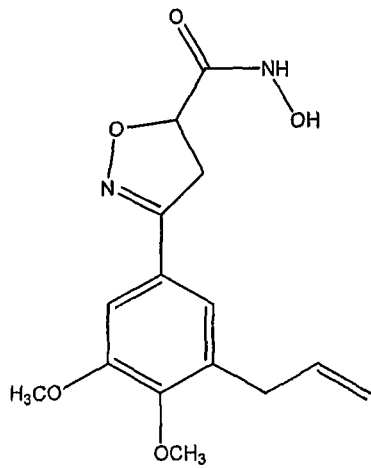
14-羟基-14-氮-双螺[5.1.5.2]-十五-9-烯-7,15-二酮 7-肟



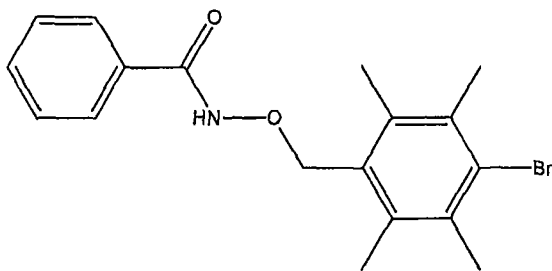
N-羟基-2-(2-苯基-噻吩-3-基)-乙酰胺



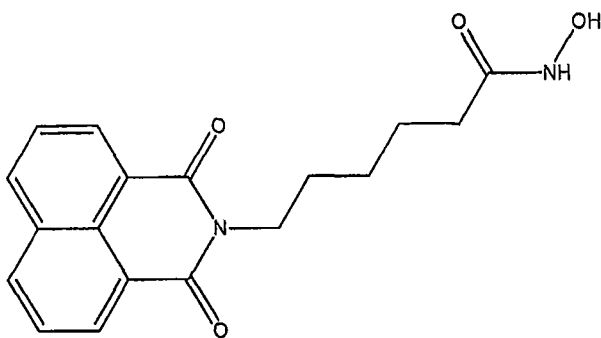
3,5-二甲基-金刚烷-1-甲酸羟基酰胺



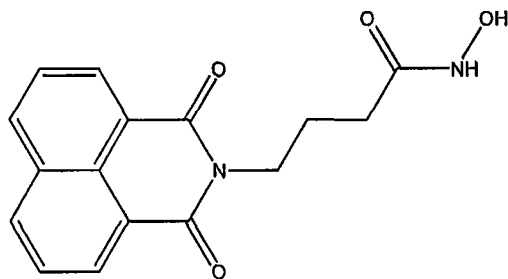
3-(3-烯丙基-4,5-二甲氧基-苯基)-4,5-二氢-异噁唑-5-甲酸羟基酰胺



N-(4-溴-2,3,5,6-四甲基-苯甲氧基)-苯甲酰胺



6-(1,3-二氧代-1H,3H-苯并[de]异喹啉-2-基)-己酸羟基酰胺



#### 4-(1,3-二氧化-1H,3H-苯并[de]异喹啉-2-基)-N-羟基-丁酰胺

如果适用，则本发明的化合物包括所述化合物本身以及任何盐（优选医药学上可接受的盐）、溶剂合物、笼形物、水合物、多晶型物或前药。如本文所用，术语“医药学上可接受的盐”为由（例如）任何一个本文所揭示的式的化合物的酸性和碱性基团形成的盐。说明性盐包括（但不限于）硫酸盐、柠檬酸盐、醋酸盐、草酸盐、氯化物、溴化物、碘化物、硝酸盐、硫酸氢盐、磷酸盐、酸式磷酸盐、异烟酸盐、乳酸盐、水杨酸盐、酸式柠檬酸盐、酒石酸盐、油酸盐、丹宁酸盐、泛酸盐、酒石酸氢盐、抗坏血酸盐、琥珀酸盐、顺丁烯二酸盐、苯磺酸盐、龙胆酸盐、反丁烯二酸盐、葡糖酸盐、葡糖醛酸盐、蔗糖盐、甲酸盐、苯甲酸盐、谷氨酸盐、甲磺酸盐、乙磺酸盐、苯磺酸盐、对甲苯磺酸盐和双羟萘酸盐（即 1,1'-亚甲基-双-(2-羟基-3-萘甲酸盐)）。术语“医药学上可接受的盐”也指由具有酸性官能团（例如羧酸官能团）的任何一个本文所揭示的式的化合物与医药学上可接受的无机或有机碱制备的盐。合适的碱包括（但不限于）例如钠、钾和锂的碱金属的氢氧化物；例如钙和镁的碱土金属的氢氧化物；例如铝和锌的其他金属的氢氧化物；氨和有机胺，例如未经取代或经羟基取代的单、二或三烷基胺；二环己基胺；三丁胺；吡啶；N-甲基,N-乙基胺；二乙胺；三乙胺；单、双或三-(2-羟基-低碳烷基胺)，例如单、双或三-(2-羟乙基)胺、2-羟基-叔丁基胺或三-(羟甲基)胺、N,N,-二-低碳烷基-N-(羟基低碳烷基)-胺，例如 N,N-二甲基-N-(2-羟乙基)胺或三-(2-羟乙基)胺；N-甲基-D-葡糖胺；和氨基酸，例如精氨酸、赖氨酸等。术语“医药学上可接受的盐”也指由具有碱性官能团（例如氨基官能团）的任何一个本文所揭示的式的化合物与医药学上可接受的无机或有机酸制备的盐。合适的酸包括硫酸氢盐、柠檬酸、醋酸、草酸、氢氯酸（HCl）、氢溴酸（HBr）、氢碘酸（HI）、硝酸、二硫化氢、磷酸、乳酸、水杨酸、酒石酸、二酒石酸、抗坏血酸、琥珀酸、顺丁烯二酸、苯磺酸、反丁烯二酸、葡糖酸、葡糖二酸、甲酸、苯甲酸、谷氨酸、甲磺酸、乙磺酸、苯磺酸和对甲苯磺酸。

如本文所用，术语“多晶型物”意谓本发明化合物或其络合物的固体结晶形态。同一化合物的不同多晶型物可表现不同的物理、化学和/或光谱性质。不同物理性质包括（但

不限于) 稳定性(例如热或光稳定性)、压缩性和密度(在配方和产物制造中重要)和溶解速率(其可影响生物可用性)。稳定性差异可由化学反应性(例如差别氧化,使得由一种多晶型物构成的剂型比由另一多晶型物构成的剂型褪色更迅速)或机械特性(例如锭剂在储存时随动力学有利的多晶型物转化为热力学更稳定的多晶型物而破碎)或两者(例如一种多晶型物的锭剂在高湿度下更易于破裂)的变化而产生。多晶型物的不同物理性质可影响其加工。例如,一种多晶型物由于(例如)其粒子的形状或粒径分布比另一种多晶型物可能更易于形成溶剂合物或可能更难以过滤或洗掉杂质。

如本文所用,术语“水合物”意谓本发明化合物或其盐进一步包括通过非共价分子间力结合之化学计量或非化学计量的水。

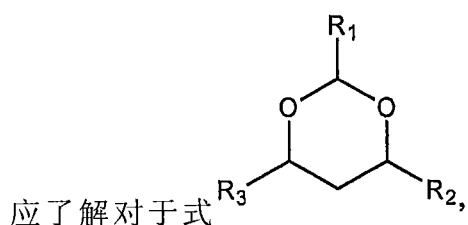
如本文所用,术语“笼形物”意谓呈含有间隔(例如通道)的晶格形式的本发明的化合物或其盐,所述间隔具有内俘获的宾分子(例如溶剂或水)。

另外,本发明的一些化合物具有一个或一个以上双键或一个或一个以上不对称中心。这类化合物可以外消旋体;外消旋混合物;单一对映异构体;个别非对映体;非对映体混合物;和顺或反、或 E 或 Z 双异构形式存在。这些化合物的所有这类异构形式明确包括在本发明中。本发明的化合物也可以多种互变异构形式出现,在这种情况下,本发明明确包括本文所述的化合物的所有互变异构形式(例如环系统的烷基化可在多个位点导致烷基化,本发明明确包括所有这类反应产物)。这些化合物的所有该类异构形式明确包括在本发明中。本文所述的化合物的所有晶体形式明确包括在本发明中。

### 化合物的合成

如上所述,本发明提供新颖化合物。本文所述的许多化合物的合成已描述在先前申请的美国专利申请中:2001年5月9日申请的 USSN 60/289,850;2002年5月9日申请的 USSN 10/144,316 和 2003年7月17日申请的 USSN 10/621,276;各申请均以引用的方式并入本文中。如所属领域的技术人员所了解,描述在这些专利申请中的多种反应和合成方案可用于制备本发明的化合物。

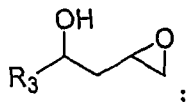
制备本发明化合物的方法于图 55 中展示。所述合成在 1,3-二噁烷核心结构的某些位置处提供较更具多样性的取代基。在某些实施例中,所述合成在  $R_3$  处提供多种类的取代基。



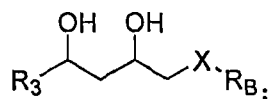
应了解对于式  $R_3$  的化合物来说,提供合成核心结构的方法,一种方

法包含以下步骤：

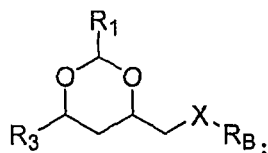
提供具有以下结构的环氧化物醇：



使所述环氧化物醇与具有结构  $R_B XH$  的试剂在合适条件下反应以产生具有以下核心结构的二醇：



使所述二醇与具有结构  $R_1 CH(OMe)_2$  的试剂在合适条件下反应以产生具有以下核心结构的骨架：



其中  $R_1$  为经取代或未经取代的芳香族或杂芳香族部分（例如，经金属螯合部分取代的芳基环）；

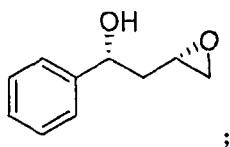
$R_B$  为氢、保护基或脂肪族、脂环族、杂脂肪族、杂环、芳香族或杂芳香族部分；

$X$  为  $-O-$ 、 $-C(R')_2-$ 、 $-S-$  或  $-NR'-$ ，其中  $R'$  为氢、保护基或脂肪族、脂环族、杂脂肪族、杂环、芳香族或杂芳香族部分；且

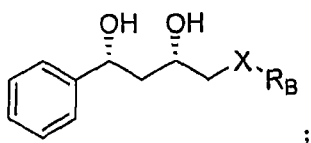
$R^3$  为脂肪族、脂环族、杂脂肪族、杂环、芳香族或杂芳香族部分。

在某些实施例中， $R_3$  为脂肪族部分。在某些实施例中， $R_3$  为杂脂肪族部分。在某些实施例中， $R_3$  为杂环部分。在某些实施例中， $R_3$  为碳环部分。在某些实施例中， $R_3$  为芳香族部分。在其他实施例中， $R_3$  为杂芳香族部分。如所属领域的技术人员所了解， $R_3$  处的多种取代基可通过在所述合成中使用不同醛作为起始物质而引入所述合成中。其实例于图3中展示，其中苯甲醛用作起始物质。多种经取代的苯甲醛以及脂肪族醛、非环状醛或非芳香族醛也可用于所说明的合成中。

在某些示范性实施例中，所述环氧化物醇具有以下结构：

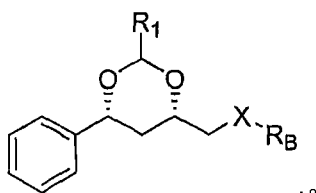


所述二醇具有以下结构：

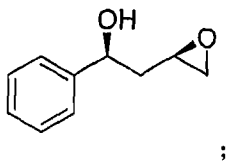


其中 X 为 S 或 O；

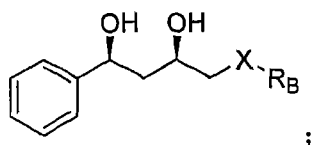
且所述核心骨架具有以下结构：



在某些其他示范性实施例中，所述环氧化物醇具有以下结构：

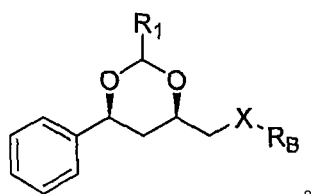


所述二醇具有以下结构：



其中 X 为 S 或 O；

且所述核心骨架具有以下结构：



#### 本发明化合物的用途

如下文所述，现已令人惊讶地发现本发明的化合物及类似物可治疗和预防蛋白降解病症，尤其骨髓瘤。因此，在一实施例中，本发明还提供通过向患有蛋白降解病症的个体投与有效量的本文所述的化合物治疗所述个体的方法。所述化合物可经由聚集体或聚集体和蛋白酶体途径抑制蛋白降解。

个体可由保健专家或个体的自我识别而识别为患有或容易罹患蛋白降解病症。

本发明还提供治疗表现蛋白降解病症的症状的细胞的方法，包含向所述细胞投与治疗有效量的蛋白降解抑制剂。所述细胞包括一种或一种以上来自个体的细胞或培养细胞。所述细胞可从个体移出或分离。来自个体的有用细胞包括以下中的一种或一种以上：骨髓基质细胞（BMSC）、周边血液单核细胞（PBMC）、淋巴细胞、毛囊、血球、其他上皮细胞、骨髓浆细胞、原发性癌细胞、患者源肿瘤细胞、正常或癌性造血干细胞、神经干细胞、实体肿瘤细胞、星形细胞等。培养细胞包括以下中的一种或一种以上：MM.1S、U266、RPMI8226、DOX40、MM.1R、INA-6、LR5、原发和确立癌细胞系、原发和确立正常细胞系。所治疗细胞可为细胞的纯净群体或可将其与例如其他血球、喂养细胞或骨髓细胞的其他细胞类型混合。所述培养细胞可为纯群体或可使其与其他细胞混合。可使培养细胞与其他培养细胞或与来自个体的细胞混合。或者，可使所述培养细胞与喂养细胞或骨髓细胞混合。

本发明还提供治疗罹患或容易罹患多发性骨髓瘤的个体的方法，包含向有需要的个体投与治疗有效量的蛋白降解抑制剂，从而治疗所述罹患或容易罹患多发性骨髓瘤的个体。多发性骨髓瘤可通过（例如）检测血清或尿液中的 M-蛋白、检测骨髓检查中大于 10% 的浆细胞、检测骨骼 x 射线中溶骨病变或全身化骨质疏松症和/或软组织浆细胞瘤的存在来诊断。在某些实施例中，在治疗多发性骨髓瘤中使 HDAC 抑制剂与蛋白酶体抑制剂组合。在某些实施例中，所述 HDAC 抑制剂为本发明的化合物。在某些实施例中，所述蛋白酶体抑制剂为硼替佐米（VELCADE®）。

本发明还提供治疗罹患或容易罹患实体肿瘤的个体的方法，包含向有需要的个体投与治疗有效量的蛋白降解抑制剂，从而治疗所述罹患或容易罹患实体肿瘤的个体。对用蛋白降解抑制剂治疗尤其敏感的实体肿瘤包括乳腺癌、肺癌、结肠癌和前列腺癌。在某些实施例中，在治疗这些癌症中使 HDAC 抑制剂与蛋白酶体抑制剂组合。在某些实施例中，所述 HDAC 抑制剂为本发明的化合物。在某些实施例中，所述蛋白酶体抑制剂为硼替佐米（VELCADE®）。

本发明提供评定在个体中蛋白降解病症治疗功效的方法，包含测定一种或一种以上治疗前表型，向所述个体投与治疗有效量的蛋白降解抑制剂，和在用蛋白降解抑制剂治疗的初始时期后测定所述一种或一种以上表型，其中所述一种或一种以上表型的调节指示蛋白降解抑制剂治疗功效。所述个体可预诊断患有蛋白降解病症，或所述方法可进一步包含诊断患有蛋白降解病症的个体。

“治疗的初始时期后”或在投与蛋白降解抑制剂后经适当时段，例如 2 小时、4 小时、8 小时、12 小时或 72 小时、数周或数月，可再次测定比例、含量和/或细胞定位中的一种或一种以上。一种或一种以上表型的调节可指示蛋白降解抑制剂的功效。一种或一种以上表型可在整个治疗中周期性地测定。例如，一种或一种以上表型可每隔数小时、数天或数周检查以评定治疗的其他功效。所述方法可用来筛选或选择可受益于用蛋白降解抑制剂的治疗的患者。

本文提供监控用聚集体抑制剂治疗的个体的进展的方法。所述方法包含测定一种或一种以上治疗前表型；向所述个体投与治疗有效量的聚集体抑制剂；和在用所述聚集体抑制剂治疗的初始时期后测定一种或一种以上表型，其中一种或一种以上表型的调节指示聚集体抑制的治疗功效。

还提供选择用于用蛋白降解抑制剂治疗的患有蛋白降解病症的个体的方法。所述选择方法包含测定一种或一种以上治疗前表型；向所述个体投与治疗有效量的蛋白降解抑制剂；和在用所述蛋白降解抑制剂治疗的初始时期后测定所述一种或一种以上表型；其中所述一种或一种以上表型的调节指示所述病症可能对用蛋白降解抑制剂治疗具有有利的临床反应。

可作为蛋白降解抑制剂用于本文所述的方法中抑制剂为一种或一种以上组蛋白乙酰基转移酶抑制剂（Mitsiades 等人，*Transcriptional signature of histone deacetylase inhibition in multiple myeloma: biological and clinical implications. Proc Natl Acad Sci USA. 2004;101:540-545*；Rosato RR, Grant S. *Histone deacetylase inhibitors in clinical development. Expert Opin Investig Drugs. 2004;13:21-38*；各自以引用的方式并入本文中）。

突巴新、硼替佐米、万珂、SARA、R115777 FTI、<sup>166</sup>Holminun-DOTMP、三氧化二砷、17-AAG、MG132、sapojargon、NPI-0052 或本文所述的其他化合物。

本发明的蛋白降解抑制剂可抑制细胞蛋白（例如酶）的活性，例如，合适的蛋白降解抑制剂可抑制 HDAC6 的活性，例如 HDAC6 酶活性。HDAC6 酶活性的抑制又可抑制聚集体介导的蛋白降解。合适的蛋白降解抑制剂也可抑制（例如）HDAC6 的 C 端乙酰化活性，从而抑制聚集体介导的蛋白降解。其他合适的蛋白降解抑制剂可抑制聚集体的活性。

在某些实施例中，由本发明的方法和组合物产生的 HDAC6 抑制作用导致 HSP90 乙酰化。HSP90 的乙酰化致使这种蛋白对于许多其服务蛋白具有较少活性，因此增加细胞中的蛋白应激。这在例如乳腺癌和前列腺癌的癌症中尤其重要。在这些癌症中，因为糖皮质激素受体需要 HSP90 功能以接合糖皮质激素，所以 HSP90 的乙酰化导致类固醇结合受体的活性减小。已发现 HSP90 抑制作用减小含糖皮质激素受体的细胞的糖皮质激素反应性。因此，投与 HDAC6 抑制剂导致 HSP90 的高度乙酰化，导致对乳腺癌细胞中雌激素的敏感性减小和对前列腺癌细胞中雄激素的敏感性减小。

合适的聚集体抑制剂包括突巴新、斯瑞泰德或本文所述的本化合物。

本发明的蛋白降解抑制剂也可抑制蛋白酶体活性。合适的蛋白酶体抑制剂包括以下中的一种或一种以上：组蛋白乙酰基转移酶抑制剂（14, 15）、突巴新、硼替佐米、万珂、SAHA、R115777 FTI、<sup>166</sup>Holminun-DOTMP、三氧化二砷、17-AAG、MG132、sapojargon、NPI-0052 或式 I 化合物、式 I 化合物的衍生物。

其他合适的蛋白降解抑制剂包括肽抑制剂，例如来源于 HDAC6、HSP 90、聚集体途径上游与下游的蛋白质的肽。例如，HDAC6 的 C 端部分，包括 Buz 结构域。

本发明的蛋白降解抑制剂能够调节细胞的一种或一种以上表型。所述表型可为响应特定治疗或化合物的生物或临床结果。表型包括贫血、血小板减少、中性粒细胞减少、溶骨病变、骨痛、免疫机能缺陷、肾机能不全、血钙过多、成熟浆细胞异倍性、恶性细胞百分数、微管蛋白的乙酰化状态、成熟浆细胞的细胞凋亡、聚集体含量、成熟浆细胞中聚集体含量、HDAC6 泛素化、成熟浆细胞中 HDAC6 泛素化、与成熟浆细胞中动力蛋白有关的 HDAC6、成熟浆细胞中细胞的泛素化蛋白含量、成熟浆细胞中卡斯蛋白酶-8 含量、成熟浆细胞中 PARP 含量、成熟浆细胞中胸苷吸收量、膨胀的 ER 池、成熟浆细胞凝集、成熟浆细胞中免疫球蛋白沉淀、非组蛋白蛋白质的乙酰化状态、细胞蛋白的整体泛素化状态、细胞周期调控状态、坏疽、细胞凋亡标示物、细胞凋亡状态、罗氏小体形成、囊性纤维化跨膜蛋白受体状态和细胞蛋白沉淀的调节或细胞和细胞外蛋白的整体

乙酰化状态。

贫血、聚集体含量、血小板减少、中性粒细胞减少、溶骨病变、骨痛、免疫机能缺陷、肾机能不全、血钙过多、成熟浆细胞异倍性、恶性细胞百分数、成熟浆细胞中胸苷吸收量、成熟浆细胞中全长卡斯蛋白酶-8 含量、成熟浆细胞中全长 PARP 含量或成熟浆细胞凝集中的一种或一种以上的减少指示所述治疗为有效的。

微管蛋白的乙酰化状态、成熟浆细胞中的 HDAC6 泛素化、裂解形式卡斯蛋白酶-8 的含量、裂解形式 PARP 的含量、坏疽、非组蛋白蛋白质的乙酰化状态、细胞泛素化水平、细胞凋亡、细胞凋亡标示物、细胞周期调控异常或成熟浆细胞中免疫球蛋白的沉淀的增加指示所述治疗为有效的。

表型可通过此项技术中已知的许多不同方法测定。例如，个体的表型，例如贫血、血小板减少、中性粒细胞减少、溶骨病变、骨痛、免疫机能缺陷、肾机能不全和血钙过多，可通过诊断这些病况的此项技术中已知的诊断方法测定。表型-成熟浆细胞异倍性可通过细胞生成方法测定。恶性细胞的百分比可例如通过组织学着色、流式细胞计、FISH、PCR、射线照相技术、MRI、CT 扫描、代谢方法等方法测定。微管蛋白的乙酰化状态、成熟浆细胞的细胞凋亡、成熟浆细胞中聚集体含量、成熟浆细胞中的 HDAC6 泛素化、与成熟浆细胞中动力蛋白有关的 HDAC6、成熟浆细胞中细胞的泛素化蛋白含量、成熟浆细胞中卡斯蛋白酶-8 含量、裂解形式卡斯蛋白酶-8 的含量、成熟浆细胞中 PARP 含量、裂解形式 PARP 的含量和成熟浆细胞中胸苷吸收量可通过例如免疫沉淀、西方印迹、ELISA、免疫组织化学、质谱分析法或这些和其他方法的组合的生物化学方法测定。

根据本发明，样品的表型可在治疗之前、蛋白降解病症疑似诊断之后、治疗之后和治疗期间的任何时间测定。可在任何时期或任何其他时期期间对来自个体的样品使用所述方法一次或一次以上。

本发明的方法可进一步包括在用所述蛋白降解抑制剂的第二时期后测定个体的表型。治疗的第二时期可与治疗的第一时期或初始时期一样长或可比治疗的第一时期或初始时期更长或更短。治疗的第二时期的测定可对从个体获得的第二生物样品进行。

可向用蛋白降解抑制剂治疗的个体或细胞进一步投与治疗有效量的一种或一种以上的其他蛋白降解抑制剂。所述其他抑制剂可为聚集体抑制剂或蛋白酶体抑制剂。所述其他抑制剂可为（例如）硼替佐米、突巴新、组蛋白乙酰基转移酶抑制剂、突巴新、硼替佐米（VELCADE®）、SAHA、R115777 FTI、<sup>166</sup>Holminun-DOTMP、三氧化二砷、17-AAG 或式 I 化合物、式 I 化合物的衍生物。

可向个体或细胞共同投与以下中的一种或一种以上：化学治疗剂、辐射剂、激素剂、

生物制剂或消炎剂至正接受蛋白降解病症治疗的个体。化学治疗剂可包括他莫昔芬、曲妥珠单抗、拉洛昔芬、阿霉素、氟尿嘧啶/5-FU、帕米膦酸二钠、阿纳托唑、依西美坦、环磷酰胺、表阿比星、雷曲唑、托瑞米芬、氟维司群、氟甲睾酮、曲妥珠单抗、甲胺喋呤、醋酸甲地孕酮、多烯紫杉醇、太平洋紫杉醇、睾内酯、氮丙啶、长春花碱、卡培他滨、醋酸高塞勒瑞、唑来膦酸、紫杉醇、长春花碱和/或长春新碱。有用的非类固醇消炎剂包括（但不限于）阿司匹林（aspirin）、布洛芬（ibuprofen）、双氯芬酸（diclofenac）、萘普生（naproxen）、苯噻洛芬（benoxaprofen）、氟比洛芬（flurbiprofen）、非诺洛芬（fenoprofen）、氟布芬（flubufen）、酮洛芬（ketoprofen）、吲哚洛芬（indoprofen）、匹洛芬（piroprofen）、卡洛芬（carprofen）、奥沙普秦（oxaprozin）、帕莫洛芬（pramoprofen）、姆洛芬（muroprofen）、三噻洛芬（trioxaprofen）、舒洛芬（suprofen）、氨基洛芬（aminoprofen）、噻洛芬酸（tiaprofenic acid）、氟洛芬（fluprofen）、布氯酸（bucloxic acid）、吲哚美辛（indomethacin）、舒林酸（sulindac）、托美丁（tolmetin）、佐美酸（zomepirac）、硫平酸（tiopinac）、齐多美辛（zidometacin）、阿西美辛（acemetacin）、芬替酸（fentiazac）、环氯茛酸（clidanac）、氧平酸（oxpinac）、甲芬那酸（mefenamic acid）、甲氯芬那酸（meclofenamic acid）、氟芬那酸（flufenamic acid）、尼氟酸（niflumic acid）、托芬那酸（tolfenamic acid）、二氟塞尔（diflurisal）、氟苯柳（flufenisal）、吡罗昔康（piroxicam）、舒多昔康（sudoxicam）、伊索昔康（isoxicam）；水杨酸衍生物，包括阿司匹林、水杨酸钠、三水杨酸胆碱镁、双水杨酯、二氟尼柳（diflunisal）、水杨酰水杨酸、柳氮磺吡啶（sulfasalazine）和奥沙拉秦（olsalazin）；对氨基苯酚衍生物，包括对乙酰胺基酚和非那西丁（phenacetin）；吲哚和茛乙酸，包括吲哚美辛、舒林酸和依托度酸（etodolac）；杂芳基乙酸，包括托美丁、双氯芬酸和酮洛酸；邻氨基苯甲酸（芬那酸），包括甲芬那酸和甲氯芬那酸；烯醇酸，包括昔康类（oxicams）（吡罗昔康、替诺昔康（tenoxicam））和吡唑烷二酮类（苯基丁氮酮、oxyphenthartazone）；烷酮，包括萘丁美酮及其医药学上可接受的盐以及其混合物。对于 NSAID 的更详细描述，参见 *Paul A. Insel, Analgesic-Antipyretic and Antiinflammatory Agents and Drugs Employed in the Treatment of Gout, in Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics 617-57 (Perry B. Molinoff 和 Raymond W. Ruddon 编, 第 9 版, 1996)* 和 *Glen R. Hanson, Analgesic, Antipyretic and Anti-Inflammatory Drugs in Remington: The Science and Practice of Pharmacy Vol II 1196-1221 (A.R. Gennaro 编, 第 19 版, 1995)* 其以引用的方式全文并入本文中。

在用蛋白降解抑制剂治疗个体或细胞的同时，可监控所述细胞或个体。

本发明的方法可进一步包含比较一种或一种以上治疗前或治疗后表型与标准表型。所述标准表型为参考细胞或细胞群体中的相应表型。参考细胞为一种或一种以上的以下细胞：来自未怀疑患有蛋白降解病症的人或个体的细胞、来自个体的细胞、培养细胞、来自个体的培养细胞或来自治疗前个体的细胞。来自个体的细胞可包括（例如）骨髓基质细胞（BMSC）、周边血液单核细胞（PBMC）、淋巴细胞、毛囊、血球、其他上皮细胞、骨髓浆细胞、原发癌细胞、患者源肿瘤细胞、正常或癌性造血干细胞、神经干细胞、实体肿瘤细胞、星形细胞等。

本发明的方法还包括抑制细胞或个体中聚集体介导的蛋白降解的方法，包含使所述细胞与聚集体抑制剂接触。在一实施例中，所述聚集体蛋白降解是由 HDAC6 介导。所述方法可进一步包含抑制所述细胞或个体中的蛋白酶体蛋白降解。例如，通过投与硼替佐米和突巴新。

#### 医药组合物

本发明还提供一种医药组合物，其包含有效量的式 I、式 II 的本发明化合物或本文所述的其他化合物和医药学上可接受的载剂。在另一实施例中，如先前所述，所述有效量有效治疗蛋白降解病症。

在一实施例中，本发明的化合物是使用医药学上可接受的配方向个体投与，例如，在将医药学上可接受的配方投与个体后向所述个体提供本发明化合物持续至少 12 小时、24 小时、36 小时、48 小时、1 周、2 周、3 周或 4 周的传递的医药学上可接受的配方。

在某些实施例中，这些医药组合物适于局部或口服投与个体。在其他实施例中，如下文详细描述，本发明的医药组合物可特别以固体或液体形式调配用于投与，包括适于以下投与方式的那些形式：（1）口服投与，例如灌服剂（水性或非水性溶液或悬浮液）、锭剂、大丸剂、粉剂、颗粒、糊剂；（2）非经肠投与，例如以例如无菌溶液或悬浮液形式经皮下、肌肉内或静脉内注射；（3）局部施用，例如以乳膏剂、软膏剂或喷雾剂形式施用到皮肤上；（4）阴道内或直肠内，例如阴道栓剂、乳膏剂或泡沫形式；或（5）气雾，例如含有所述化合物的水性气雾剂、脂质制剂或固体颗粒形式。

短语“医药学上可接受的”是指在可靠医学判断范畴内适用于与人类和动物的组织接触而没有过度毒性、刺激、过敏反应或其他问题或并发症并且与合理的受益/风险相匹配的本发明的那些本发明化合物、含有所述化合物的组合物和/或剂型。

短语“医药学上可接受的载剂”包括涉及将本发明的化学制品从身体的一个器官或部分传送或转运到身体的另一器官或部分的医药学上可接受的物质、组合物或媒剂，例如液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂、溶剂或囊封物质。各载剂在与配方中的其他

成分相容和对患者无害的意义上为“可接受的”。可充当医药学上可接受的载剂的物质的一些实例包括：(1) 糖，例如乳糖、葡萄糖和蔗糖；(2) 淀粉，例如玉米淀粉和马铃薯淀粉；(3) 纤维素及其衍生物，例如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和醋酸纤维素；(4) 粉末状黄芪胶；(5) 麦芽；(6) 明胶；(7) 滑石；(8) 赋形剂，例如可可脂和栓剂蜡；(9) 油剂，例如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油；(10) 二醇，例如丙二醇；(11) 多元醇，例如甘油、山梨糖醇、甘露糖醇和聚乙二醇；(12) 酯，例如油酸乙酯和十二烷酸乙酯；(13) 琼脂；(14) 缓冲剂，例如氢氧化镁和氢氧化铝；(15) 海藻酸；(16) 无热原水；(17) 等渗盐水；(18) 林格氏溶液(Ringer's solution)；(19) 乙醇；(20) 磷酸盐缓冲溶液；和(21) 其他用于医药配方中的无毒相容性物质。

湿润剂、乳化剂和润滑剂(例如十二烷基硫酸钠和硬脂酸镁)以及着色剂、脱模剂、包衣剂、甜味剂、调味剂和芳香剂、防腐剂和抗氧化剂也可存在于所述组合物中。

医药学上可接受的抗氧化剂的实例包括：(1) 水溶性抗氧化剂，例如抗坏血酸、盐酸半胱氨酸、硫酸氢钠、焦亚硫酸钠、亚硫酸钠等；(2) 油溶性抗氧化剂，例如抗坏血酸棕榈酸酯、丁羟茴香醚(BHA)、丁基化羟基甲苯(BHT)、卵磷脂、没食子酸丙酯、 $\alpha$ -生育酚等；和(3) 金属螯合剂，例如柠檬酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、山梨糖醇、酒石酸、磷酸等。

含有本发明化合物的组合物包括适于口服、经鼻、经局部(包括颊和舌下)、经直肠、经阴道、气雾和/或非经肠投与的那些组合物。所述组合物可方便地以单位剂型存在且可通过制药技术中众所周知的任何方法来制备。可与载剂物质组合以产生单一剂型的活性成分的量将视所治疗的主体、特定投与方式而变化。可与载剂物质组合以产生单一剂型的活性成分的量通常为所述化合物产生治疗效应的量。通常，以百分之百计，所述量将在约1%至约99%的活性成分的范围，优选为约5%至约70%，更优选为约10%至约30%。

制备这些组合物的方法包括使本发明的化合物与载剂和视情况一种或一种以上辅助成分联合的步骤。通常，所述配方通过使本发明的化合物与液体载剂或细粉状固体载剂或两者均匀且密切联合，且随后必要时使产物成形来制备。

适于口服投与的本发明组合物可呈胶囊剂、扁囊剂、丸剂、锭剂、糖锭剂(使用调味基质，通常为蔗糖和阿拉伯胶或黄芪胶)、粉剂、颗粒形式、或呈水性或非水性液体中的溶液或悬浮液形式、或呈水包油或油包水液体乳液形式、或呈酞剂或糖浆形式、或呈软锭剂(使用惰性基质，例如明胶和甘油或蔗糖和阿拉伯胶)形式和/或呈漱口剂等形式，各自含有预定量的本发明化合物作为活性成分。化合物也可以大丸剂、药糖剂或糊

剂形式投与。

在用于口服的本发明的固体剂型（胶囊剂、锭剂、丸剂、糖衣丸、粉剂、颗粒等）中，使活性成分与一种或一种以上医药学上可接受的载剂（例如柠檬酸钠或磷酸二钙）和/或任何以下物质混合：（1）填充剂或增量剂，例如淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露糖醇和/或硅酸；（2）粘合剂，例如羧甲基纤维素、海藻酸盐、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖和/或阿拉伯胶；（3）保湿剂，例如甘油；（4）崩解剂，例如琼脂、碳酸钙、马铃薯或木薯淀粉、海藻酸、某些硅酸盐和碳酸钠；（5）溶液迟延剂，例如石蜡；（6）吸收加速剂，例如季铵化合物；（7）湿润剂，例如乙酰基醇和单硬脂酸甘油酯；（8）吸收剂，例如高岭土和膨润土；（9）润滑剂，例如滑石、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、十二烷基硫酸钠以及其混合物；和（10）着色剂。在胶囊剂、锭剂和丸剂的情况下，所述医药组合物还可包含缓冲剂。类似类型的固体组成也可用作使用例如乳糖（lactose 或 milk sugar）的赋形剂以及高分子量聚乙二醇等的软和硬填充的明胶胶囊中的填充剂。

锭剂可通过视情况与一种或一种以上辅助成分一起压缩或模铸来制造。压缩锭剂可使用粘合剂（例如明胶或羟丙基甲基纤维素）、润滑剂、惰性稀释剂、防腐剂、崩解剂（例如淀粉羟基乙酸钠或交联羧甲基纤维素钠）、表面活性或分散剂来制备。模铸锭剂可通过在合适机器中模铸用惰性液体稀释剂湿润之粉末状活性成分的混合物来制造。

锭剂和本发明医药组合物的其他固体剂型（例如糖衣丸、胶囊剂、丸剂和颗粒）可视情况刻痕或用例如医药调配技术中众所周知的肠溶衣和其他包衣的包衣或外壳来制备。其也可使用（例如）提供所需释放概况的变化比例的羟丙基甲基纤维素、其他聚合物基质、脂质体和/或微球体调配以使其中的活性成分的缓慢或受控释放。其可通过（例如）经由细菌保留过滤器的过滤或通过并入灭菌剂来灭菌以呈无菌固体组合物形式，所述组合物可在使用前迅速溶解于无菌水或其他无菌可注射介质中。这些组合物也可视情况含有遮光剂且可为仅仅在胃肠道的某些部分中或优先在胃肠道的某些部分中视情况以延迟方式释放活性成分的组合物。可使用的包埋组合物的实例包括聚物质和蜡。所述活性成分也可（在适当情况下）与一种或一种以上的上述赋形剂一起呈微囊密封形式。

本发明化合物的用于口服的液体剂型包括医药学上可接受的乳液、微乳液、溶液、悬浮液、糖浆且酞剂。除活性成分之外，液体剂型可含有通常用于此项技术中的惰性稀释剂，例如水或其他溶剂；增溶剂和乳化剂，例如乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苯甲醇、苯甲酸苄酯、丙二醇、1,3-丁二醇、油剂（详细来说，棉籽油、花生油、玉米油、胚芽油、橄榄油、蓖麻油和芝麻油）、甘油、四氢呋喃醇、聚乙二醇和脱水山梨糖醇的脂肪酸酯以及其混合物。

除惰性稀释剂之外，口服组合物可包括辅助剂，例如湿润剂、乳化剂和悬浮剂、甜味剂、调味剂、着色剂、加香剂和防腐剂。

除本发明的活性化合物之外，悬浮液可含有悬浮剂，例如乙氧基化异硬脂醇、聚氧化乙烯山梨糖醇和脱水山梨糖醇酯、微晶纤维素、偏氢氧化铝、膨润土、琼脂和黄芪胶以及其混合物。

用于直肠或阴道投与的本发明的医药组合物可以栓剂形式提供，其可通过使一种或一种以上本发明的化合物与一种或一种以上包含（例如）可可脂、聚乙二醇、栓剂蜡或水杨酸酯的合适非刺激性赋形剂或载剂混合来制备，且其在室温下为固体，而在体温下为液体，且因此将在直肠或阴道腔内融化且释放活性剂。

适于阴道投与的本发明组合物还包括阴道栓剂、棉塞剂、乳膏剂、凝胶剂、糊剂、泡沫或含有此项技术中已知为适当的此类载剂的喷雾配方。

本发明化合物的用于局部或经表皮投与的剂型包括粉剂、喷雾剂、软膏剂、糊剂、乳膏剂、洗液、凝胶剂、溶液、贴片和吸入剂。本发明的活性化合物可在无菌条件下与医药学上可接受的载剂和与可能需要的任何防腐剂、缓冲剂或推进剂混合。

除本发明的本发明化合物之外，所述软膏剂、糊剂、乳膏剂和凝胶剂可含有赋形剂，例如动物和植物脂肪、油剂、蜡、石蜡、淀粉、黄芪胶、纤维素衍生物、聚乙二醇、硅酮、膨润土、硅酸、滑石和氧化锌或其混合物。

除本发明的化合物之外，粉剂和喷雾剂可含有赋形剂，例如乳糖、滑石、硅酸、氢氧化铝、硅酸钙和聚酰胺粉剂或这些物质的混合物。喷雾剂可另外含有通常的推进剂，例如氯氟烃和挥发性未经取代的烃，例如丁烷和丙烷。

本发明的化合物或者可以气雾剂形式投与。这可通过制备含有所述化合物的水性气雾剂、脂质制剂或固体颗粒来实现。可使用非水性（例如碳氟化合物推进剂）悬浮液。声波喷雾器为优选，因为其使药剂最小程度地暴露于可导致所述化合物降解的剪切力中。

通常，水性气雾剂通过调配所述药剂的水溶液或悬浮液以及常规的医药学上可接受的载剂和稳定剂来制备。所述载剂和稳定剂随特定化合物的需要而变化，但通常包括非离子型表面活性剂（吐温（Tween）、普卢兰尼克（Pluronic）或聚乙二醇）、无害蛋白质样血清白蛋白、脱水山梨糖醇酯、油酸、卵磷脂、例如甘氨酸的氨基酸、缓冲剂、盐、糖或糖醇。气雾剂通常由等渗溶液制备。

经皮贴片具有提供本发明化合物受控传递到身体上的附加益处。这类剂型可通过溶解或分散药剂于合适介质中来制备。吸收增强剂也可用于增加活性成分穿过皮肤的通

量。所述通量的速率可通过提供速率控制膜或分散活性成分于聚合物基质或凝胶中来控制。

同样预期眼用配方、眼用软膏、粉剂、溶液等在本发明的范畴内。

适于非经肠投与的本发明的医药组合物包含一种或一种以上本发明的化合物与一种或一种以上医药学上可接受的无菌等渗水性或非水性溶液、分散液、悬浮液或乳液或可仅在使用前复原为无菌可注射溶液或分散液的无菌粉剂，所述医药组合物可含有抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂、使配方与预定接受者的血液等渗的溶质、或悬浮或增稠剂。

可用于本发明的医药组合物中的合适水性和非水性载剂的实例包括水；乙醇；多元醇（例如甘油、丙二醇、聚乙二醇等）以及其合适的混合物；植物油，例如橄榄油；和可注射的有机酯，例如油酸乙酯。可例如通过使用例如卵磷脂的包衣物质通过在分散液情况下保持所需粒度及通过使用表面活性剂来维持适当流动性。

这些组合物也可含有辅助剂，例如防腐剂、湿润剂、乳化剂和分散剂。微生物作用的预防可通过包括多种抗细菌和抗真菌剂，例如对羟苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚山梨酸等来确保。也可希望将等渗剂，例如糖、氯化钠等纳入所述组合物中。另外，可注射医药形式的延长吸收可通过纳入例如单硬脂酸铝和明胶的延迟吸收的试剂来达到。

有时，为了延长药物的效应，希望减缓来自皮下或肌肉内注射的药物的吸收。这可通过使用具有不良水溶性的结晶或非晶形物质的液体悬浮液来实现。药物的吸收速率又取决于其分解速率，所述分解速率又取决于晶体大小和结晶形态。或者，非经肠投与的药物形式的延迟吸收通过溶解或悬浮所述药物于油性媒剂中来实现。

可注射储槽形式通过形成本发明化合物于例如聚丙交酯-聚乙交酯的可生物降解的聚合物中的微囊封基质来制造。取决于药物与聚合物的比率和所用特定聚合物的性质，可控制药物释放的速率。其他可生物降解的聚合物的实例包括聚(原酸酯)和聚(酸酐)。储槽可注射配方可通过俘获所述药物于与身体组织相容的脂质体或微乳状液中来制备。

当本发明的化合物作为药物投与人类和动物时，其可以本身形式提供或以含有（例如）0.1至99.5%（更优选0.5至90%）的活性成分与医药学上可接受的载剂的医药组合物形式提供。

不考虑所选投与路径，可将以合适水合形式使用的本发明的化合物和/或本发明的医药组合物通过所属领域的技术人员已知的常规方法调配成医药学上可接受的剂型。

本发明医药组合物中的活性成分的投与的实际剂量水平和时程可以变化，以便获得有效获得特定患者的所需治疗反应的活性成分的量、组合物和投与方式，而不对所述患者产生毒性。示范性剂量范围为0.1至10毫克/天。

本发明的本发明化合物的优选剂量以患者可耐受且不发展严重的血钙过多为极限。本发明的本发明化合物优选以约 0.001 mg 至约 100 mg/kg 体重、约 0.001-约 10 mg/kg 或约 0.001 mg-约 100 mg/kg 体重的浓度投与。范围中间值至上述值也意欲成为本发明的一部分。

### 筛选分析

为寻求蛋白降解且详细来说 HDAC6 的效能选择性抑制剂（例如在纳摩尔范围（nanomolarrange）内有效），本发明提供新颖筛选方法。在一实施例中，所述筛选方法为癌细胞的定量、细胞、基于影像的筛选。

本发明的筛选方法包括癌细胞的定量、高产量、基于影像的筛选。细胞可例如在多孔板或芯片（例如 384 孔板形式）或在芯片（例如 BioTrove OpenArray™ Chips（BioTrove, Woburn, MA））中生长。所述细胞可在这些孔和板中生长或被处理。将其用小分子库、肽库、核酸库处理。所述库中的一些可能偏向如本文所论述的 HDAC 抑制作用。其他库可能偏向其他聚集体或蛋白酶体抑制标靶的抑制作用。处理后，可通过如本文所论述的表型监控所述细胞。例如，可使用微管蛋白和组蛋白乙酰化状态-特异性抗体且由相应荧光二次抗体辨别或如果其结合的话可直接标记且检测。随后将孔或通孔以不偏斜方式刻痕。这可例如通过自动 Axon 5000A 落射荧光显微镜进行。刻痕考虑（例如）与对照物相比荧光的量、相对于参考物荧光的相对量或荧光的量。对照物可用于参考。例如，可使用突巴新、曲古菌素和 DMSO 的对照物作为对照物。随后根据对于在 RPMI-8226 骨髓瘤细胞系中的直接细胞毒性和与硼替佐米的协同作用的评定优先考虑分子。

微管蛋白选择性亚库可包括来源于定向多样性合成途径的分子。例如，可筛选描述在 Sternson SM 等人, *Org Lett.* 2001 Dec 27; 3(26):4239-42; Haggarty SJ 等人, *Chem Biol.* 2003 年 5 月; 10(5):383-96; Haggarty SJ 等人, *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003 Apr 15; 100(8):4389-94. Epub 2003 Apr 03; 和 Haggarty SJ 等人, *Comb Chem High Throughput Screen.* 2004 Nov; 7(7):669-76 中的化合物的库以识别其他的活性化合物。

识别在细胞中抑制蛋白降解的候选化合物的方法包含使表现聚集体形成的细胞与候选化合物接触，和测定所述细胞的表型，其中所述表型的调节指示所述化合物的功效。细胞的表型可如本文所述例如通过基于影像的多维筛选来测定。用于筛选分析的细胞类型包括骨髓瘤患者细胞、骨髓瘤细胞系、骨髓瘤细胞系的原代细胞培养物。细胞培养物、原代培养物或患者细胞可与基质细胞或其他细胞一起共同培养。所述接触可通过添加候选化合物至培养基中，直接添加至所述细胞中，或例如在横向流动或平面流动贴片紧固装置中以流体形式流过所述细胞来进行。所属领域的技术人员将能够识别具有本发明的

益处的其他适当方法。

候选分子可为小分子、肽或核酸中的一种或一种以上。所述核酸可为例如 RNA 或 DNA 分子，例如 mRNA、RNAi、siRNA；或 oligo。

合适的肽可包括来源于 HDAC6、动力蛋白、泛素或伴侣蛋白的肽。例如，肽来源于 HDAC6 的 C 端、(氨基酸 439-503)、HDAC6 的氨基酸 500-790、HDAC6 的氨基酸 781-931 或氨基酸 1-460。其他合适的肽包括由 Yao 识别的 HDAC6 的动力蛋白结合结构域 (aa 439-503)；C 端 TDAC 结构域 (aa 500-790)；泛素结合 BUZ 结构域 (aa 781-931)；或 N 端 460 氨基酸。

合适的小分子包括天然和合成产物。所述分子可包含于一个库中；化合物的库可商业（例如自 ChemBridge, San Diego, CA）获得或可通过已知方法（例如，如本文所述的方法）制备。

评价测试化合物的其他筛选方法包括使表现聚集体形成的细胞与测试化合物接触，和评价接触后的细胞，其中一种或一种以上表型的调节与参考值的相关性指示测试化合物可用作蛋白降解病症治疗。

所述方法可进一步包括用所述蛋白降解抑制剂治疗的初始时期后测定所述细胞的表型。治疗的初始期可为建立本发明的治疗化合物的稳定和/或治疗有效血清含量所花费的时间，或个体清除治疗剂的实质部分所花费的时间或由个体或与治疗有关的护理专家选择的任何时段。

本发明的这个实施例非常适于筛选调节（例如抑制）细胞、组织或个体中的蛋白降解或调节细胞、组织或个体的如本文所述的表型的分子的化学库。所述化学库可为肽库、肽模拟物库、化学合成的库、重组体，例如噬菌体呈现库，和基于活体外转译的库、其他非肽合成的有机库等等。

使用本发明的方法筛选的库可包括多种类型的化合物。可根据本发明的方法筛选的库的实例包括（但不限于）肽；无规生物寡聚体；多聚体（diversomer），例如乙内酰胺类、苯并二氮呋类和二肽；插烯多肽（vinylogous polypeptide）；非肽基肽模拟物；寡聚氨基甲酸酯；肽基磷酸酯；肽核酸库；抗体库；碳水化合物库；和小分子库（优选小有机分子库）。在一些实施例中，所筛选的库中的化合物为核酸或肽分子。在一非限制性实例中，肽分子可存在于噬菌体呈现库中。在其他实施例中，所述类型的化合物包括（但不限于）肽类似物，包括包含非天然产生的氨基酸（例如 D-氨基酸、氨基酸的含磷类似物，例如  $\gamma$ -氨基磷酸和  $\gamma$ -氨基磷酸或具有非肽键的氨基酸）的肽；核酸类似物，例如硫代磷酸酯和 PNA；激素；抗原；合成或天然产生的药物；鸦片剂；多巴胺（dopamine）；

5-羟色胺 (serotonin); 儿茶酚胺; 凝血酶; 乙酰胆碱; 前列腺素; 有机分子; 信息素; 腺苷; 蔗糖; 葡萄糖; 乳糖和半乳糖。多肽或蛋白质的库也可用于本发明的分析中。

在一优选的实施例中, 组合库为小有机分子库, 包括 (但不限于) 苯并二氮呋类、类异戊二烯类、噻唑烷二酮类、metathiazanones、吡咯啉类、吗啉基化合物和苯并二氮呋类。在另一实施例中, 所述组合库包括肽; 无规生物寡聚体; 苯并二氮呋类; 多聚体, 例如乙内酰胺类、苯并二氮呋类和二肽; 插烯多肽; 非肽基肽模拟物; 寡聚氨基甲酸酯; 肽基磷酸酯; 肽核酸库; 抗体库; 或碳水化合物库。组合库本身为市售的 (参见, 例如 ComGenex, Princeton, New Jersey; Asinex, Moscow, Ru, Tripos, Inc., St. Louis, Missouri; ChemStar, Ltd, Moscow, Russia; 3D Pharmaceuticals, Exton, Pennsylvania; Martek Biosciences, Columbia, Maryland 等等)。

在一优选的实施例中, 预先选定所述库以便所述库的化合物更易于受到细胞吸收。例如, 根据增加化合物进入细胞的可能性的具体参数, 例如 (但不限于) 大小、亲油性、亲水性和氢键来选择化合物。在另一实施例中, 所述化合物通过三维或四维计算机计算程序来分析。

根据本发明的方法使用的组合化合物库可经合成。存在对于针对产生小有机化合物的大型集合的合成方法的重大关注, 可对于其药理学、生物学或其他活性进行筛选。用于产生巨大组合库的合成方法可在溶液中或在固相中 (即在固相载体上) 执行。固相合成使得实施多步反应和驱动反应以高产率完成变得更容易, 因为可容易地添加过量试剂且在各反应步骤之后将其洗去。固相组合合成也倾向于改善分离、纯化和筛选。然而, 更常规的液相化学法支持比固相化学法更宽广种类的有机反应。

本发明的组合化合物库可使用 Kilcoin 等人的美国专利第 6,190,619 号所述的设备来合成, 所述专利以引用之方式全文并入本文中。美国专利第 6,190,619 号揭示一种能够容纳用于并行合成多种离散化合物或用于化合物的组合库的多个反应容器的合成设备。

在一实施例中, 所述组合化合物库可在溶液中合成。Boger 等人的美国专利第 6,194,612 号 (其以引用的方式全文并入本文中) 中揭示的方法的特征在于可作为模板用于液相合成组合库的化合物。所述模板设计成能使反应产物易于使用液体/液体或固体/液体萃取从未反应的反应物中纯化。通过使用所述模板组合合成产生的化合物优选为小有机分子。所述库中的一些化合物可模拟非肽或肽的效应。与组合化合物库的固相合成形成对比, 液相合成不需要使用监控多步固相合成的个别步骤的专门规程 (Egner 等人, 1995, J. Org. Chem. 60:2652; Anderson 等人, 1995, J. Org. Chem. 60:2650; Fitch 等人, 1994, J. Org. Chem. 59:7955; Look 等人, 1994, J. Org. Chem. 49:7588; Metzger 等人, 1993,

Angew. Chem., Int. Ed. Engl. 32:894; Youngquist 等人, 1994, Rapid Commun. Mass Spect. 8:77; Chu 等人, 1995, J. Am. Chem. Soc. 117:5419; Brummel 等人, 1994, Science 264:399; 和 Stevanovic 等人, 1993, Bioorg. Med. Chem. Lett. 3:431)。

可用于本发明的方法的组合化合物库可在固相载体上合成。在一实施例中, 分裂合成法(在合成期间分离和混合固相载体的规程)用于在固相载体上合成化合物库(参见, 例如 Lam 等人, 1997, Chem. Rev. 97:41-448; Ohlmeyer 等人, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:10922-10926 和其中引用的参考文献)。最终库中的各个固相载体具有附着于其表面上的大体上一种类型的化合物。在固相载体上合成组合库的其他方法(其中一种产物附着于各载体上)为所属领域的技术人员已知(参见, 例如 Nefzi 等人, 1997, Chem. Rev. 97:449-472)。

#### *用于识别 HDAC 和 TDAC 抑制剂的免疫荧光分析*

本发明提供用于识别具有 HDAC 和/或 TDAC 抑制活性的测试剂的基于免疫荧光的分析。本发明的分析是基于使用乙酰化微管蛋白和乙酰化赖氨酸的特异性抗体(即乙酰化组蛋白的标示物)。所述分析尤其可用于识别与抑制 TDAC 相比特异性抑制 HDAC 的药剂或与抑制 HDAC 相比特异性抑制 TDAC 的药剂。如上所述, 包括小分子、聚合物、生物分子、蛋白质、肽、多核苷酸等等的任何类型的药剂均可使用本发明的分析进行筛选。在某些实施例中, 筛选小分子。在某些特定的实施例中, 所述小分子为突巴新类或为突巴新衍生物。在某些实施例中, 所述小分子为本发明的化合物。所述测试剂也可为购买的、经由传统的合成技术制备的、经由组合化学技术制备的或从历史化学物品收集获得的小分子。在某些实施例中, 所述测试剂为生物分子。在其他实施例中, 所述测试剂为蛋白质或肽。在其他实施例中, 所述测试剂为多核苷酸。在某些实施例中, 所述测试剂为聚合物。

所述分析涉及使细胞与具体浓度的测试剂在具体条件下接触。所述具体条件包括培养基的类型、药剂的浓度、溶解或悬浮于其中的溶剂、pH 值、温度、培育时间等等。这些特定参数可通过操作员或科学家实施所属领域的技术人员应了解的分析来确定。用测试化合物培育确定时间之后, 将细胞用针对乙酰化微管蛋白的第一一次抗体和针对乙酰化赖氨酸的第二一次抗体处理。随后使所述细胞与对于各一次抗体具有特异性且可由独特信号识别的两种二次抗体接触。在某些实施例中, 所述独特信号为独特的荧光信号。然而, 也可使用化学发光、磷光、比色、酶促反应产物或其他报导体。测量且视情况定量来自各二次抗体的信号以确定在指定条件下用所述测试剂产生的 TDAC 和 HDAC 抑制作用的量。视情况, 抑制程度是相对于未添加测试剂的对照物来确定。在某些实施例

中，省去二次抗体且将一次抗体独特标记用于识别和视情况定量。

任何类型的细胞均可用于本发明的分析。所述细胞可来自任何物种。例如，可使用细菌细胞、酵母细胞、哺乳动物细胞、小鼠细胞、大鼠细胞、灵长类动物细胞或人类细胞。在某些实施例中，所述细胞为人类细胞，其可来源于任何组织或器官系统或可处于任何发育阶段。所述细胞可来源于皮肤、毛发、神经、肌肉、骨骼、消化道、泌尿生殖道、血管、骨髓、心脏、肺、肝、胰腺、胃、结肠、肾、膀胱、睾丸、卵巢、子宫、宫颈、脾、内分泌系统、脑、脊髓、眼睛等等。所述细胞可为干细胞、胚胎干细胞、胎儿细胞、祖细胞等等。在某些实施例中，所述细胞为人类癌细胞系。可使用任何类型的癌细胞。某些示范性细胞系包括多发性骨髓瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、急性髓性白血病(AML)、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、肺癌、结肠癌、白血病、淋巴瘤、皮肤癌、脑癌、宫颈癌、胃癌、骨癌等等。具体细胞系包括 MM.1S、U266、RPMI8226、DOX40、MM.1R、INA-6、LR5 等等。

通常将细胞涂于多孔组织培养板（例如 384 孔板）上且使其粘附所述板，然后添加指定浓度的测试剂。可测试各测试剂的多种浓度以建立剂量反应曲线以计算 IC<sub>50</sub> 值。允许所述测试剂与所述细胞一起在生理条件下培育 1-24 小时，优选 4-16 小时。随后，将所述细胞固定、阻断且洗涤。将经处理的细胞用一次抗体（一种对乙酰化微管蛋白具有特异性且另一种对乙酰化赖氨酸具有特异性）培育。所述抗体可为单克隆的或多克隆的。在某些实施例中，所述抗体由商业来源获得。随后将所述一次抗体用荧光二次抗体标记。使这些板成像，且视情况定量来自各二次抗体的荧光信号。如所属领域的技术人员所了解，可关于其他标示物将细胞着色，例如其他蛋白质、核酸内含物、DNA 内含物、RNA 内含物、细胞器等等。

随后可将收集的数据用于计算剂量反应曲线，计算 IC<sub>50</sub> 值，建立结构-功能相互关系，计算 HDAC 抑制作用与 TDAC 抑制作用的比率，确定对于 HDAC 或 TDAC 的特异性等等。

本发明的分析尤其能够用于使用多孔板、流体处理机器人、板成像器和计算机和开发用于高产量筛选的软件的高产量系统。在某些实施例中，并行分析至少 100 种测试条件（例如测试剂、测试剂的浓度、细胞类型、温度、用测试剂培育的时间、pH 值、培养基等等）。在其他实施例中，并行分析至少 300 种试验条件。在其他实施例中，并行分析至少 500 种试验条件。在其他实施例中，并行分析至少 1000 种试验条件。

将使用本发明的分析识别为 HDAC 和/或 TDAC 抑制剂的化合物视为本发明的一部分。在某些实施例中，所述分析用于识别 HDAC 的特异性抑制剂。在其他实施例中，所

述分析用于识别 TDAC 的特异性抑制剂。

### 试剂盒

本发明提供用于治疗个体的蛋白降解病症的试剂盒。所述试剂盒可包括一种或一种以上本发明的化合物（例如突巴新、式 I 化合物）或其医药学上可接受的酯、盐和前药和使用说明书。所述使用说明书可包括剂量、投与路径、患者教育信息、有效期限、储存条件、适应症等。

本发明的化合物可以治疗有效量与医药学上可接受的载剂一起提供于所述试剂盒中或其可以大批量与医药学上可接受的载剂一起提供。

本发明还提供包装组合物，其包含治疗有效量的蛋白降解抑制剂和医药学上可接受的载剂或稀释剂。所述包装组合物可经调配以治疗罹患或容易罹患蛋白降解病症的个体且所述包装组合物与治疗罹患或容易罹患蛋白降解病症的个体的说明书一起包装。

本发明还提供用于筛选蛋白降解抑制剂的试剂盒。所述试剂盒可包括对照组合物，例如突巴新和尼尔突巴新以供参考。所述试剂盒还可包括例如测试化合物的试剂、缓冲剂、培养基（例如细胞生长培养基）、细胞等等。测试化合物可包括已知化合物或新发现的化合物，例如化合物的组合库。

还提供用于评定蛋白降解病症治疗功效的试剂盒。所述试剂盒可包括用于测定一种或一种以上本文所述的表型的试剂（例如用于测定微管蛋白的乙酰化状态的试剂）、使用说明书和收集个体样品的用具。

一种或一种以上本发明的试剂盒可包装在一起，例如用于评定蛋白降解治疗功效的试剂盒可与用于治疗蛋白降解病症的试剂盒一起包装。

### 实例

#### 实验程序

**骨髓基质细胞（BMSC）培养物。**

BM 样本由患有 MM 的患者获得。通过 Ficoll-Hipaque 密度沉积分离的单核细胞（MNC）用于确立长期 BM 培养物。当已产生粘附细胞单层时，将细胞采集在含有 0.25% 胰蛋白酶和 0.02% EDTA 的汉克氏缓冲盐水溶液（Hank's Buffered Saline Solution）中，洗涤且通过离心收集。

**细胞系、患者 BM 浆细胞和 BM 基质细胞（SC）。**

Dex-敏感性人类 MM 细胞系（MM.1S）和 Dex-抵抗性人类 MM 细胞系（MM.1R）由 Dr. Steven Rosen（Northwestern University, Chicago, IL）友善提供。RPMI8226 和 U266 人类 MM 细胞系由美国典型微生物菌种保藏中心（American Type Culture Collection）

(Rockville, MD) 获得。IL-6 依赖性 INA-6 细胞系由 Dr M Gramatzki (Erlangen, Germany) 友善提供。美法仑抵抗性 RPMI-LR5 和阿霉素抵抗性 RPMI-Dox40 细胞系由 Dr William Dalton (Lee Moffitt Cancer Center, Tampa, FL) 提供。将所有 MM 细胞系在含有 10% 胎牛血清 (FBS, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)、 $2\mu\text{M}$  L-谷氨酰胺、100 U/ml 青霉素和 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  链霉素 (GIBCO, Grand Island, NY) 的 RPMI-1640 中培养。INA-6 细胞在添加 IL-6 (1 ng/mL) 的情况下维持。如先前描述 (31), MM 患者浆细胞是通过使用抗体调配物 (cocktail) (RosetteSep Separation System, StemCell Technologies, Vancouver, Canada) 阴性选择而由骨髓 (BM) 吸出物纯化。如使用抗-CD138 Ab (BD Pharmingen, San Diego, CA) 的流式细胞分析证实, MM 细胞的纯度 >90%。如先前所述 (28、43), 由 Ficoll-Hipaque 密度沉积由 BM 吸出物分离的单核细胞 (MNC) 也用以确立长期 BM 基质细胞 (BMSC)。使用患者样品的所有实验都根据伦理审查委员会 (Institutional Review Board) 所核准的规程来执行。

#### 抑制剂。

肽硼酸蛋白酶体抑制剂硼替佐米由 Millennium Pharmaceuticals (Cambridge, MA) 提供。HDAC6 特异性抑制剂突巴新及其非活性衍生物尼尔突巴新自 Broad Institute of Harvard University (18) 和 Massachusetts Institute of Technology 获得。两种抑制剂均溶解于 DMSO 中且在  $-20^{\circ}\text{C}$  下储存直至使用。

#### DNA 合成。

增殖通过  $^3\text{H}$ -胸苷吸收测量。简短来说, 将 MM 细胞 ( $3\times 10^4$  细胞/孔) 在 96 孔培养板中在培养基、万珂和/或突巴新存在下在  $37^{\circ}\text{C}$  下培育 48 h。DNA 合成通过 [ $^3\text{H}$ ]-胸苷 ([ $^3\text{H}$ ]-TdR, Perkin Elmer, Boston, MA) 吸收测量。在 48 h 培养的最后 8 h 期间, 将细胞用 [ $^3\text{H}$ ]TdR (0.5 uCi/孔) 施加脉冲。所有实验均重复三次执行。

#### 生长抑制作用分析。

如先前所述 (33), 硼替佐米和/或突巴新对 MM 细胞生长的抑制效应通过测量溴化 3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯四唑鎓 (MTT) 染料吸光率来评定。将经 48 h 培养的细胞在 48 h 培养的最后 4 h 用 10  $\mu\text{l}$  5 mg/ml MTT 对各孔施加脉冲, 然后含有 0.04 N HCl 的 100  $\mu\text{l}$  异丙醇施加脉冲。吸光率是在 570 nm 下使用分光光度计 (Molecular Devices Corp., Sunnyvale CA) 测量。所有实验均重复四次执行。

#### 西方印迹。

将 MM 细胞用万珂和/或突巴新培养; 采集; 洗涤; 且使用以下溶解缓冲液溶解: 50 mM Tris-HCl (pH 7.4)、150 mM NaCl、1% NP-40、5 mM EDTA、5 mM NaF、2 mM

Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>、1 mM PMSF、5 μg/ml 留培丁 (leupeptine) 和 5 μg/ml 抑肽酶。使细胞溶胞物经受 SDS-PAGE, 将其转移至 PVDF 膜 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) 中且用抗特异性蛋白质的 Abs 免疫印迹。

#### 流式细胞分析。

对于细胞周期分析来说, 将在万珂 (5 μM) 和/或突巴新 (5 μM) 中培养 24 h 的 MM 细胞采集, 用磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 洗涤, 用 70%乙醇固定且用 10 μg/ml RNase (Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, IN) 处理。随后将细胞用碘化丙啶 (PI, Sigma) (5 μg/ml) 着色且使用程序 M 软件在 Epics 流式细胞仪 (Coulter Immunology, Hialeah, FL) 上测定细胞周期概况 (44)。

#### 万珂和突巴新对 BM 中副分泌 MM 细胞生长的效应。

为了评价粘附于 BMSC 上的 MM 细胞中的生长刺激和信号传输, 在万珂和/或突巴新存在下将 3×10<sup>4</sup> 个 MM.1S 细胞在 BMSC 涂布的 96 孔板上培养 48 h。DNA 合成如上所述来测量。

#### 免疫印迹。

将用突巴新和/或硼替佐米培养的细胞采集; 洗涤; 且使用以下溶解缓冲液溶解: 50 mM Tris-HCl (pH 7.4)、150 mM NaCl、1% NP-40、5 mM EDTA、5 mM NaF、2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>、1 mM PMSF、5 μg/ml 留培丁和 5 μg/ml 抑肽酶。使全细胞溶胞物经受 SDS-PAGE, 将其转移至硝化纤维素膜 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) 中且用特异性 Abs 免疫印迹 (31)。西方印迹使用抗-HDAC6、乙酰化赖氨酸、乙酰化组蛋白 H3、乙酰化组蛋白 H4、泛素 (Ub)、磷酸基-SAPK (JNK)、卡斯蛋白酶-8、卡斯蛋白酶-9、卡斯蛋白酶-3 和 PARP Abs (Cell Signaling, Beverly, MA); 抗-α-微管蛋白 Ab (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA); 以及抗-动力蛋白 Ab (Sigma, Saint Louis, MO) 进行。对于免疫沉淀, 像我们的先前研究 (31) 一样, 在 4°C 下将全细胞溶胞物用抗-Ub 或动力蛋白 Abs 培育隔夜, 且随后在 4°C 下用蛋白质 A/G PLUS-琼脂糖 (Santa Cruz Biotechnology) 培育 2 h。随后使免疫沉淀物经受用于检测 HDAC6 和动力蛋白的西方印迹。

#### 瞬时转染 HDAC6 siRNA。

使用 “Cell Line Nucleofecto™ Kit V” 根据制造商 (Amaxa Biosystems, Gaithersburg, MD) 的说明书将 MM.1S 细胞用 HDAC6 siRNA (Dharmacon Inc., Lafayette, CO) 瞬时转染 (33)。转染后, 在存在或不存在硼替佐米的情况下使 MM.1S 细胞经受西方印迹和 MTT 分析。

#### 粘附于 BMSC 的 MM 细胞的生长。

为了评价组合的突巴新与硼替佐米治疗对粘附于 BMSC 上的 MM 细胞的生长的效应，在存在或不存突巴新和/或硼替佐米的情况下，将 MM.1S 和 RPMI8226 细胞在涂布 BMSC 的 96 孔板上培养 24 h。如先前所述 (44)，处理之后，DNA 合成通过 [<sup>3</sup>H]-胸苷 (Perkin Elmer, Boston MA) 吸收测量。所有实验均重复四次执行。

#### 统计分析。

经药物治疗的培养物对比对照培养物中观察到的差异的统计显著性使用 Wilcoxon 符号秩检验 (Wilcoxon signed-ranks test) 确定。最小显著性水平为  $p < 0.05$ 。如先前所述 (45)，突巴新与硼替佐米之间的相互作用通过等效效应图 (isobologram) 分析使用 CalcuSyn 软件程序 (Biosoft, Ferguson, MO) 来分析以确定所述组合为相加效应还是协同效应。

#### 实例 1

##### 突巴新特异性诱导 MM 细胞系中 $\alpha$ -微管蛋白的乙酰化。

HDAC6 的基线表达是在若干 MM 细胞系中检验。尽管 MM.1S、U266、INA-6、RPMI8226 和 RPMI-LR5 MM 细胞系构成性表达 HDAC6，但是在 RPMI-Dox-40 细胞中仅显现低含量的 HDAC6 (图 1A)。因为突巴新通过特异性抑制 HDAC6 活性诱导 A549 人类肺癌细胞系中  $\alpha$ -微管蛋白的乙酰化 (40)，所以检验突巴新对于 MM.1S 和 RPMI8226 MM 细胞中的  $\alpha$ -微管蛋白乙酰化的效应。如图 1B 所示，突巴新以剂量依赖方式显著诱导 MM.1S 与 RPMI8226 细胞中的  $\alpha$ -微管蛋白的乙酰化，而不改变蛋白质表达；重要的是，通过西方印迹没有辨别出其他乙酰化蛋白。类似结果在 INA-6 和 RPMI-Dox40 细胞中观察到 (数据未展示)。评定突巴新的剂量依赖性效应且展示突巴新 (5  $\mu$ M) 在 12 h 下诱导 RPMI8226 细胞中  $\alpha$ -微管蛋白的峰值乙酰化 (图 1C)。重要的是，HDAC6 的表达经突巴新治疗没有改变 (数据未展示)。

组蛋白乙酰化已与恶性肿瘤的发展有关 (46、47)；相反地，组蛋白脱乙酰基酶的抑制剂代表有前途的新治疗策略 (48)。已经表明第二代杂种极性化合物 SAHA (49) 与新颖异羟肟酸衍生物 NVP-LAQ824 (50) 介导抗-MM 活性。因为这些药剂非选择性地抑制 HDAC，所以 SAHA 对 MM.1S 和 RPMI8226 细胞中的赖氨酸的乙酰化的效应也得以检验。与特异性诱导  $\alpha$ -微管蛋白乙酰化的突巴新 (图 1B、1C) 形成对比，SAHA 触发比  $\alpha$ -微管蛋白乙酰化更有效的组蛋白 H3 和 H4 上的赖氨酸乙酰化 (图 1D)。这些结果表明 HDAC6 在 MM 细胞系中得以构成性表达且突巴新特异性诱导  $\alpha$ -微管蛋白的乙酰化，证实突巴新对 MM 细胞中 HDAC6 活性的特异性抑制效应。

#### 实例 2

突巴新抑制 MM 细胞生长。

基于突巴新对 HDAC6 的特异性抑制效应，随后检验突巴新对于药物敏感性 MM 细胞系（MM.1S、U266、INA-6 和 RPMI8226）和药物抵抗性 MM 细胞系（RPMI-LR5 和 RPMI-Dox40）的细胞毒性。将这些细胞用突巴新（1.25-20  $\mu\text{M}$ ）处理 48 h（图 2A）和 72 h（图 2B），且如所述通过 MTT 分析评定细胞毒性。突巴新显著抑制药物敏感性 MM 细胞生长与药物抵抗性 MM 细胞生长，在 72 h 下  $\text{IC}_{50}$  为 5-20  $\mu\text{M}$ 。最具敏感性的细胞系和最具抵抗性的细胞系分别为 RPMI8226 细胞和 MM.1R 细胞（图 2B）。重要的是，突巴新不诱导 PBMC 中的任何细胞毒性（图 2C）。这些结果提出突巴新敏感性与对常规化学治疗剂（地塞米松、美法仑和阿霉素）的抵抗性无关，且提出在肿瘤细胞中相对在正常细胞中的有利治疗指数。展示 HDAC 抑制剂 SAHA 和 NVP-LAQ824 经由卡斯蛋白酶依赖性细胞凋亡触发 MM 细胞死亡，研究突巴新诱导的细胞毒性是否也经由细胞凋亡介导。在用突巴新（10  $\mu\text{M}$ ）处理 0-24 h 的 MM.1S 和 RPMI8226 细胞中，诱导了时间依赖性卡斯蛋白酶-8/PARP 的裂解（图 2D），证实我们的 MTT 结果。这些数据强有力提出 MM 细胞中突巴新诱导的细胞毒性经由卡斯蛋白酶-依赖性细胞凋亡介导。

### 实例 3

突巴新抑制 HDAC6 与动力蛋白的相互作用；当与硼替佐米组合时，其诱导泛素化蛋白的累积。

为了克服 MM 中的硼替佐米抵抗性，迫切需要新颖治疗剂选择。基于我们展示硼替佐米抑制 DNA 修复的临床前研究（29、31），已展示硼替佐米的组合治疗对 DNA 杀伤剂（即美法仑和阿霉素）敏感且克服了对它的抵抗性（29），还展示 hsp-27 表达与硼替佐米抵抗性有关（30、51）；相反地，p38MAPK 抑制剂可下调硼替佐米抵抗性 MM 细胞系和患者细胞中的 hsp-27 且克服硼替佐米抵抗性。近来研究表明聚泛素化蛋白质经由蛋白酶体与聚集体途径降解（图 3A）。

HDAC6 构成性结合聚泛素化错误折叠蛋白质与动力蛋白，从而募集错误折叠蛋白质负荷至动力蛋白运动原以沿微管转运至聚集体（39）。检验由突巴新产生的 HDAC6 活性抑制作用是否改变 HDAC6 与 Ub 和/或动力蛋白的相互作用。HDAC6 与 MM.1S 细胞中的聚泛素化蛋白质（图 3B）和动力蛋白（图 3C）一致地共同免疫沉淀。在用突巴新（2.5  $\mu\text{M}$  和 5  $\mu\text{M}$ ）处理 8 h 后，HDAC6 与动力蛋白的共同免疫沉淀以剂量依赖性方式得到明显抑制，而 HDAC6 与泛素化蛋白质之间的共同免疫沉淀未受影响（图 3B）。随后检验突巴新对蛋白质的聚泛素化的影响。正如所料，聚泛素化蛋白质在突巴新处理的 RPMI8226 细胞中显著积聚；然而，认识到在处理的 MM.1S 细胞中没有显著变化（图

3D), 暗示聚泛素化蛋白质的补偿性的蛋白酶体降解。这些结果也指示聚泛素化蛋白质在 RPMI8226 细胞中的降解更取决于聚集体而不是蛋白酶体, 这与表明 RPMI8228 细胞对突巴新比 MM.1S 细胞对突巴新更敏感的 MTT 数据一致 (图 2A、2B)。重要的是, 与仅用突巴新或硼替佐米任一药剂相比, 组合的突巴新 (5  $\mu\text{M}$ ) 与硼替佐米 (5 nM) 显著增加聚泛素化蛋白质在 MM.1S 细胞与 RPMI8226 细胞中的累积 (图 3E)。这些结果进一步指示聚泛素化蛋白质的降解发生在蛋白酶体与聚集体中, 因此, 抑制两种途径会诱导聚泛素化蛋白质在 MM 细胞中的显著累积。

#### 实例 4

突巴新与硼替佐米的协同抗-MM 活性经由 JNK-卡斯蛋白酶活化介导。

在用突巴新与硼替佐米组合处理之后已展示聚泛素化蛋白质的显著累积, 检验组合处理是否也可诱导 MM 细胞中的显著细胞毒性。正如所料, 突巴新协同增加 MM.1S 细胞与 RPMI8226 细胞中硼替佐米诱导的细胞毒性。例如, 5 nM 和 10 nM 硼替佐米分别触发 26%和 66% RPMI8226 细胞死亡, 在与 5  $\mu\text{M}$  突巴新组合时, RPMI8226 细胞死亡分别增加到 87%和 91% (图 4A)。为了分析这种组合处理介导协同抗-MM 毒性的机制, 随后在 MM.1S 细胞中执行细胞周期概况。如在我们先前研究 (4) 中, 突巴新 (5  $\mu\text{M}$ ) 单独不改变细胞周期轮廓, 而硼替佐米 (5 nM) 单独触发 G2M 相 MM.1S 细胞增加 (14.2% 至 39.5%); 重要的是, 突巴新与硼替佐米的组合触发亚 G0/G1 相细胞的显著增加 (5.6% 至 30.4%), 暗示组合处理触发细胞凋亡细胞死亡 (图 4B)。进一步检验 p21<sup>Cip1</sup> 的表达。与细胞周期概况一致, 突巴新不触发 p21<sup>Cip1</sup> 的诱导。重要的是, 突巴新抑制由硼替佐米诱导的 p21<sup>Cip1</sup> 的诱导 (图 4C)。

如我们先前的研究所述 (9、22), 因为聚泛素化蛋白质的累积会诱导细胞应激反应, 所以随后检验 MM.1S 细胞的这种组合处理是否会触发细胞应激反应的标志 JNK (也称为应激活化的蛋白激酶) 的活化, 然后卡斯蛋白酶裂解。突巴新单独不触发 JNK 的磷酸化或卡斯蛋白酶/PARP 裂解, 并且硼替佐米单独仅诱导 JNK 的适度磷酸化以及卡斯蛋白酶-9、-8、-3 和 PARP 裂解 (图 4C)。受到极大关注的是, 组合的突巴新与硼替佐米的处理明显增加 MM.1S 细胞中的 JNK 磷酸化与卡斯蛋白酶/PARP 裂解 (图 4C), 这与细胞毒性分析 (图 4A) 一致。其他细胞应激反应相关蛋白质 (即, hsp-70 和 Grp78) 也由这种组合处理诱导 (数据未展示)。这些结果指示突巴新抑制由硼替佐米诱导的 G2 相停滞, 从而促进经由应激诱导的 JNK 活化、然后卡斯蛋白酶/PARP 裂解所介导的细胞凋亡。

如先前所述, 为了识别 HDAC6 与硼替佐米一起抑制介导协同 MM 细胞的细胞毒性的特殊作用, 将 MM.1S 细胞用 HDAC6 siRNA 瞬时转染。HDAC6 蛋白表达通过转染而

显著下调 (图 4D); 重要的是, 硼替佐米以剂量依赖方式显著增加转染子中的细胞毒性 (图 4E)。与尼尔突巴新相反, 非活性羧酸突巴新类似物不影响 $\alpha$ -微管蛋白的乙酰化 (图 4F) 或增加由硼替佐米诱导的 MM.1S 细胞中细胞毒性的增加 (图 4G)。类似结果在 RPMI8226 细胞中观察到 (数据未展示)。这些结果展示 HDAC6 的抑制作用特异性增加 MM 中硼替佐米诱导的细胞毒性。

#### 实例 5

与硼替佐米组合的突巴新表明在 MM 患者浆细胞中有显著细胞毒性。

在 MM 细胞系中突巴新与硼替佐米的组合处理已展示显著的细胞毒性, 进一步检验所述组合在从 BM 分离的 CD138-阳性 MM 患者浆细胞(BMPC)中的效应。将这些 BMPC 在有或没有突巴新 (5  $\mu$ M) 的情况下在存在硼替佐米 (5 nM 和 10 nM) 或不存在硼替佐米的情况下培养 24 h。与 MM 细胞系数据一致, 由硼替佐米诱导的 BMPC 中的细胞毒性因突巴新明显增加 (图 5A、5B 和 5C); 重要的是, 认识到在类似处理的正常 PBMC 中没有毒性 (图 5D)。

我们随后检验与硼替佐米组合的突巴新为何特异性诱导 MM 患者浆细胞中而不是 PBMC 中的细胞毒性的机制。将由同一 MM 患者获得的 PBMC 与 BMPC 用突巴新 (5  $\mu$ M) 处理 12 h。HDAC6 的构成性表达在 BMPC 中比在 PBMC 中相对更高; 重要的是,  $\alpha$ -微管蛋白的乙酰化在 BMPC 中而不是在 PBMC 中因突巴新明显增加 (图 5E)。进行中的研究进一步描述这种观察的分子机制。

#### 实例 6

与硼替佐米组合的突巴新抑制副分泌 MM 细胞生长。

我们先前已展示 BM 微环境带来 MM 细胞中的细胞生长和耐药性 (3、30、31), 且随后研究在存在或不存在硼替佐米的情况下 HDAC6 抑制作用在 BM 环境内的 MM 细胞中的功能结果。将 MM.1S 和 RPMI8226 细胞在有或没有 BMSC 的情况下在存在突巴新 (2.5  $\mu$ M 和 5  $\mu$ M) 和/或硼替佐米 (2.5-10 nM) 或不存在突巴新和/或硼替佐米的情况下培养。粘附至 BMSC 的 MM 细胞触发 MM.1S 细胞的 [ $^3$ H]-胸苷吸收量增加 (1.75,  $p < 0.01$ ) (图 6A) 与 RPMI8226 细胞的 [ $^3$ H]-胸苷吸收量的增加 (2.0 倍,  $p < 0.01$ ) (图 6B)。突巴新或硼替佐米单独以剂量依赖方式抑制 BMSC-诱导的 [ $^3$ H]-胸苷吸收量 ( $p < 0.01$ )。重要的是, 突巴新显著增加粘附 MM.1S 细胞 (图 6A) 和 RPMI8226 细胞 (图 6B) 中硼替佐米诱导的 [ $^3$ H]-胸苷吸收的抑制作用。由 MTT 分析评定的 BMSC 活力没有因组合处理而改变 (数据未展示)。这些数据指示突巴新与硼替佐米的组合处理触发 BM 环境中对于 MM 细胞的协同选择性抗肿瘤活性, 从而克服细胞粘附介导的对常规疗法的抵抗性。总

之，这些结果有力地提出用突巴新和硼替佐米双重抑制聚集体和蛋白酶体分别协同增加 MM 细胞毒性。其提供临床试验的框架用来增加对硼替佐米的敏感性且克服对硼替佐米的抵抗性，从而改善 MM 中患者的结果。

突巴新选择性抑制 HDAC6 的羧基端结构域，引起微管蛋白高度乙酰化。值得注意的是，先前报导突巴新对 A549 肺癌细胞的组蛋白乙酰化、翻译概况、细胞周期或活力没有影响。

突巴新在对微管蛋白乙酰化发挥作用所需的浓度下对骨髓瘤细胞系具细胞毒性（图 1a、b）。在突巴新与有效的蛋白酶体抑制剂硼替佐米（万珂）之间观察到协同作用（图 1c）。明显地，组合中的这些分子对周边血液单核细胞的活力没有影响（图 1d）。这些数据指出抑制蛋白质代谢的似乎合理的细胞毒性结果，保证进一步的研究。在 RPMI-8226 细胞系中获得的初步资料表明细胞泛素化蛋白质随突巴新而增加（图 2a）。在大鼠星形细胞和纹状体神经元中使用在可比较浓度下的突巴新的先前实验已得到暗示罗氏小体形成的细节（图 2b）。这些资料支持 HDAC6 介导的聚集体形成是由羧基端脱乙酰基酶结构域介导的假设且归因于突巴新细胞毒性的机制。

本发明的筛选方法包括在 384 孔板形式中用偏向 HDAC 抑制作用的小分子库处理的癌细胞的定量、高产量、基于影像的筛选。使用微管蛋白和组蛋白乙酰化状态特异性抗体且所述抗体由相应荧光二次抗体辨别。将孔以不偏斜方式在自动 Axon 5000A 落射荧光显微镜上刻痕，检验产生有效、选择性微管蛋白乙酰化的能力。使用曲古菌素、突巴新和 DMSO 的对照物以供参考。随后根据对于在 RPMI-8226 骨髓瘤细胞系中的直接细胞毒性和与硼替佐米的协同作用的评定优先考虑分子。

突巴新为靶向 HDAC6 的第一结构域选择性 HDAC 抑制剂。在低微摩尔浓度下，突巴新引起微管蛋白高度乙酰化和对于每一骨髓瘤细胞系显著的抗增殖、促凋亡效应。另外，突巴新有效地使骨髓瘤细胞对硼替佐米的亚毒性浓度敏感。在有或没有硼替佐米的情况下，均未见到突巴新对周边血液单核细胞的不利影响。明显地，在骨髓基质和介白素-6 存在下，突巴新的稳固细胞毒性效应得以在所有细胞系中维持。

## 实例 7

聚集体对恶性浆细胞的蛋白质代谢的作用的表征。

聚集体的生物化学纯化。将所述聚集体在多发性骨髓瘤的典型人类细胞模型的面板中生物化学式分离。中心粒周微管组织复合物（MTOC）中的蛋白酶体亚单位的存在是如下文所论述来测定。HDAC6 在这些细胞系中的每一者中的表达已由免疫印迹证实。中心体的制备将如所描述执行<sup>20</sup>。简短来说，将细胞采集且用细胞松弛素 D (cytochalasm

D) 和诺考达唑 (nocodazole) 处理以使细胞骨架和微管解聚。将细胞溶解且使细胞核粒化之后, 中心体通过蔗糖梯度纯化且评定 20S 蛋白酶体含量。还测定蛋白酶体抑制作用和蛋白质折叠应激对纯化的聚集体的蛋白酶体含量的效应。

聚集体的荧光微观检测: 在聚集体形成的情况下, 中间纤维重新组装随波形蛋白 (vimentin) 帽在中心体中的形成而发生。聚集体形成通过荧光显微术使用抗 HDAC6、hsp70 和波形蛋白的抗体来评定。如先前所报导, 如果聚集体形成增加, 那么确定用蛋白酶体抑制剂处理的骨髓瘤细胞系和引起错误折叠蛋白应激的分子进行检验。

在患者源骨髓瘤细胞中的聚集体形成: 活体内测定聚集体对骨髓瘤细胞中的蛋白质代谢的作用, 评定患者源骨髓瘤细胞中蛋白酶体和 HDAC6 抑制作用对聚集体形成的效应。使用免疫荧光方法, 如上表征聚集体的结构和组成。使用荧光显微术通过免疫球蛋白检验单型细胞聚集层。使用周边血液单核细胞作为对照物, 进行硼替佐米敏感性和抵抗性患者源细胞的研究。这种分析可确立聚集体为癌细胞存活的蛋白水解标志和对蛋白酶体抑制作用的临床抵抗性的决定因素。

#### 实例 8

##### 确定 HDAC6 介导聚集体形成的机制。

HDAC6 的结构-功能分析: 与聚集体形成相关的酶结构域的特征通过遗传学方法与化学遗传学方法使用聚集体形成的典型泛素化蛋白质模型(DF508 CFTR)<sup>3</sup> 进行。一种方法是敲除野生型 HDAC6 并用在氨基端和羧基端脱乙酰基酶结构域中突变的 HDAC6 蛋白转染细胞<sup>9</sup>。另一方法是敲除具有小、干扰性 RNA 的 HDAC6, 优选使用分别转染的各酶结构域的选择性突变体。

HDAC6 的化学遗传分析: 在 DF508 CFTR 过度表达的细胞中, 突巴新对泛素化蛋白应激和聚集体形成的效应用适当曲古菌素和特拉卜辛 (trapoxin) 对照物进行评定。曲古菌素为两种 HDAC6 结构域的有效抑制剂, 而特拉卜辛为有效的 HDAC 抑制剂, 其并不唯一地抑制 HDAC6。

HDAC6 的蛋白质标靶的蛋白质组分析: 测定 HDAC6 的非组蛋白标靶。使用以化学遗传学和质谱分析为基础的两种方法。将粘附细胞用突巴新处理 24 小时且在不干扰细胞核或微管的培养皿上溶解, 富集胞浆蛋白标靶。使用利用乙酰化-赖氨酸兔多克隆抗体的基于抗体的纯化检测方案, 已知所述抗体结合具有经修饰的赖氨酸残基的许多细胞蛋白质。选择性乙酰化的标靶通过质谱分析测定。如上制备来自经突巴新处理的细胞的胞浆溶胞物且使其与琥珀酰亚胺、共价修饰的非乙酰化赖氨酸残基反应。将所述溶胞物用纯化的 HDAC6-H216A 处理, 其仅具有一个官能羧基端脱乙酰基酶结构域。随后将最新

脱乙酰化的赖氨酸用琥珀酰亚胺基-生物素共价修饰用于抗体蛋白链菌素纯化和质谱检测。

### 实例 9

能够研究多发性骨髓瘤小鼠模型中的蛋白质代谢和聚集体形成的 **HDAC6** 的有效选择性抑制剂的识别。

将来源于定向多样性合成途径的分子用于硅片上的 (*in silico*) 结构-活性关系模型以确定选择性、效能和细胞毒性的模决定因素。

### 参考文献

1. Adams J. The proteasome: a suitable antineoplastic target. *Nat Rev Cancer*. 2004;4:349-360.
2. Kopito RR. Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends Cell Biol*. 2000; 10: 524-530.
3. Johnston JA, Ward CL, Kopito RR. Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J Cell Biol*. 1998; 143: 1883-1898.
4. Junn E, Lee SS, Suhr UT, Mouradian MM. Parkin accumulation in aggresomes due to proteasome impairment. *J Biol Chem*. 2002; 277: 47870-47877.
5. Notterpek L, Ryan MC, Tobler AR, Shooter EM. PMP22 accumulation in aggresomes: implications for CMT1A pathology. *Neurobiol Dis*. 1999; 6: 450-460.
6. Anton LC, Schubert U, Bacik I, Princiotta MF, Wearsch PA, Gibbs J, Day PM, Realini C, Rechsteiner MC, Bennink JR, Yewdell JW. Intracellular localization of proteasomal degradation of a viral antigen. *J Cell Biol*. 1999; 146: 113-124.
7. Garcia-Mata R, Bebok Z, Sorscher EJ, Sztul ES. Characterization and dynamics of aggresome formation by a cytosolic GFP-chimera. *J Cell Biol*. 1999; 146: 1239-1254.
8. Dul JL, Davis DP, Williamson EK, Stevens FJ, Argon Y. Hsp70 and antifibrillogenic peptides promote degradation and inhibit intracellular aggregation of amyloidogenic light chains. *J Cell Biol*. 2001; 152: 705-716.
9. Kawaguchi Y, Kovacs JJ, McLaurin A, Vance JM, Ito A, Yao TP. The deacetylase HDAC6 regulates aggresome formation and cell viability in response to misfolded protein stress. *Cell*. 2003; 115: 727-738.
10. Hideshima T, Richardson P, Chauhan D, Palombella VJ, Elliott PJ, Adams J, Anderson KC. The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. *Cancer Res*. 2001; 61: 3071-3076.
11. Kopito RR, Sitia R. Aggresomes and Russell bodies. Symptoms of cellular

indigestion? *EMBO Rep.* 2000; 1: 225-231.

12. Manetto V, Abdul-Karim FW, Perry G, Tabaton M, Autilio-Gambetti L, Gambetti P. Selective presence of ubiquitin in intracellular inclusions. *Am J Pathol.* 1989; 134: 505-513.

13. Sullivan ML, Youker RT, Watkins SC, Brodsky JL. Localization of the BiP molecular chaperone with respect to endoplasmic reticulum foci containing the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in yeast. *J Histochem Cytochem.* 2003; 51: 545-548.

14. Mitsiades CS, Mitsiades NS, McMullan CJ, Poulaki V, Shringarpure R, Hideshima T, Akiyama M, Chauhan D, Munshi N, Gu X, Bailey C, Joseph M, Libermann TA, Richon VM, Marks PA, Anderson KC. Transcriptional signature of histone deacetylase inhibition in multiple myeloma: biological and clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004; 101: 540-545.

15. Rosato RR, Grant S. Histone deacetylase inhibitors in clinical development. *Expert Opin Investig Drugs.* 2004; 13: 21-38.

16. Taunton J, Hassig CA, Schreiber SL. A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p. *Science.* 1996; 272: 408-411.

17. Grozinger CM, Hassig CA, Schreiber SL. Three proteins define a class of human histone deacetylases related to yeast Hda1p. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 96: 4868-4873.

18. Haggarty SJ, Koeller KM, Wong JC, Grozinger CM, Schreiber SL. Domain-selective small-molecule inhibitor of histone deacetylase 6 (HDAC6)-mediated tubulin deacetylation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100: 4389-4394.

19. Sternson SM, Wong JC, Grozinger CM, Schreiber SL. Synthesis of 7200 small molecules based on a substructural analysis of the histone deacetylase inhibitors trichostatin and trapoxin. *Org Lett.* 2001; 3: 4239-4242.

20. Fabunmi RP, Wigley WC, Thomas PJ, DeMartino GN. Activity and regulation of the centrosome-associated proteasome. *J Biol Chem.* 2000; 275: 409-413.

21. Corcoran LJ, Mitchison TJ, Liu Q. A novel action of histone deacetylase inhibitors in a protein aggregates disease model. *Curr Biol.* 2004; 14: 488-492.

22. Serrador JM, Cabrero JR, Sancho D, Mittelbrunn M, Urzainqui A, Sanchez-Madrid F. HDAC6 deacetylase activity links the tubulin cytoskeleton with immune synapse organization. *Immunity.* 2004; 20: 417-428.

23. Gregory, W. M., Richards, M. A. & Malpas, J. S. (1992) *J Clin Oncol* **10**, 334-342.

24. Attal, M., Harousseau, J. L., Facon, T., Guilhot, F., Doyen, C, Fuzibet, J. G., Monconduit, M., Hulin, C, Caillot, D., Bouabdallah, R., Voillat, L., Sotto, J. J., Grosbois, B. & Bataille, R. (2003) *NEngl J Med* **349**, 2495-2502.

25. Hideshima, T. & Anderson, K. C. (2002) *Nat Rev Cancer* 2, 927-937.
26. Hideshima, T., Richardson, P., Chauhan, D., Palombella, V., Elliott, P., Adams, J. & Anderson, K. C. (2001) *Cancer Res.* 61, 3071-3076.
27. Mitsiades, N., Mitsiades, C. S., Poulaki, V., Chauhan, D., Gu, X., Bailey, C, Joseph, M., Libermann, T. A., Treon, S. P., Munshi, N. C, Richardson, P. G., Hideshima, T. & Anderson, K. C. (2002) *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 14374-14379.
28. Hideshima, T., Chauhan, D., Richardson, P., Mitsiades, C, Mitsiades, N., Hayashi, T., Munshi, N., Dang, L., Castro, A., Palombella, V., Adams, J. & Anderson, K. C. (2002) *J Biol Chem* 277, 16639-47.
29. Mitsiades, N., Mitsiades, C. S., Richardson, P. G., Poulaki, V., Tai, Y. T., Chauhan, D., Fanourakis, G., Gu, X., Bailey, C, Joseph, M., Libermann, T. A., Schlossman, R., Munshi, N. C, Hideshima, T. & Anderson, K. C. (2003) *Blood* 101, 2377-80.
30. Chauhan, D., Li, G., Shringarpure, R., Podar, K., Ohtake, Y., Hideshima, T. & Anderson, K. C. (2003) *Cancer Res* 63, 6174-6177.
31. Hideshima, T., Mitsiades, C, Akiyama, M., Hayashi, T., Chauhan, D., Richardson, P., Schlossman, R., Podar, K., Munshi, N. C, Mitsiades, N. & Anderson, K. C. (2003) *Blood* 101,1530-1534.
32. Hideshima, T., Chauhan, D., Hayashi, T., Akiyama, M., Mitsiades, N., Mitsiades, C, Podar, K., Munshi, N. C, Richardson, P. G. & Anderson, K. C. (2003) *Oncogene* 22, 8386-8393.
33. Hideshima, T., Podar, K., Chauhan, D., Ishitsuka, K., Mitsiades, C, Tai, Y.-Z., Hamasaki, M., Raje, N., Hideshima, H., Schreiner, G., Nguyen, A. N., Navas, T., Munshi, N. C, Richardson, P. G., Higgins, L. S. & Anderson, K. C. (2004) *Oncogene* 23, 8766-8776.
34. Hideshima, T., Chauhan, D., Schlossman, R. L., Richardson, P. R. & Anderson, K. C. (2001) *Oncogene* 20, 4519-4527.
35. Richardson, P. G., Barlogie, B., Berenson, J., Singhal, S., Jagannath, S., Irwin, D., Rajkumar, S. V., Srkalovic, G., Alsina, M., Alexanian, R., Siegel, D., Orlowski, R. Z., Kuter, D., Limentani, S. A., Lee, S., Hideshima, T., Esseltine, D. L., Kauffman, M., Adams, J., Schenkein, D. P. & Anderson, K. C. (2003) *N Engl J Med* 34S, 2609-2617.
36. Kopito, R. R. (2000) *Trends Cell Biol* 10, 524-530.
37. Bennett, E. J., Bence, N. F., Jayakumar, R. & Kopito, R. R. (2005) *Mol Cell* 17, 351-365.
38. Garcia-Mata, R., Gao, Y. S. & Sztul, E. (2002) *Traffic* 3, 388-396.
39. Kawaguchi, Y., Kovacs, J. J., McLaurin, A., Vance, J. M., Ito, A. & Yao, T. P. (2003) *Cell* 115, 727-738.

40. Haggarty, S. J., Koeller, K. M., Wong, J. C., Grozinger, C. M. & Schreiber, S. L. (2003) *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 4389-4394.
41. Haggarty, S. J., Koeller, K. M., Wong, J. C., Butcher, R. A. & Schreiber, S. L. (2003) *Chem Biol* **10**, 383-396.
42. Wong, J. C., Hong, R. & Schreiber, S. L. (2003) *J Am Chem Soc* **125**, 5586-5587.
43. Uchiyama, H., Barut, B. A., Mohrbacher, A. F., Chauhan, D. & Anderson, K. C. (1993) *Blood* **82**, 3712-20.
44. Hideshima, T., Chauhan, D., Hayashi, T., Podar, K., Akiyama, M., Mitsiades, C., Mitsiades, N., Gong, B., Bonham, L., de Vries, P., Munshi, N., Richardson, P. G., Singer, J. W. & Anderson, K. C. (2003) *Cancer Res* **63**, 8428-8436.
45. Raje, N., Kumar, S., Hideshima, T., Ishitsuka, K., Chauhan, D., Mitsiades, C, Podar, K., Le Gouill, S., Richardson, P., Munshi, N. C, Stirling, D. I., Antin, J. H. & Anderson, K. C. (2004) *Blood* 出版中.
46. Urnov, F. D., Yee, J., Sachs, L., Collingwood, T. N., Bauer, A., Beug, H., Shi, Y. B. & Wolffe, A. P. (2000) *Embo J* **19**, 4074-4090.
47. Cress, W. D. & Seto, E. (2000) *J Cell Physiol* **184**, 1-16.
48. Marks, P. A., Miller, T. & Richon, V. M. (2003) *Curr Opin Pharmacol* **3**,344-351.
49. Mitsiades, N., Mitsiades, C. S., Richardson, P. G., McMullan, C, Poulaki, V., Fanourakis, G., Schlossman, R., Chauhan, D., Munshi, N. C, Hideshima, T., Richon, V. M., Marks, P. A. & Anderson, K. C. (2003) *Blood* **101**, 4055-62.
50. Catley, L., Weisberg, E., Tai, Y. T., Atadja, P., Remiszewski, S., Hideshima, T., Mitsiades, N., Shringarpure, R., LeBlanc, R., Chauhan, D., Munshi, N., Schlossman, R., Richardson, P., Griffin, J. & Anderson, K. C. (2003) *Blood* **102**, 2615-2622.
51. Chauhan, D., Li, G., Hideshima, T., Podar, K., Mitsiades, C, Mitsiades, N., Catley, L., Tai, Y. T., Hayashi, T., Shringarpure, R., Burger, R., Munshi, N., Ohtake, Y., Saxena, S. & Anderson, K. C. (2003) *Blood* **102**, 3379-3386.
52. Hideshima, T., Richardson, P. & Anderson, K. C. (2003) *Immunol Rev* **194**, 164-76.
53. Mitsiades, C. S., Mitsiades, N. S., McMullan, C. J., Poulaki, V., Shringarpure, R., Akiyama, M., Hideshima, T., Chauhan, D., Joseph, M., Libermann, T. A., Garcia-Echeverria, C, Pearson, M. A., Hofmann, F., Anderson, K. C. & Kung, A. L. (2004) *Cancer Cell* **5**, 221-230.

本文列举的所有参考文献、专利和专利申请的内容均以引用的方式全文并入本文中。在此附上的附录 A（25 页）的内容以引用的方式全文并入本文中。

其他实施例在以下权利要求书内。

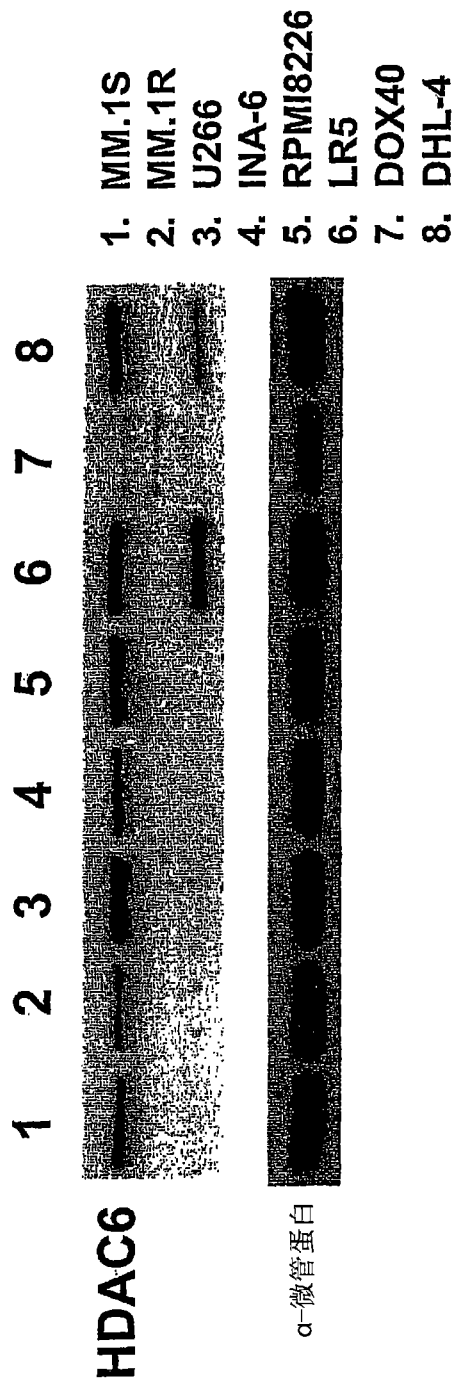


图1

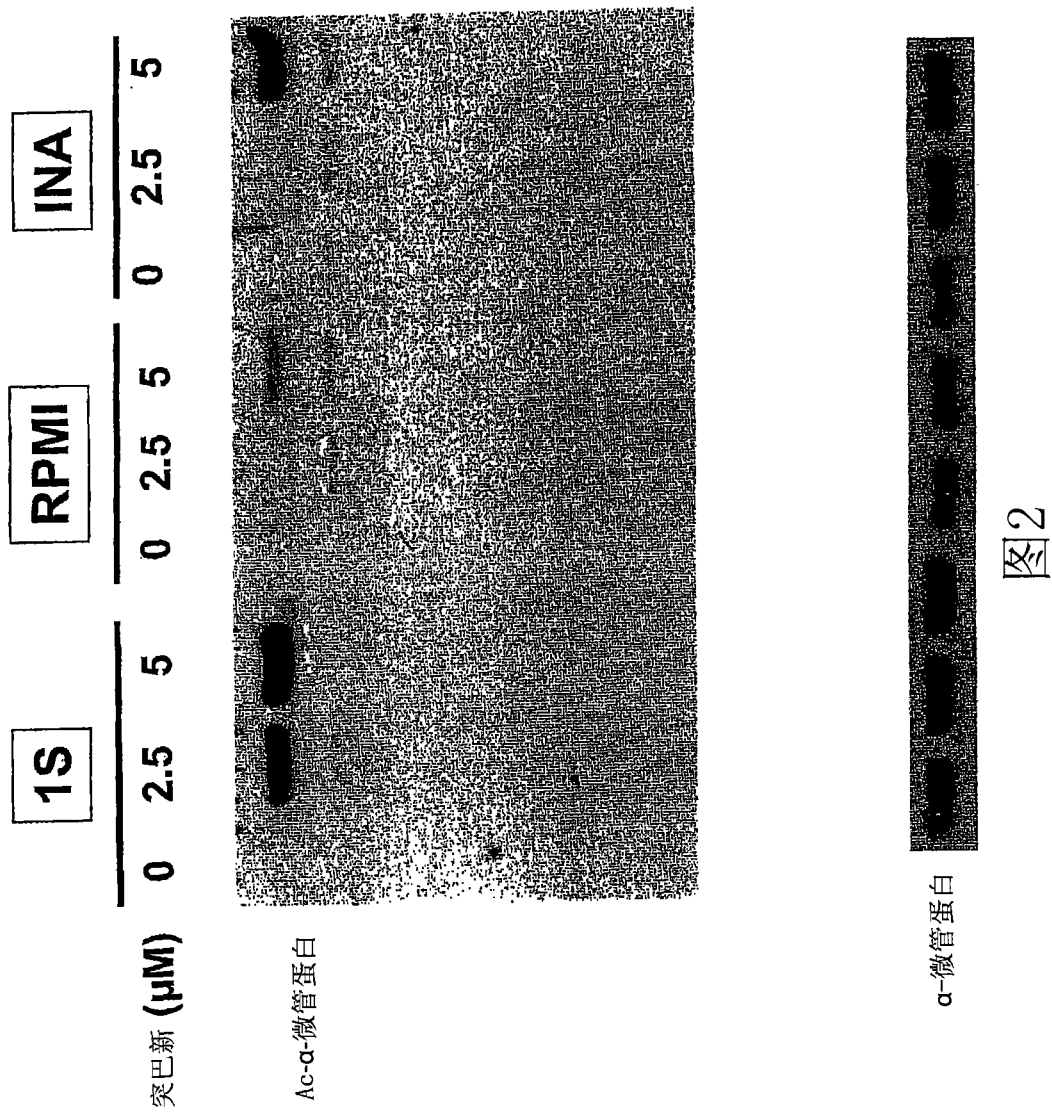
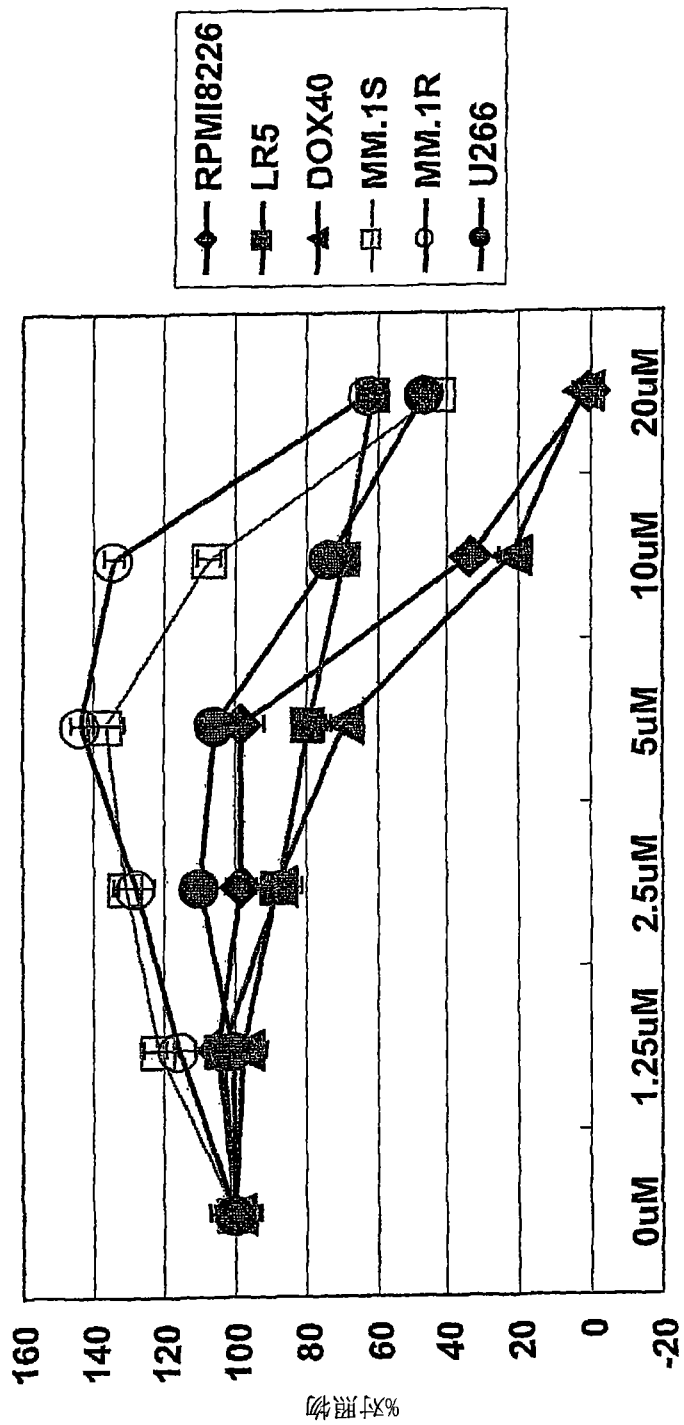


图2

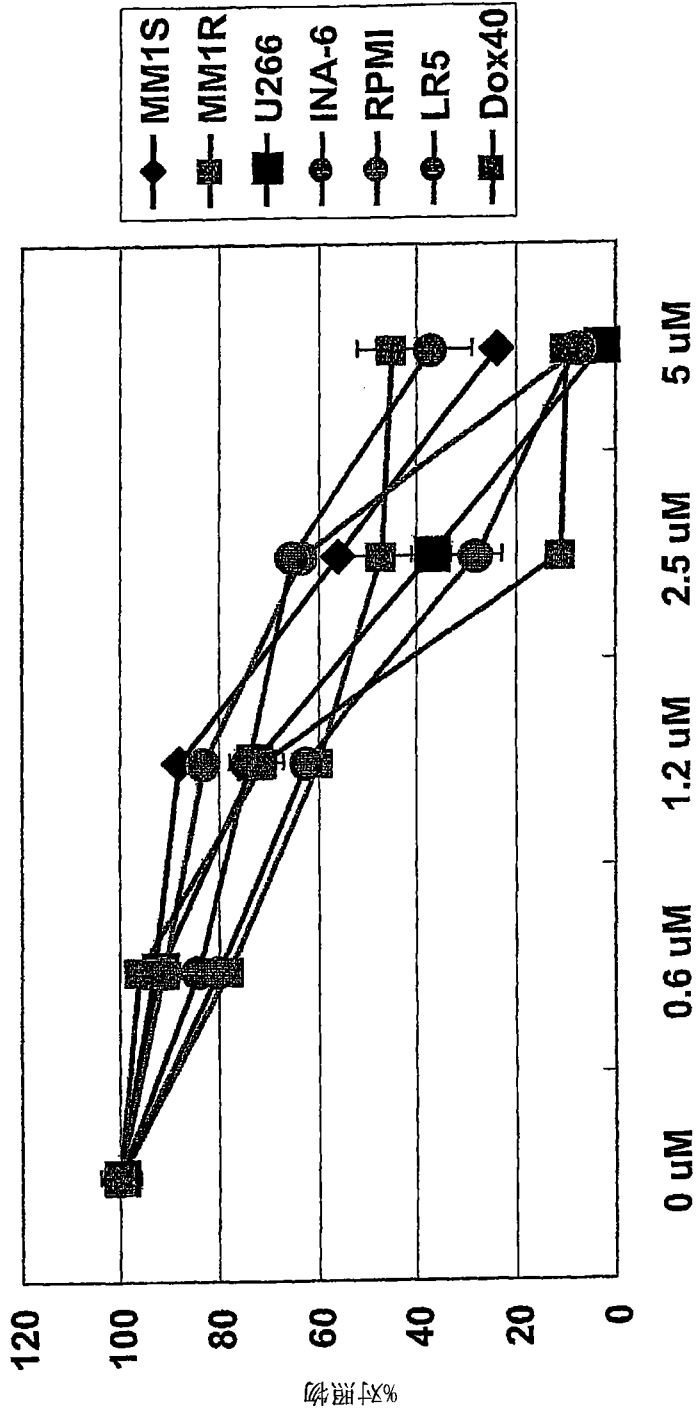
突巴新抑制MM细胞生长 (48 h MTT分析)



突巴新

图 3A

突巴新抑制MM细胞生长 (48 h <sup>3</sup>H-胸苷吸收)



突巴新

图3B

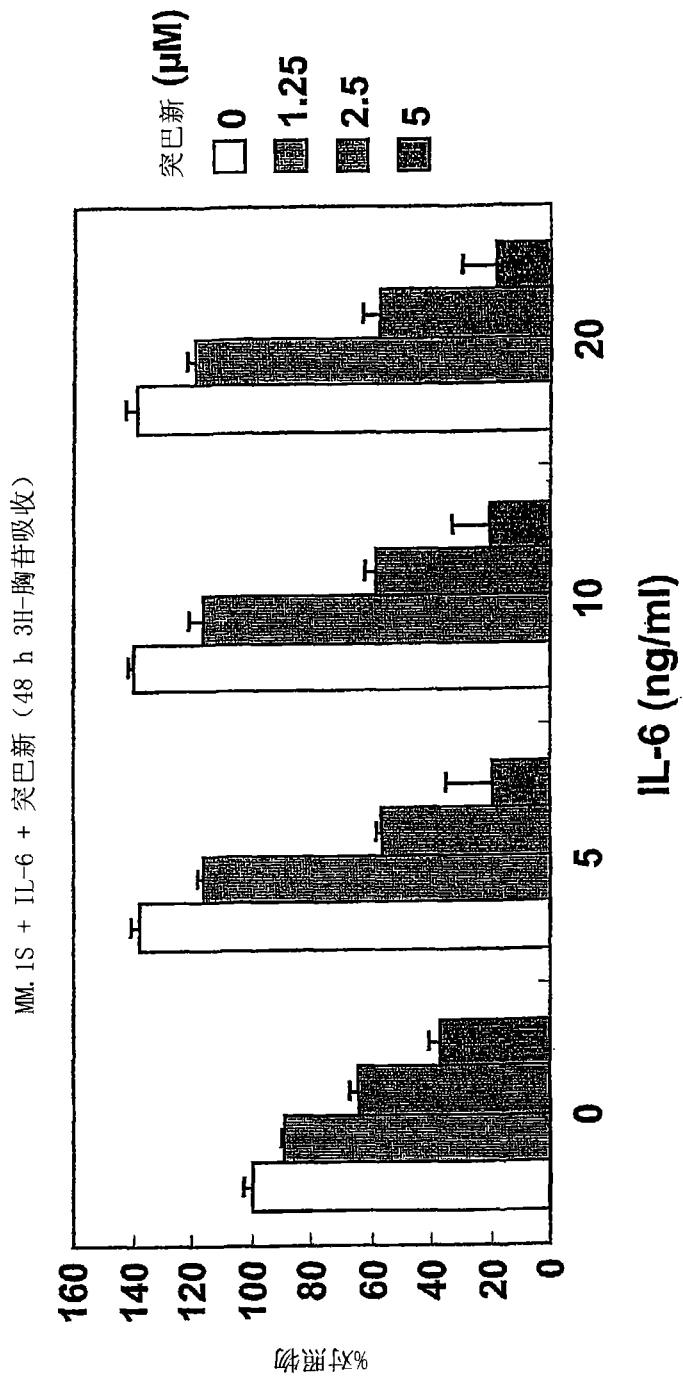


图4

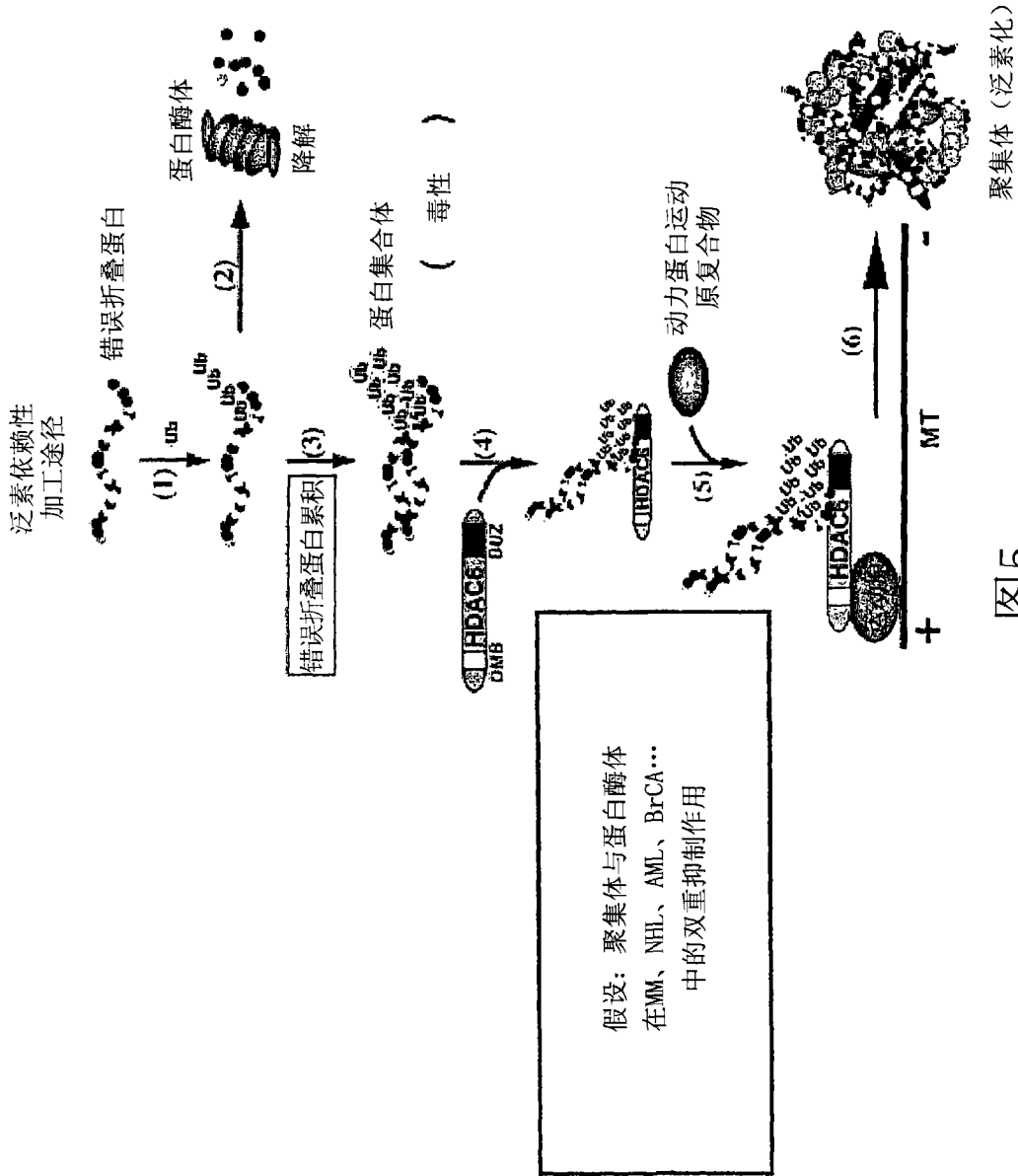


图5

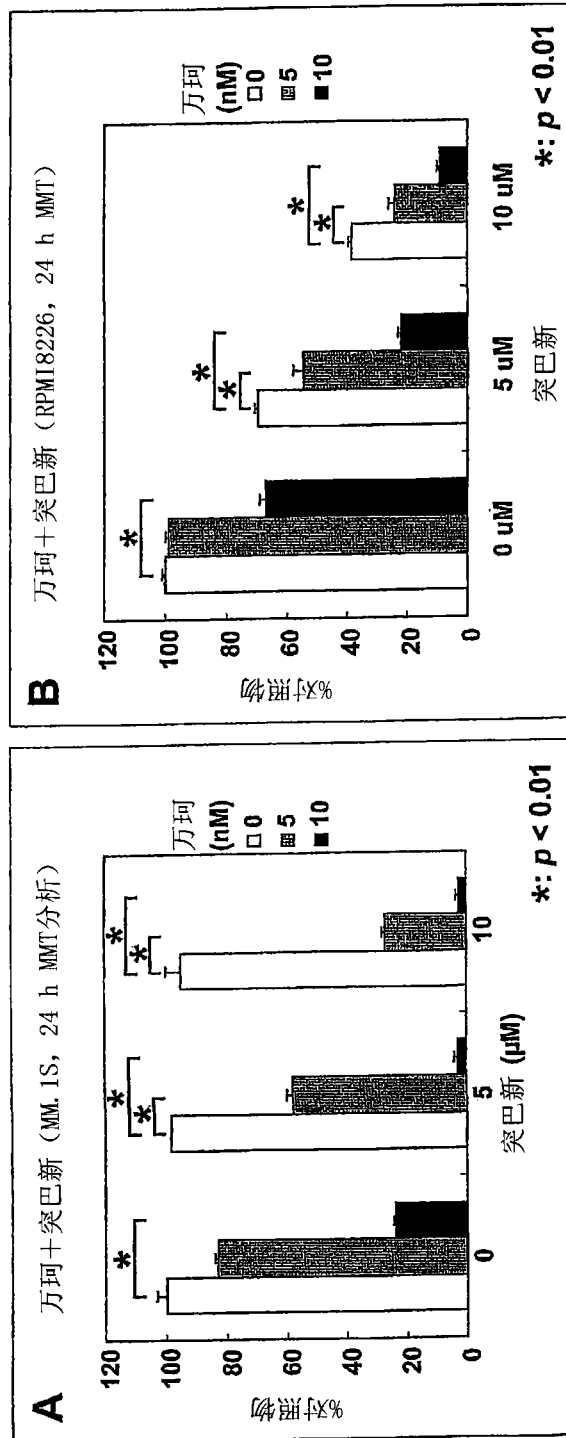


图6

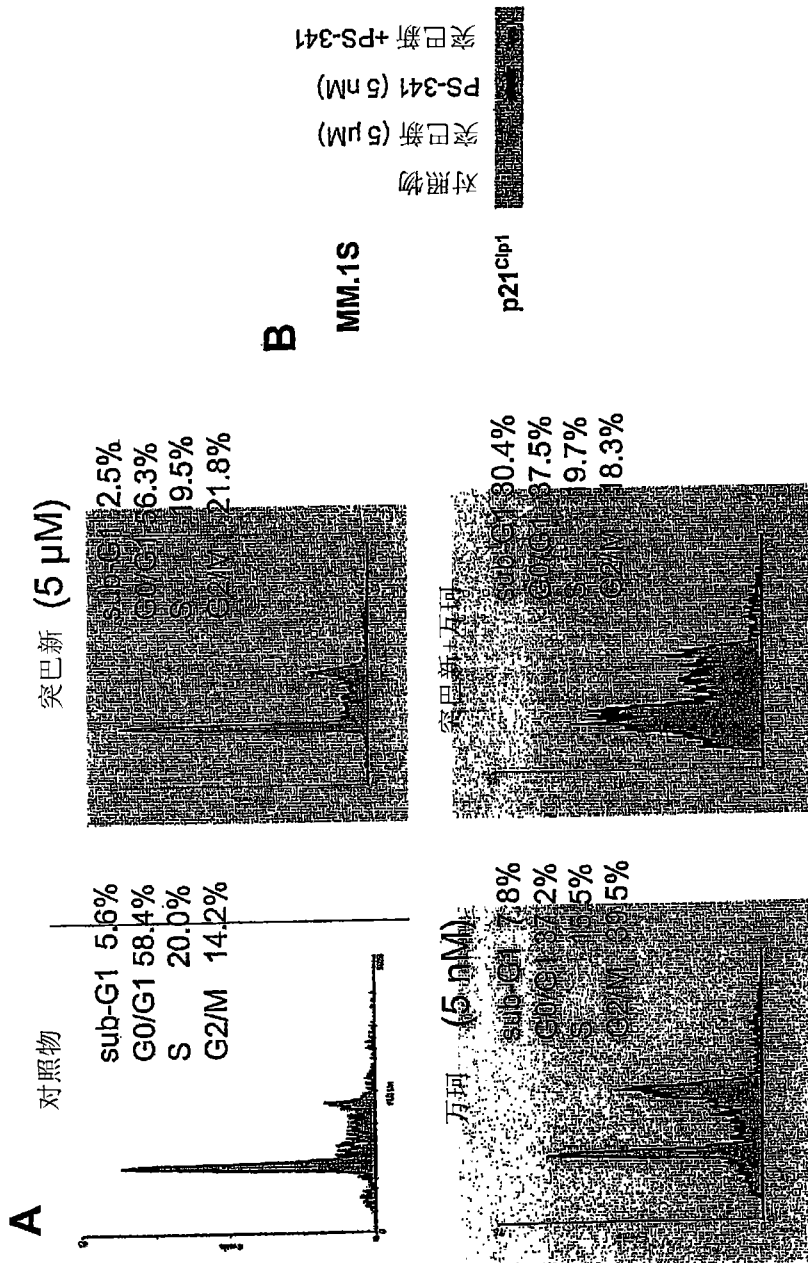


图7

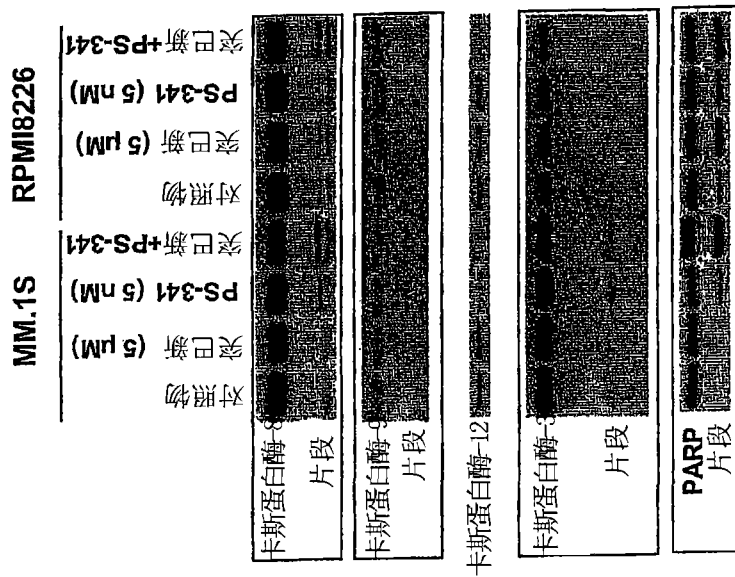


图8

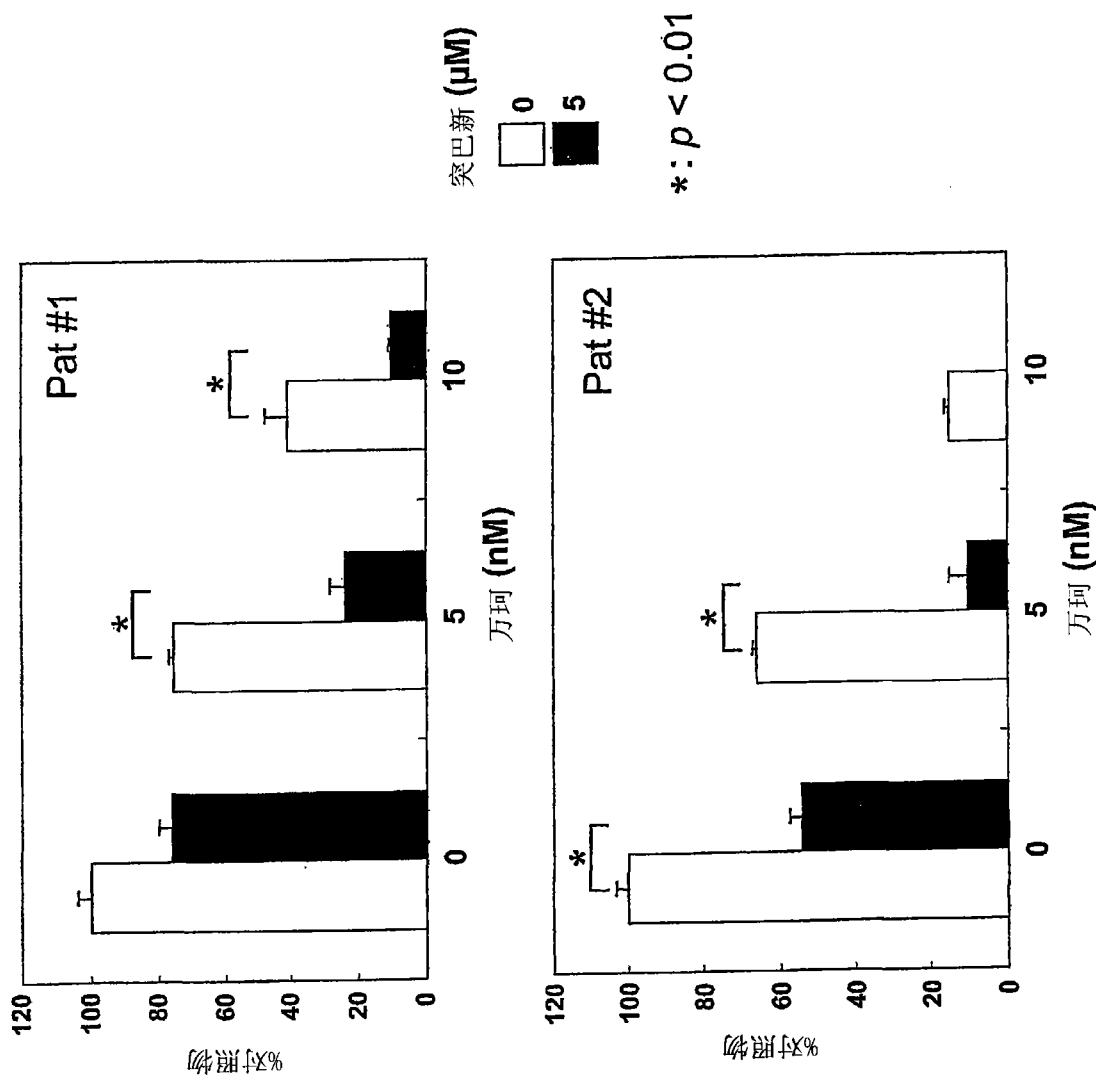
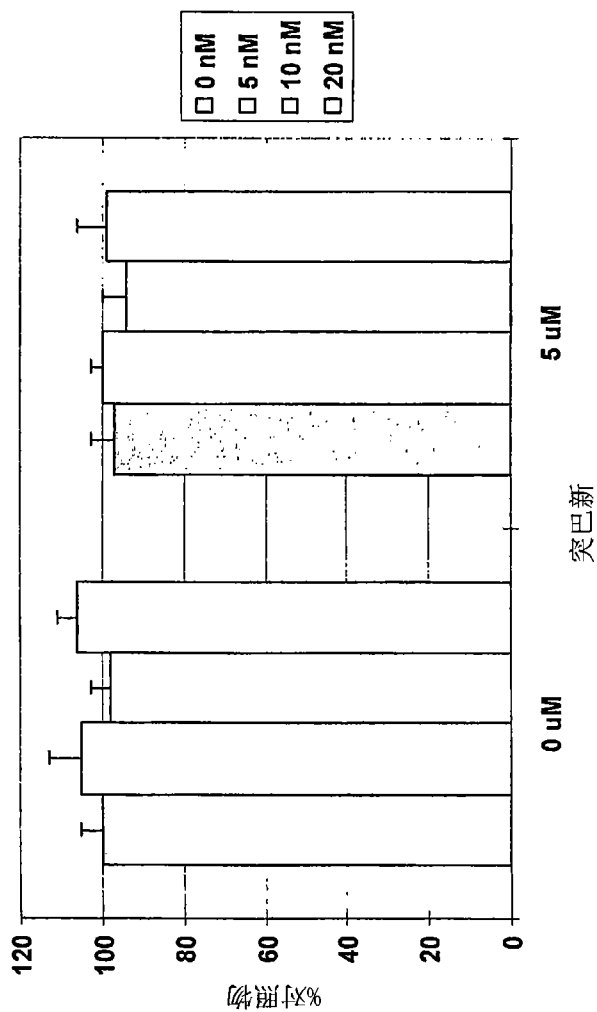


图9

突巴新和硼替佐米对PBMC没有毒性



- 组合在所有研究的骨髓瘤细胞系中具细胞毒性 (普遍)
- 对PBMC没有明显的效应 (广泛治疗窗)
- 克服细胞粘附介导的耐药性 (预测临床反应)
- 患者源骨髓瘤细胞对5-10 nM硼替佐米敏感 (毒性)

图10

在MM. 1S中在BMSC存在下突巴新+万珂 (24 h 3H-胸苷吸收)

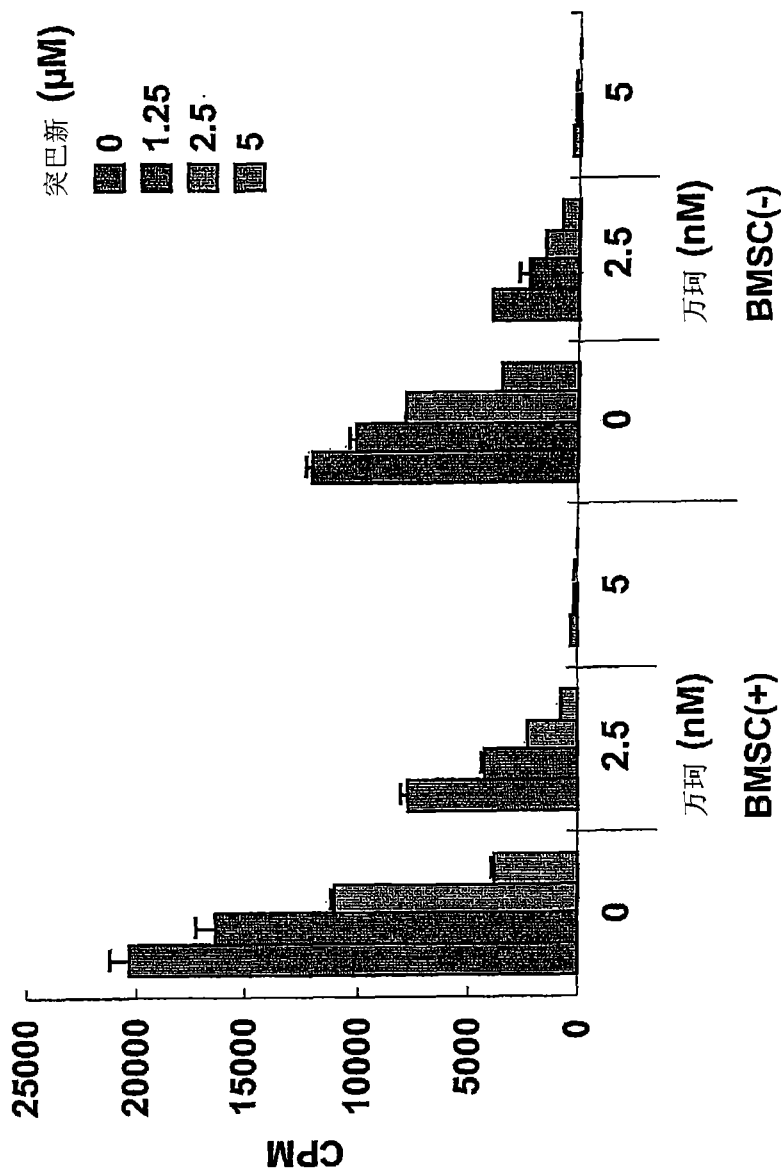


图11

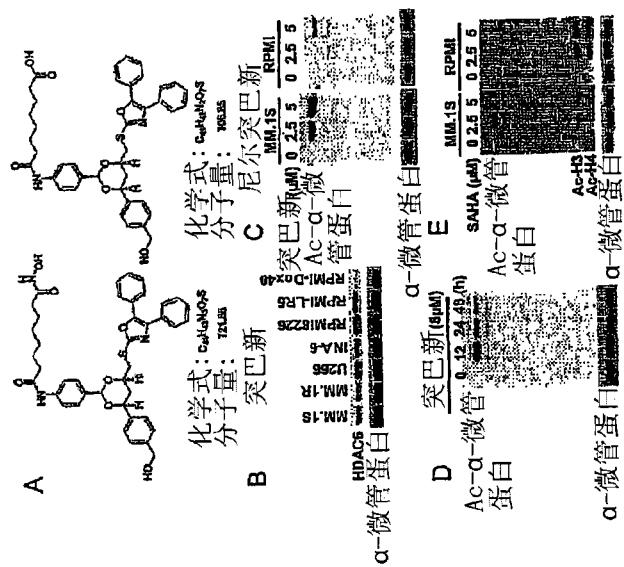


图12

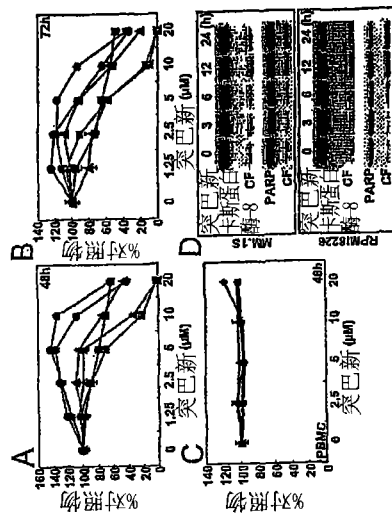


图13

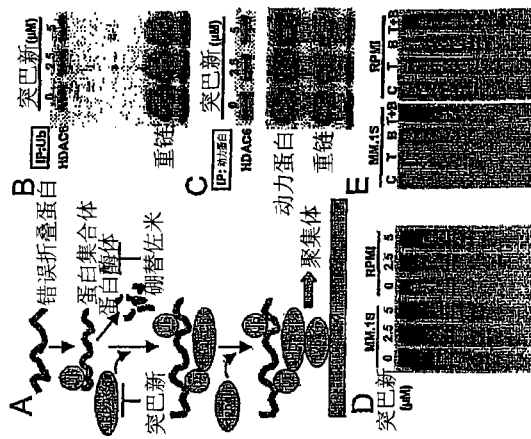


图14

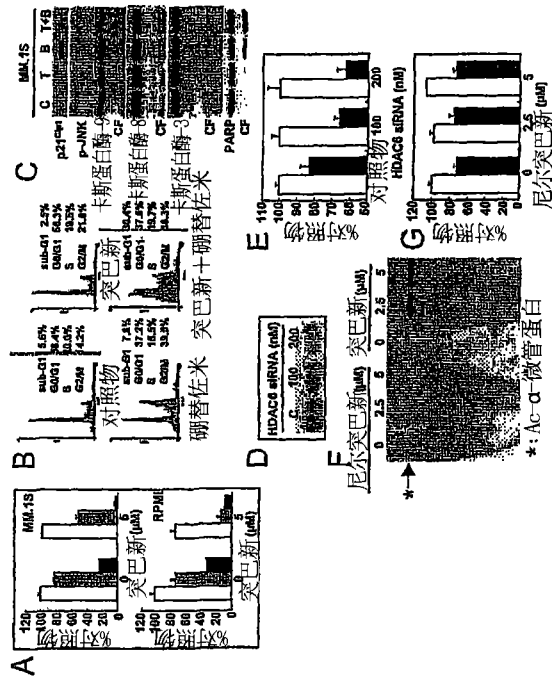


图15

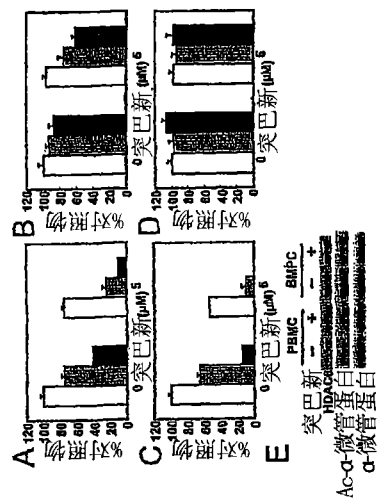


图16

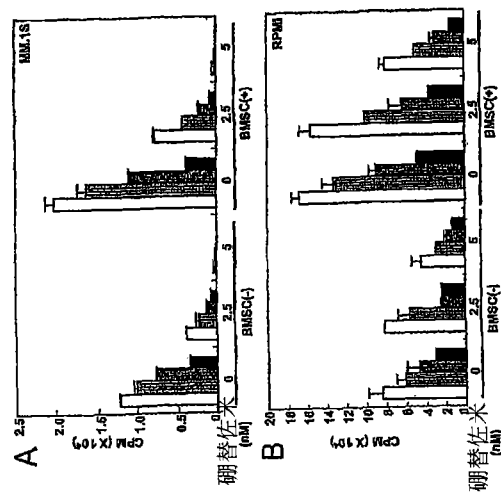


图17

突巴新和硼替佐米：有效抑制蛋白代谢

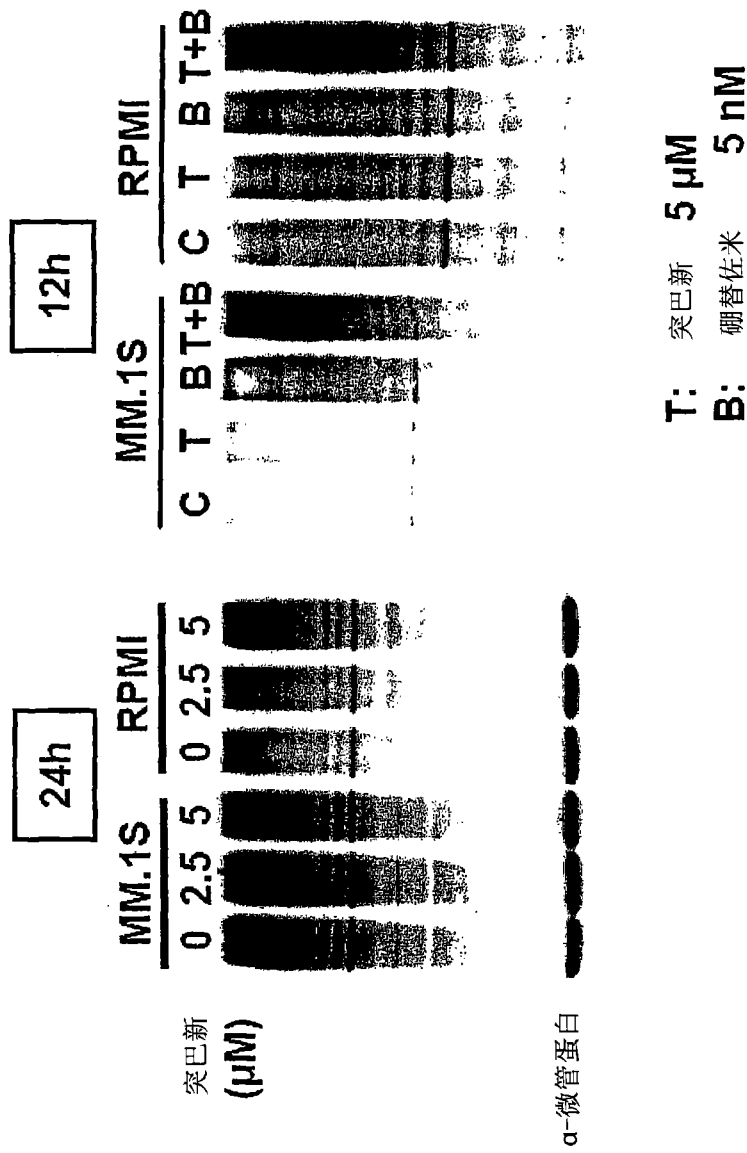
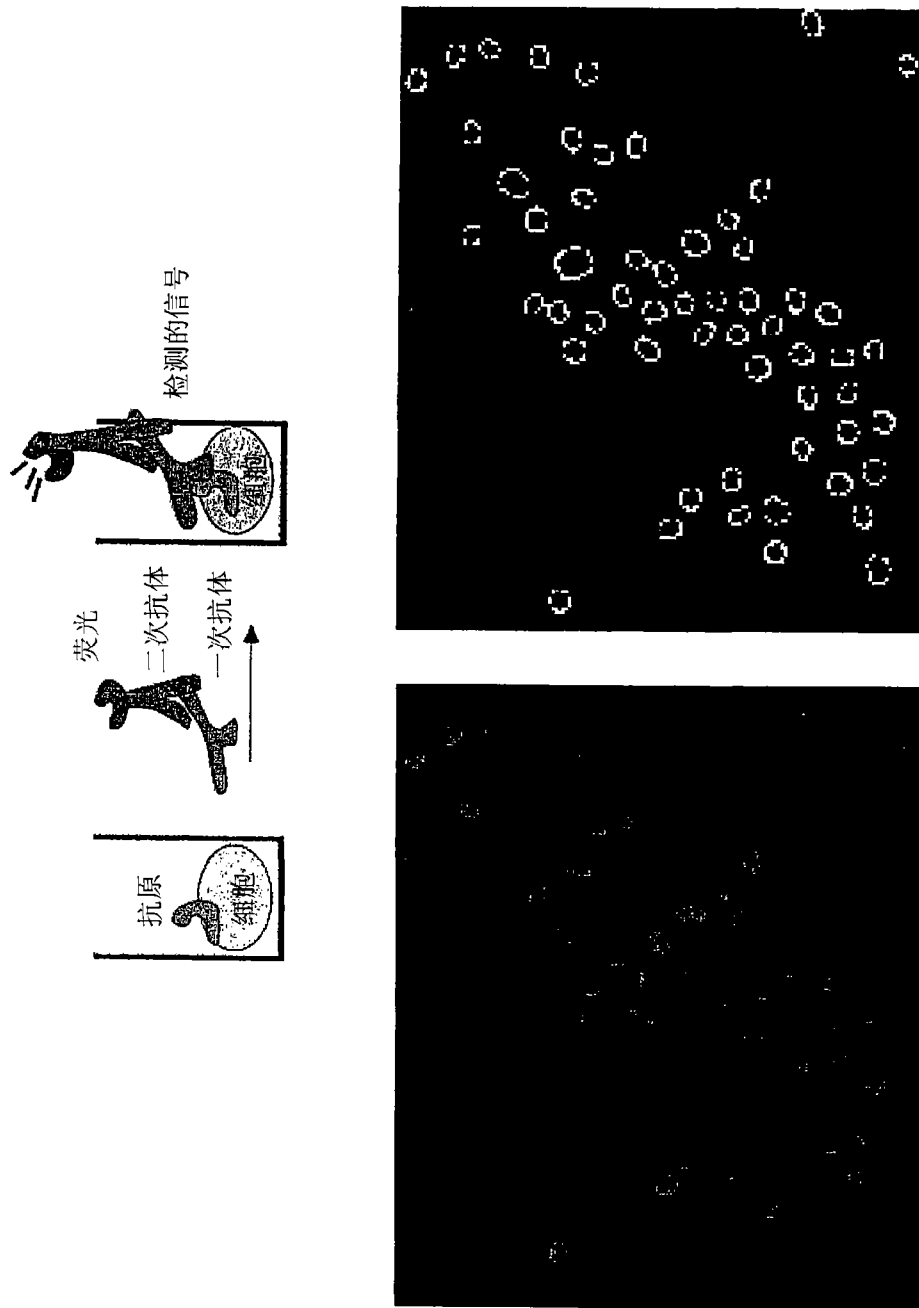


图18



药物化学：HT/IF定量分析的发展

图19

LBH589对比突巴新：毒性和与硼替佐米的协同作用

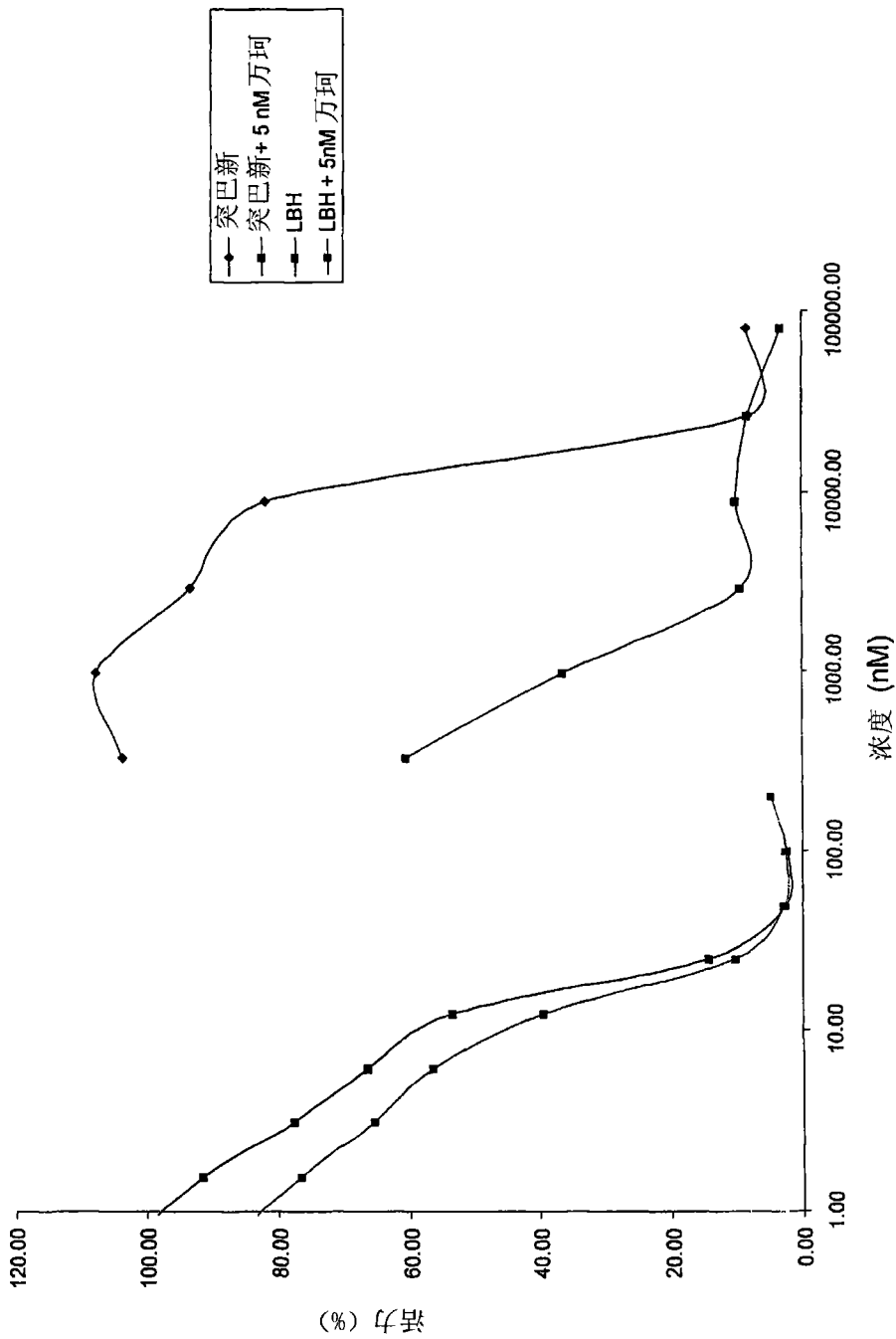


图20

MM.1S (48h)

LBH589对突巴新：毒性和与硼替佐米的协同作用

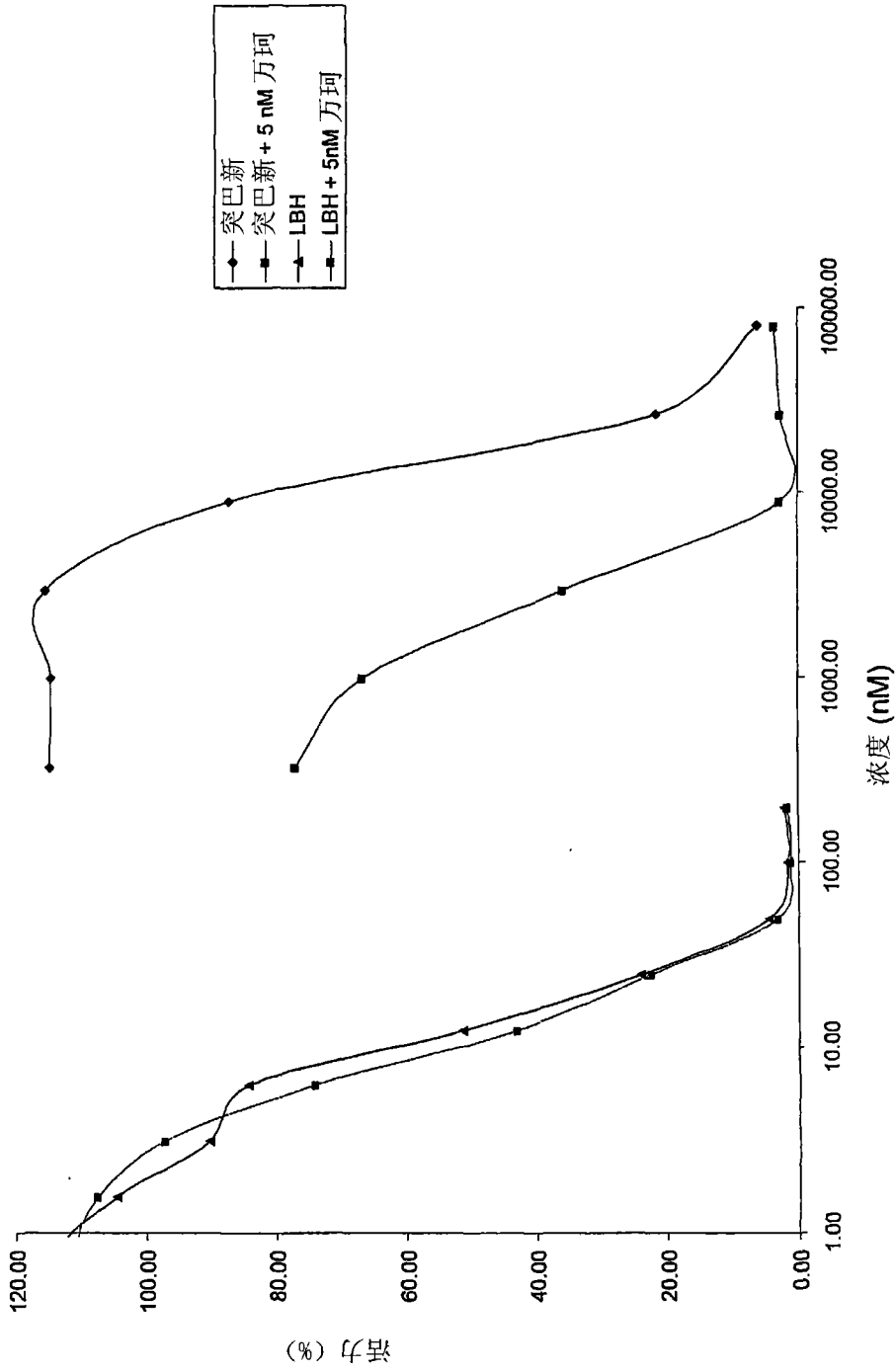


图21

RPMI-8226 (48h)

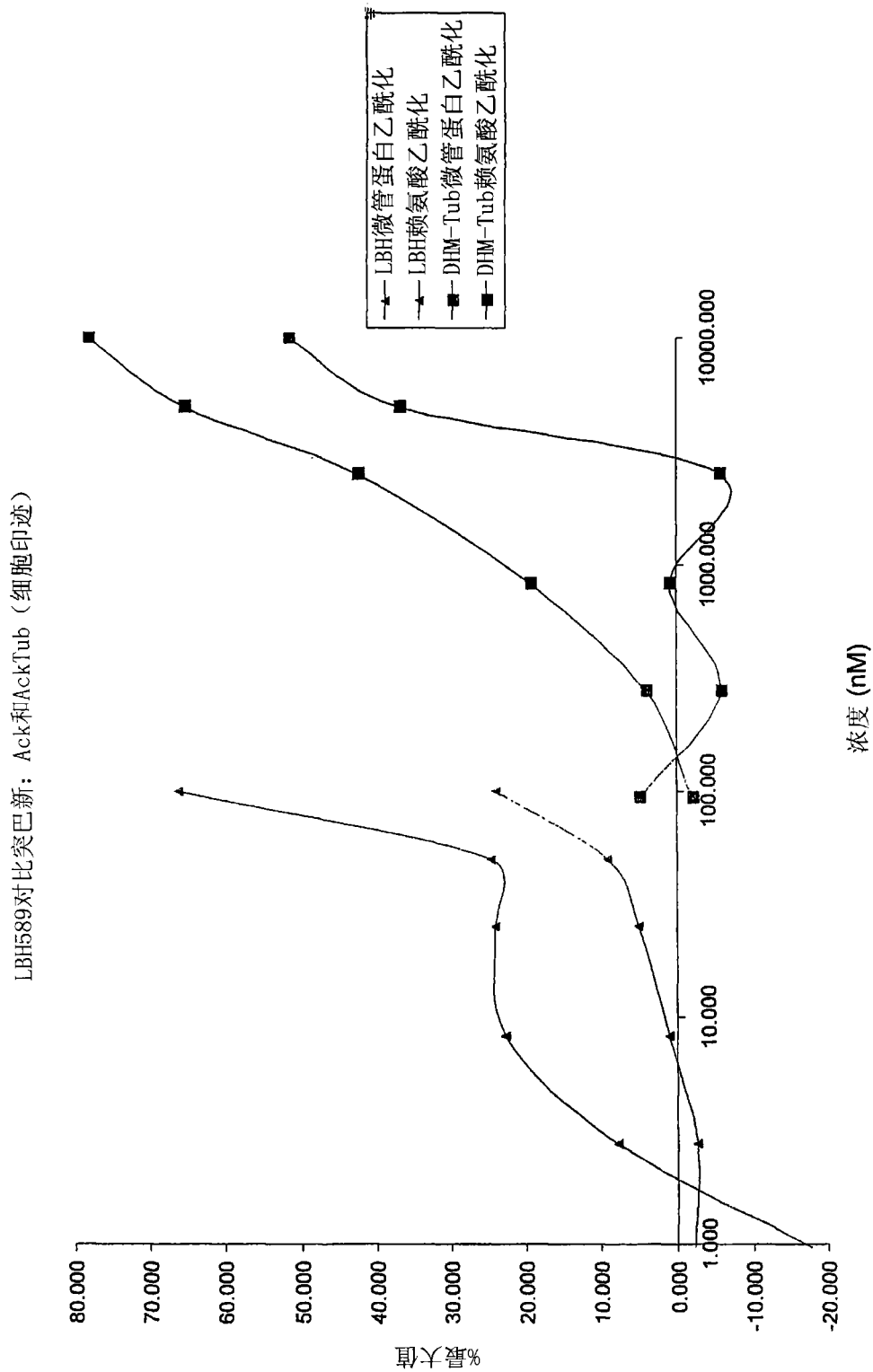


图22

293T (12h)

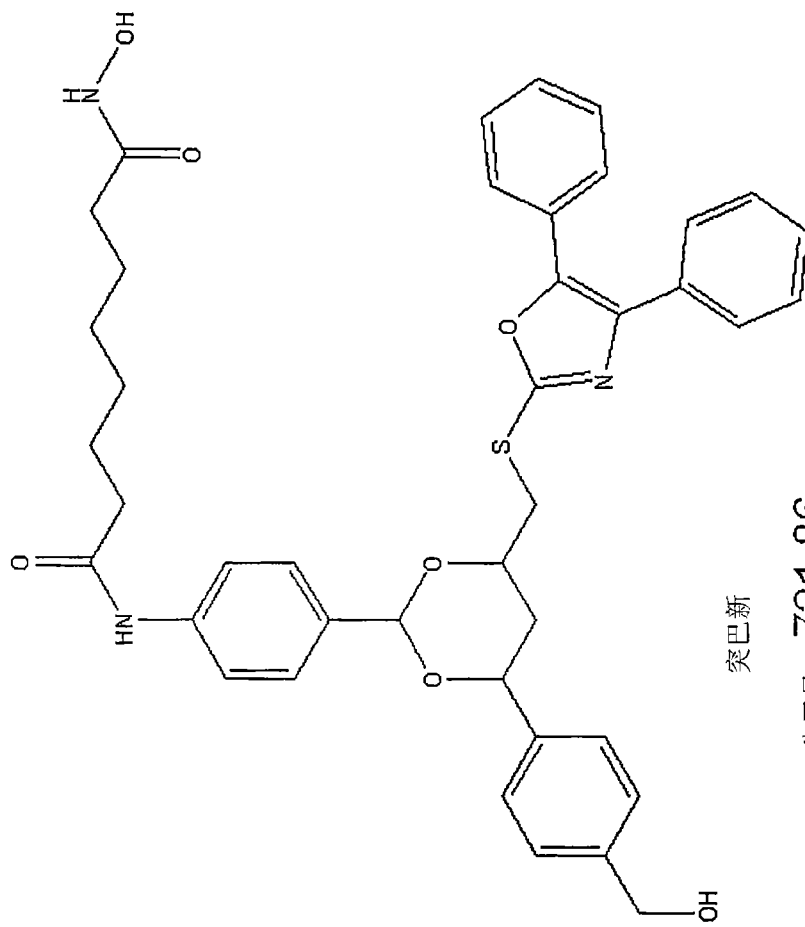


图23

在骨髓瘤细胞中突巴新与万珂之间的协同作用

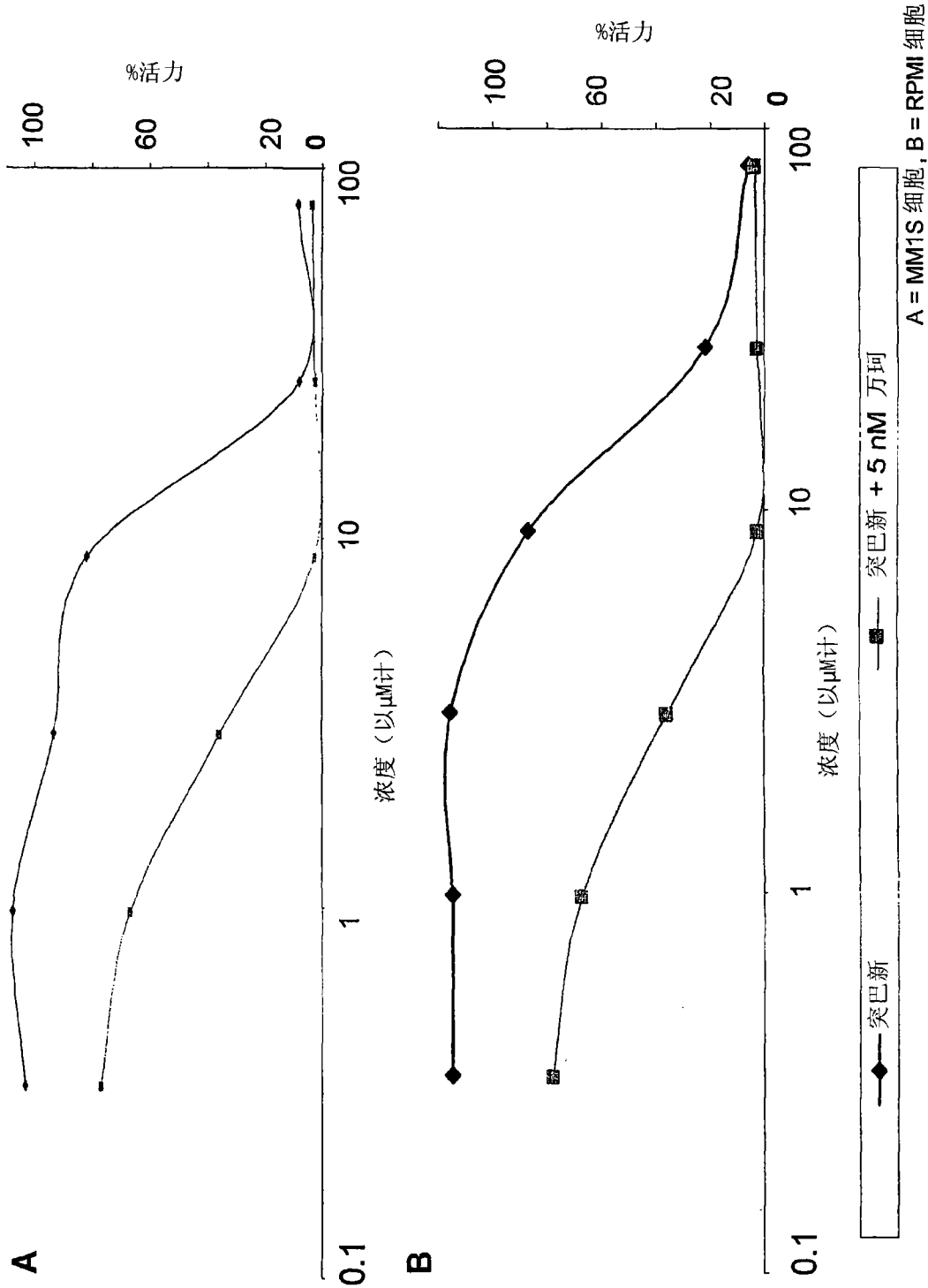


图24

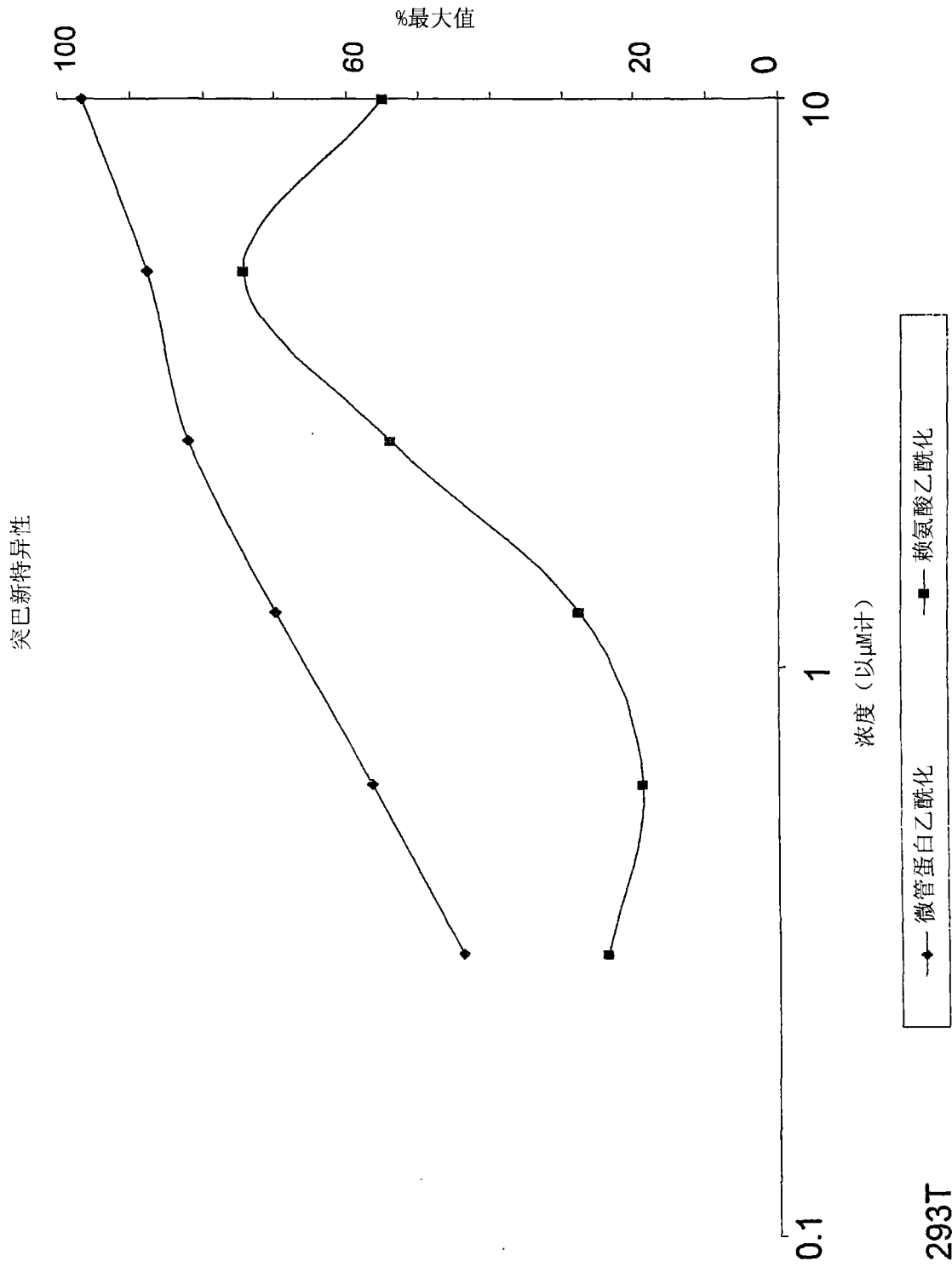


图25

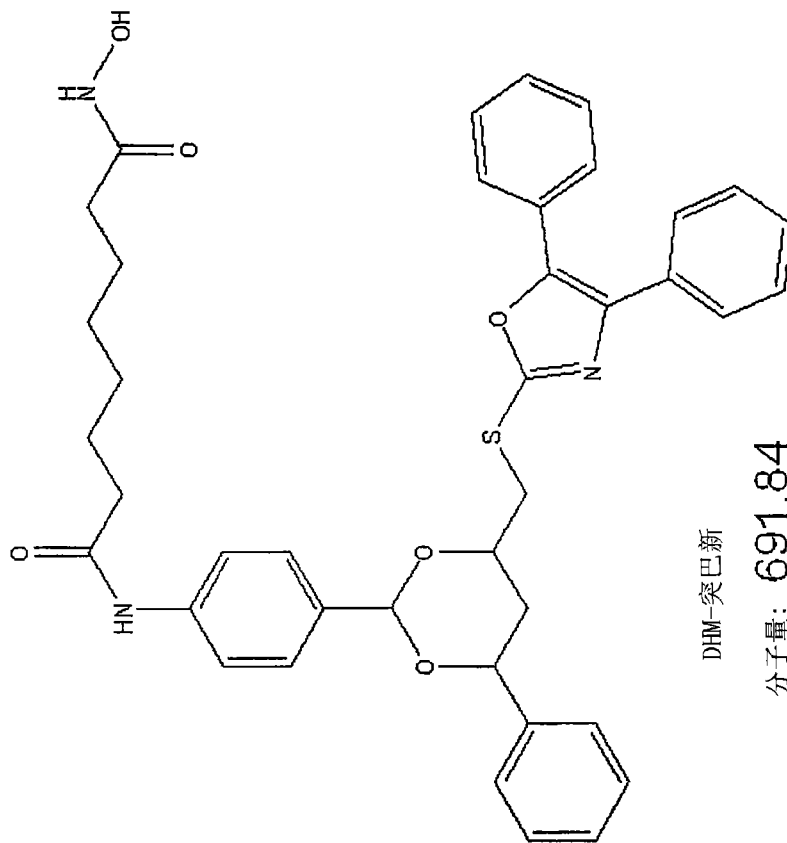
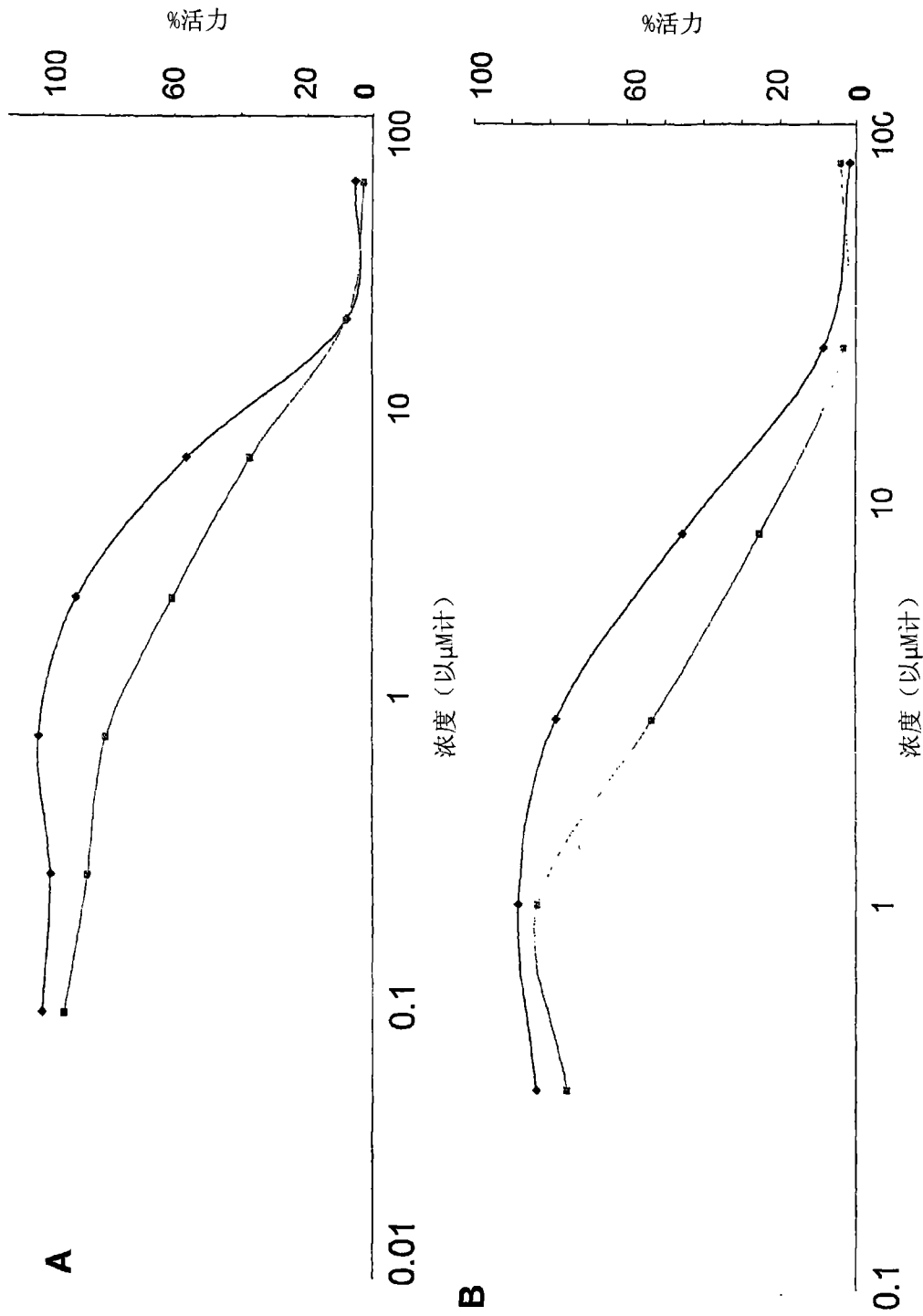


图26

在骨髓瘤细胞中DHM-突巴新与万珂之间的协同作用



A = MM1S 细胞, B = RPMI 细胞

图27

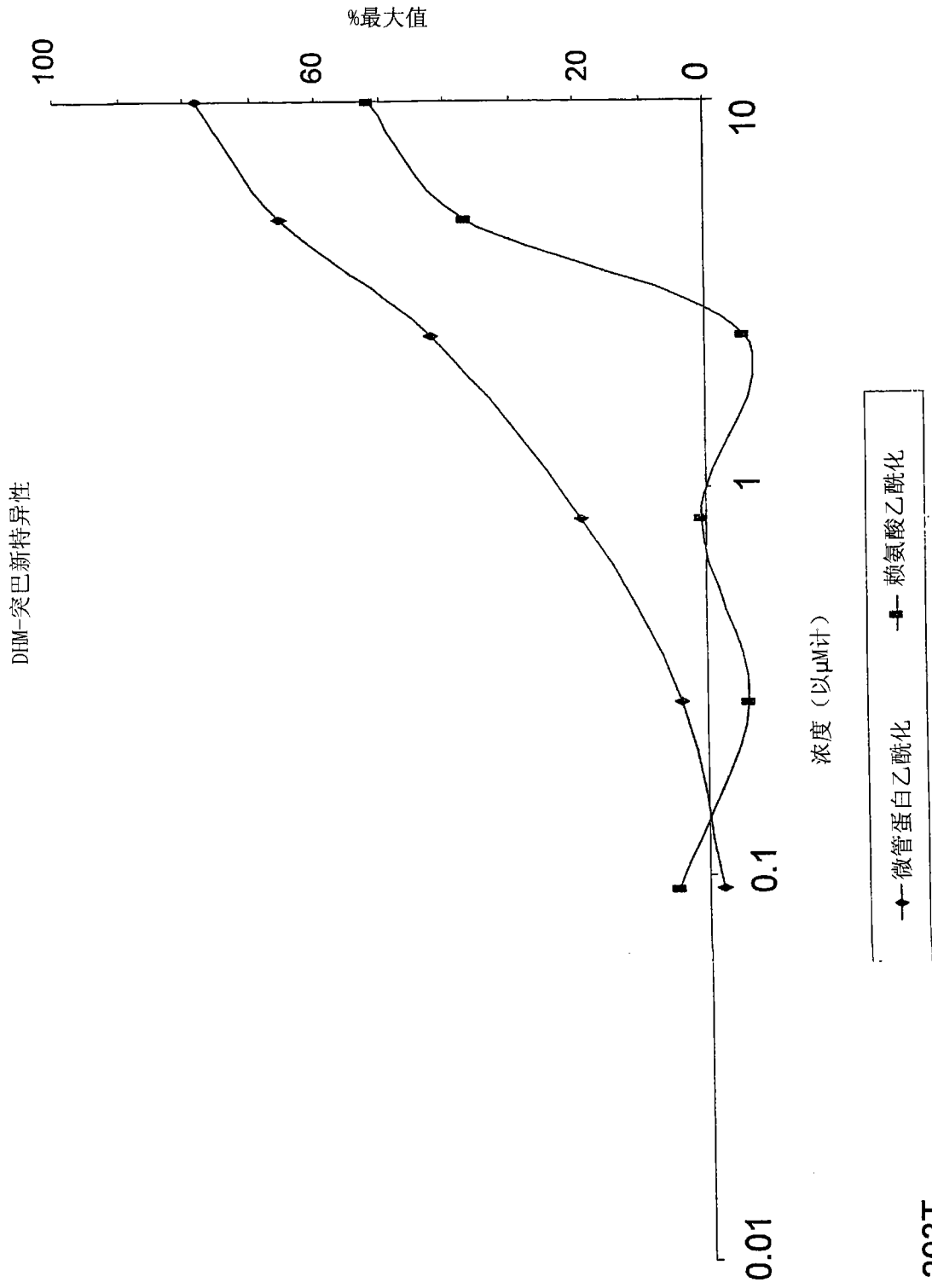


图28



### NKI-87-7 细胞毒性

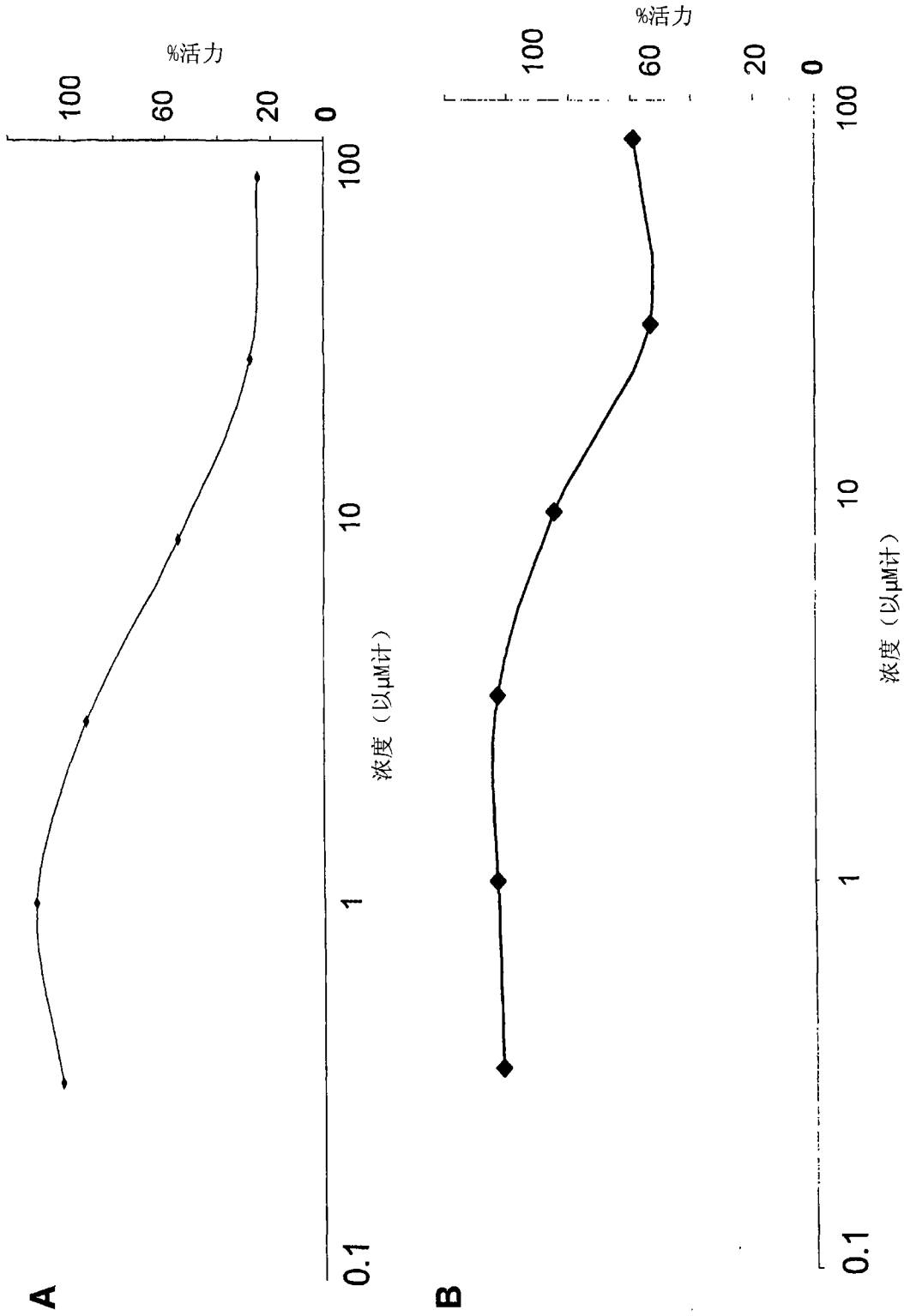
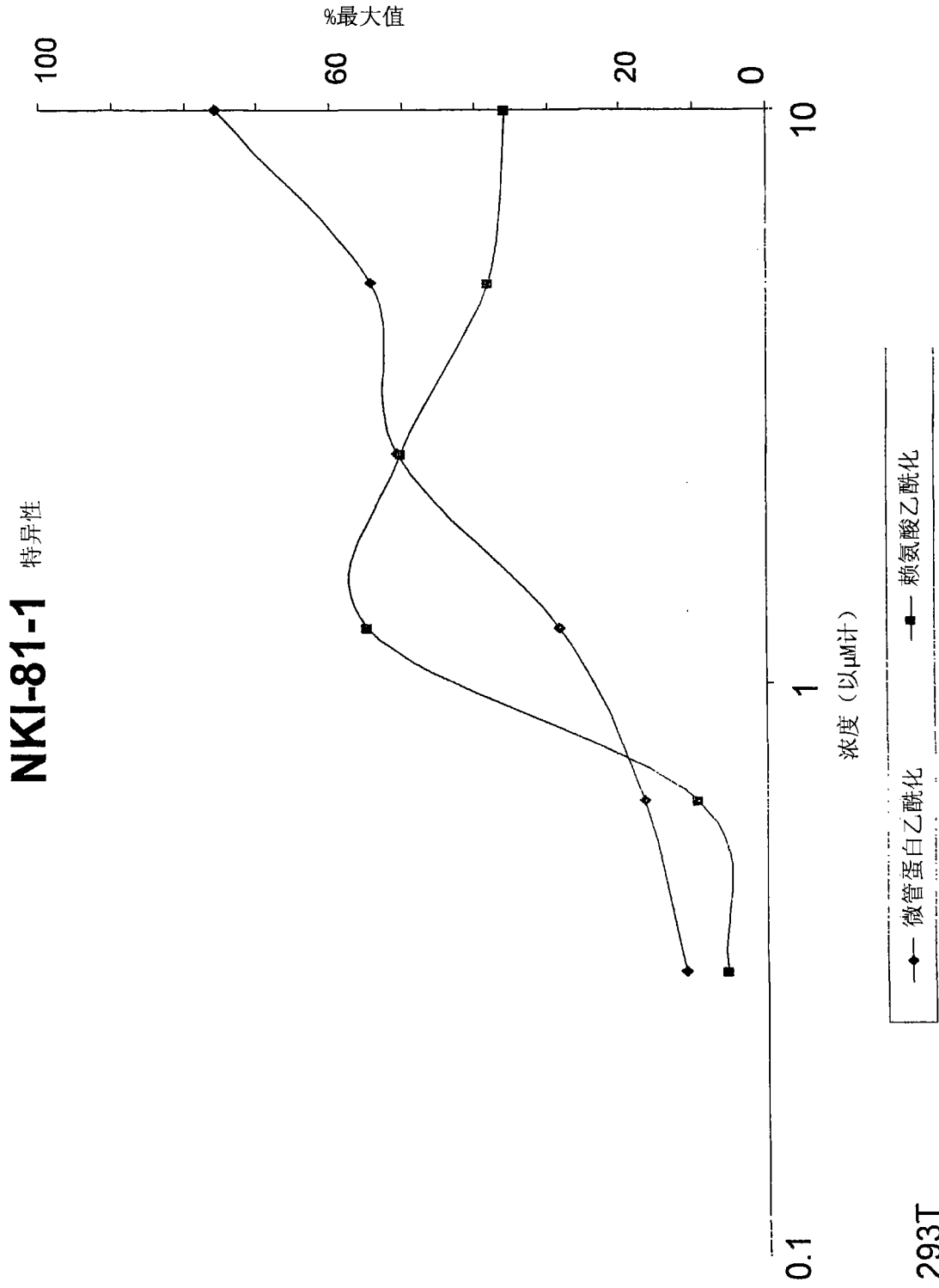
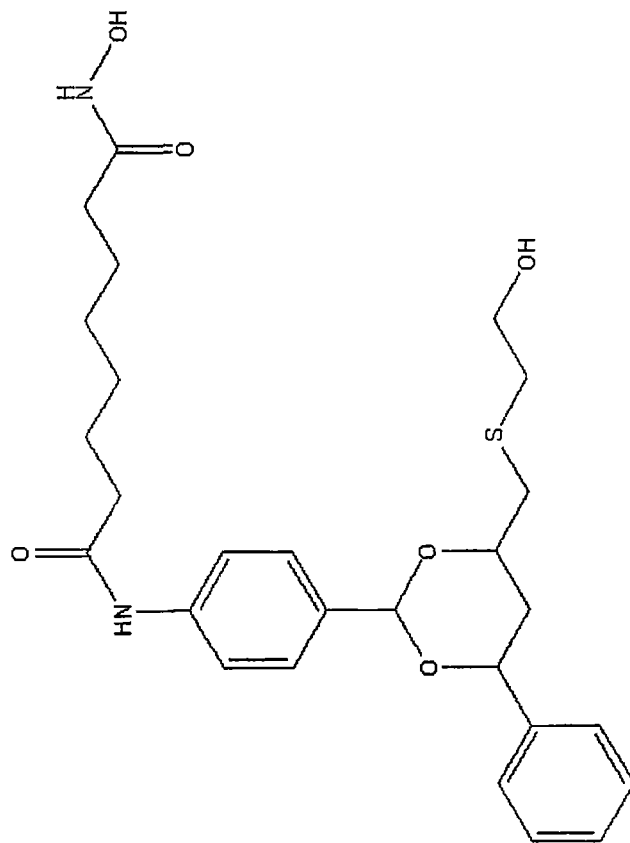


图30 A = MM1S 细胞, B = RPMI 细胞



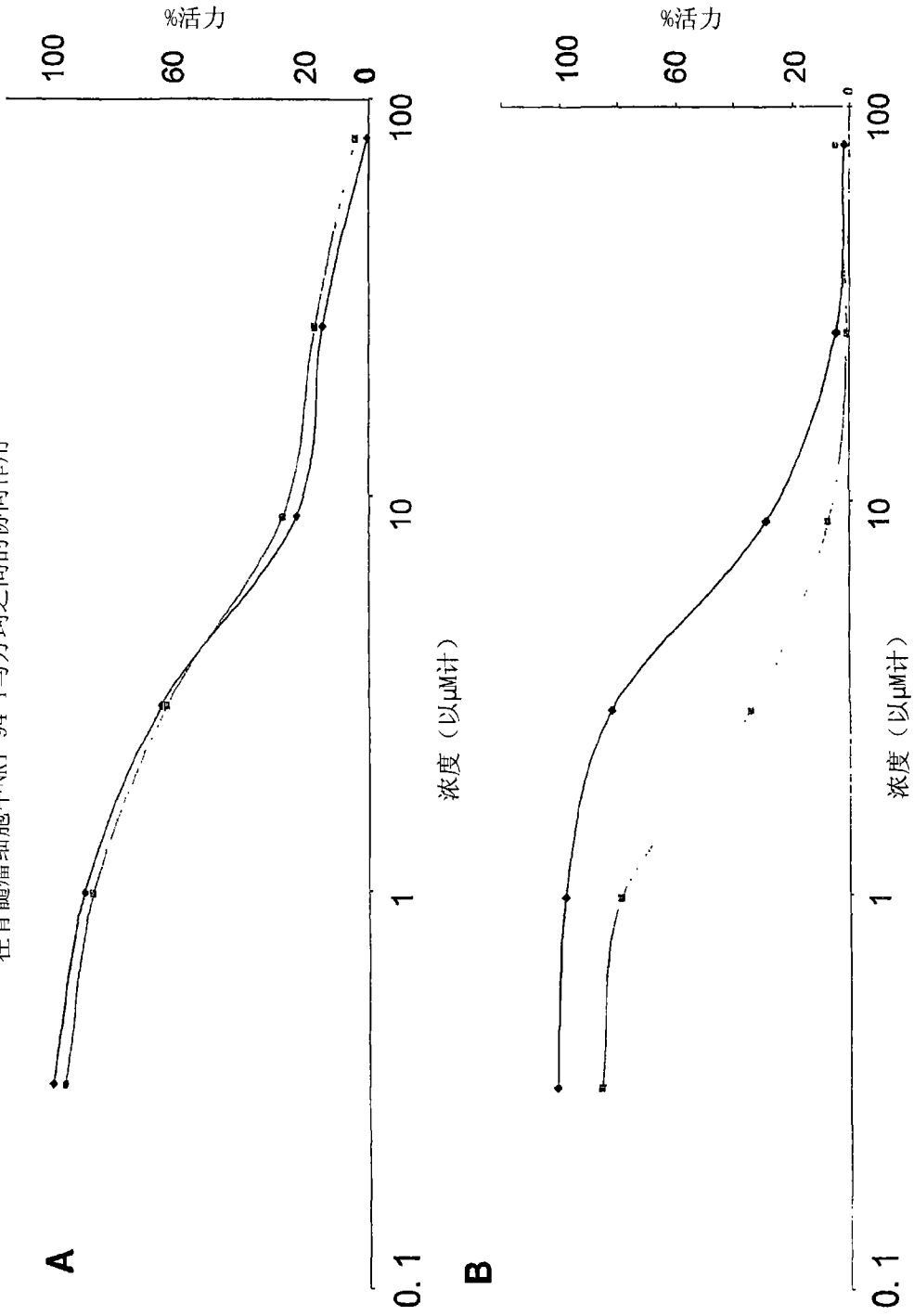


NIKI-94-1

分子量: 516.65

图32

在骨髓瘤细胞中NK1-94-1与万珂之间的协同作用



—●— NK1-94-1    - - - ■ - - - NK1-94-1 + 5 nM 万珂

A = MM1S 细胞, B = RPMI 细胞

图 33

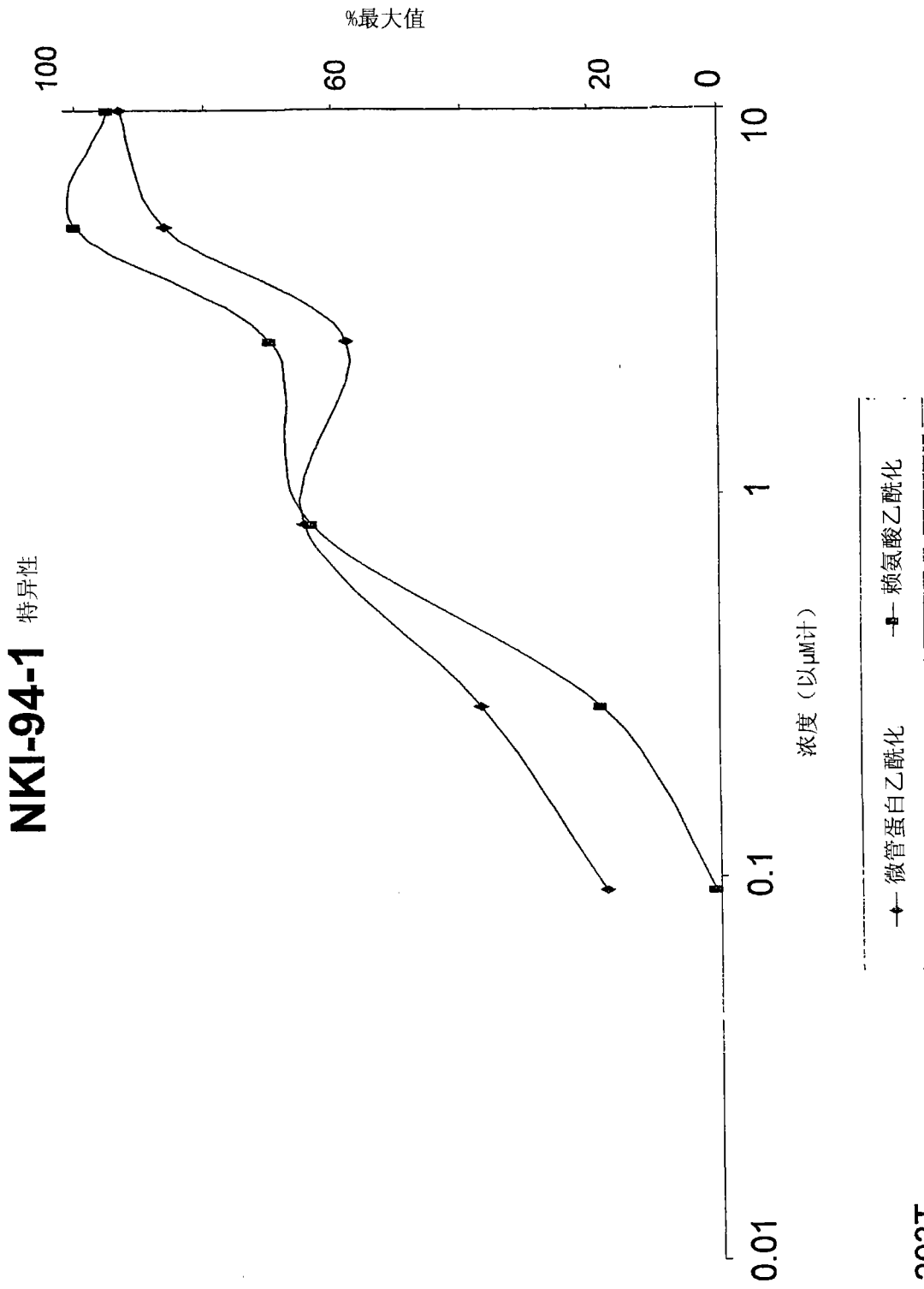
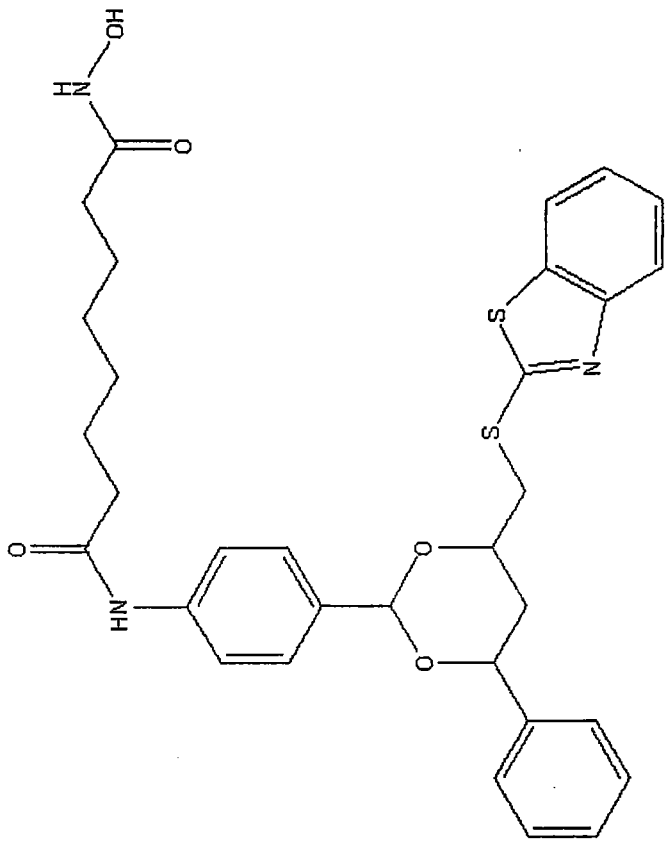


图 34

293T



NKI-59-1

分子量: 605.77

图35

在骨髓瘤细胞中NKI-59-1与万珂之间的协同作用

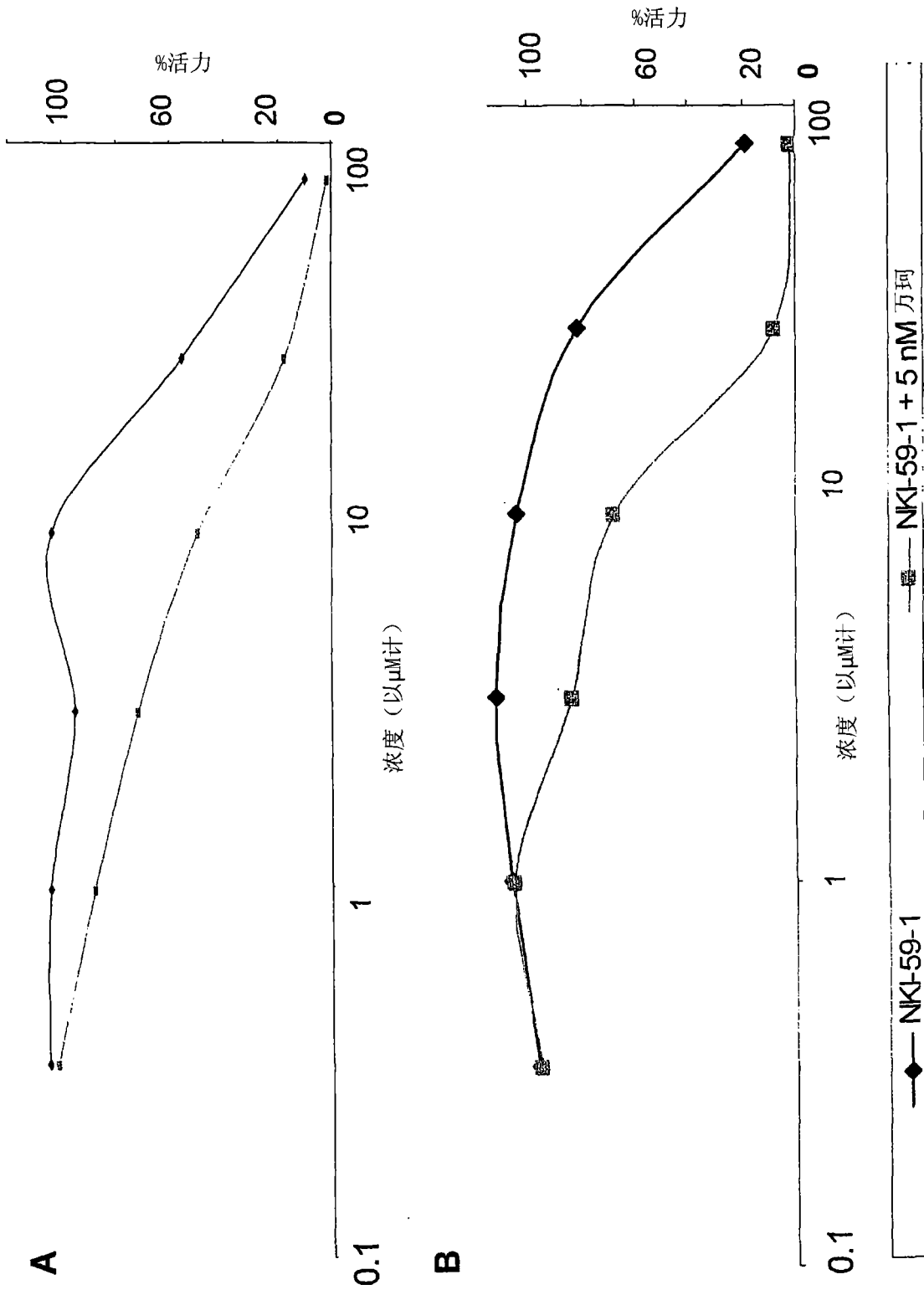


图36

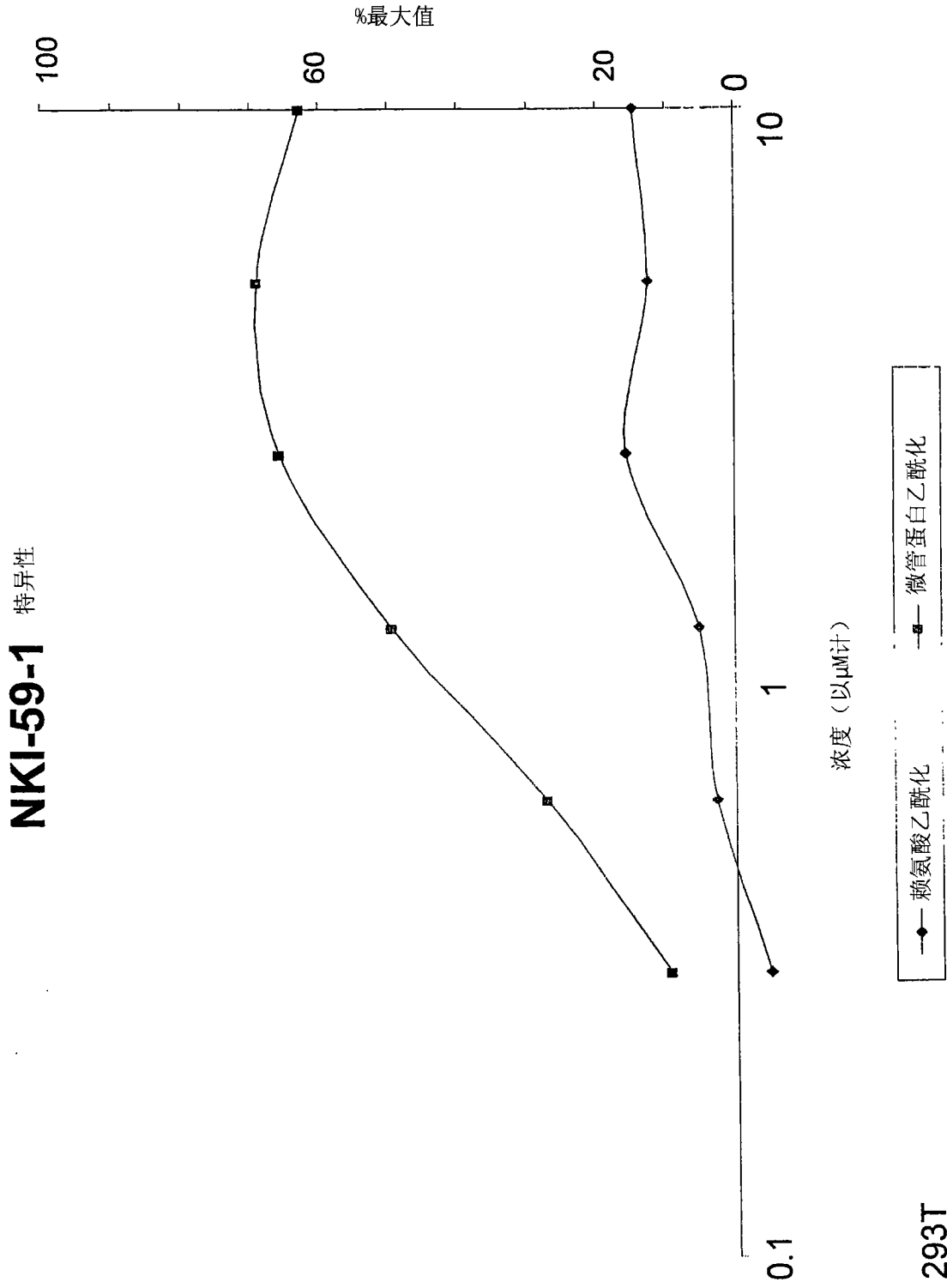
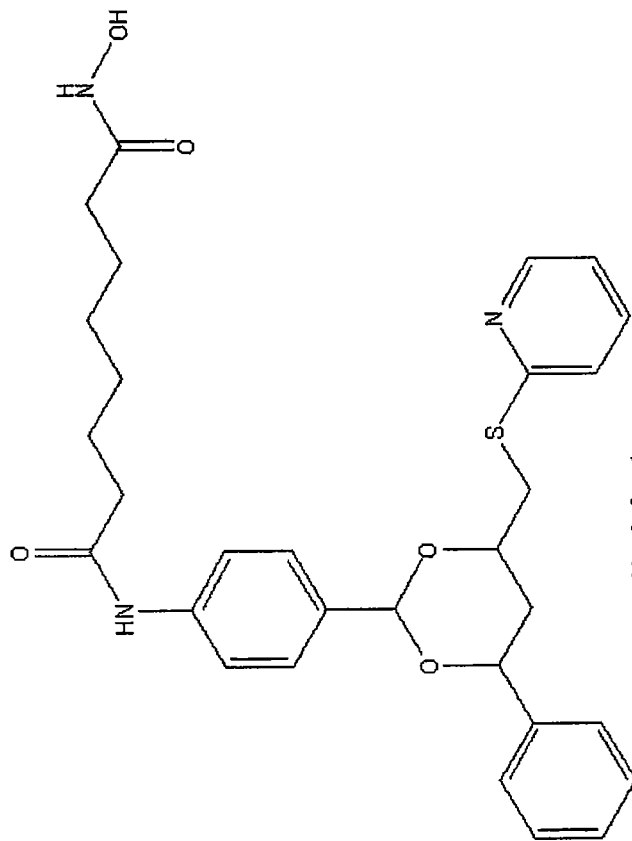


图37



NKI-60-1

分子量: 549.68

图38

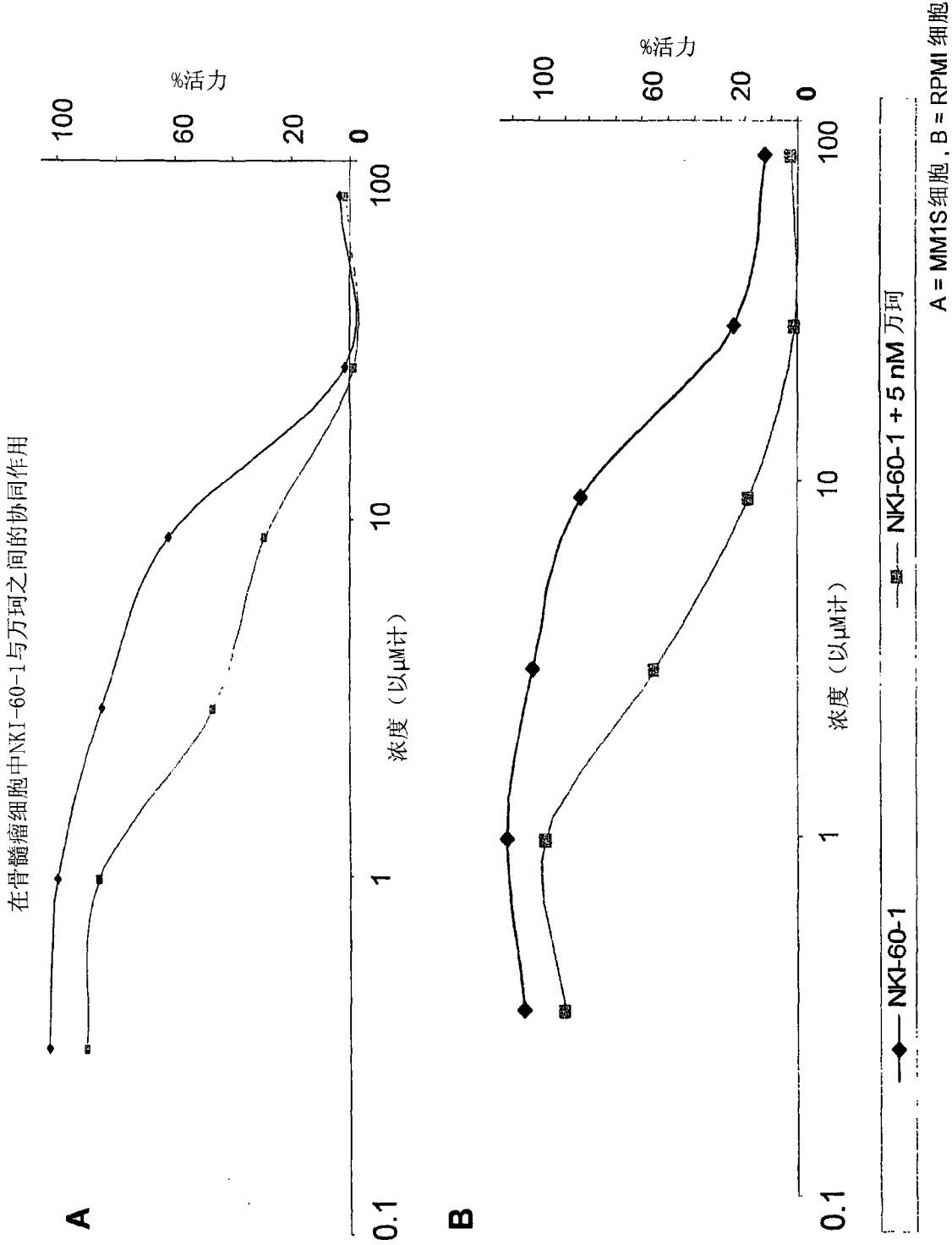
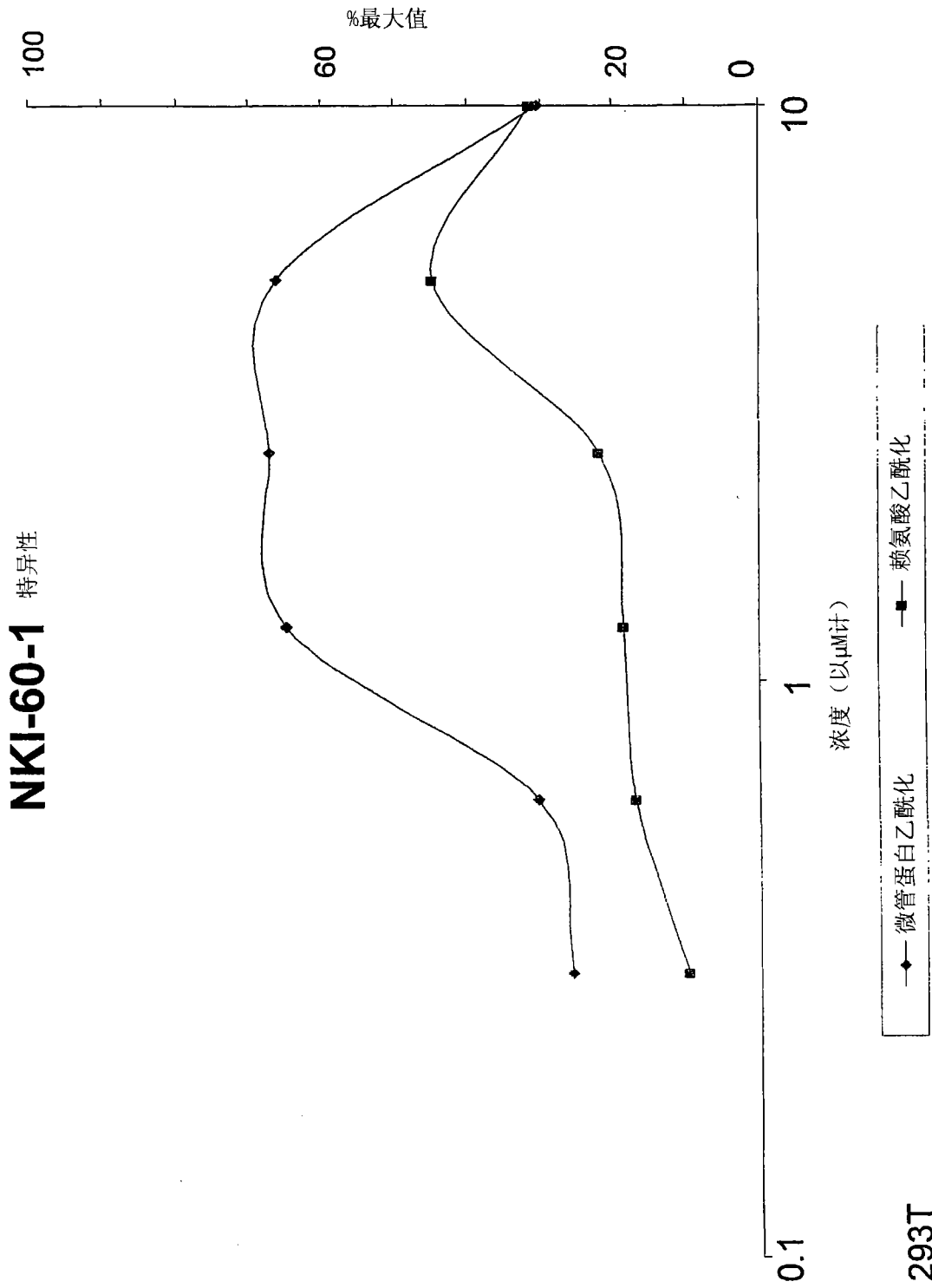
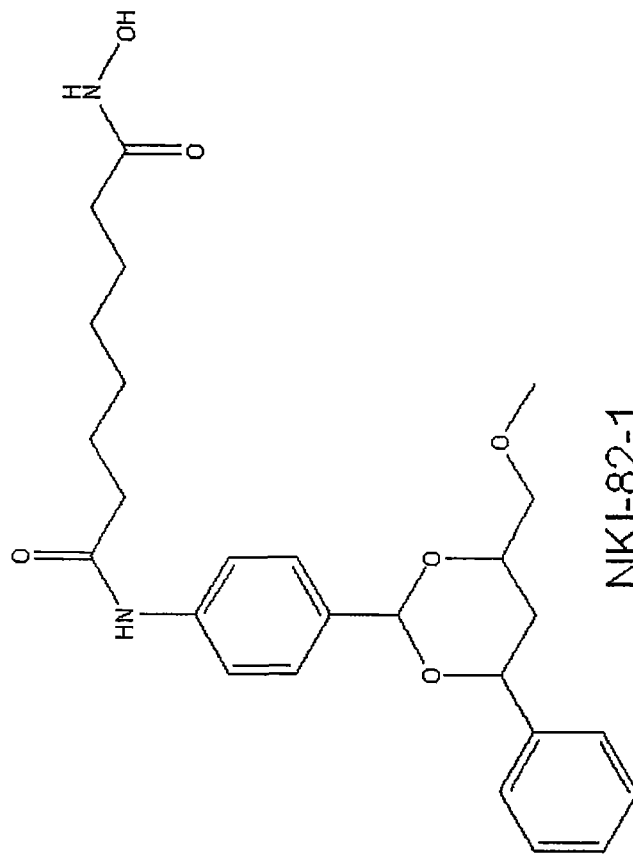


图39



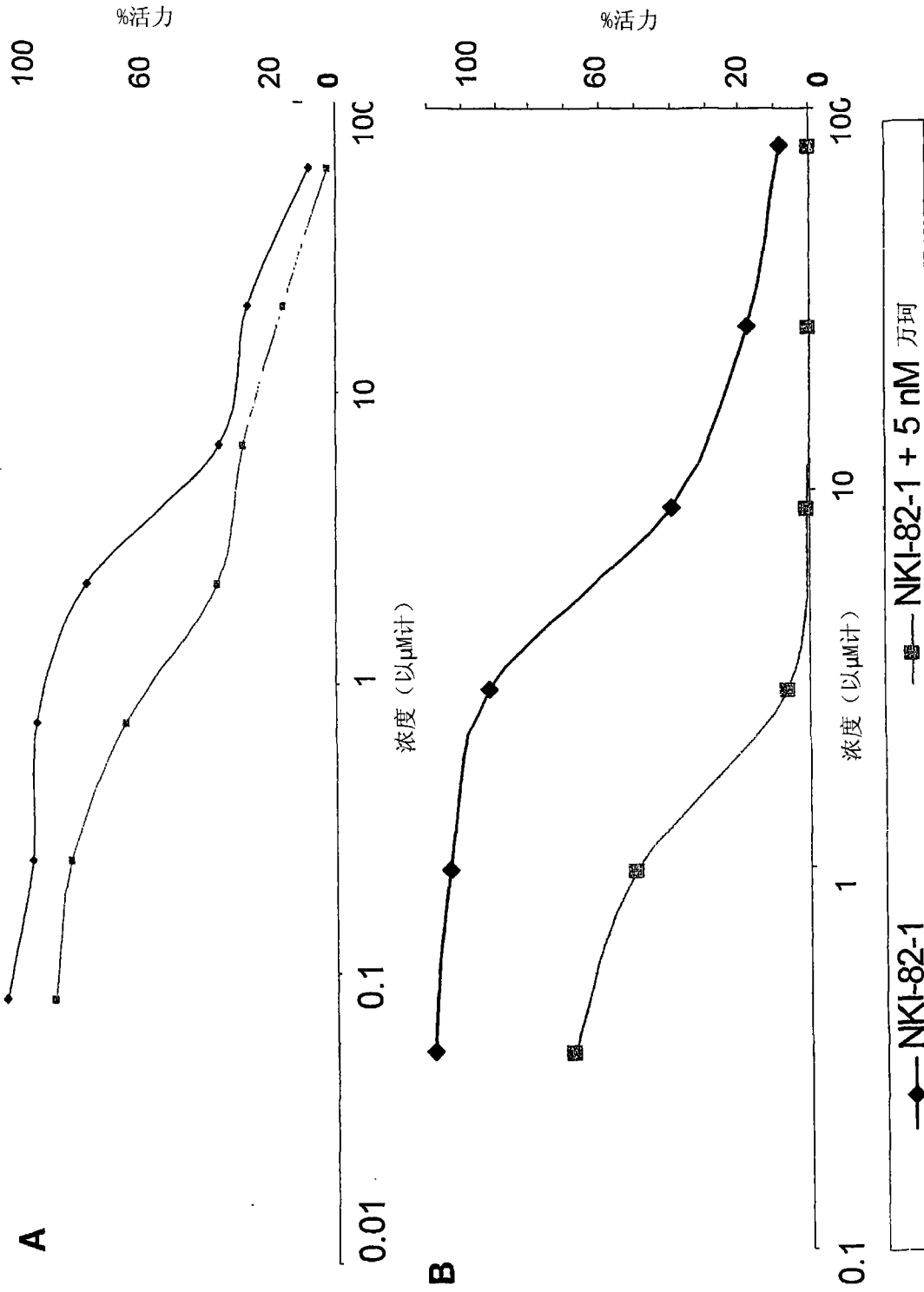


NKI-82-1

分子量: 470.56

图41

在骨髓瘤细胞中NKI-82-1与万珂之间的协同作用



A = MM1S 细胞, B = RPMI 细胞

图42

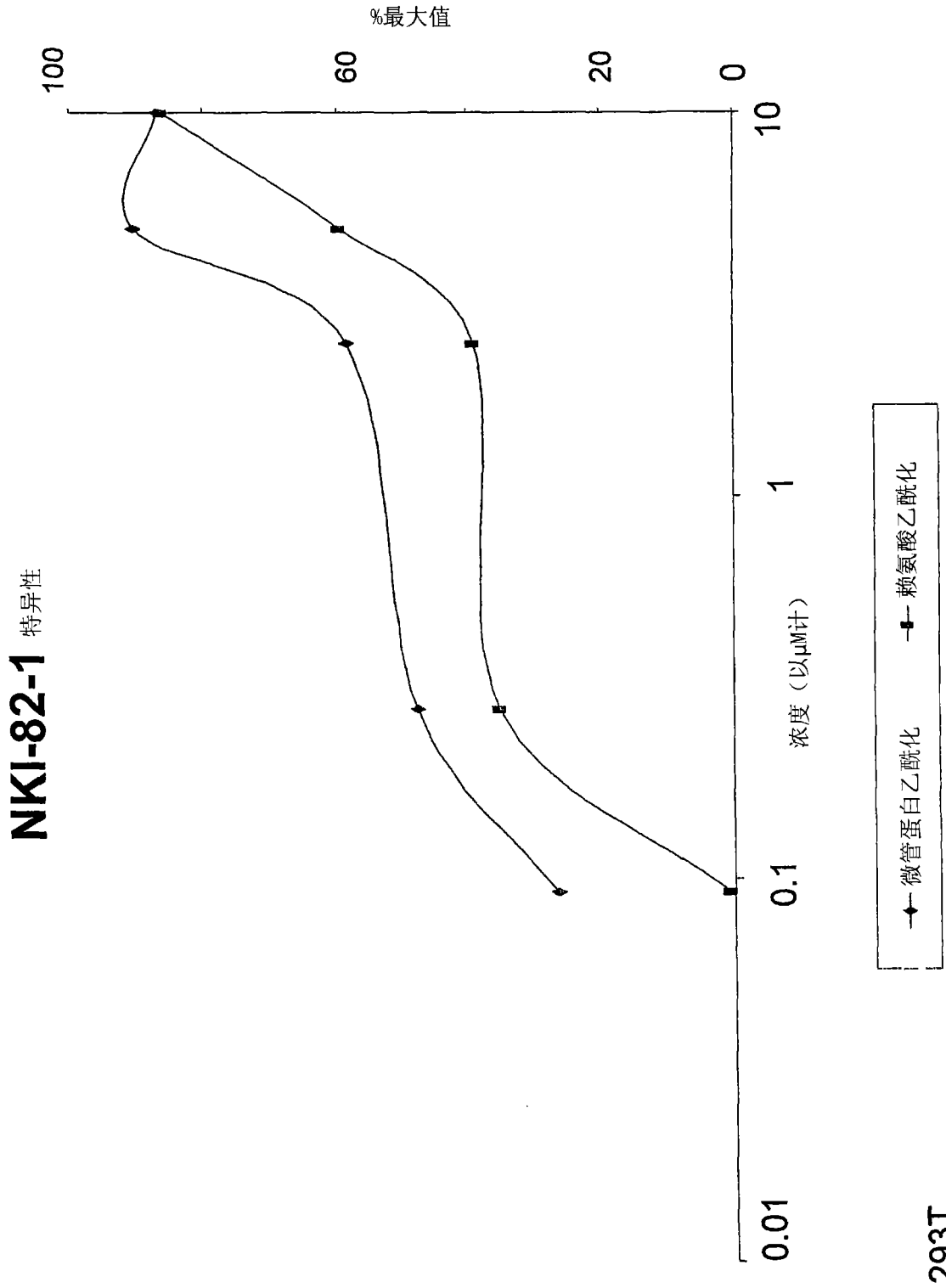
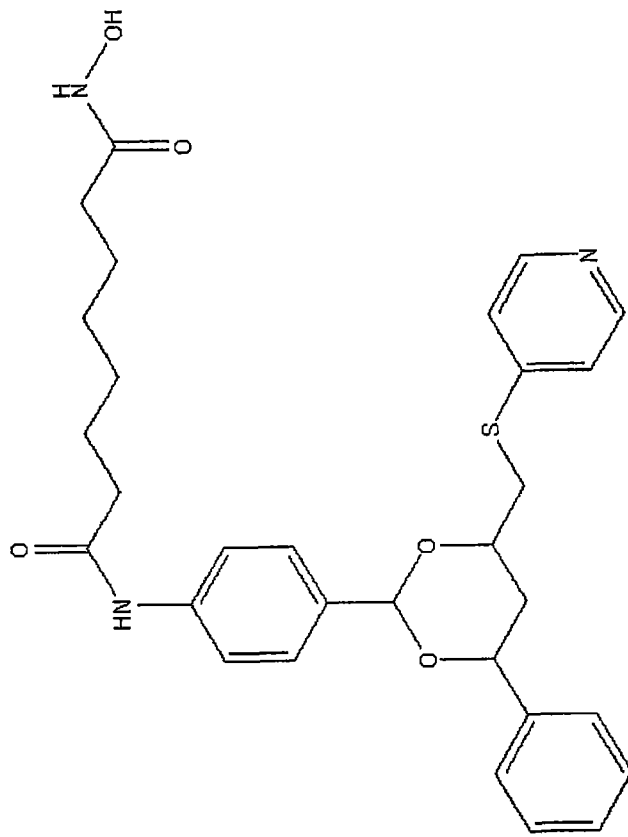


图43

293T



NKI-84-1

分子量: 549.68

图44

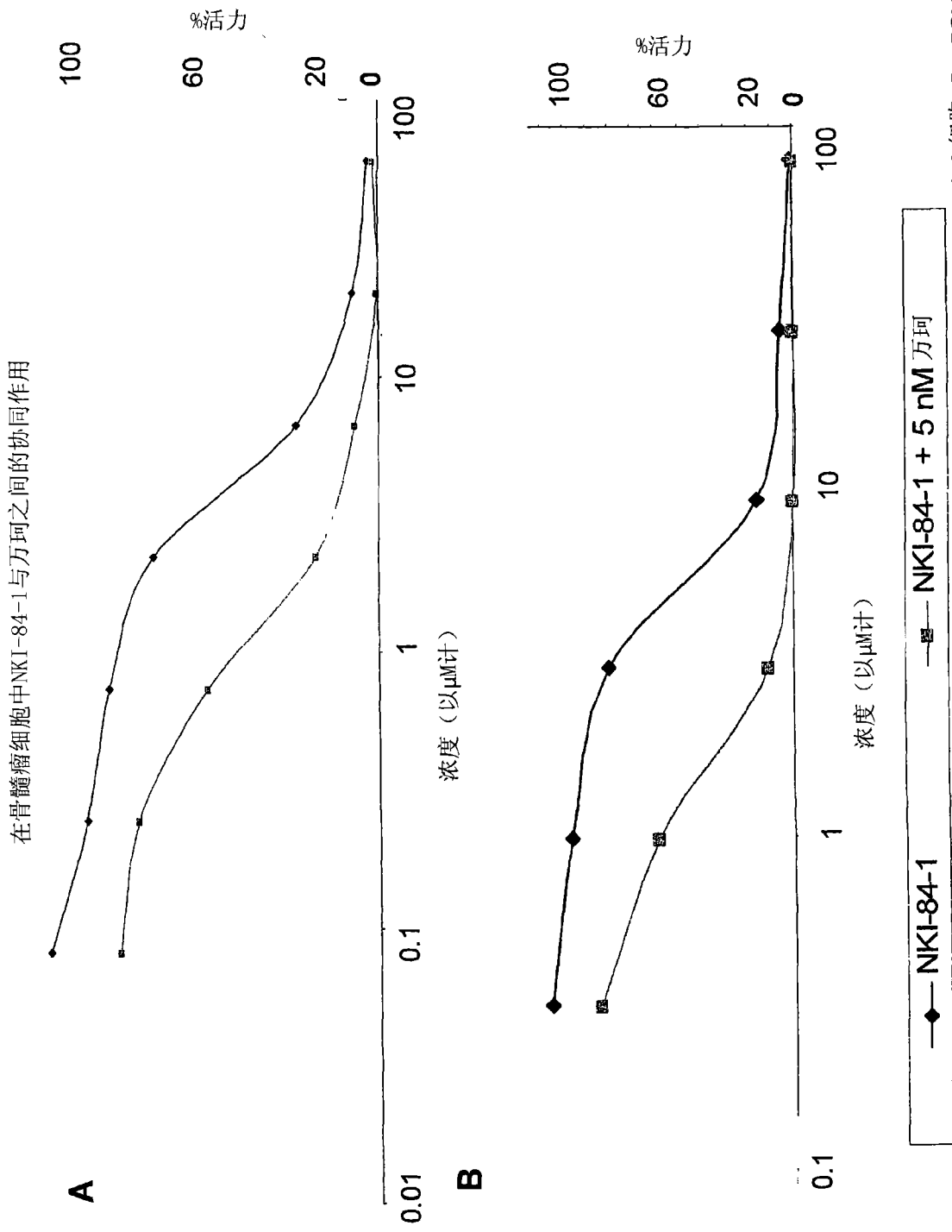
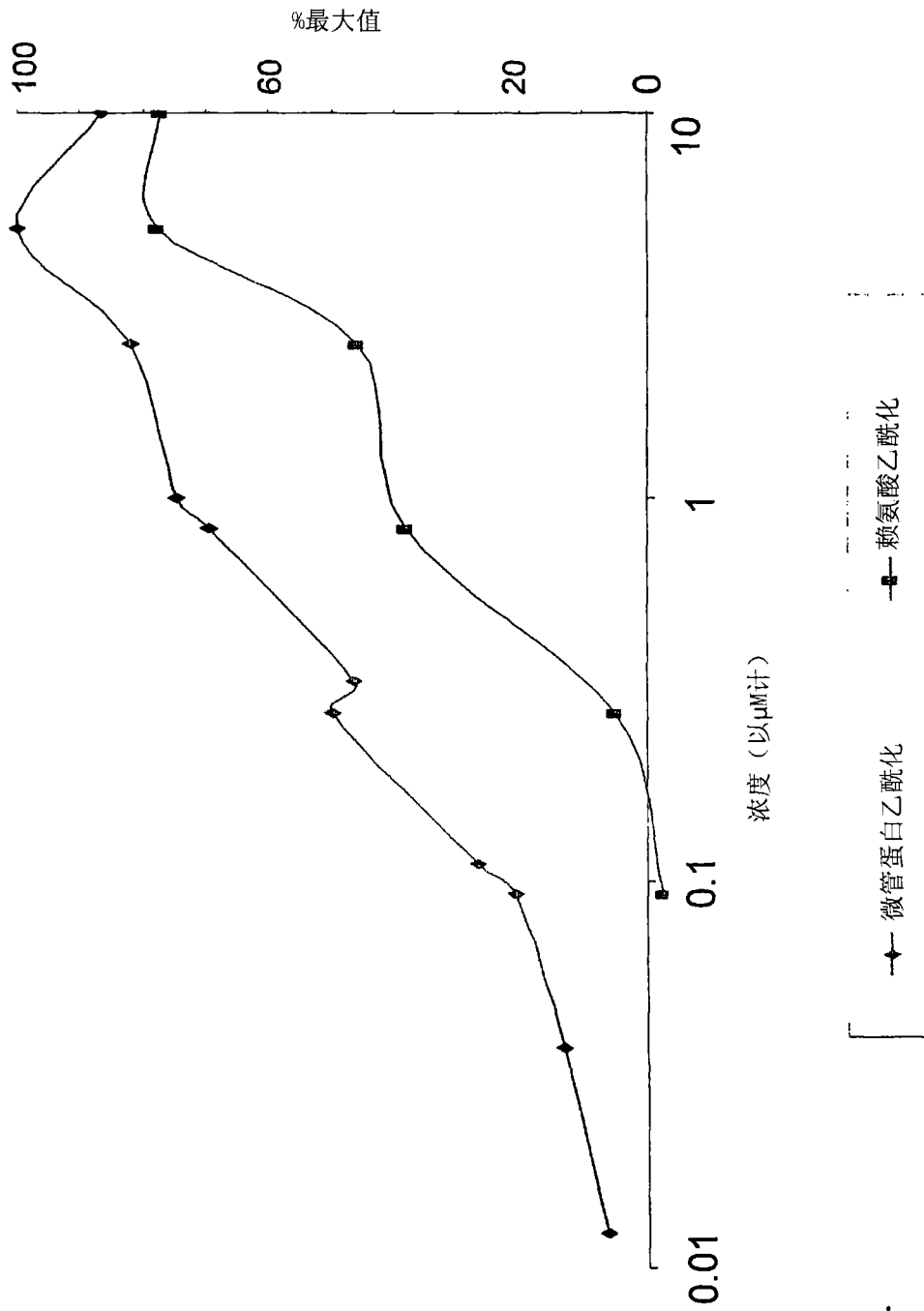


图45

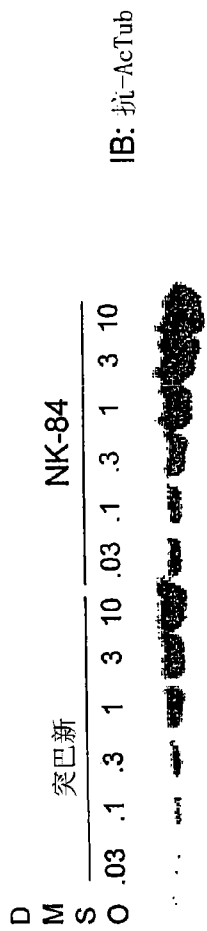
# NKI-84-1 特异性



293T

图46

突巴新和NK-84对微管蛋白乙酰化的影响



RPMI-8226

图47

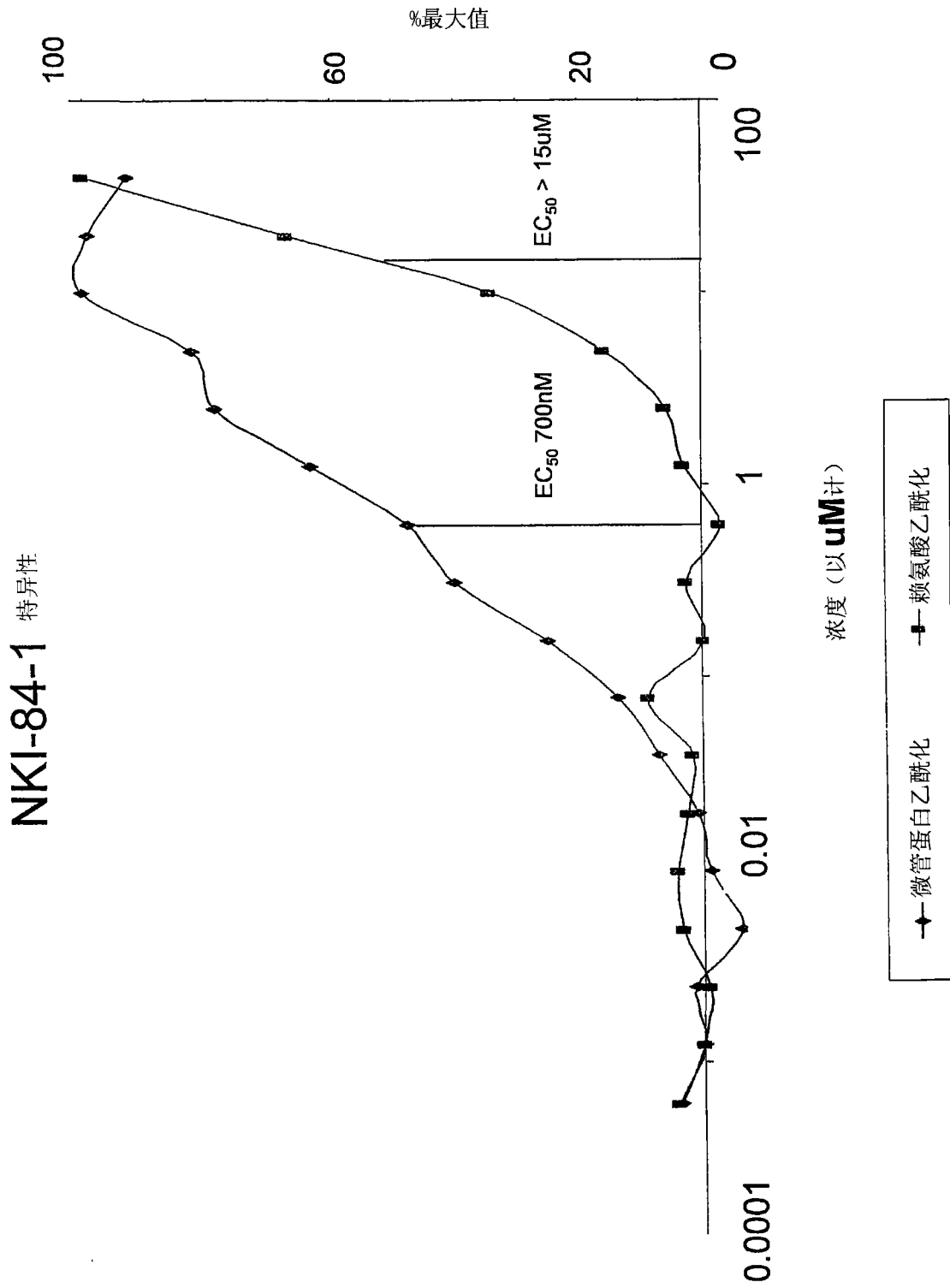


图48

A549

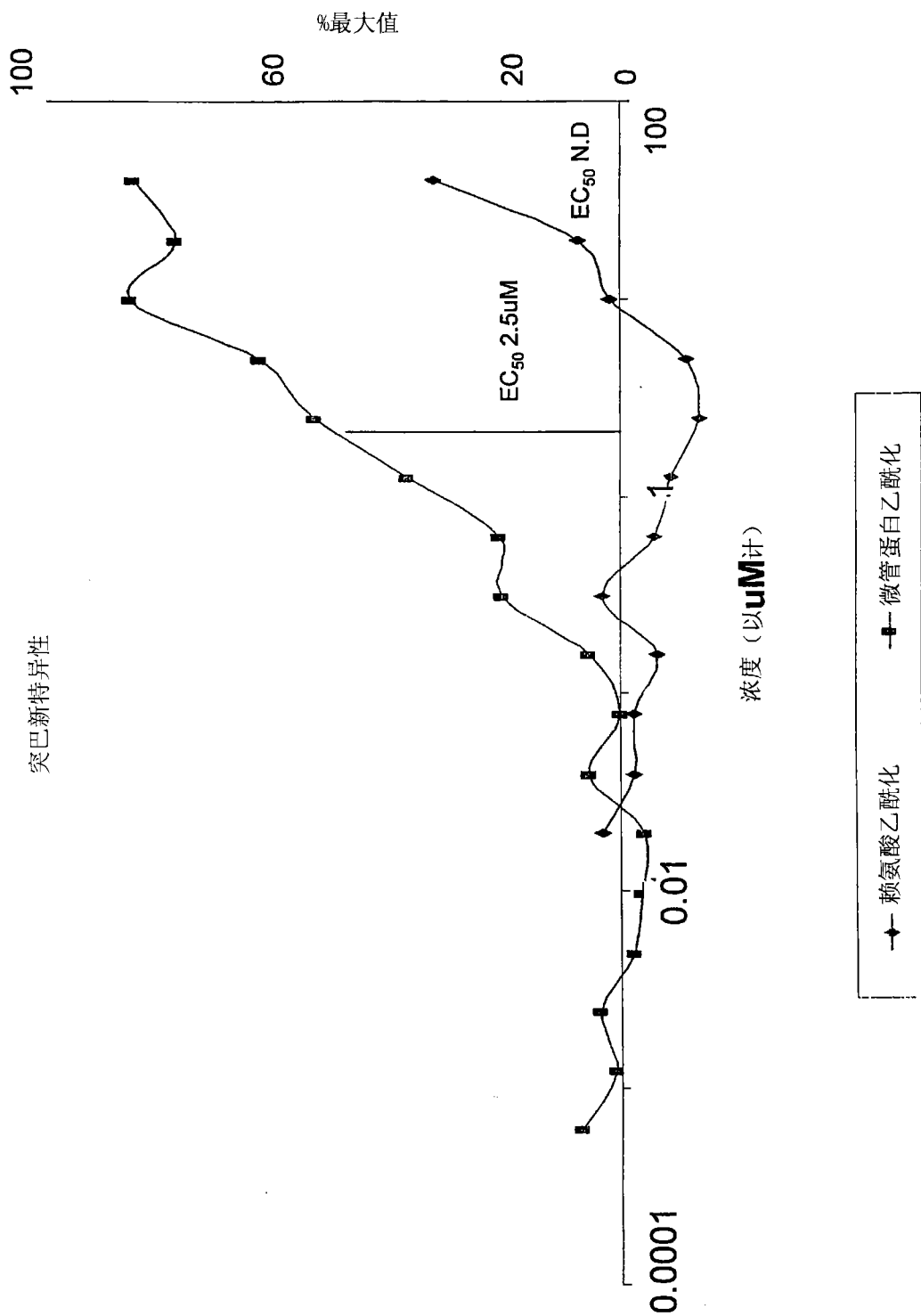


图49

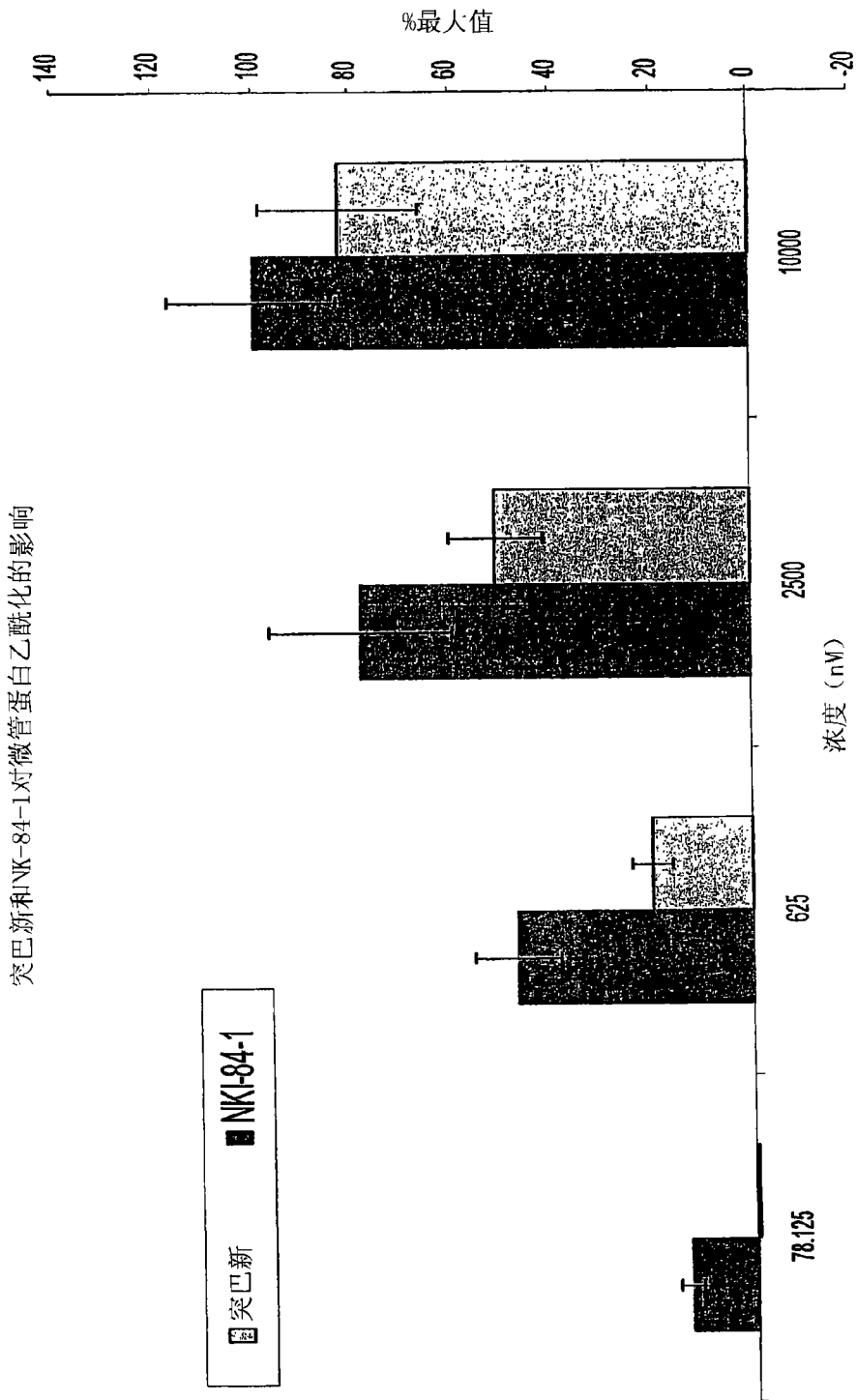


图 50

A549

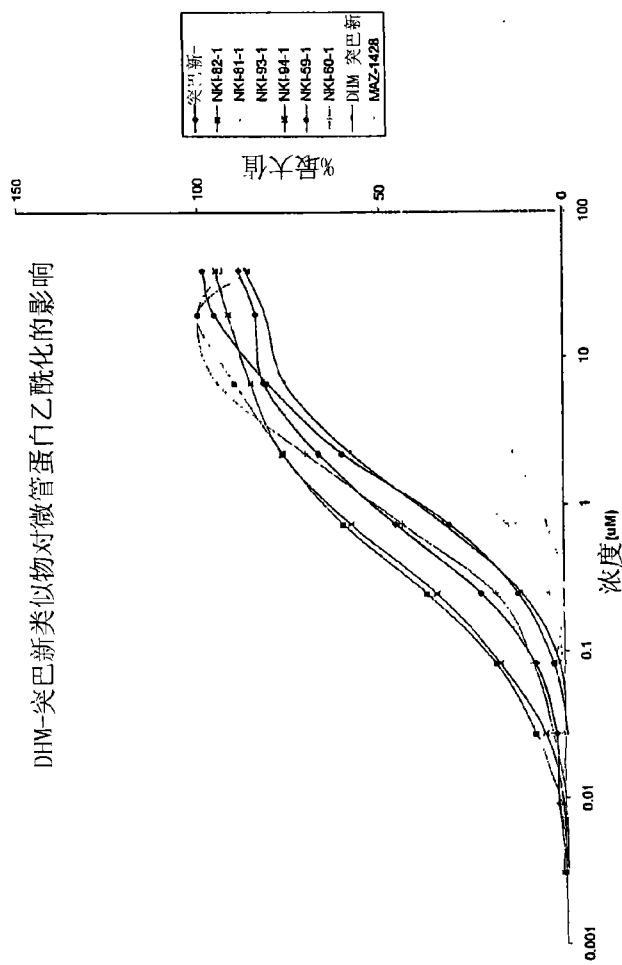


图51

系列1类似物: TDAC抑制活性

	HDAC抑制作用	TDAC抑制作用
突巴新	7.2 $\mu\text{M}$	0.9 $\mu\text{M}$
DIH-突巴新	25 $\mu\text{M}$	1.5 $\mu\text{M}$
<b>NKI-59-1</b>	11 $\mu\text{M}$	1.5 $\mu\text{M}$
<b>NKI-60-1</b>	3 $\mu\text{M}$	0.9 $\mu\text{M}$
<b>NKI-82-1</b>	1.5 $\mu\text{M}$	0.45 $\mu\text{M}$
<b>NKI-84-1</b>	1.5 $\mu\text{M}$	160 nM
<b>NKI-94-1</b>	1.6 $\mu\text{M}$	0.5 $\mu\text{M}$
<b>NKI-81-1</b>	13 $\mu\text{M}$	3.8 $\mu\text{M}$

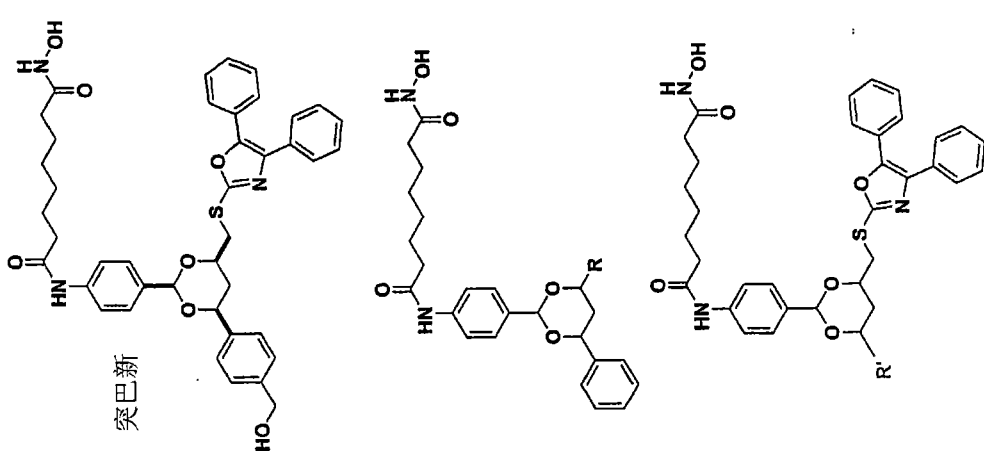
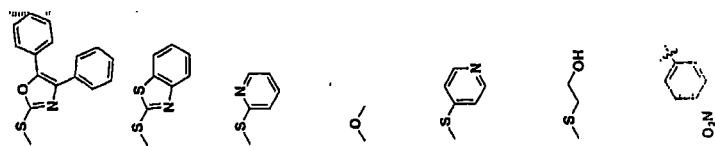
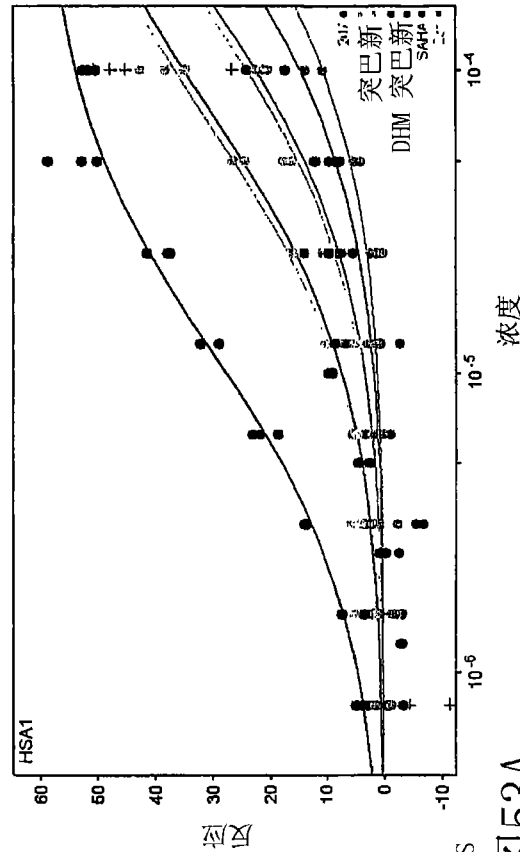
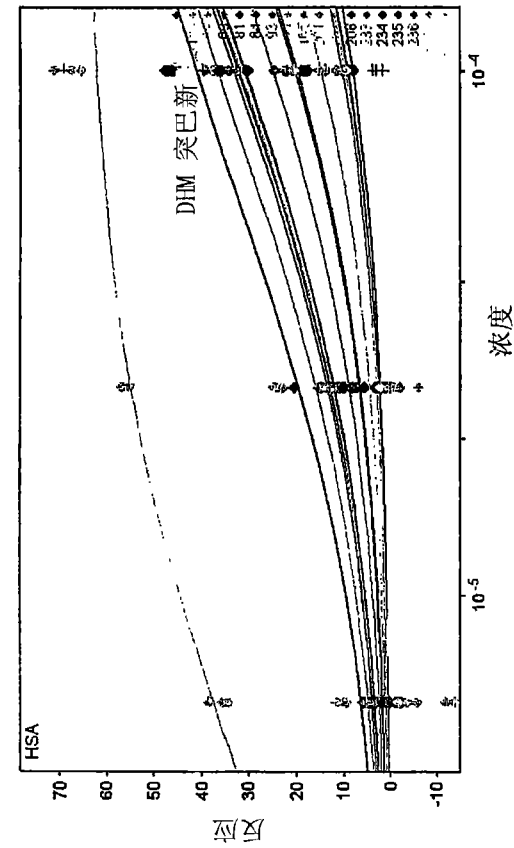


图52



	平均 KD (nM)	平均 KD (M)	结合百分数
DHM 突巴新	96.85	9.69E-05	87.5%
突巴新	5.53	5.53E-06	99.2%
59	100.8	1.01E-04	87.1%
60	67.3	6.73E-05	91.0%
81	244.25	2.44E-04	73.6%
84	80.85	8.09E-05	89.4%

94	95.8	9.58E-05	87.7%
----	------	----------	-------

201	73.7	7.37E-05	90.2%
207	202.75	2.03E-04	77.0%
208	184.75	1.85E-04	78.6%
233	99.8	9.98E-05	87.2%
234	563.5	5.64E-04	54.7%
235	676	6.76E-04	50.1%
236	108	1.08E-04	86.3%

ADME-Tox: 通过SPR结合的HAS

图53A

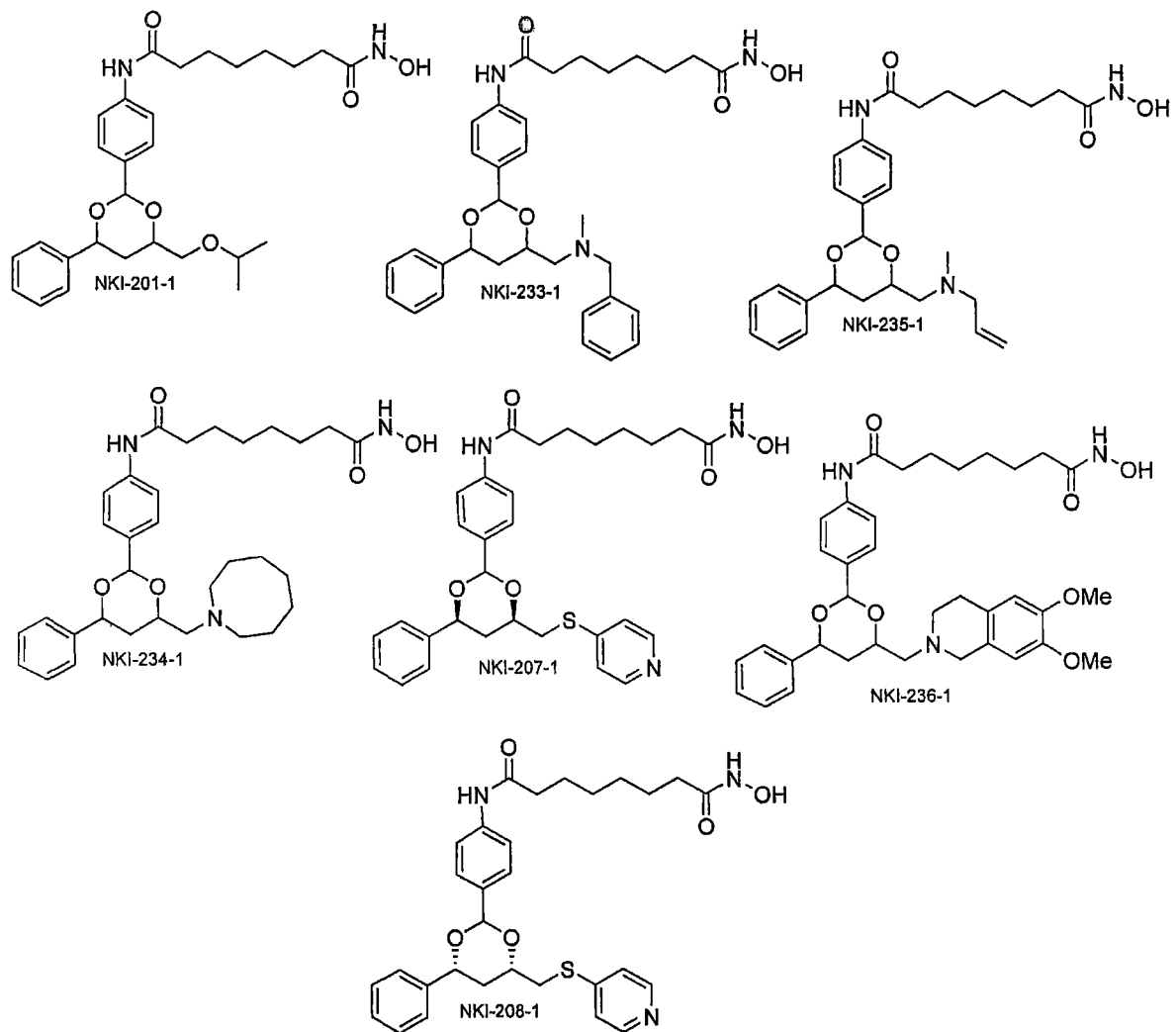
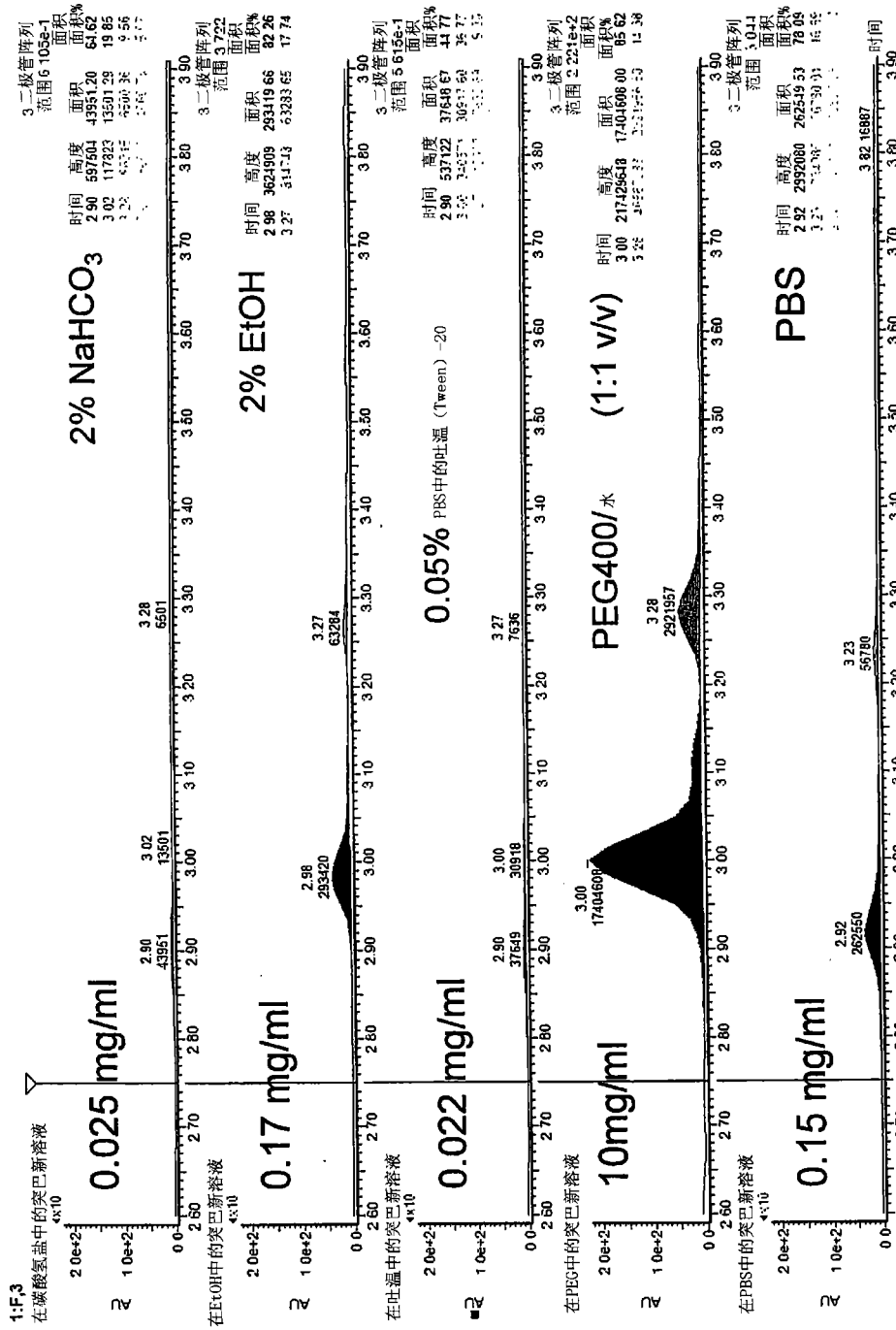


图53B



ADME: 对于小鼠MM模型和PK的溶解性测试

图54

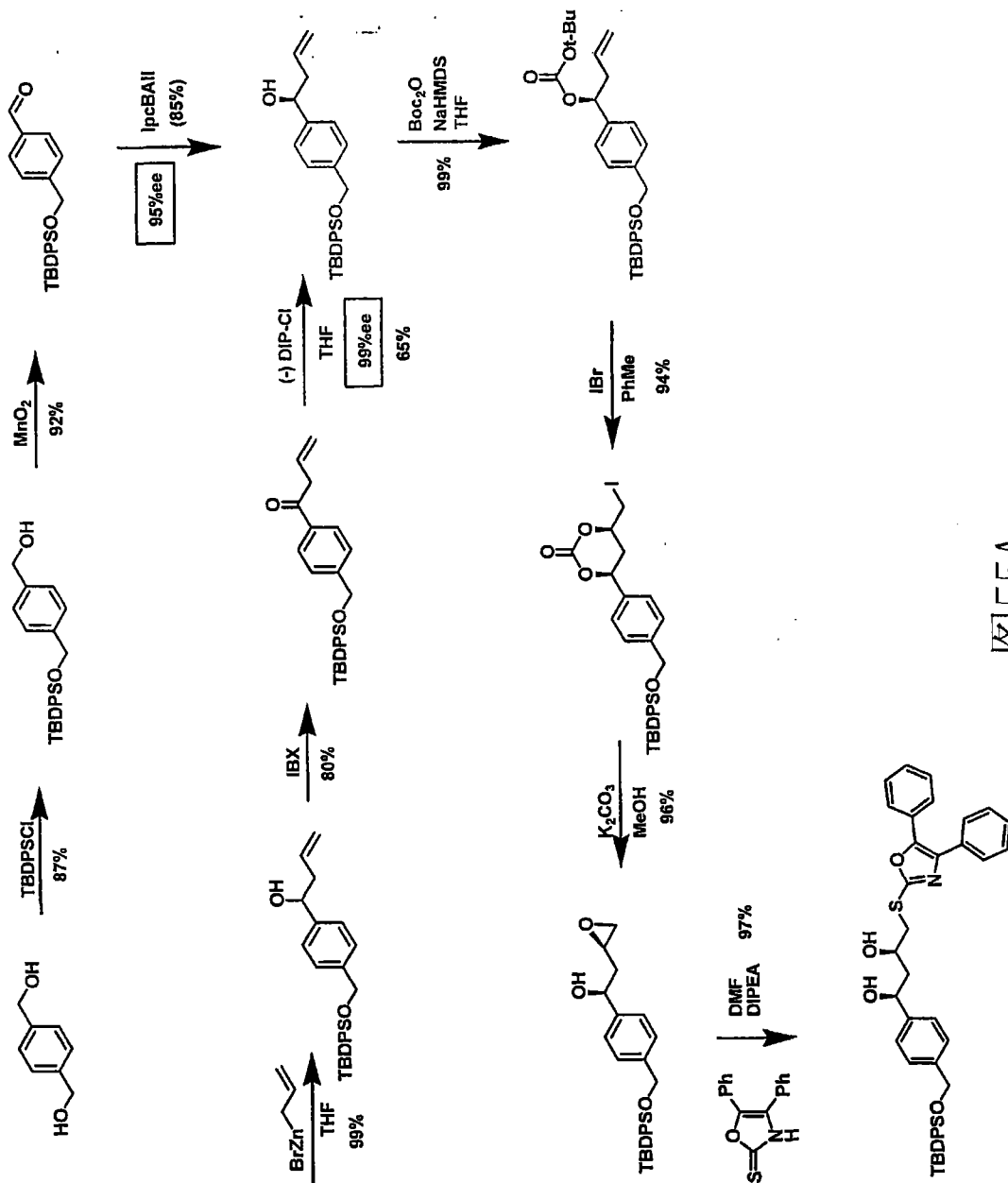


图55A

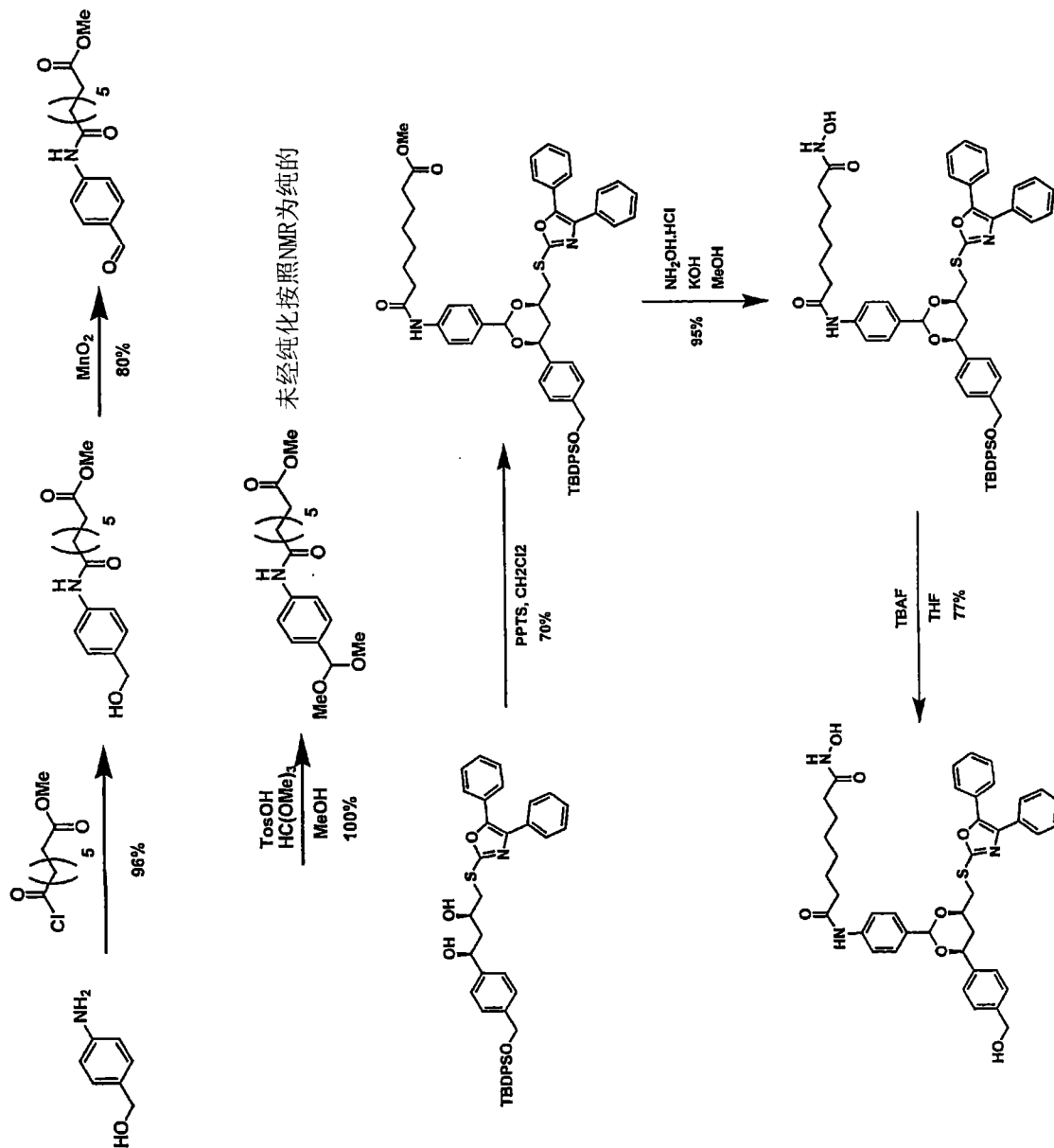


图55B

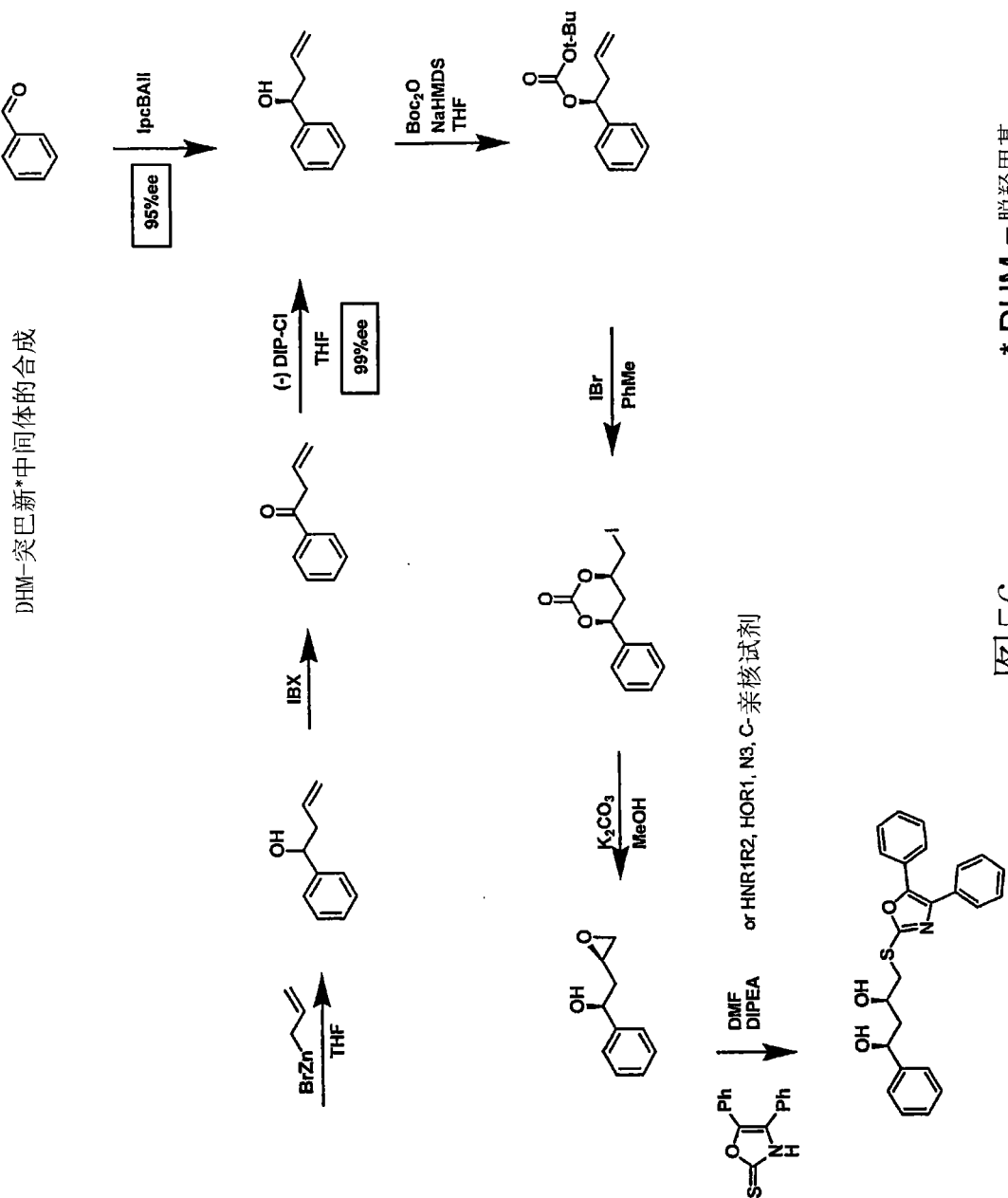


图56



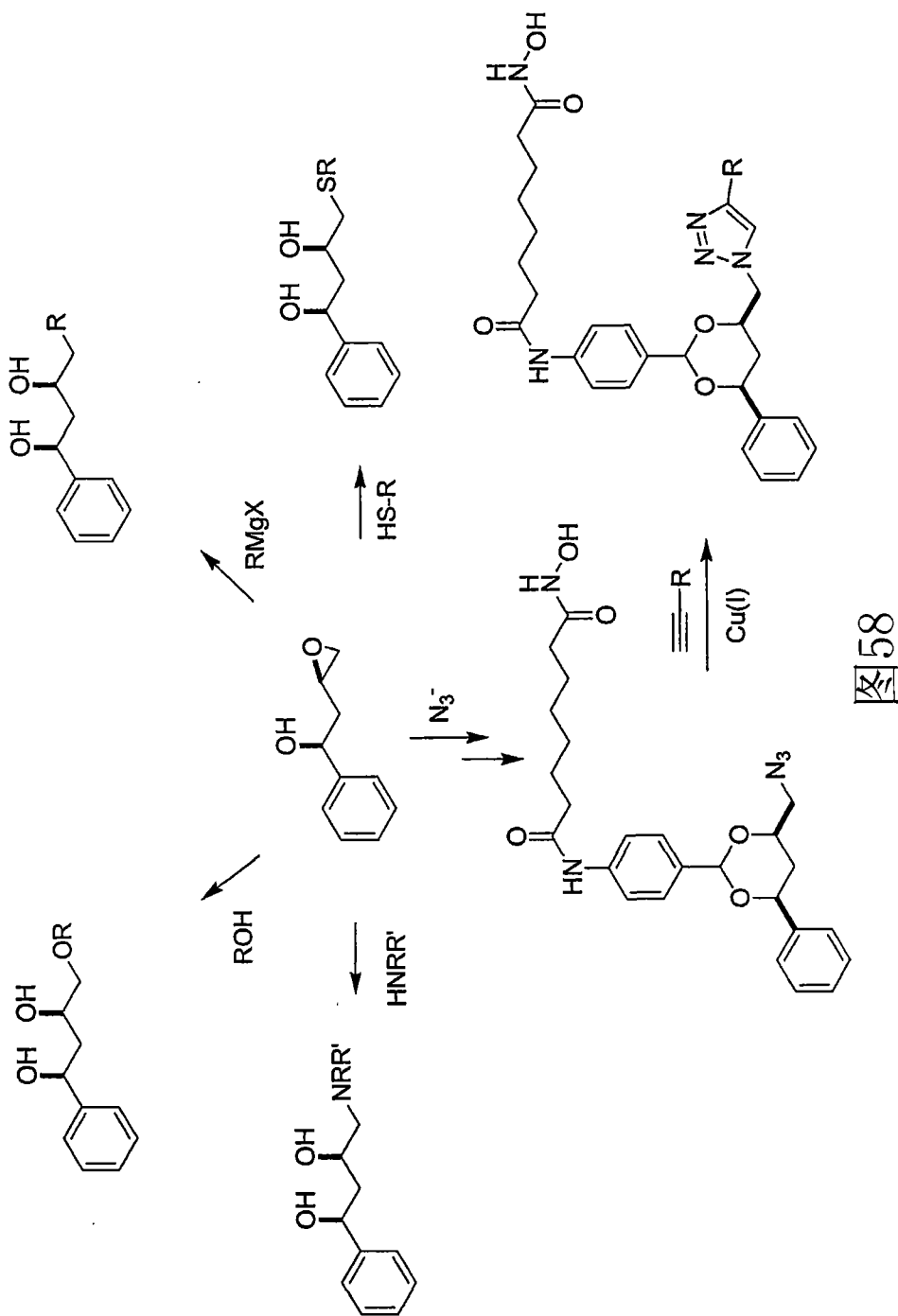
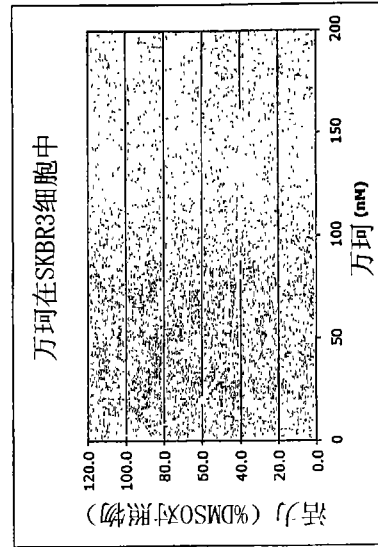
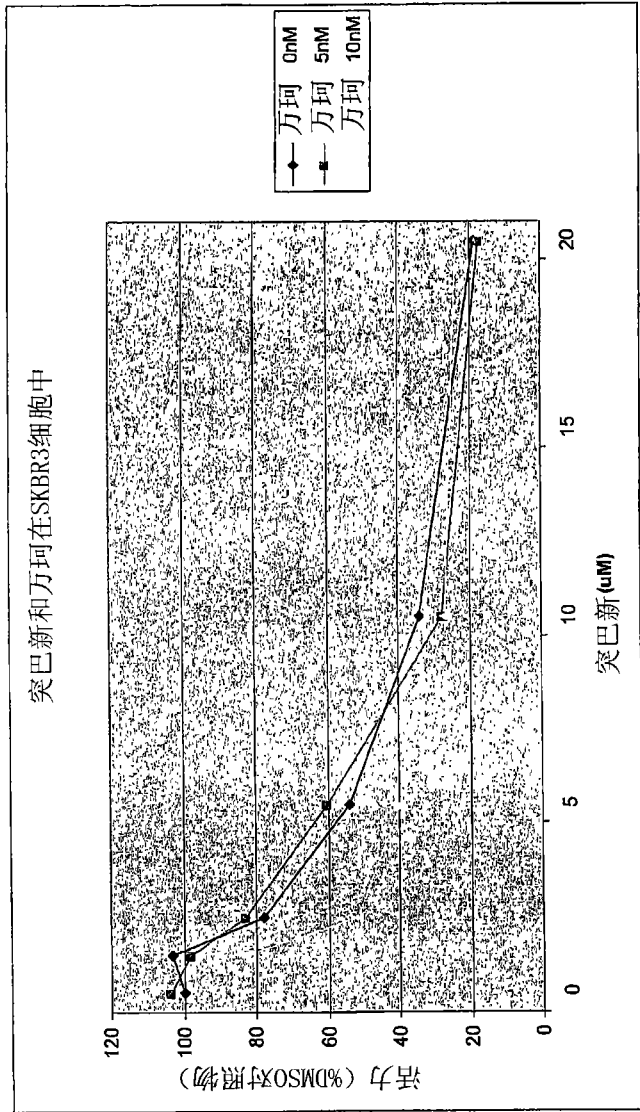


图 58



乳癌中的HDAC6: 突巴新赋予硼替佐米敏感性

图59