

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 371 630**

51 Int. Cl.:
A61K 38/12 (2006.01)
A61K 38/15 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 13/08 (2006.01)
C12Q 1/34 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02760663 .1**
96 Fecha de presentación: **20.08.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1426054**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.06.2004**

54 Título: **USO MEDICINAL DE UN INHIBIDOR DE HISTONA DESACETILASA Y MÉTODO PARA EVALUAR SU EFECTO ANTITUMORAL.**

30 Prioridad:
21.08.2001 JP 2001250846

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
05.01.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
05.01.2012

73 Titular/es:
Astellas Pharma Inc.
3-11, Nihonbashi-Honcho 2-chome, Chuo-ku
Tokyo 103-8411, JP

72 Inventor/es:
SASAKAWA, Yuka y
NAOE, Yoshinori

74 Agente: **de Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 371 630 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Uso medicinal de un inhibidor de histona desacetilasa y método para evaluar su efecto antitumoral.

Campo técnico.

La presente invención se refiere a un agente terapéutico para el cáncer de próstata.

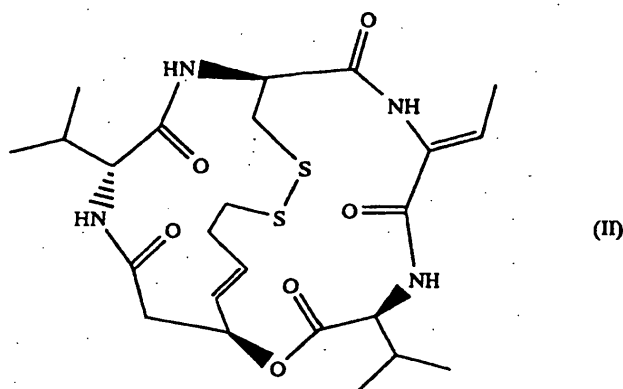
5 **Técnica de base.**

10 En los últimos años, está ganando reconocimiento la “medicina a la medida” que tiene en cuenta las diferencias individuales entre pacientes, y se considera necesaria la búsqueda de un marcador para distinguir entre un cáncer contra el cual un agente farmacológico es eficaz y un cáncer contra el cual el agente farmacológico es ineficaz. Se trata de mejorar éticamente y médicamente la compensación del coste del tratamiento con la medicación, administrando un agente farmacéutico a los pacientes después de comprobar previamente la probabilidad de que el mismo tenga efecto, para así mejorar la eficacia y evitar la toxicidad del agente farmacéutico, y para reducir el uso no significativo del agente farmacéutico. En el tratamiento del cáncer, siempre se ha deseado el desarrollo de un método para predecir la eficacia de los agentes anticancerosos, porque ello podría ser un medio importante para hacer un puente sobre la brecha entre el estudio básico y la aplicación clínica.

15 Además, en relación con una sustancia o un compuesto del que se ha afirmado de un modo general que tiene actividad antitumoral, se ha indicado que, cuando el informe está basado solamente en resultados obtenidos *in vitro*, tales resultados no conducen directamente a la predicción de resultados *in vivo*. En otras palabras, es un problema el hecho de que una sustancia que muestra actividad antitumoral *in vitro* no muestre necesariamente actividad antitumoral *in vivo*, y resulta difícil la aplicación de una sustancia que muestra actividad antitumoral *in vitro* directamente como agente anticanceroso.

20

Por ejemplo, se ha publicado que un compuesto representado por la fórmula (II)



25

30

introduce una potente actividad antitumoral inhibiendo selectivamente la histona desacetilasa (se ha publicado también que esta sustancia causa una elevada acetilación de la histona en una célula tratada con esta sustancia y, como consecuencia, induce la actividad del control transcripcional de varios genes, actividad inhibidora del ciclo celular y actividad inhibidora de la apoptosis (documento JP-B-7-64872, H. Nakajima et al, Exp. Cell Res. 241, 126 - 133 (1998)). Sin embargo, ninguna publicación ha establecido un factor capaz de predecir un efecto antitumoral de este compuesto, y, tal como está la situación, todavía se han de resolver muchos problemas tales como si los resultados *in vitro* valen directamente *in vivo*, si el compuesto muestra o no un efecto práctico *in vivo* en cualquier tumor, y problemas similares.

35

40

La histona desacetilasa es una enzima metalo-desacetilada en la que el Zn está coordinado en el centro activo (M. S. Finin et al, Nature, 401, 188 - 193 (1999)). Se considera que esta enzima cambia la afinidad para el DNA de varias histonas acetiladas. Un fenómeno biológico directo que esto trae consigo son cambios en la estructura de la cromatina. La unidad mínima de la estructura de cromatina es un nucleosoma en el que un DNA de 146 pb está enrollado 1,8 veces de forma contraria a la de las agujas del reloj alrededor de un octámero de histona (H2A, H2B, H3 y H4, 2 moléculas cada una, histona nuclear). La histona nuclear estabiliza la estructura del nucleosoma por cuanto la carga positiva en el terminal N de cada proteína histona interacciona con el DNA. La acetilación de la histona está controlada por el equilibrio entre la reacción de acetilación, en la que está implicada la histona acetil transferasa, y la reacción de desacetilación, en la que está implicada la histona desacetilasa. La acetilación de la histona ocurre en un resto de lisina bien preservado evolutivamente, en el terminal N de la proteína histona, por lo que se

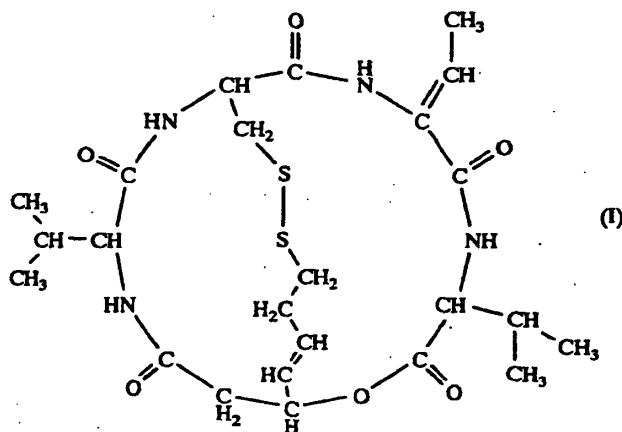
considera que la proteína histona nuclear pierde la carga en el terminal N, la interacción con el DNA se atenúa, y la estructura del nucleosoma se hace inestable. En consecuencia, se considera que la desacetilación de la histona procede al revés, o sea hacia la estabilización de la estructura del nucleosoma. Sin embargo, quedan aún muchos aspectos no aclarados, tales como que el grado de acetilación cambia la estructura de la cromatina, y cómo se relaciona con el control transcripcional inducido secundariamente, y similares.

Descripción de la invención.

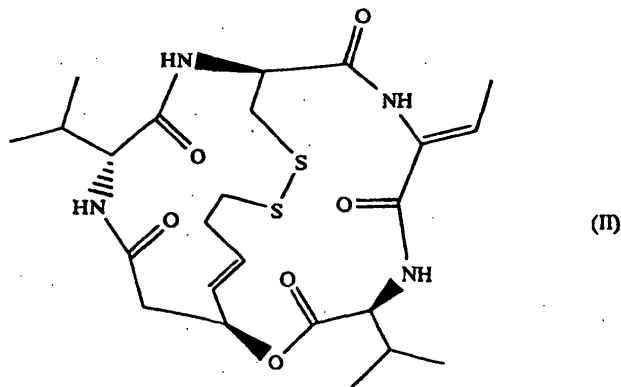
Un objeto de la presente invención es proporcionar un nuevo agente terapéutico para el cáncer de próstata. Otro objeto de la presente descripción es describir un método para evaluar y predecir el efecto antitumoral de un inhibidor de la histona desacetilasa.

Los autores de la presente invención han llevado a cabo estudios intensos en un intento de resolver los problemas anteriormente mencionados, y han encontrado un agente terapéutico para el cáncer de próstata que permite la confirmación del efecto antitumoral *in vivo*. Además, los autores de la presente invención han encontrado que el efecto antitumoral del inhibidor de la histona desacetilasa varía dependiendo del tipo de tumor, y que la variación se observa junto con cambios en el estado de expresión de un gen o proteína específico, y basándose en tal observación han establecido un método para evaluar el efecto antitumoral de un inhibidor de la histona desacetilasa, lo que tuvo como resultado la realización de la presente invención. En consecuencia, la presente invención proporciona lo siguiente:

(1) Un agente para el tratamiento del cáncer de próstata que comprende, como ingrediente activo, un compuesto representado por la fórmula (I) (que en adelante se denominará FK228; SEC ID N° 5)



en particular un compuesto representado por la fórmula (II) (que en adelante se denominará FR901228)



o una sal del mismo.

(2) El agente para el tratamiento del cáncer de próstata del apartado (1) antes mencionado, que tiene una acción antitumoral *in vivo*.

(3) Una composición farmacéutica para el tratamiento del cáncer de próstata, que comprende FK228, en particular la fórmula FR901228, y un vehículo aceptable farmacéuticamente.

(4) La composición farmacéutica para el tratamiento del cáncer de próstata del apartado (3) antes mencionado, que tiene una acción antitumoral *in vivo*.

5 (5) Un método para el tratamiento del cáncer de próstata, que comprende administrar una cantidad efectiva de FK228, en particular de la fórmula FR901228.

(6) El uso de FK228, en particular de la fórmula FR901228, para la producción de un agente para el tratamiento del cáncer de próstata.

10 (7) El uso del compuesto (6) antes mencionado, en el que el agente para el tratamiento del cáncer de próstata tiene una acción antitumoral *in vivo*.

Breve descripción de los dibujos.

15 La Fig. 1 es una gráfica que muestra el efecto antitumoral de FR901228 sobre el cáncer de próstata humano, en la que el eje vertical muestra la velocidad de crecimiento del tumor, el eje transversal muestra el número de días transcurridos desde la administración inicial, y la tasa de crecimiento del tumor se expresa en una proporción relativa del volumen del tumor después del día 0 relativo al volumen del tumor el día 0 tomada como 1.

La Fig. 2 incluye gráficas que muestran el efecto antitumoral de FR901228 sobre el linfoma humano, en la que el eje vertical muestra la proporción de ratones supervivientes y el eje transversal muestra el número de días transcurridos después de la implantación de las células tumorales.

20 La Fig. 3 incluye gráficas que muestran el efecto antitumoral de FR901228 sobre el cáncer de próstata humano ((a); PC-3) y el cáncer de riñón ((b); ACHN), en las que el eje vertical muestra la velocidad de crecimiento del tumor, el eje transversal muestra el número de días transcurridos después de la administración inicial; y la velocidad de crecimiento del tumor se expresa en una proporción relativa del volumen del tumor después del día 0 relativa al volumen del tumor el día 0 tomada como 1.

25 La Fig. 4 incluye gráficas que muestran la acción de FR901228 sobre la expresión del gen p21 *in vitro* (célula PC-3, célula ACHN).

(a), (b); El eje vertical muestra la cantidad relativa de expresión del gen p21, y el eje trasversal muestra el tiempo de contacto (h) con FR901228.

(c); El eje vertical muestra la cantidad relativa de expresión del gen p21.

30 La Fig. 5 incluye gráficas que muestran la acción de FR901228 sobre la expresión del gen p21 y la expresión del gen c-myc *in vivo* (célula PC-3, célula ACHN), en las que el eje vertical muestra la cantidad relativa de la expresión de los genes p21 o c-myc, y el eje trasversal muestra el número de días transcurridos después de la administración de FR901228.

Descripción detallada de la invención.

35 El agente terapéutico para el cáncer de próstata de la presente invención comprende, como ingrediente activo, un compuesto (FK228) representado por la fórmula (I) o una sal del mismo. De los compuestos de fórmula (I), es preferible un compuesto (FR901228) representado por la fórmula (II), que es un estereoisómero. Estos compuestos tienen una fuerte actividad inhibidora de la histona desacetilasa (Nakajima, H. et al; *ibid.* (1998)) y preferentemente está contenido el FR901228 en el agente terapéutico para el cáncer de próstata de la presente invención, porque tiene una más fuerte actividad inhibidora de la histona desacetilasa.

40 En la presente memoria, una simple referencia a FK228 significa un grupo de compuestos al margen de la estereoisomería, incluyendo los compuestos representados por la fórmula (II), a menos que se especifique otra cosa.

45 El FK228 y una sal del mismo son sustancias conocidas y disponibles. Por ejemplo, el FR901228, que es uno de los estereoisómeros del FK228, puede obtenerse cultivando una cepa capaz de producir FR901228 y perteneciente al género *Chromobacterium* bajo condiciones aerobias, y recuperando la sustancia del caldo de cultivo. Como cepa capaz de producir FR901228 y perteneciente al género *Chromobacterium*, por ejemplo, cabe mencionar *Chromobacterium violaceum* WB968 (FERM BP-1968). Más específicamente, puede obtenerse FR901228 a partir de una cepa productora de FR901228 de acuerdo con el método descrito en el documento JP-B-7-64872 (correspondiente a la

patente de EE.UU. n° 4977138). El FR901228 se recupera preferentemente a partir de una cepa capaz de producir FR901228 y perteneciente al género *Chromobacterium*, porque es más fácil de obtener. Sin embargo, el FR901228 sintético o semisintético tiene también ventajas, debido a que no se requieren etapas de purificación, o se requieren pocas. Del mismo modo, también pueden semisintetizarse FK228 distintos de FR901228, o sintetizarse totalmente de acuerdo con un método conocido convencionalmente. Más específicamente, pueden producirse de acuerdo con el método publicado por Khan W.Li, et al (J. Am. Chem. Soc., vol. 118, 7237 - 7238 (1996)).

La sal de FK228 es una sal aceptable biológicamente, generalmente no tóxica, y los ejemplos de la misma incluyen sales con una base inorgánica (p. ej. sales de metal alcalino tales como sal sódica, sal potásica, etc., sales de metal alcalinotérreo tales como sal cálcica, sal magnésica, etc., y sal amónica), sales con una base orgánica (p. ej. sales de amina orgánica tales como sal de trietilamina, sal de diisopropiletil amina, sal de piridina, sal de picolina, sal de etanolamina, sal de trietanolamina, sal de diciclohexilamina, sal de N,N'-dibenciletilendiamina, etc.), sales de adición de ácido inorgánico (p. ej. hidrocloreuro, hidrobromuro, hidrosulfato, fosfato, etc.), sales orgánicas de adición de ácido carboxílico o ácido sulfónico (p. ej. formiato, acetato, trifluoroacetato, maleato, tartrato, fumarato, metanosulfonato, bencenosulfonato, toluenosulfonato, etc.), sales con un aminoácido básico o ácido (p. ej. arginina, ácido aspártico, ácido glutámico, etc.), sales con una base y sales de adición de ácido.

El FK228 puede tener un estereoisómero (p. ej. FR901228) tal como un isómero óptico o un isómero geométrico, basado en un átomo de carbono asimétrico o un doble enlace, y todos los isómeros y las mezclas de los mismos están dentro del alcance de la presente invención.

Los compuestos solvato de FK228, FR901228 y sus sales (p. ej. compuestos de inclusión (p. ej. hidratos, etc.)) están también comprendidos dentro del alcance de la presente invención.

En la presente invención, *in vivo* e *in vitro* generalmente tienen el significado que se usa en el campo pertinente. Esto es, "*in vivo*" se refiere a un estado en el que una función o reacción biológica se expresa en el organismo vivo, e "*in vitro*" se refiere a una expresión de tal función o reacción en un tubo de ensayo (sistema de cultivo de tejidos, sistema de cultivo de células, sistema libre de células, etc.).

El tumor que va a ser la diana en la presente invención es un tumor en el cual el FK228, que es un inhibidor de la histona desacetilasa, ejerce un efecto antitumoral, y los ejemplos del mismo incluyen el cáncer de próstata, en donde el efecto *in vivo* es especialmente acusado. La presente invención muestra el buen efecto antitumoral *in vivo*, en particular contra este tumor.

El agente terapéutico para el cáncer de próstata de la presente invención puede ser usado como preparado farmacéutico en forma de un sólido, un semisólido o un líquido que contiene FK228, o una sal del mismo, como ingrediente activo mezclado con un vehículo o excipiente orgánico o inorgánico adecuado para la aplicación oral o parenteral. El ingrediente activo puede ser mezclado con un vehículo convencional no tóxico, aceptable farmacéuticamente, por ejemplo polvo, comprimido, pella, cápsula, supositorio, líquido, emulsión, suspensión, aerosol, pulverización, y otra forma adecuada para ser usada. En caso necesario también pueden usarse agentes auxiliares, estabilizantes, espesantes y similares. Estos vehículos y excipientes pueden usarse después de un tratamiento de esterilización en caso necesario, o pueden esterilizarse después de la formulación en un preparado. El FK228 o una sal del mismo puede estar contenido en cantidad suficiente para proporcionar un efecto antitumoral, en el agente terapéutico para el cáncer de próstata.

Cuando el agente farmacéutico se aplica a una persona, preferentemente se aplica mediante administración intravenosa, intramuscular u oral. Aunque la dosis terapéuticamente eficaz de FK228 o una sal del mismo, que son ingredientes activos, varía dependiendo de la edad y la condición de cada paciente a tratar, y del tipo de cáncer, generalmente es de 0,1 a 100 mg, preferentemente de 1 a 50 mg, más preferentemente de 5 a 30 mg al día en la cantidad de FK228, por unidad de superficie corporal (m²) de la persona, en el caso de la administración intravenosa para el tratamiento del tumor.

La presente descripción describe también un método de evaluación del efecto antitumoral del inhibidor de la histona desacetilasa. Usando este método, puede encontrarse un inhibidor de la histona desacetilasa que puede ejercer un efecto antitumoral sobre las células tumorales diana, sin administrar realmente el inhibidor al organismo humano.

Por "inhibidor de la histona desacetilasa" se entiende un compuesto que se une al sitio activo de la histona desacetilasa competitivamente con el sustrato, o un compuesto que se une a un sitio distinto del sitio activo de la histona desacetilasa y tiene la acción de alterar la actividad enzimática de la histona desacetilasa, y comprende un compuesto ya conocido como inhibidor de la histona desacetilasa cuyo uso es conocido, todos los compuestos (sintéticos o naturales) de los que se ha publicado que tienen una actividad inhibidora de la histona desacetilasa, y todos los compuestos que se publiquen en el futuro. Para ser concretos, cabe mencionar el FK228 anteriormente mencionado, una sal del mismo y un derivado del mismo (p. ej. FK228 acetilado, una forma tiol en la que el enlace S-S ha sido reducido, etc.). Además, la tricostatina A, el butirato sódico, el ácido suberoilánilida hidroxámico (SAHA), el MS-

275, el péptido que contiene ácido hidroxámico cíclico, la apicidina, la trapoxina y similares, son también compuestos cuya actividad inhibitoria de la histona desacetilasa ha sido publicada.

5 El método de evaluación del efecto antitumoral del inhibidor de la histona desacetilasa de la presente descripción incluye al menos (i) una etapa de tratamiento de una célula de ensayo con un inhibidor de la histona desacetilasa, y (ii) una etapa de medida del cambio en la expresión de un gen y/o una proteína específicos en la célula de ensayo, antes y después del tratamiento con dicho inhibidor, y comparar las dos cantidades de la expresión. Cada etapa se explica con detalle a continuación.

(i) Etapa de tratamiento de una célula de ensayo con un inhibidor de la histona desacetilasa.

En esta etapa, se cultiva una célula de ensayo en una solución que contiene un inhibidor de la histona desacetilasa.

10 Aunque la célula de ensayo a utilizar en la presente descripción no está limitada de un modo particular, siempre y cuando tenga histona desacetilasa, como la evaluación del efecto antitumoral del inhibidor de la histona desacetilasa, en particular la especificidad del inhibidor por el sitio del tumor, es uno de los problemas de la presente descripción, la célula de ensayo a usar se deriva preferentemente de un tumor sobre el que se desea examinar el efecto. Por ejemplo, cuando se ha de evaluar el efecto sobre el cáncer de próstata, se usan células PC-3, que son células de 15 de cáncer de próstata humano cultivadas, y similares. Varias células cancerosas humanas cultivadas para usarlas como células de ensayo, incluyendo estas células cancerosas, están disponibles comercialmente, o son disponibles en diversos bancos de células, y similares. Para el examen del efecto de un tratamiento a largo plazo, o de la eficacia para pacientes individuales, es decir medicina hecha a la medida, es posible cultivar una célula cancerosa que puede ser obtenida a partir de un tumor del paciente y usar la célula cancerosa como célula de ensayo.

20 El inhibidor de la histona desacetilasa a usar en esta etapa es como se mencionó anteriormente.

Las condiciones de tratamiento de la célula de ensayo y el inhibidor de la histona desacetilasa están exentas de cualquier limitación particular, siempre y cuando el efecto del inhibidor de la histona desacetilasa pueda ser ejercido en su totalidad y ajustado apropiadamente de acuerdo con factores tales como el tipo de célula de ensayo a usar y en tipo de inhibidor de la histona desacetilasa a ensayar, y similares.

25 El disolvente para dar una solución del inhibidor de la histona desacetilasa no está particularmente limitado, siempre y cuando pueda disolver el inhibidor de la histona desacetilasa y no muestre toxicidad hacia la célula de ensayo. Generalmente, se prepara una solución concentrada con etanol, PEG400, solución al 10% de HCO-60, dimetil-sulfóxido y similares, un disolvente mixto de los mismos y similares, se diluye a la concentración deseada con un medio de cultivo, tampón fisiológico y similares, y se usa. La concentración del inhibidor de la histona desacetilasa en la solución es generalmente de 0,001 a 1000 nM, preferentemente de 0,01 a 100 nM, más preferentemente de 30 0,1 a 10 nM, y en algunos casos la solución se diluye en serie y se prepara una serie de diluciones y se usa.

En el método de evaluación de la presente descripción, el número de las células de ensayo que se han de inocular puede aumentarse o disminuirse apropiadamente dependiendo del tiempo de tratamiento, y similares, con un inhibidor de la histona desacetilasa. Generalmente es aproximadamente de 1×10^3 a 1×10^6 células, preferentemente 35 aproximadamente de 1×10^4 a 1×10^5 células por mL de medio de cultivo.

El tiempo de tratamiento (tiempo de cultivo) de la célula de ensayo con un inhibidor de la histona desacetilasa se ajusta apropiadamente de acuerdo el tipo y la concentración de las células de ensayo y el inhibidor, y otras condiciones del cultivo, y varía dependiendo del objeto de evaluación, pero generalmente es de 1 a 100 h, preferentemente de 1 a 72 h. Cuando se desea la confirmación de un efecto antitumoral mantenido a largo plazo, se ajusta un tiempo de tratamiento comparativamente más largo. La célula de ensayo se trata (se cultiva) generalmente a 37°C en presencia de 5% de CO₂ + 95% de O₂. 40

(ii) Etapa de medida del cambio en la expresión de un gen específico y/o una proteína específica en la célula de ensayo antes y después del tratamiento con dicho inhibidor, y de comparación de la cantidad de ambas expresiones.

45 Esta etapa puede llevarse a cabo por cualquier método por el cual pueda observarse la cantidad de expresión de un gen específico y/o una proteína específica en la célula de ensayo. Por ejemplo, pueden mencionarse los procedimientos descritos a continuación.

(1) Un gen, en particular mRNA, o proteína es extraído de una célula de ensayo antes del tratamiento con un inhibidor de la histona desacetilasa.

50 (2) Como se describe con detalle en la etapa (i), anteriormente expuesta, de tratamiento de una célula de ensayo con un inhibidor de la histona desacetilasa, después de que se ha tratado la célula de ensayo con el inhibidor de la

histona desacetilasa y se ha cultivado durante un periodo de tiempo dado, un gen, en particular mRNA, o una proteína se extraen de la célula tratada de la misma manera que en el apartado (1) anteriormente expuesto.

(3) Usando una sustancia que tiene una afinidad específica para un gen específico (o una proteína específica), se detecta el gen específico (o la proteína específica). Aquí, gen específico (o proteína específica) significan un gen o proteína que muestra un cambio en la cantidad de su expresión antes y después del tratamiento con el inhibidor de la histona desacetilasa, y muestra una correlación entre el cambio en la cantidad de expresión y el efecto antitumoral del inhibidor de la histona desacetilasa. Específicamente, cabe mencionar el gen p21 (proteína) y el gen c-myc (proteína). El gen p21 es un gen regulador del ciclo celular implicado en la supresión del progreso del ciclo celular, y se sabe que su producto inhibe la actividad del complejo de cinasa/ cinasa dependiente de ciclina, bloqueando así el progreso del ciclo celular. El gen c-myc codifica una proteína intracelular y su expresión génica cambia de forma acusada de acuerdo con el crecimiento de la célula, el desarrollo de la célula y la canceración. En consecuencia, la implicación del producto génico en el crecimiento celular está atrayendo la atención.

Para un gen específico (o una proteína específica) a medir en la presente descripción, un tipo de medida es suficientemente útil, pero cuando se necesita conocer un efecto antitumoral más detallado, preferentemente se miden al mismo tiempo dos o más tipos de genes específicos (o de proteínas específicas).

La sustancia que tiene afinidad específica para el gen específico o para la proteína específica está libre de cualquier limitación particular siempre y cuando tenga una sensibilidad tal que permita la detección de expresión en las células de ensayo. Como se usa en el presente texto, por "afinidad específica" se entiende la propiedad de hibridarse o unirse solamente a un gen o proteína objetos. Como sustancia para detectar el gen específico, cabe mencionar una sustancia completamente complementaria a la totalidad o a una parte de dicho gen, o una sustancia que contiene una o varias discrepancias dentro de la extensión que satisface la propiedad antes mencionada. Entre los ejemplos específicos se incluyen oligo- o poli-nucleótidos que contienen una parte o la totalidad de la secuencia de bases del gen y sus secuencias complementarias, y similares, y se elige una sustancia apropiada dependiendo de la forma del gen que hay que detectar. La derivación de la sustancia no está particularmente limitada siempre y cuando tenga una afinidad específica para el gen, y puede ser sintetizada o formada segmentando una parte necesaria del gen y purificando la parte por un método convencional. La sustancia puede ser marcada con una sustancia fluorescente, una enzima, un radioisótopo, y similares. Como sustancia a emplear para detectar una proteína específica, por ejemplo, cabe mencionar un anticuerpo que tenga afinidad específica para la proteína, o un fragmento del mismo. La afinidad específica del mismo significa la capacidad para reconocer específicamente la proteína por una reacción antígeno – anticuerpo y unirse a ella. El anticuerpo y el fragmento del mismo no están particularmente limitados, siempre y cuando puedan unirse específicamente a la proteína, y puede ser cualquiera entre un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, y fragmentos funcionales de los mismos. Estos anticuerpos y sus fragmentos funcionales pueden ser producidos de acuerdo con un método empleado generalmente en el campo pertinente. Estos anticuerpos y sus fragmentos pueden ser marcados con una sustancia fluorescente, una enzima, un radioisótopo y similares.

La extracción de un gen, en particular de mRNA, así como la extracción de una proteína, de la célula de ensayo puede llevarse a cabo de acuerdo con un método empleado generalmente en el campo pertinente, o por una combinación apropiada de tales métodos. Cuando se extrae mRNA, su expresión se examina de acuerdo con un método empleado generalmente en el campo pertinente, tal como transferencia Northern, RT-PCR y similares, usando una sustancia que tiene afinidad específica para el gen específico anteriormente mencionado. Por otra parte, cuando se extrae una proteína, su expresión se examina de acuerdo con un método empleado generalmente en el campo pertinente, tal como la inmunotransferencia, la transferencia Western y similares, usando una sustancia (un anticuerpo, un fragmento del mismo, etc.) que tiene afinidad específica para la proteína específica anteriormente mencionada.

De esta manera, se miden los cambios en la expresión de un gen específico (o una proteína específica) en una célula de ensayo antes y después del tratamiento con un inhibidor de la histona desacetilasa, y se comparan para determinar si el inhibidor de la histona desacetilasa ensayado ha mostrado efectivamente o no una actividad antitumoral en la célula ensayada. Cuando se usa como índice el gen p21 (o la proteína) y el tratamiento con un inhibidor de la histona desacetilasa aumenta la cantidad de expresión, se determina que el inhibidor tiene un efecto antitumoral contra un tumor del que se ha derivado la célula de ensayo. Cuando se usa como índice el gen c-myc (o la proteína) y el tratamiento con un inhibidor de la histona desacetilasa hace disminuir la cantidad de expresión, se determina que el inhibidor tiene un efecto antitumoral contra un tumor del que se ha derivado la célula de ensayo. Cuando se usa como célula de ensayo una célula tumoral obtenida clínicamente de un paciente, puede conseguirse la predicción del efecto antitumoral que refleja la especificidad individual del paciente.

En la presente descripción, puede proporcionarse un método de cribado de un inhibidor de la histona desacetilasa que tiene una actividad antitumoral específica del sitio del tumor (tipo), utilizando el método de evaluación anteriormente mencionado del efecto antitumoral del inhibidor de la histona desacetilasa. La especificidad por el sitio del tumor de cada inhibidor puede determinarse usando una célula de ensayo derivada de un tumor diana, tratando con un inhibidor de la histona desacetilasa cuyo efecto se ha de examinar, y determinando la presencia o no del efecto antitumoral de acuerdo con el método anteriormente mencionado.

La presente memoria describe además un método para obtener un gen para que sea un índice para la predicción de la eficacia del FK228. Analizando la expresión del gen (grupo) obtenido por tal método, puede obtenerse la información de si el FK228 es o no útil para el tratamiento, de si el cáncer diana es afectado por el FK228, y similares, lo que puede contribuir a la "medicina hecha a la medida".

5 El método se lleva a cabo de forma específica como sigue.

(1) Etapa de tratamiento de la célula tumoral sensible a FK228 y la célula tumoral resistente a FK228, con FK228.

10 Aquí, la célula tumoral sensible a FK228 significa una célula tumoral del tipo de aquellas cuyo crecimiento suprime el FK228. Por ejemplo, cabe mencionar la célula del cáncer de próstata PC-3 como se muestra en los ejemplos descritos más adelante. Además, SC-6, que es una célula de cáncer gástrico, es un tipo célula tumoral sensible a FK228. Por otra parte, la célula tumoral resistente a FK228 es una célula tumoral del tipo de las que el FK228 no consigue manifestar la supresión de su crecimiento y FK228 no puede proporcionar un efecto de supresión tumoral sobre ella. Por ejemplo, puede mencionarse la célula de cáncer de riñón ACHN como se muestra en los ejemplos descritos más adelante. Además, la A498, que es una célula de cáncer de riñón, es un tipo de célula tumoral resistente a FK228.

15 El tratamiento de estas células tumorales con FK228 se lleva a cabo de la misma manera que en el apartado "Etapa de tratamiento de una célula de ensayo con un inhibidor de la histona desacetilasa" anteriormente expuesto.

(2) Etapa de selección de los genes que muestran aumento o disminución de la expresión mediante la etapa de tratamiento (1) anterior.

20 Esta etapa de selección de genes puede llevarse a cabo usando las técnicas descritas en la presente memoria y métodos empleados de un modo general en el campo pertinente. Preferentemente se emplea una técnica que usa un chip génico en vista de la ventaja de posibles análisis de una gran cantidad de expresiones génicas a la vez.

(3) Etapa de selección entre los genes seleccionados en la etapa (2) anterior.

(i) un gen que muestra aumento de la expresión debido al tratamiento con FK228, expresión más alta en la célula tumoral sensible a FK228 y expresión más baja en la célula tumoral resistente a FK228,

25 (ii) un gen que muestra aumento de la expresión debido al tratamiento con FK228, expresión más baja en la célula tumoral sensible a FK228 y expresión más alta en la célula tumoral resistente a FK228,

(iii) un gen que muestra disminución de la expresión debido al tratamiento con FK228, expresión más alta en la célula tumoral sensible a FK228 y expresión más baja en la célula tumoral resistente a FK228, o

(iv) un gen que muestra disminución de la expresión debido al tratamiento con FK228, expresión más baja en la célula tumoral sensible a FK228 y expresión más alta en la célula tumoral resistente a FK228.

30 En otras palabras, esta etapa está destinada a la selección de genes que muestran algunos cambios en la expresión (aumento o disminución) debido al tratamiento con FK228, y muestran un estado de expresión diferente dependiendo de si es sensible o insensible a FK228. Analizar el estado de expresión del gen (grupo) puede ser un medio útil para predecir la eficacia de FK228 sin administrar FK228.

35 El método de encontrar el aumento o la disminución de la expresión del gen puede llevarse a cabo de acuerdo con métodos empleados de un modo general en el campo pertinente, y se realiza usando las técnicas también descritas en la presente memoria. Preferentemente se emplea una técnica que utiliza un chip génico, en vista de la ventaja de posibles análisis de una gran cantidad de expresiones génicas a la vez.

Ejemplos.

40 La presente invención se explica específicamente y con detalle a continuación, haciendo referencia a los Ejemplos, que no han de considerarse limitantes.

Algunos de estos ejemplos han sido incluidos tan sólo con fines de referencia.

Ejemplo 1.**(1) Preparación del agente farmacéutico.**

Se pesó la cantidad necesaria de FR901228 y se añadió un disolvente (10% HCO-60/solución salina). La mezcla se trató con ultrasonidos para permitir la disolución. Una sustancia de control positivo Paclitaxel se disolvió en solución de Cremophor EL/etanol (1:1) a razón de 24 mg/mL antes del ensayo, y se conservó en un refrigerador. Al usarlo, se diluyó con una cantidad 9 veces mayor de solución salina fisiológica, a 2,4 mg/mL (componente del disolvente: 5% de Cremophor EL - 5% de etanol - 90% de solución salina).

(2) Animal de ensayo.

Para la prueba antitumoral del agente farmacéutico, se adquirieron ratones BALB/cANnNCrj-nu/nu (machos, 6 semanas de edad) de Charles River Japón y, después de la aclimatación durante no menos de una semana, se usaron para el ensayo. Los ratones fueron criados bajo un entorno SPF (libres de gérmenes patógenos específicos), y se les permitió el libre acceso al agua y al alimento.

(3) Tumor de ensayo.

La línea de células de cáncer de próstata humano cultivadas (PC-3, disponible de la Japanese Foundation for Cancer Research, Cancer Chemotherapy Center, Fundamental Research [Fundación Japonesa para la Investigación del Cáncer, Centro de Quimioterapia del Cáncer, Investigación Básica]) fue implantada por vía subcutánea 2 a 3 x 10⁷ células, en un ratón lampiño (atímico). Un tumor sólido desarrollado fue subcultivado no menos de 3 generaciones, y usado para el ensayo.

(4) Implantación experimental y agrupamiento.

Un tumor sólido subcultivado en un ratón lampiño fue implantando subcutáneamente en el lomo derecho de un ratón en forma de un fragmento cuadrado de tejido tumoral de aproximadamente 3 mm. Después de la implantación del tumor, cuando el volumen del tumor (1/2 x diámetro más largo X diámetro más corto²) alcanzó 100 a 300 mm³, los ratones fueron agrupados en 6 ratones por grupo para nivelar el tamaño del tumor.

(5) Administración.

La administración se inició el día del agrupamiento (día 0). Se administró por vía intravenosa FR901228 a un grupo de administración de FR901228, 3 veces cada 4 días (q4dx3) (3,2 y 1,8 mg/kg). Se administró por vía intravenosa Paclitaxel (24 mg/kg) durante 5 días consecutivos (qdx5) a un grupo de administración de paclitaxel como sustancia para control positivo. A un grupo de control o testigo se le administró (q4dx3) tan solo un disolvente (10% HCO-60/solución salina). La cantidad de líquido para cada administración se calculó (0,1 mL/10 g de peso corporal) basándose en el peso corporal medido el día de la administración. Obsérvese que 3,2 mg/kg/día (q4dx3) de FR901228 y 24 mg/kg/día (qdx5) eran las dosis máximas toleradas (MTD: maximum tolerated doses).

(6) Medida del tamaño del tumor y el peso corporal.

El tamaño del tumor (diámetro más largo, diámetro más corto) y el peso corporal se midieron dos veces por semana desde el día 0.

(7) Evaluación del efecto antitumoral.

El nivel de crecimiento del tumor fue evaluado basándose en la tasa de crecimiento del tumor (volumen relativo del tumor RTV). La velocidad de supresión del crecimiento se expresó en una proporción relativa de volumen del tumor después del día 0 respecto del volumen del tumor en el día 0 como 1. El efecto antitumoral se determinó el día 14^o (día 14) a partir del inicio de la administración del agente farmacéutico. Cuando la proporción de la tasa de crecimiento del tumor del grupo de administración respecto del grupo testigo (administración de disolvente), (T/C%) era no más del 50% y se encontraba una diferencia significativa (P < 0,01) en la prueba U de Mann Whitney, se determinó que el agente farmacéutico era eficaz.

Ejemplo 2.**(1) Preparación del agente farmacéutico.**

Se pesó la cantidad necesaria de FR901228 y se añadió un disolvente (10% HCO-60/solución salina). La mezcla se trató con ultrasonidos para permitir la disolución.

(2) Animal de ensayo.

Para la prueba antitumoral del agente farmacéutico, se adquirieron ratones Fox Chase C.B-17/lcr-SCID.Jcl (machos, 6 semanas de edad) de CLEA JAPAN INC. y, después de la aclimatación durante no menos de una semana, se usaron para el ensayo. Los ratones fueron criados bajo un entorno SPF, y se les permitió el libre acceso al agua y al alimento.

(3) Tumor de ensayo.

La línea de células de linfoma humano cultivadas (U937: obtenida del Dr. Minowada, Hayashibara Biochemical Laboratories, Inc.) fue cultivada en RPMI (que contiene 10% de FCS) y subcultivada *in vitro*.

(4) Implantación experimental y agrupamiento.

Se administró a los ratones ciclofosfamida (Shionogi & Co., Ltd., 150 mg/kg) por vía intraperitoneal. Un linfoma (1×10^7 células) subcultivado *in vitro* fue implantado por vía intraperitoneal al día siguiente. Después de la implantación del tumor, los ratones fueron agrupados en 6 ratones (el grupo testigo 12) por grupo para nivelar el peso corporal.

(5) Administración.

La administración se inició el día del agrupamiento (día 0). Se administró por vía intraperitoneal FR901228 a un grupo de administración de FR901228 una o dos veces a la semana (0,1 a 1,0 mg/kg). A un grupo de control o testigo se le administró tan solo un disolvente (10% HCO-60/solución salina).

(6) Evaluación.

Como efecto antitumoral, se contaron los días de supervivencia de los ratones.

Los resultados se muestran en la Fig. 2. La Fig. 2(a) muestra los resultados de la administración de FR901228 una vez a la semana, y la Fig. 2(b) muestra los resultados de la administración de FR901228 dos veces a la semana. El FR901228 mostró un efecto antitumoral *in vivo* contra el linfoma humano.

Ejemplo 3.

(1) Preparación del agente farmacéutico.

Se pesó la cantidad necesaria de FR901228 y se añadió un disolvente (10% HCO-60/solución salina). La mezcla se trató con ultrasonidos para permitir la disolución. Una sustancia de control positivo Paclitaxel se disolvió en solución de Cremophor EL/etanol (1:1) a razón de 24 mg/mL antes del ensayo, y se conservó en un refrigerador. Al usarlo, se diluyó con una cantidad 9 veces mayor de solución salina fisiológica, a 2,4 mg/mL (componente del disolvente: 5% de Cremophor EL - 5% de etanol - 90% de solución salina).

(2) Animal de ensayo.

Para la prueba antitumoral del agente farmacéutico, se adquirieron ratones BALB/cANnNCrj-nu/nu (machos, 6 semanas de edad) de Charles River Japón y, después de la aclimatación durante no menos de una semana, se usaron para el ensayo. Los ratones fueron criados bajo un entorno SPF, y se les permitió el libre acceso al agua y al alimento.

(3) Tumor de ensayo.

La línea de células de cáncer de riñón humano cultivadas (ACHN: disponible de ATCC) fue implantada por vía subcutánea $2 - 3 \times 10^7$ células, en un ratón lampiño. Un tumor sólido desarrollado fue subcultivado no menos de 3 generaciones, y usado para el ensayo.

(4) Implantación experimental y agrupamiento.

El tumor sólido subcultivado en un ratón lampiño fue implantando subcutáneamente en el lomo derecho de un ratón en forma de un fragmento cuadrado de tejido tumoral de aproximadamente 3 mm. Después de la implantación del tumor, cuando el volumen del tumor ($1/2 \times \text{diámetro más largo} \times \text{diámetro más corto}^2$) alcanzó 100 a 300 mm³, los ratones fueron agrupados en 6 ratones por grupo para nivelar el tamaño del tumor.

(5) Administración.

La administración se inició el día del agrupamiento (día 0). Se administró por vía intravenosa FR901228 a un grupo de administración de FR901228 3 veces al 4 días (q4dx3) (3,2 y 1,8 mg/kg). Se administró por vía intravenosa Paclitaxel (24 mg/kg) durante 5 días consecutivos (qdx5) a un grupo de administración de paclitaxel como sustancia para control positivo. A un grupo de control o testigo se le administró (q4dx3) tan solo un disolvente (10% HCO-60/solución salina). La cantidad de líquido para cada administración se calculó (0,1 mL/10 g de peso corporal) basándose en el peso corporal medido el día de la administración. Obsérvese que 3,2 mg/kg/día (q4dx3) de FR901228 y 24 mg/kg/día (qdx5) de paclitaxel eran los valores de las dosis MTD.

(6) Medida del tamaño del tumor y el peso corporal.

El tamaño del tumor (diámetro más largo, diámetro más corto) y el peso corporal se midieron dos veces por semana desde el día 0.

(7) Evaluación del efecto antitumoral.

El nivel de crecimiento del tumor fue evaluado basándose en la tasa de crecimiento del tumor (volumen relativo del tumor RTV). La velocidad de supresión del crecimiento se expresó en una proporción relativa de volumen del tumor después del día 0 respecto del volumen del tumor en el día 0 como 1. El efecto antitumoral se determinó el día 14° (día 14) a partir del inicio de la administración del agente farmacéutico. Cuando la proporción de la tasa de crecimiento del tumor del grupo de administración respecto del grupo testigo (administración de disolvente) (T/C%) era no más del 50% y se encontraba una diferencia significativa ($P < 0,01$) en la prueba U de Mann Whitney, se determinó que el agente farmacéutico era eficaz.

Los resultados se muestran en la Fig. 3. El FR901228 mostró un potente efecto antitumoral contra PC-3 a la dosis de 3,2 mg/kg (Fig. 3(a)) pero no mostró ningún efecto antitumoral contra ACHN (Fig. 3(b)).

Ejemplo 4.

(1) Preparación del agente farmacéutico.

Se pesó la cantidad necesaria de FR901228 y se disolvió en un disolvente (etanol al 99,5%) a la concentración de 1 mg/mL. Después, la solución se diluyó con medio de cultivo.

(2) Tumor de ensayo.

Células cancerosas humanas cultivadas (PC-3 y ACHN) fueron cultivadas en DMEM (que contiene 10% de FCS).

(3) Cultivo y extracción de RNA.

Las células fueron inoculadas a razón de 2×10^6 células por placa de cultivo, y se cultivaron en presencia de FR901228 (5 ng/mL) durante un tiempo dado. Después de cultivar las células, se extrajo el RNA con un reactivo TRIZOL (GIBCO BRL) de acuerdo con el manual de trabajo.

(4) PCR en tiempo real.

El RNA fue sometido a transcripción inversa usando un reactivo de transcripción inversa Taq-man (PE Biosystem) de acuerdo con el manual de trabajo. A continuación, el gen p21 fue amplificado (multiplicado) usando una mezcla maestra para PCR SYBR green (PE Biosystem) y cebador 5'-GGC AGA CCA GCA TGA CAC ATT-3' (p21 secuencia arriba) (SEC ID; N° 1), 5'-GGA TTA GGG CTT CCT CTT GGA G-3' (SEC ID; N° 2) de acuerdo con el manual de trabajo, y se detectó con el detector de secuencias ABI 7700 PRISM (PE Biosystem). La cantidad de expresión del gen p21 fue calculada a partir de una curva patrón, se dividió por la cantidad de expresión del gen de β -actina, que se usó como patrón interno, y se expresó en una cantidad de expresión relativa estandarizada.

Los resultados se muestran en la Fig. 4. Poniéndose en contacto con FR901228 *in vitro*, PC-3 (Fig. 4(a)) mostró un aumento de expresión del gen p21 con el transcurso del tiempo. En cambio, ACHN no mostró aumento de la expresión del gen p21 (Fig. 4(b)). Sin tratar, el gen p21 mostró poca expresión en PC-3, pero mostró expresión en ACHN (Fig. 4(c)).

Ejemplo 5.

Un cáncer humano de próstata PC-3 o de riñón ACHN fue implantado por vía subcutánea en un ratón lampiño y, cuando el tamaño del tumor alcanzó de 100 a 300 mg, se administró por vía intravenosa FR901228 (3,2 mg/kg). El tumor fue extirpado al paso del tiempo y, después de extraer el RNA, se examinó la cantidad de expresión del gen p21 y el gen c-myc mediante PCR en tiempo real, de la misma manera que en el Ejemplo 4. El gen c-myc fue amplificado usando una mezcla maestra para PCR SYBR green (PE Biosystem) y cebador 5'-GAC AGA TCA GCA ACA ACC GAA A-3' (c-myc humano secuencia arriba) (SEC ID; No 3), 5'-TTG TGT GTT CGC CTC TTG ACA T-3' (c-myc humano secuencia abajo) (SEC ID; No 4) de acuerdo con el manual de trabajo, y se detectó con un detector de secuencias ABI 7700 PRISM (PE Biosystem).

Los resultados se muestran en la Fig. 5. El tumor PC-3 mostró aumento de la expresión del gen p21 *in vivo*, con un pico a las 3 h después de la administración de FR901228 (Fig. 5(a)). En cambio, el ACHN no mostró aumento de la expresión del gen p21 (Fig. 5(a)). Aunque el gen c-myc mostró disminución de la expresión en PC-3, mostró aumento de la expresión en ACHN (Fig. (b)).

Ejemplo 6: Análisis (*in vitro*) de la expresión génica por FK228 en células tumorales usando un chip génico.

El efecto del FK228 sobre la expresión del gen *in vivo* en células tumorales humanas fue analizado usando un chip génico.

<material – procedimiento>

(1) Materiales de ensayo.

Agente farmacéutico FK220 (FR910228).

Concentración de empleo: 50 ng/mL.

Método de preparación: se preparó de antemano una solución de 10 mg/mL con etanol y se diluyó en serie con un medio de cultivo para dar soluciones de 50 ng/mL.

Forma de dosificación: solución (preparada al usarla).

Células usadas: cáncer de próstata humano (PC-3), linfoma humano (U937), cáncer de riñón humano (ACHN).

Medio de cultivo: DMEM (para PC-3, ACHN), RPMI1640 (para U937), ambos obtenidos de Nikken Biomedical Laboratory, que contiene además FCS (Moregate) y penicilina-estreptomina (ICN Biomedicals Inc.).

Extracción del RNA: RNeasy Mini Kit (Qiagen) RNasa, agua libre de DNasa (Life Technologies)

Síntesis de DNA: Superscript Choice System (Life Technologies) Ethachinmate (Nippon gene) Cebador T7-(dT)24 (Amersham Pharmacia)

Síntesis de cRNA: BioArray RNA Transcript Labeling Kit (Amersham Pharmacia)

Fragmentación de cRNA: Trizma Base (SIGMA)

Acido acético glacial (SIGMA)

Acetato de magnesio (SIGMA)

Acetato potásico (SIGMA)

Hibridación: Eukaryotic Hybridization Control Kit (Amersham Pharmacia)

Solución de EDTA 0,5M (SIGMA)

Sal MES de sodio (SIGMA)

Monohidrato de MES libre de ácido (SIGMA)

DNA de esperma de arenque (Promega)

Solución de albúmina de suero bovino acetilada (Life Technologies)

Tinción: ficoeritrina-estreptavidina (Molecular Probes)

IgG de cabra, calidad reactivo (SIGMA)

Anticuerpo anti-estreptavidina (cabra), biotilada (Vector Lab)

Chip usado: HuGeneFL array (Amersham Pharmacia)

(2) Preparación de las células y extracción del RNA.

Células tumorales humanas (PC-3, U937, ACHN) que alcanzaron la confluencia en matraces F75, fueron sometidas a un tratamiento con tripsina para dar suspensiones de células individuales, que fueron inoculadas en cinco matraces F75 y cultivadas durante 24 h. El medio de cultivo se desechó y se añadieron un medio de cultivo fresco (18 mL) y una concentración 10 veces mayor (50 ng/mL) de una solución de FR901228 (2 mL). La mezcla se cultivó en un incubador con CO₂ a 37°C durante un tiempo dado (0, 1, 3, 12 y 24 h). Después de completarse el cultivo, se desechó el medio de cultivo y se extrajo el RNA total de acuerdo con el protocolo del RNeasy Mini Kit (Qiagen). El RNA se determinó cuantitativamente y se confirmó por electroforesis.

(3) Síntesis del cRNA.

De acuerdo con el manual de GeneChip, capítulo 2 a capítulo 4, y los manuales de RNeasy Mini Kit y RNA Transcript Labeling Kit, el RNA fue purificado, el cDNA fue sintetizado, el cRNA fue sintetizado y el cRNA fue fragmentado.

(4) Hibridación, lavado-tinción, cribado.

5 La hibridación, el lavado-tinción y el cribado se llevaron a cabo de acuerdo con el manual de GeneChip, capítulo 5 a capítulo 7.

(5) Análisis.

Analizados usando GeneSpring (software de análisis de datos de microarrays: manufacturado por Silicon Genetics).

<Resultados>

10 El cáncer de próstata humano PC-3 y el linfoma humano U937, que son células tumorales sensibles a FK228, y el cáncer de riñón humano ACHN, que es una célula tumoral resistente a FK228, se pusieron en contacto *in vitro* con FK228 en el curso del tiempo y a continuación se extrajo el RNA, y se examinaron 7070 genes detectables usando GeneChip, en relación con los genes que muestran cambios en la expresión debidos a FK228. Tales genes fueron analizados de acuerdo con los procedimientos que siguen.

15 Análisis 1: Selección de genes que muestran cambio en la expresión debidos a la inhibición de la histona desacetilasa.

Para limitar los genes que muestran cambios en la expresión debidos a FK228, se eligió un gen que muestra un cambio lineal de expresión (condición de análisis de GeneSpring: gen que muestra cambios en la expresión en 0,5 veces o más de 0,5 veces o 0,5 veces o menos en cualquier momento).

Análisis 2: Selección de genes implicados en la eficacia.

20 Cuando se pone en contacto con FK228 durante 72 h, el efecto de supresión del crecimiento en PC-3, U937 y ACHN en el valor de IC₅₀ fue 3,17, 3,20 y 4,25 ng/mL, respectivamente, indicando casi el mismo grado de efecto supresor del crecimiento en estas células tumorales. De estos resultados, se consideró que los genes que se relacionan con la supresión del crecimiento muestran comúnmente cambios en la expresión en cualquier célula. Se encontraron 105 genes que mostraron comúnmente aumento en la expresión en estos tres tipos de células tumorales humanas y 100 genes que mostraron comúnmente disminución en la expresión en estos tres tipos de células tumorales humanas.

Ejemplo 7.

Análisis de la expresión génica (*in vivo*) por FK228 en células tumorales usando un chip génico.

El efecto de FK228 sobre la expresión génica *in vivo* en células tumorales humanas fue analizado usando un chip génico.

30 <material · procedimiento>

(1) Materiales de ensayo.

Agente farmacéutico FK228 (FR901228)

Dosis: 10 mg/kg

35 Dosis de administración: 10 mL/kg

Disolvente: 10% de HCO-60/solución salina

Forma de dosificación: solución (preparada al usarla)

40 Célula tumoral: cáncer de próstata humano PC-3 (fragmento de tumor 3 mm x 3 mm x 3 mm/sitio de implantación en ratón s.c.) cáncer gástrico humano SC-6; obtenido del Central Institute for Experimental Animals (fragmento de tumor de 3 mm x 3 mm x 3 mm/sitio de implantación en ratón s.c.) cáncer de riñón humano ACHN (fragmento de tumor 3 mm x 3 mm x 3 mm/sitio de implantación en ratón s.c.) cáncer de riñón humano A498; obtenido de ATCC (fragmento de tumor de 3 mm x 3 mm x 3 mm/sitio de implantación en ratón s.c.)

Animal subcultivado: BALB c/nu/nu macho

Extracción del RNA: RNeasy Mini Kit (Qiagen)

RNasa, agua libre de DNasa (Life Technologies)

45 Síntesis de DNA: Superscript Choice System (Life Technologies)

Ethachinmate (Nipon Gene)
 Cebador T7-(dT)24 (Amersham Pharmacia)
 Síntesis de cRNA: BioArray RNA Transcript Labeling Kit (Amersham Pharmacia)
 Fragmentación de cRNA: Trizma Base (SIGMA)
 5 Acido acético glacial (SIGMA)
 Acetato de magnesio (SIGMA)
 Acetato potásico (SIGMA)
 Hibridación: Eukaryotic Hybridization Control Kit (Amersham Pharmacia)
 Solución de EDTA 0,5M (SIGMA)
 10 Sal MES de sodio (SIGMA)
 Monohidrato de MES libre de ácido (SIGMA)
 DNA de esperma de arenque (Promega)
 Solución de albúmina de suero bovino acetilada (Life Technologies)
 Chip usado: array HuGeneFL (Amersham Pharmacia)

15 (2) Preparación de células y extracción del RNA.

Un fragmento cuadrado de tumor de 3 mm (PC-3, SC-6, ACHN, A498) fue implantado por vía subcutánea en un ratón lampiño y, cuando el tumor llegó a aproximadamente 100 mg (diámetro más largo 9 mm, diámetro más corto 8 mm), se administró por vía intravenosa FR901228 (10 mg/Kg). A las 0, 0,5, 1, 2 y 4 horas después de la administración de FR901228, el tumor fue extirpado y se extrajo el RNA total de acuerdo con el protocolo de RNeasy Mini Kit (50) (Qiagen). El RNA fue cuantificado y confirmado por electroforesis.

(3) Síntesis del cRNA.

De acuerdo con el manual de GeneChip, capítulo 2 a capítulo 4, y los manuales de RNeasy Mini Kit y RNA Transcript Labeling Kit, el RNA fue purificado, se sintetizó el cRNA, se sintetizó el cRNA y se fragmentó el cRNA.

(4) Hibridación, lavado-tinción, cribado.

25 La hibridación, el lavado-tinción y el cribado se llevaron a cabo de acuerdo con el manual de GeneChip, capítulo 5 a capítulo 7.

(5) Análisis.

Analizados usando GeneSpring (software de análisis de datos de microarrays: manufacturado por Silicon Genetics).

<Resultados>

30 Se administró por vía intravenosa FR901228 (10 mg/kg) a ratones portadores de cáncer de próstata humano PC-3, cáncer gástrico humano SC-6, cáncer de riñón humano ACHN y cáncer de riñón humano A498, y se extirpó el tumor al cabo del tiempo (0, 0,5, 1, 2 y 4 h). Después se extrajo el RNA y 7070 genes detectables usando GeneChip fueron examinados en busca de genes que muestran cambios en la expresión debidos a FR901228.

35 La tasa de supresión del crecimiento del cáncer de próstata humano PC-3, cáncer gástrico humano SC-6, cáncer de riñón humano ACHN y cáncer de riñón humano A498 por la administración de FR901228 (3,2 mg/kg) fue 98%, 84%, 20% y 29%, respectivamente. Por tanto, se determinó que PC-3 y SC-6 eran tumores sensibles de FK228, y que ACHN y A498 eran tumores resistentes a FK228.

Ejemplo 8.

Modo de expresión génica en un tumor sensible a FK228 y un tumor resistente a FK228.

40 La correlación entre el modo de expresión génica y la eficacia del FK220 fue examinada en el tumor confirmado como sensible o resistente en el Ejemplo 7. Se prestó una especial atención a los genes (105 genes) que mostraron aumento de la expresión por el tratamiento con FK228 y a los genes (100 genes) que mostraron disminución de la expresión por el mismo, como se demostró mediante la prueba *in vitro* en el Ejemplo 6, y se estudió la correlación entre estos genes y la eficacia. Además, se investigó un gen que mostró alta expresión en un tumor sensible y baja expresión en un tumor resistente, y un gen que mostró baja expresión en un tumor sensible y alta expresión en un tumor resistente. Como resultado, de los 105 genes que mostraron aumento de la expresión *in vitro* mediante el tratamiento con FR901228, se encontró que 6 genes mostraban alta expresión en un tumor sensible y baja expresión en un tumor resistente, y se encontró que 4 genes mostraban baja expresión en un tumor sensible y alta expresión en un tumor resistente (Tabla 1). Además, de los 100 genes que mostraron disminución de la expresión *in vitro* mediante el tratamiento con FR901228, se encontró que 4 genes mostraban alta expresión en un tumor sensible y

baja expresión en un tumor resistente, y se encontró que 9 genes mostraban baja expresión en un tumor sensible y alta expresión en un tumor resistente (Tabla 2).

Tabla 1: Genes que mostraron alta expresión en un tumor sensible y baja expresión en un tumor resistente, o genes que mostraron baja expresión en un tumor sensible y alta expresión en un tumor resistente (genes que mostraron aumento de la expresión *in vitro* por tratamiento con FR901228).

5

<p>Tumor sensible (alta) y tumor resistente (baja) M13686_s_at (SFTP1) proteína asociada a agente tensioactivo pulmonar U68111_at (PPP1R2) Fuente: gen de inhibidor 2 de fosfatasa de proteína humana, exón 6 y cds completo U60521_at (CASP9) caspasa 9, proteasa de cisteína relacionada con la apoptosis L19783_at_(PIGH) fosfatidilinositol glicano, clase H X60487_at_ (H4/h) J04056_at_ (CBR1) carbonil reductasa 1</p>
<p>Tumor sensible (baja) y tumor resistente (alta) U56998_at (CNK) cinasa inducible por citosina X68277_at (DUSP1) fosfatasa 1 especificidad dual U65092_at (MSG1) gen melanocito específico 1 X01703_at Fuente: gen humano para alfa tubulina (b alfa 1)</p>

Tabla 2: Genes que mostraron alta expresión en un tumor sensible y baja expresión en un tumor resistente, o genes que mostraron baja expresión en un tumor sensible y alta expresión en un tumor resistente (genes que mostraron disminución de la expresión *in vitro* por tratamiento con FR901228).

<p>Tumor sensible (alta) y tumor resistente (baja) X74987_s_at (RNASEL1) inhibidor ribonucleasa L (2',5'-oligoisoadenilato sintetasa-dependiente) J03801_f_at (LYZ) lisozima (amiloidosis renal) U09578_at (MAPKAPK3) mitógeno-activada proteína cinasa-activada proteína cinasa 3 D50678_at (LRP8) proteína 8 relacionada con el receptor de lipoproteína de baja densidad</p>
<p>Tumor sensible (baja) y tumor resistente (alta) Y10375_s_at (SIRP-alfa 1) Z14982_rnal_at (gen subunidad de proteosoma codificada por MHC LAMP7-E1) ajuste alternativo X62048_at (WEE1) wee1 (S. pombe) homólogo X71874_cds1_at (PSMB10) subunidad proteosoma (prosoma, macropaina), tipo beta, 10 U32849_at (NMI) N-myc (y STAT) interactor D55716_at (Plcdc47) Fuente: mRNA humano par Plcdc47, cds completo M98045_at (FPGS) folilpoliglutamato sintasa U21551_at (ECA39) Source: ECA39 mRNA humano, cds completo U06681_at U07620_at (PRKM10) proteína cinasa mitógeno activada 10 (MAP cinasa)</p>

10

Estos genes sugieren correlación con la eficacia de FK228 y correlación con la sensibilidad o la resistencia a FK228, indicando así la posibilidad de que estos genes sean utilizables como marcador de predicción de la eficacia.

Aplicabilidad industrial.

15

El agente terapéutico para el cáncer de próstata de la presente invención, que comprende como ingrediente activo FK228 (en particular FR901228) o una sal del mismo que tiene actividad inhibitora de la histona desacetilasa, tienen una acción antitumoral superior no solo *in vitro* sino también *in vivo*. Por tanto, pueden ser usados clínicamente, de forma particularmente adecuada para el tratamiento del cáncer.

Texto libre de listado de secuencias.

20

SEC ID; No 1: oligonucleótido diseñado para actuar como cebador para PCR de p21 mRNA.
SEC ID; No 2: oligonucleótido diseñado para actuar como cebador para PCR de p21 mRNA.
SEC ID; No 3: oligonucleótido diseñado para actuar como cebador para PCR de c-myc mRNA.
SEC ID; No 4: oligonucleótido diseñado para actuar como cebador para PCR de c-myc mRNA.
SEC ID; No 5: Xaa es un aminoácido representado por la fórmula NH₂C(CHCH₃) COOH.

25

El grupo carboxilo de fórmula COOHCH₂CH(CHCHC₂H₄- SH)OH está unido con un grupo amino de Val, que es el primer aminoácido, un grupo hidroxilo está unido con un grupo carboxilo de Val, que es el cuarto aminoácido, y un grupo SH está unido con un puente disulfuro con un grupo SH de Cys, que es el segundo aminoácido.

Esta solicitud está basada en la solicitud de patente nº 2001-250846 presentada en Japón.

ES 2 371 630 T3

LISTADO DE SECUENCIAS.

<110> FUJISAWA PHARMACEUTICAL CO., LTD.

<120> Uso farmacéutico del inhibidor de la histona desacetilasa y método de evaluación de su efecto antitumoral.

5

<130> 09491

<150> JP 2001-250846

<151> 21-8-2001

10

<160> 5

<210> 1

<211> 21

15

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido diseñado para actuar como cebador para PCR de p21 mRNA.

20

<400> 1

ggcagaccag catgacacat t

21

<210> 2

<211> 22

25

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido diseñado para actuar como cebador para PCR de p21 mRNA.

30

<400> 2

ggattagggc ttctcttgg ag

22

<210> 3

<211> 22

35

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

40

<223> Oligonucleótido diseñado para actuar como cebador para PCR de c-myc mRNA.

<400> 3

gacagatcag caacaaccga aa

22

<210> 4

<211> 22

45

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

50

<223> Oligonucleótido diseñado para actuar como cebador para PCR de c-myc mRNA.

<400> 4

ttgtgtgttc gcctcttgac at

22

55

<210> 5

<211> 4

<212> PRT

<213> Chromobacterium sp.

60

<220>

<221> SITE

<222> (3)

<223> Xaa es un aminoácido representado por la fórmula $\text{NH}_2\text{C}(\text{CHCH}_3)\text{COOH}$.

<220>

<221> SITE

<222> (1), (2), (4)

5 <223> En la fórmula $\text{COOHCH}_2\text{CH}(\text{CHCHC}_2\text{H}_4\text{SH})\text{OH}$, el grupo carboxílico está unido con el grupo amino del primer aminoácido Val, el grupo hidroxilo está unido con el grupo carboxílico del cuarto aminoácido Val, y el grupo SH está unido con el grupo SH del segundo aminoácido Cys por medio de un puente disulfuro.

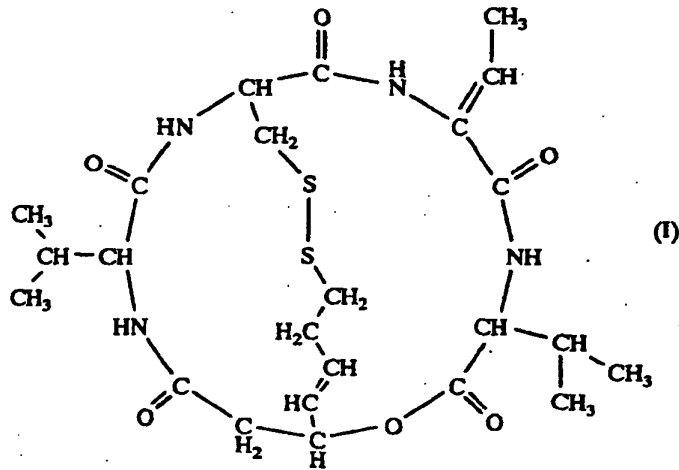
<400> 5

Val Cys Xaa Val

4

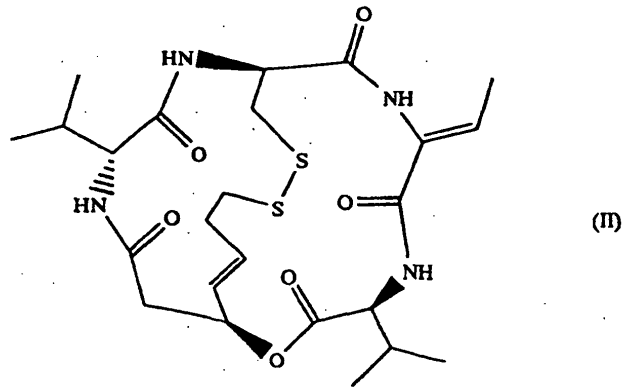
REIVINDICACIONES

1ª. Un agente para el tratamiento del cáncer de próstata que comprende un compuesto representado por la fórmula (I)



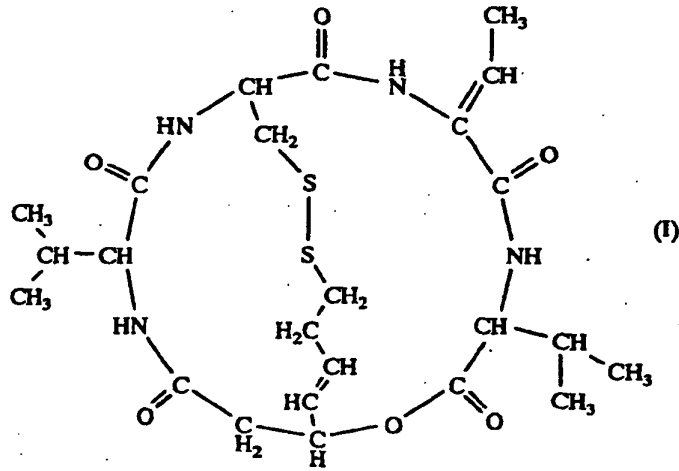
o una sal del mismo como ingrediente activo.

5 2ª. El agente para el uso según la reivindicación 1ª, en el que el compuesto representado por la fórmula (I) es un compuesto representado por la fórmula (II)



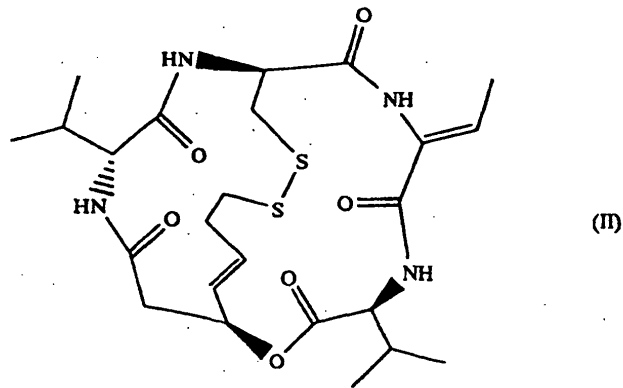
3ª. El agente para el uso según las reivindicaciones 1ª o 2ª, que tiene una acción antitumoral *in vivo*.

10 4ª. Una composición farmacéutica para el uso en el tratamiento del cáncer de próstata, que comprende un compuesto representado por la fórmula (I)



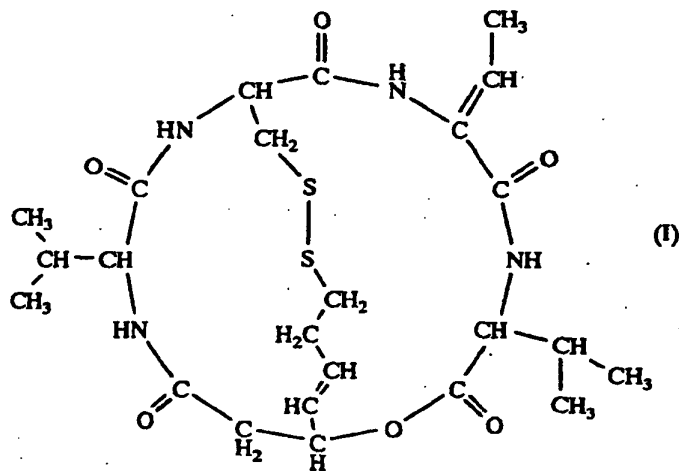
o una sal del mismo, y un vehículo aceptable farmacéuticamente.

5ª. La composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 4ª, en el que el compuesto representado por la fórmula (I) es un compuesto representado por la fórmula (II)



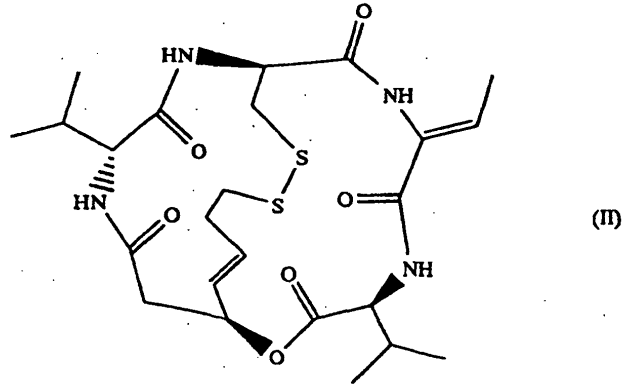
5

6ª. El uso de un compuesto representado por la fórmula (I)



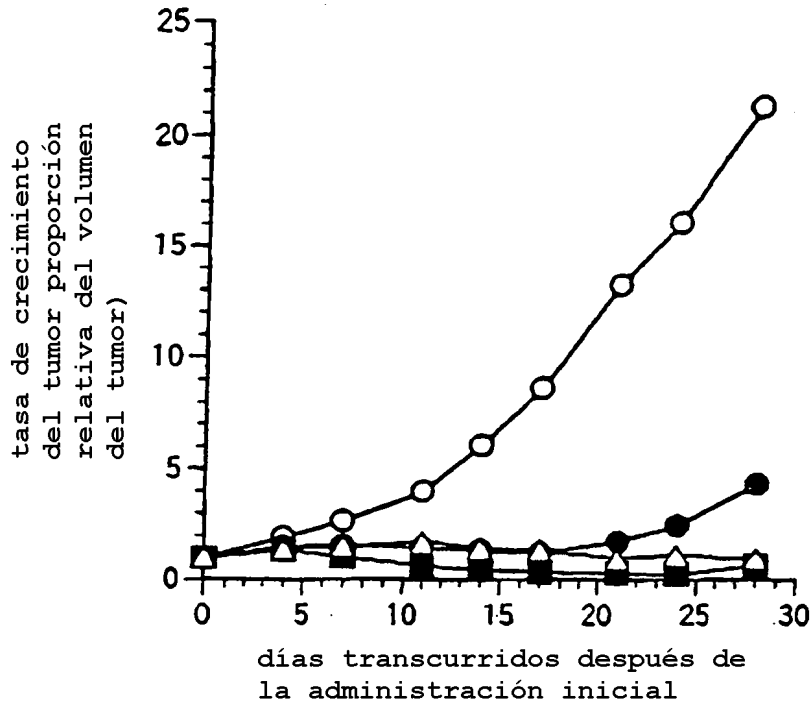
o una sal del mismo, para la preparación de un agente para el tratamiento del cáncer de próstata.

7^a. El uso según la reivindicación 6^a, en el que el compuesto representado por la fórmula (I) es un compuesto representado por la fórmula (II)



5 8^a. El uso según la reivindicación 6^a o 7^a, en el que el agente para el tratamiento del cáncer de próstata tiene una acción antitumoral *in vivo*.

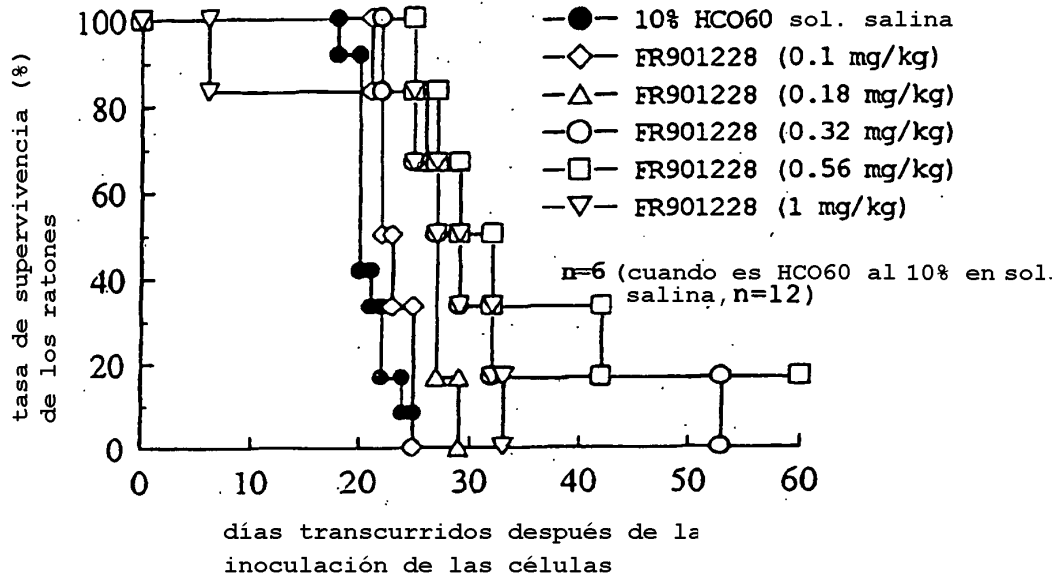
FIG. 1



- control
- FR901228 (1.8 mg/kg)
- FR901228 (3.2 mg/kg)
- △— Paclitaxel (24 mg/kg)

FIG. 2

(a)



(b)

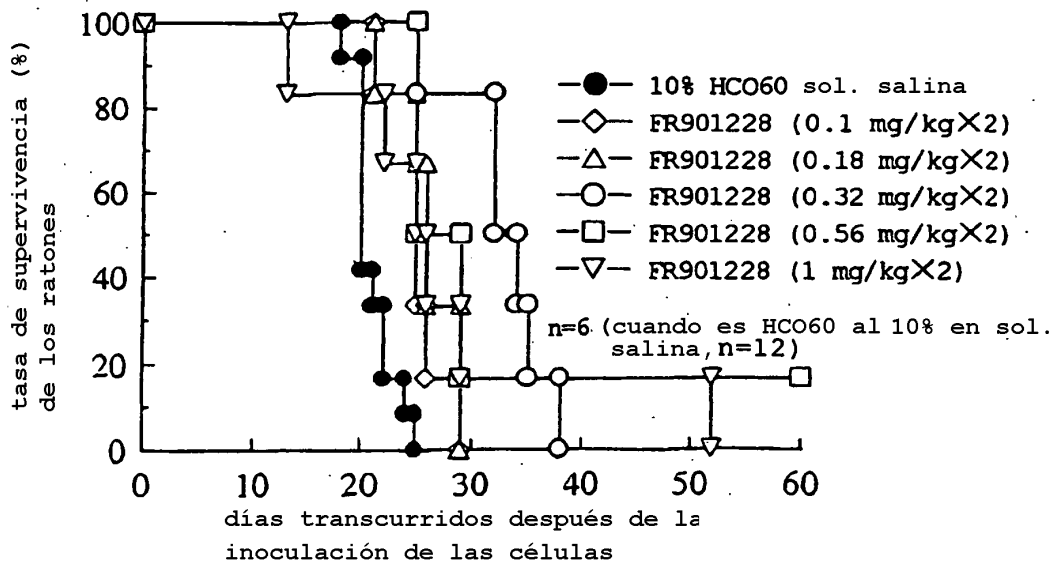
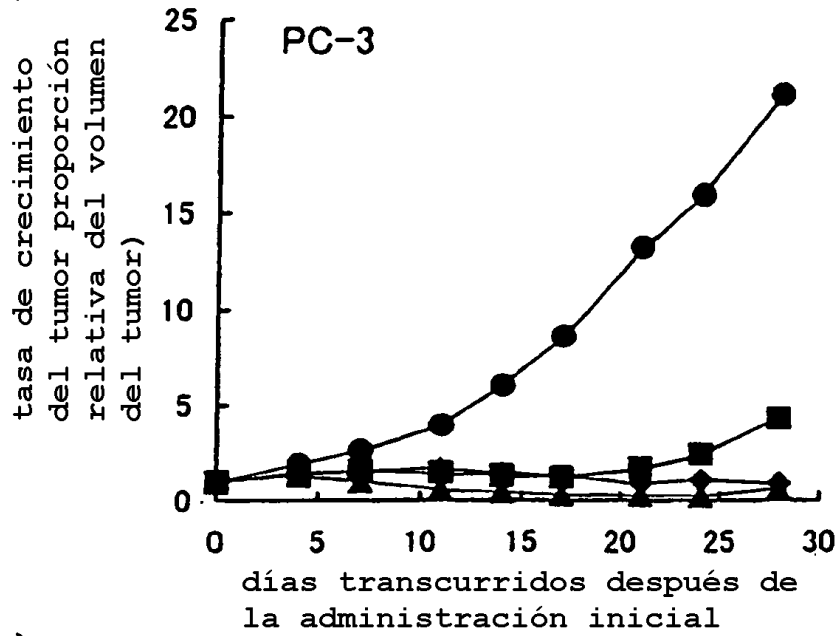
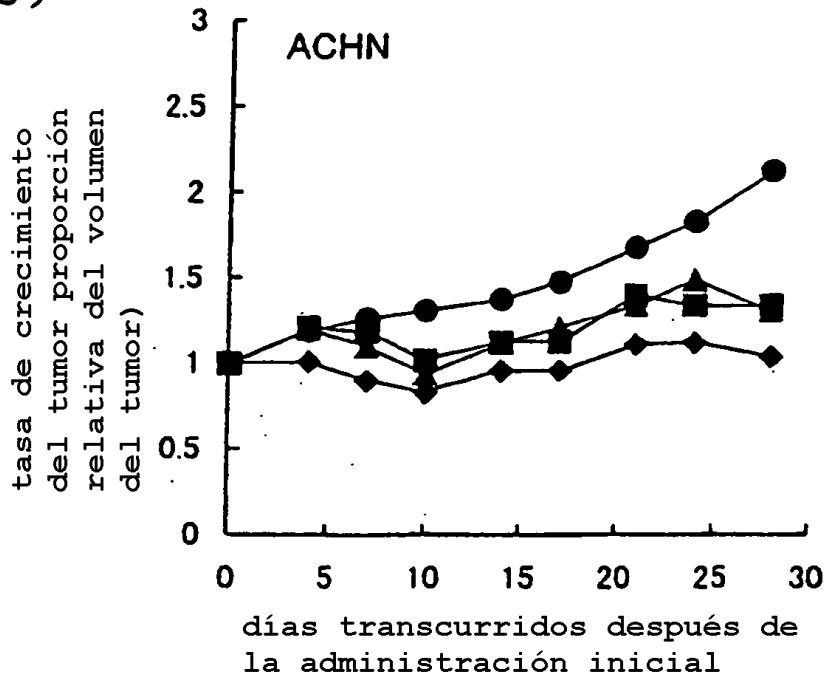


FIG. 3

(a)

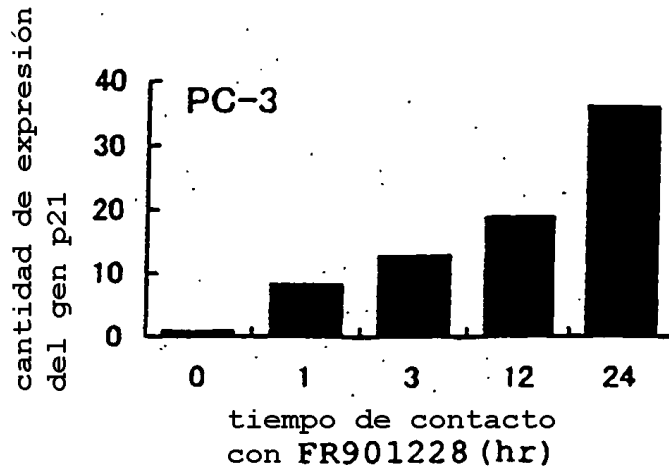


(b)

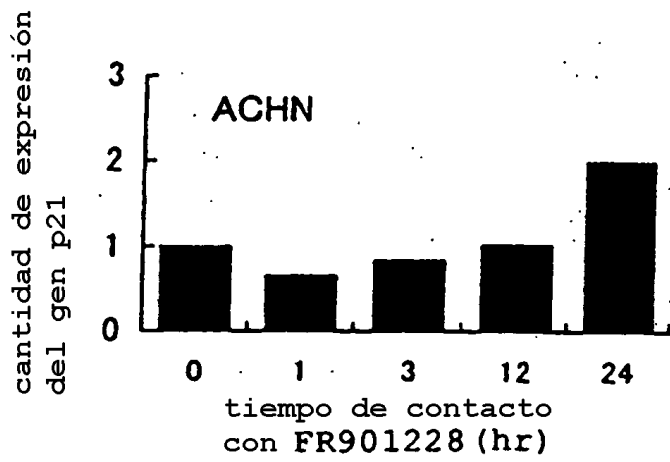


- control
- FR901228 (1.8 mg/kg)
- ▲— FR901228 (3.2 mg/kg)
- ◆— Paclitaxel (24 mg/kg)

(a) **FIG. 4**



(b)



(c)

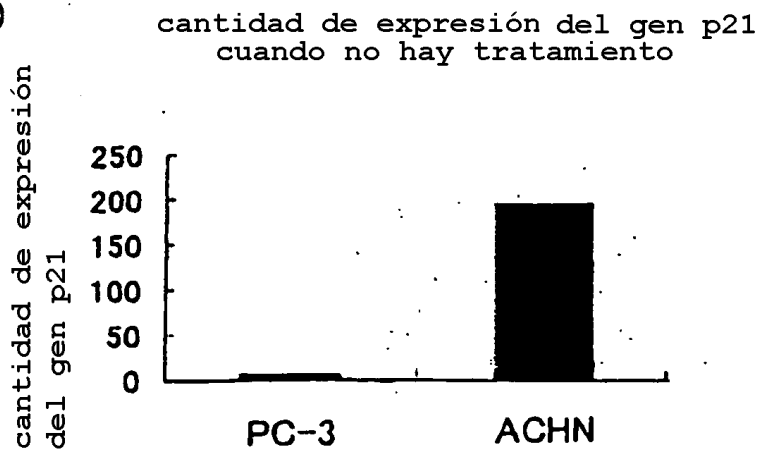


FIG. 5

