



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 321 584**

51 Int. Cl.:

C07K 5/103 (2006.01)

C12N 9/99 (2006.01)

A61K 38/12 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

A61P 7/06 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01947940 .1**

96 Fecha de presentación : **09.07.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1302476**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.04.2003**

54 Título: **FK228 reducido y su uso.**

30 Prioridad: **17.07.2000 JP 2000-216584**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
09.06.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
09.06.2009

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

72 Inventor/es: **Nakajima, Hidenori;**
Tanaka, Akito;
Yoshida, Minoru y
Horinouchi, Sueharu

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 321 584 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

FK228 reducido y su uso.

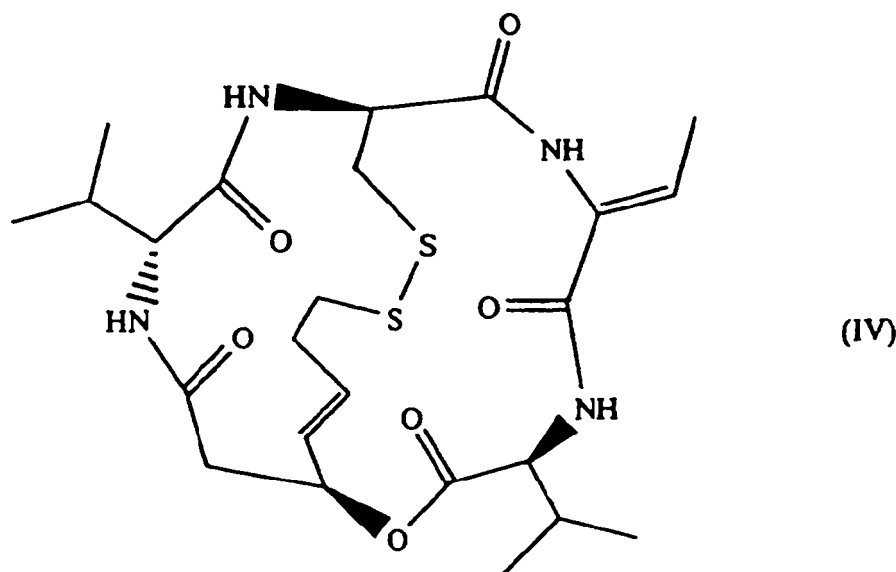
5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un compuesto que tiene una actividad inhibidora de histona desacetilasa y al uso del mismo.

10 **Técnica precedente**

La histona desacetilasa es una enzima de metalodesacetilación que tiene Zn en un centro activo (M.S. Finnin *et al.*, Nature 401, 188-193 (1999)). Se considera que esta enzima cambia la afinidad de diversas histonas acetiladas para DNA. El fenómeno biológico directo llevado a cabo por la misma es un cambio estructural de cromatina. La unidad mínima de estructura de cromatina es un nucleosoma en el que DNA de 146 pb está arrollado 1,8 veces en dirección contraria a las agujas del reloj alrededor de un octámero de histona (H2A, H28, H3 y H4, cada uno 2 moléculas, histona nuclear). La histona nuclear estabiliza la estructura del nucleosoma mediante la interacción de la carga positiva del extremo N de cada proteína de histona con DNA. La acetilación de la histona está controlada por el equilibrio entre la reacción de acetilación, en la que está implicada histona acetiltransferasa, y la desacetilación, en la que está implicada histona desacetilasa. La acetilación de la histona se produce en un residuo de lisina del extremo N de proteína de histona que está evolutivamente bien conservada. Por consiguiente, se considera que la proteína de histona nuclear pierde la carga eléctrica del extremo N, la interacción con DNA está atenuada y la estructura del nucleosoma se hace inestable. Por lo tanto, se considera que la desacetilación de histona produce lo opuesto, o estabilización de la estructura del nucleosoma. Sin embargo, hay mucho que clarificar con respecto al grado de cambio de estructura de cromatina debido a la acetilación y su relación con el control de la transcripción derivado de forma secundaria.

Por otra parte, se ha informado que un compuesto representado por la fórmula (IV)



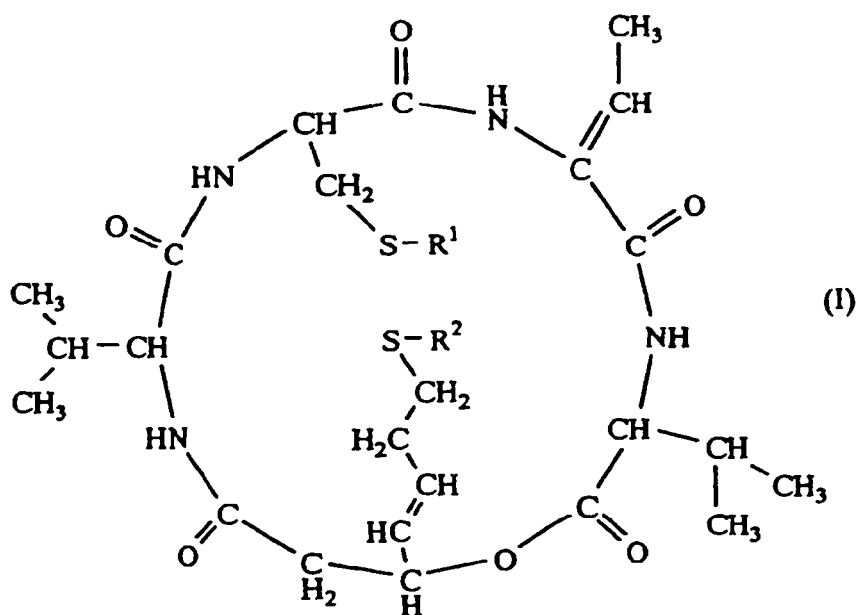
(en lo sucesivo también denominado en la presente memoria sustancia FR901228) deriva una potente actividad antitumoral al inhibir selectivamente histona desacetilasa. Por otra parte, esta sustancia provoca una alta acetilación de histona en células tratadas, como resultado de la cual deriva actividad de control de la transcripción para diversos genes, actividad inhibidora del ciclo celular y actividad inhibidora de la apoptosis (JP-B-7-64872, H. Nakajima *et al.*, Exp. Cell Res. 241, 126-166 (1998)). Aunque, por lo tanto, han existido diversos informes sobre inhibidores de histona desacetilasa derivados de sustancias presentes en la naturaleza, la sustancia FR901228 es un primer agente farmacéutico que tiene acetilación de histona conectada con fenómenos biológicos expresados por la misma, y con cuya utilidad clínica ha estado de acuerdo. La sustancia FR901228 tiene un enlace de disulfuro en una molécula.

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un compuesto que tenga una actividad inhibidora de histona desacetilasa más fuerte y un inhibidor de histona desacetilasa que comprenda el compuesto. Otro objetivo de la presente invención es proporcionar el uso del compuesto que tiene una actividad inhibidora de histona desacetilasa como un agente farmacéutico.

Descripción de la invención

Como resultado de los estudios intensivos realizados por los presentes inventores en un intento de alcanzar los objetivos mencionados anteriormente, se ha encontrado que, al reducir el enlace de disulfuro de la sustancia FR901228 hasta una forma tiólica, puede producirse una actividad inhibidora de histona desacetilasa más fuerte y, además, que este compuesto es útil como un agente farmacéutico, lo que daba como resultado la terminación de la presente invención. De acuerdo con esto, la presente invención proporciona lo siguiente.

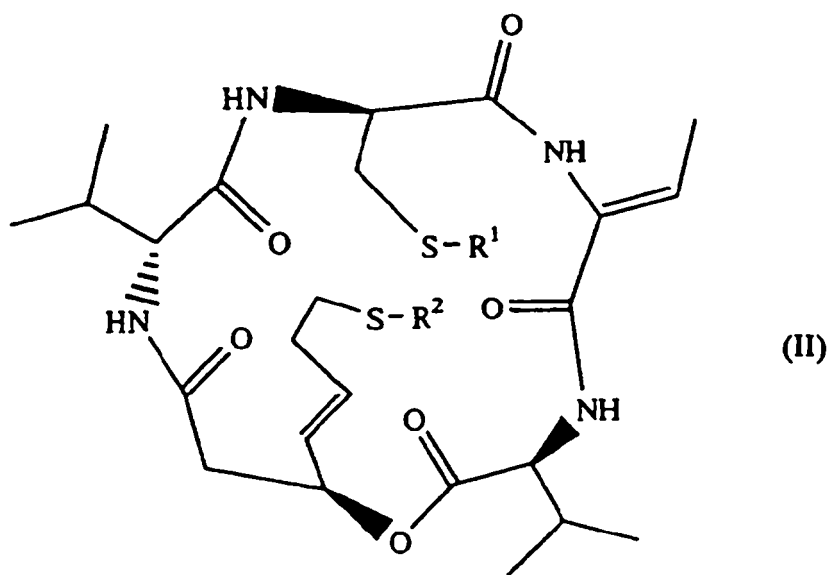
(1) Un compuesto representado por la fórmula (I)



en la que R¹ y R² son iguales o diferentes y cada uno es un átomo de hidrógeno o un grupo protector de tiol, o una de sus sales.

(2) El compuesto del (1) mencionado anteriormente, en el que R¹ y R² son cada uno un átomo de hidrógeno, o una de sus sales.

(3) El compuesto del (2) mencionado anteriormente, que está representado por la fórmula (II)



en la que R¹ y R² son cada uno un átomo de hidrógeno (en lo sucesivo también denominado en la presente memoria una sustancia FR135313), o una de sus sales.

(4) Un método de producción de un compuesto de cualquiera de los (1)-(3) mencionados anteriormente o una de sus sales, que comprende una etapa para segmentar un enlace de disulfuro en un compuesto representado por la fórmula (III)

5

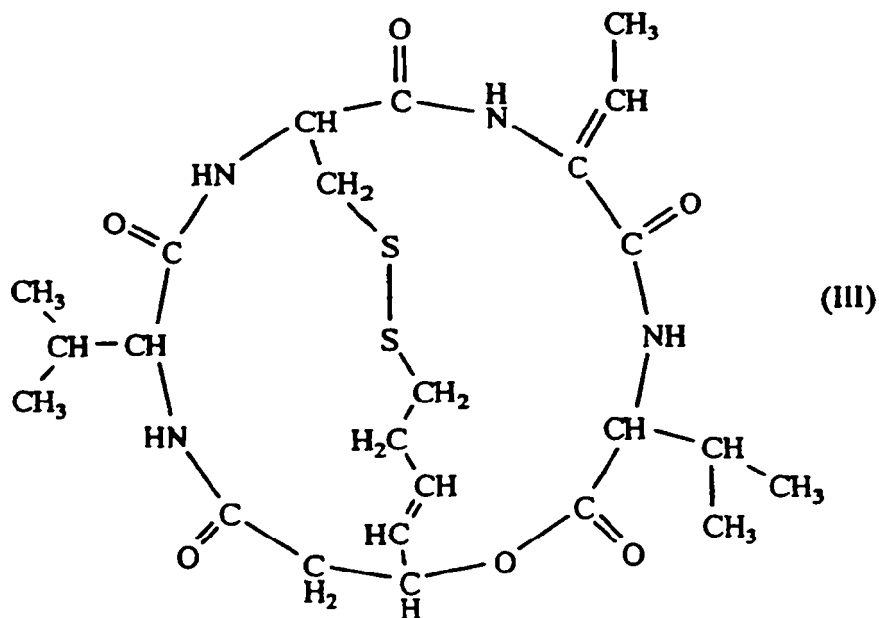
10

15

20

25

30



(en lo sucesivo también denominado en la presente memoria FK228).

(5) El método de producción del (4) mencionado anteriormente, en el que el compuesto de la fórmula (III) está representado por la fórmula (IV)

35

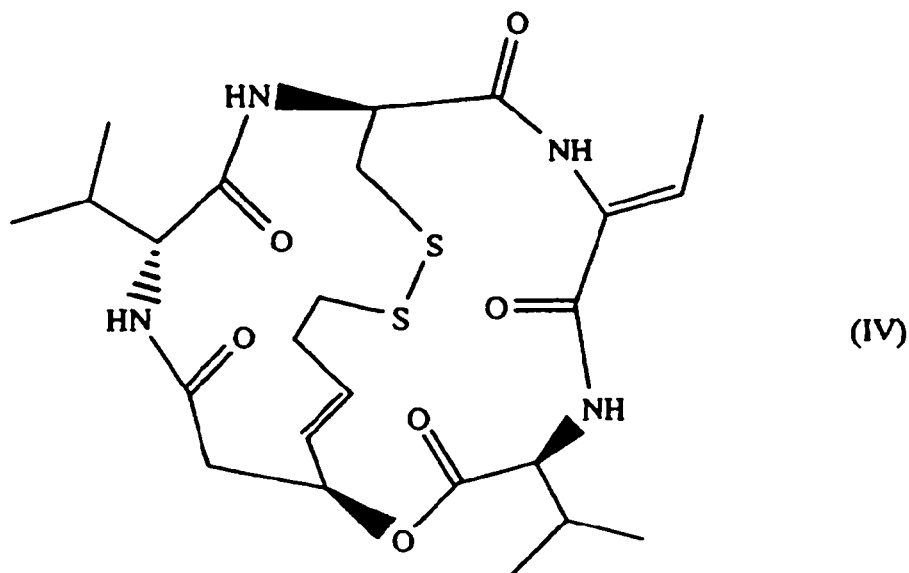
40

45

50

55

60



(en lo sucesivo también denominado en la presente memoria sustancia FR901228).

(6) El método de producción del (5) mencionado anteriormente, que comprende una etapa para cultivar una cepa bacteriana perteneciente al género *Chromobacterium*, que es capaz de producir un compuesto de la fórmula (IV), en un medio nutritivo acuoso bajo condiciones aeróbicas y recuperando el compuesto, y una etapa para segmentar un enlace de disulfuro en el compuesto recuperado de la fórmula (IV).

65

(7) Un inhibidor de histona desacetilasa que comprende un compuesto de cualquiera de los (1)-(3) mencionados anteriormente, o una de sus sales.

5 (8) Una composición farmacéutica para el tratamiento o la profilaxis de un tumor, trastornos inflamatorios, diabetes, una complicación diabética, talasemia homocigótica, fibrosis, cirrosis, leucemia promielocítica aguda (APL, por sus siglas en inglés), rechazo de trasplante de órganos o una enfermedad autoinmune, que comprende un compuesto de cualquiera de los (1)-(3) mencionados anteriormente, o una de sus sales, como un ingrediente activo.

10 (9) Un potenciador de la expresión o promotor de la reactivación de un transgén, que comprende un compuesto de cualquiera de los (1)-(3) mencionados anteriormente, o una de sus sales, como un ingrediente activo.

(10) El potenciador de la expresión o promotor de la reactivación de un transgén del (9) mencionado anteriormente, que es un agente farmacéutico.

15 (11) El potenciador de la expresión o promotor de la reactivación de un transgén del (10) mencionado anteriormente, en el que el agente farmacéutico es para terapia génica.

20 (12) Uso de un compuesto de cualquiera de los (1)-(3) mencionados anteriormente, o una de sus sales, para la producción de una composición farmacéutica para el tratamiento o la profilaxis de un tumor, trastornos inflamatorios, diabetes, una complicación diabética, talasemia homocigótica, fibrosis, cirrosis, leucemia promielocítica aguda (APL, por sus siglas en inglés), rechazo de trasplante de órganos o una enfermedad autoinmune.

25 (13) Uso de un compuesto de cualquiera de los (1)-(3) mencionados anteriormente, o una de sus sales, para la producción de un potenciador de la expresión de un transgén o un promotor de la reactivación de un transgén.

(14) El uso del (13) mencionado anteriormente, en el que el potenciador de la expresión de un transgén o el promotor de la reactivación de un transgén es para terapia génica.

30 **Descripción detallada de la invención**

La presente invención proporciona un compuesto representado por la siguiente fórmula (I)

35

40

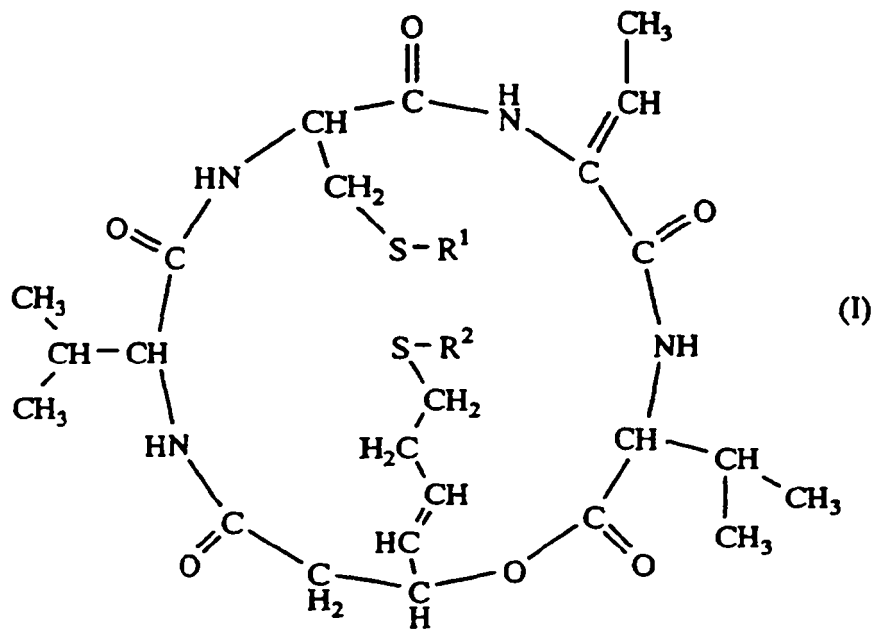
45

50

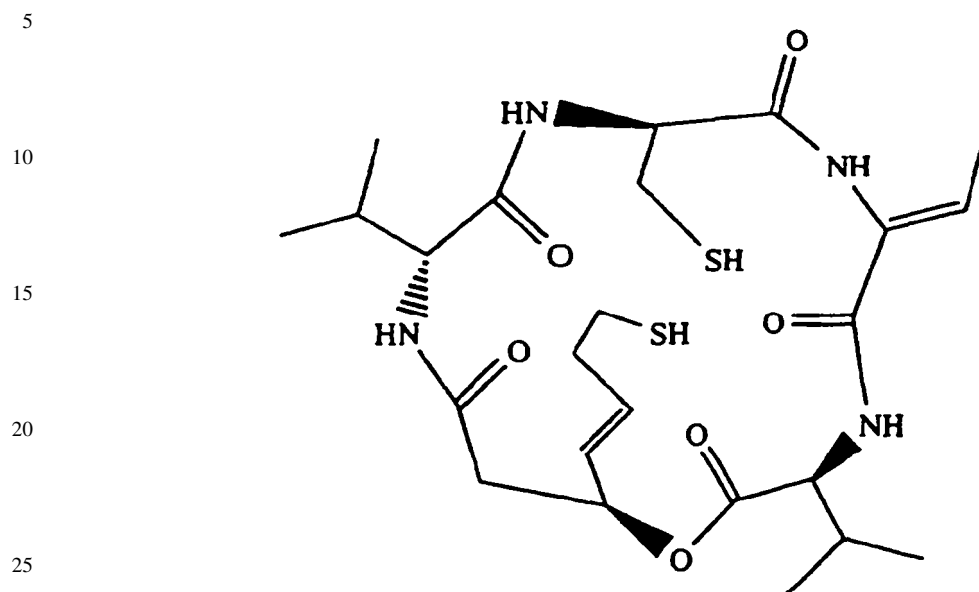
55

60

65



en la que R^1 y R^2 son iguales o diferentes y cada uno es un átomo de hidrógeno o un grupo protector de tiol, o una de sus sales. Preferiblemente, tanto R^1 como R^2 son átomos de hidrógeno, más preferiblemente una sustancia FR135313 representada por la siguiente fórmula



30 Los detalles de las definiciones mencionadas anteriormente y sus realizaciones preferibles se dan en lo siguiente.

El término "inferior" usado en la presente memoria descriptiva significa 1 a 6 átomos de carbono, a no ser que se indique otra cosa.

35 En la presente invención, un grupo protector de tiol adecuado es el usado generalmente en este campo, que se ejemplifica por, pero no se limita a, los siguientes: los que forman tioéter para proteger al grupo tiol, tales como un grupo bencilo que tiene opcionalmente sustituyentes (el sustituyente se ejemplifica por alcoxi inferior (por ejemplo, metoxi, etc.), aciloxi (por ejemplo, acetoxi, etc.), hidroxilo, nitro, picolilo, N-óxido de picolilo, antrilmetilo, difenilmetilo, fenilo, t-butilo, adamantilo, aciloximetilo (por ejemplo, pivaloiloximetilo, butoxi(terciario)-carboniloximetilo, etc.);

40 los que forman monotio, ditio o aminotioacetal para proteger al grupo tiol, tales como alcoxi(inferior)-metilo (por ejemplo, metoximetilo, isobutoximetilo, etc.), tetrahidropirano, benciltiometilo, feniltiometilo, tiazolidina, acetamidometilo, benzamidometilo;

45 los que forman tioéster para proteger al grupo tiol, tales como butoxi(terciario)-carbonilo (BOC), acetilo y su derivado, benzofilo y su derivado;

50 los que forman tioéster ácido de carbamina para proteger al grupo tiol, tales como carbamoilo, fenilcarbamoilo, alquil(inferior)-carbamoilo (por ejemplo, metilcarbamoilo, etilcarbamoilo, etc.). Más específicamente, se usa preferiblemente cada grupo protector descrito en PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS, Segunda Edición, T.W. Greene, P. G. M. Wuts WILEY-INTERSCIENCE.

55 El compuesto de la fórmula (I) mencionado anteriormente puede tener un estereoisómero, tal como un isómero óptico o un isómero geométrico, basado en un átomo de carbono asimétrico y un doble enlace, todos los cuales isómeros y sus mezclas también están incluidos en la presente invención. Por otra parte, el compuesto de la fórmula (I) puede formar una sal, que también está incluida en la presente invención. La sal es una sal biológicamente aceptable que generalmente es atóxica, y está ejemplificada por sales con sales por adición de bases y ácidos, incluyendo sales con una base inorgánica tal como una sal de metal alcalino (por ejemplo, sal sódica, sal potásica), una sal de metal alcalinotérreo (por ejemplo, sal cálcica, sal magnésica), una sal amónica, sales con una base orgánica tal como una sal de amina orgánica (por ejemplo, sal de trietilamina, sal de diisopropiltilamina, sal de piridina, sal de picolina, sal de etanolamina, sal de trietanolamina, sal de dicitlohexilamina, sal de N',N'-dibenciletilendiamina), una sal por adición de ácido inorgánico (por ejemplo, hidrocloreuro, hidrobromuro, sulfato, fosfato), una sal por adición de ácido carboxílico o ácido sulfónico orgánico (por ejemplo, formiato, acetato, trifluoroacetato, maleato, tartrato, fumarato, metanosulfonato, bencenosulfonato, toluenosulfonato y similares), una sal con un aminoácido básico o ácido (por ejemplo, arginina, ácido aspártico, ácido glutámico). Además, también se incluyen en la presente invención sus compuestos de solvato (por ejemplo, un compuesto de inclusión tal como un hidrato).

60

65

ES 2 321 584 T3

En el compuesto de la fórmula (I) de la presente invención, el enlace de disulfuro del compuesto (FK228) representado por la fórmula (III) se segmenta, y puede denominarse FK228 reducido o forma tiólica de FK228 (en lo sucesivo en la presente memoria las series de los compuestos de la presente invención también se denominan generalmente una forma tiólica de FK228).

5 La presente invención también proporciona un método de producción de la forma tiólica de FK228 de la presente invención. El método de producción de la forma tiólica de FK228 de la presente invención incluye característicamente una etapa para segmentar el enlace de disulfuro de FK228. La segmentación de este enlace puede efectuarse mediante un método conocido en este campo hasta un grado que no influya adversamente en la actividad inhibidora de histona desacetilasa de la forma tiólica de FK228 obtenida, o mediante un método modificado según sea necesario.

Más específicamente, la segmentación del enlace de disulfuro se alcanza usando un compuesto tiólico usado generalmente para un tratamiento de reducción de una proteína que tiene generalmente un enlace de disulfuro, tal como mercaptoetanol, ácido tioglicólico, 2-mercaptoetilamina, bencenotiol, paratiocresol, ditiotreitól. Preferiblemente, se usan mercaptoetanol y ditiotreitól. Un compuesto tiólico en exceso puede retirarse mediante diálisis, filtración en gel. Puede usarse un compuesto distinto al tiólico, electrolisis, tetrahidrobórato sódico, hidruro de litio y aluminio, sulfito y similares.

15 El tratamiento de reducción mencionado anteriormente se efectúa según sea apropiado mediante un procedimiento conocido dependiendo del tipo de agente reductor. Por ejemplo, cuando se usa mercaptoetanol o ditiotreitól, este reactivo se añade a FK228 y se hacen reaccionar a temperatura ambiente - bajo calentamiento durante 15 min - durante la noche, preferiblemente a temperatura ambiente durante la noche (véase Biochemical Experiment Method 8, chemical modification of SH group, Masatsune Ishiguro, Japan Scientific Societies Press, IV, chemical modification of disulfide bond; Bio-chemical Experiment Method 10, quantitative determination of SH group, Hiroshi Matsumoto, 25 Toyo Kuninori, Japan Scientific Societies Press, III, reduction of SS bond).

Un compuesto que ha de ser el material de partida de la forma tiólica de FK228 de la presente invención, a saber, FK228 o una de sus sales, es una sustancia conocida y disponible. Por ejemplo, la sustancia FR901228, que es uno de los estereoisómeros de FK228, puede obtenerse al cultivar una cepa bacteriana perteneciente al género *Chromobacterium*, que es capaz de su producción, bajo condiciones aeróbicas y recuperando la sustancia del caldo de cultivo. La cepa bacteriana perteneciente al género *Chromobacterium*, que es capaz de producir sustancia FR901228, es, por ejemplo, la cepa *Chromobacterium violaceum* WB968 (FERM BP-1968). La sustancia FR901228 puede obtenerse a partir de esta cepa de producción de acuerdo con el documento JP-B-7-64872. La sustancia FR901228 se recupera preferiblemente de una cepa bacteriana perteneciente al género *Chromobacterium*, que es capaz de producir sustancia FR901228, debido a que puede obtenerse más fácilmente. Además, una sustancia FR901228 sintetizada o semisintetizada también es ventajosa debido a que una etapa de purificación adicional es innecesaria o menor. Alternativamente, FK228 puede semisintetizarse o sintetizarse completamente de acuerdo con un método conocido convencionalmente. Más específicamente, puede usarse el método presentado por Khan W. Li *et al.* (J. Am. Chem. Soc., vol. 118, 7237-7238 (1996)).

40 Otro aspecto de la forma tiólica de FK228 de la presente invención es un compuesto en el que R¹ y/o R² son/es un grupo protector de tiol. Este compuesto puede prepararse al introducir un grupo protector de tiol en el compuesto de la presente invención en el que R¹ y R² son átomos de hidrógeno.

45 Un agente adecuado para introducir un grupo protector de tiol que ha de usarse en esta reacción se determina apropiadamente dependiendo del grupo protector que ha de introducirse. Por ejemplo, pueden mencionarse los usados generalmente, tales como el cloruro del grupo protector correspondiente (por ejemplo, cloruro de bencilo, cloruro de metoxibencilo, cloruro de acetoxibencilo, cloruro de nitrobencilo, cloruro de picolilo, N-óxido de cloruro de picolilo, cloruro de antrilmetilo, cloruro de isobutoximetilo, cloruro de feniltiometilo, etc.) y alcoholes del grupo protector correspondiente (alcohol difenilmetílico, alcohol adamantílico, alcohol acetamidometílico, alcohol benzamidometílico, etc.), dinitrofenilo, isobutileno, dimetoximetano, dihidropirano, cloroformiato de t-butilo.

55 Esta reacción puede llevarse a cabo de acuerdo con un método convencionalmente conocido para un agente introductor de grupos protectores o una combinación adecuada de tales métodos. La desprotección del grupo protector también es conocida por los expertos normales en la técnica (PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS, Segunda Edición, T.W. Greene, P.G.M. Wuts WILEY-INTERSCIENCE). Como un ejemplo específico, cuando el agente introductor es cloruro de bencilo, la protección del grupo tiol se alcanza mediante la reacción en presencia de hidróxido sódico 2 N y etanol a 25°C durante 30 min, y su desprotección se alcanza mediante tratamiento en presencia de sodio y amoníaco durante 10 min.

60 La forma tiólica de FK228 de la presente invención tiene una potente actividad inhibidora de histona desacetilasa, y es útil como un inhibidor de histona desacetilasa en diversos mamíferos, incluyendo el ser humano, tales como mono, ratón, rata, conejo, cerdo, perro, caballo, vaca.

65 Por otra parte, debido a su actividad inhibidora de histona desacetilasa, una composición farmacéutica que contiene la forma tiólica de FK228 de la presente invención es útil como un agente para el tratamiento o la profilaxis de las enfermedades (por ejemplo, un trastorno inflamatorio, diabetes, una complicación diabética, talasemia homocigótica, fibrosis, cirrosis, leucemia promielocítica aguda (APL, por sus siglas en inglés), protozoiasis) inducidas por

ES 2 321 584 T3

una expresión génica anormal. Además, la composición farmacéutica de la presente invención es útil como un agente antitumoral e inmunosupresor que evita el rechazo del trasplante de órganos y las enfermedades autoinmunes ejemplificadas posteriormente. Específicamente, se eligen las siguientes enfermedades.

5 Las reacciones de rechazo por trasplante de órganos o tejidos, tales como corazón, riñón, hígado, médula ósea, piel, cornea, pulmón, páncreas, intestino delgado, un miembro, músculo, nervio, disco intervertebral, traquea, mioblasto, cartílago, etc.;

reacciones del injerto contra el huésped después del trasplante de médula ósea;

10 enfermedades autoinmunes tales como artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, tiroiditis de Hashimoto, esclerosis múltiple, miastenia grave, diabetes tipo I, etc.;

15 infecciones provocadas por microorganismos patógenos (por ejemplo, *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium oxysporum*, *Trichophyton asteroides*, etc.);

20 enfermedades inflamatorias o hiperproliferativas de la piel o manifestaciones cutáneas de enfermedades mediadas inmunológicamente (por ejemplo, psoriasis, dermatitis atópica, dermatitis de contacto, dermatitis eczematoide, dermatitis seborreica, liquen plano, pénfigo, penfigoide bulloso, epidermolisis bullosa, urticaria, angioedema, vasculitis, eritema, eosinofilia dérmica, lupus eritematoso, acné y alopecia areata);

25 enfermedades autoinmunes del ojo (por ejemplo, queratoconjuntivitis, conjuntivitis vernal, uveitis asociada con la enfermedad de Behcet, queratitis, queratitis herpética, queratitis cónica, distrofia epitelial corneal, queratoleucoma, pénfigo ocular, úlcera de Mooren, escleritis, oftalmopatía de Graves, síndrome de VogtKoyanagi-Harada, queratoconjuntivitis seca (ojo seco), flictenula, iridociclitis, sarcoidosis, oftalmopatía endocrina, etc.);

30 enfermedades obstructivas reversibles de las vías respiratorias [asma (por ejemplo, asma bronquial, asma alérgica, asma intrínseca, asma extrínseca y asma del polvo), particularmente asma crónica o inveterada (por ejemplo, asma tardía e hipersensibilidad de las vías respiratorias), bronquitis, etc.];

35 inflamaciones mucosales o vasculares (por ejemplo, úlcera gástrica, lesión vascular isquémica o trombótica, enfermedades isquémicas del intestino, enteritis, enterocolitis necrosante, daños intestinales asociados con quemaduras térmicas, enfermedades mediadas por leucotrieno B4);

40 inflamaciones/alergias intestinales (por ejemplo, enfermedades celíacas, proctitis, gastroenteritis eosinofílica, mastocitosis, enfermedad de Crohn y colitis ulcerativa);

45 enfermedades alérgicas relacionadas con los alimentos con manifestación sintomática remota del tracto gastrointestinal (por ejemplo, migraña, rinitis y eczema);

50 enfermedades renales (por ejemplo, nefritis intersticial, síndrome de Goodpasture, síndrome urémico hemolítico y nefropatía diabética);

55 enfermedades nerviosas (por ejemplo, miositis múltiple, síndrome de Guillain-Barre, enfermedad de Meniere, neuritis múltiple, neuritis solitaria, infarto cerebral, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica (ALS, por sus siglas en inglés) y radiculopatía);

60 enfermedades isquémicas cerebrales (por ejemplo, lesión de cabeza, hemorragia en el cerebro (por ejemplo, hemorragia subaracnoide, hemorragia intracerebral), trombosis cerebral, embolismo cerebral, ataque cardíaco, apoplejía, ataque isquémico transitorio (TIA, por sus siglas en inglés) y encefalopatía hipertensiva);

enfermedades endocrinas (por ejemplo, hipertiroidismo y enfermedad de Basedow);

65 enfermedades hemáticas (por ejemplo, aplasia de glóbulos rojos pura, anemia aplástica, anemia hipoplástica, púrpura trombocitopénica idiopática, anemia hemolítica autoinmune, agranulocitosis, anemia perniciosa, anemia megaloblástica y aneritroplasia);

enfermedades óseas (por ejemplo, osteoporosis);

70 enfermedades respiratorias (por ejemplo, sarcoidosis, fibrosis pulmonar y neumonía intersticial idiopática);

enfermedades de la piel (por ejemplo, dermatomiositis, leucoderma vulgar, ictiosis vulgar, fotosensibilidad y linfoma de células T cutáneo);

75 enfermedades circulatorias (por ejemplo, arteriosclerosis, aterosclerosis, síndrome de aortitis, poliarteritis nodosa y miocardosis);

enfermedades del colágeno (por ejemplo, escleroderma, granuloma de Wegener y síndrome de Sjogren);

ES 2 321 584 T3

adiposis;

fascitis eosinofílica;

5 enfermedades periodontales (por ejemplo, daño a la encía, el periodontio, el hueso alveolar o el cemento);

síndrome nefrótico (por ejemplo, glomerulonefritis);

10 alopecia de patrón masculino, alopecia senil;

distrofia muscular;

pioderma y síndrome de Sezary;

15 enfermedades asociadas con anormalidades cromosómicas (por ejemplo, síndrome de Down);

enfermedad de Addison;

20 enfermedades mediadas por oxígeno activo (por ejemplo, lesión en órganos (por ejemplo, trastornos de circulación isquémica de órganos (por ejemplo, corazón, hígado, riñón, tracto digestivo, etc.) asociadas con la conservación, el trasplante o las enfermedades isquémicas (por ejemplo, trombosis, infarto cardíaco, etc.));

enfermedades intestinales (por ejemplo, choque endotóxico, colitis pseudomembranosa y colitis inducida por fármacos o radiación);

25 enfermedades renales (por ejemplo, insuficiencia renal isquémica aguda, fallo renal crónico);

enfermedades pulmonares (por ejemplo, toxicosis provocada por oxígeno pulmonar o fármacos (por ejemplo, paracort, bleomicina, etc.), cáncer de pulmón y enfisema pulmonar);

30 enfermedades oculares (por ejemplo, cataratas, enfermedad de almacenamiento del hierro (siderosis bulbar), retinitis pigmentosa, placas seniles, cicatrización del vítreo, quemadura alcalina corneal);

35 dermatitis (por ejemplo, eritema multiforme, dermatitis bullosa por inmunoglobulina A lineal, dermatitis por cemento);

y otras enfermedades (por ejemplo, gingivitis, periodontitis, sepsis, pancreatitis y enfermedades provocadas por contaminación ambiental (por ejemplo, contaminación del aire), envejecimiento, un carcinógeno, metástasis de carcinoma e hipobaropatía)];

40 enfermedades provocadas por liberación de histamina o liberación de leucotrieno C4; restenosis de la arteria coronaria después de angioplastia y

prevención de adhesiones posquirúrgicas;

45 enfermedades autoinmunes y estados inflamatorios (por ejemplo, edema mucosal primario, gastritis atrófica autoinmune, menopausia prematura, esterilidad masculina, diabetes mellitus juvenil, pénfigo vulgar, penfigoide, oftalmítis simpática, uveítis inducida por lentes de contacto, leucopenia idiopática, hepatitis crónica activa, cirrosis idiopática, lupus eritematoso discoide, orquitis autoinmune, artritis (por ejemplo, artritis deformante) o policondritis);

50 infección por virus de inmunodeficiencia humana (HIV, por sus siglas en inglés), sida;

conjuntivitis alérgica;

55 cicatriz hipertrófica y queloide debidos a trauma, quemadura o cirugía.

Por otra parte, la forma típica de FK228 de la presente invención es útil como un potenciador de la expresión o promotor de la reactivación de un transgén debido a su actividad inhibidora de histona desacetilasa.

60 En la presente invención, potenciación de la expresión de un transgén significa la potenciación en la célula huésped de la expresión de un gen exógeno transducido mediante ingeniería genética en las células de ser humano y diversos animales (por ejemplo, ratón, rata, cerdo, perro, caballo, vaca). La potenciación de la expresión del transgén puede ser a nivel celular (es decir, *in vitro*) o a nivel individual (es decir, *in vivo*), dando preferencia a aquel *in vivo*.

65 Según se usan en la presente memoria, *in vivo* e *in vitro* significa que estos términos se usan en este campo. Esto es, "*in vivo*" significa que las funciones y respuestas biológicas buscadas se expresan dentro de tejidos del cuerpo vivo, e "*in vitro*" significa que tales funciones y respuestas se expresan en un tubo de ensayo (sistema de cultivo tisular, sistema de cultivo celular, sistema no celular).

ES 2 321 584 T3

En la presente invención, reactivación de un transgén significa la liberación de la supresión de la expresión (silenciación) de un gen exógeno transducido mediante ingeniería genética en las células de ser humano y diversos animales (por ejemplo, ratón, rata, cerdo, perro, caballo, vaca) y la presente invención puede promover la reactivación. Además de la liberación de la silenciación, la presente invención puede promover la actividad de transcripción de un transgén que muestra expresión estable a un nivel constante, y potenciar la expresión. Tal efecto también está incluido en la “reactivación del transgén” de la presente invención. La promoción de la reactivación del transgén puede ser a un nivel celular (es decir, *in vitro*) o a nivel individual (es decir, *in vivo*), dándose preferencia a aquella *in vivo*.

Un gen exógeno puede transducirse mediante un método conocido en el campo pertinente. Por ejemplo, puede usarse beneficiosamente la transferencia de DNA mediante un método físico (método de microinyección, método de electroporación), la transferencia de DNA mediante un método químico (método del fosfato cálcico, método de DEAE-dextrano, etc.), un método biológico (vector viral tal como retrovirus y adenovirus), nuevos métodos tales como el método de liposomas de HVJ.

Cuando se usa la forma tiólica de FK228 de la presente invención o una de sus sales como un agente farmacéutico, puede usarse como una preparación farmacéutica sólida, semisólida o líquida que contiene forma tiólica de FK228 o una de sus sales como un ingrediente activo mezclado con un portador o excipiente orgánico o inorgánico para aplicación oral o parenteral. El ingrediente activo puede mezclarse con un portador farmacéuticamente aceptable atóxico típico adecuado para la forma de dosificación, tal como un polvo, un comprimido, una pella, una cápsula, un supositorio, un líquido, una emulsión, una suspensión, un aerosol, una pulverización y otra forma para el uso. Cuando es necesario, pueden usarse agente auxiliar, estabilizante, adherente. Estos portadores y excipientes pueden esterilizarse cuando sea necesario, o puede aplicarse un tratamiento de esterilización después de la formulación como una preparación. La forma tiólica de FK228 o una de sus sales están contenidos en el potenciador de la expresión o promotor de la reactivación en una cantidad suficiente para producir un efecto deseado sobre el estado que requiere la potenciación de la expresión de un transgén o su reactivación. En particular, cuando el potenciador de la expresión y promotor de la reactivación de un transgén de la invención se usa para una terapia génica, es preferible la administración parenteral, a saber, administración intravenosa, administración intramuscular, administración directa al tejido, administración a la cavidad intranasal, administración intradérmica, administración al fluido cerebroespinal, administración al tracto biliar, administración intravaginal. Además, puede usarse preferiblemente un método liposomático capaz de la administración directa a la zona y el órgano en el que se requieren la expresión y la reactivación de un transgén.

La cantidad terapéuticamente eficaz del ingrediente activo forma tiólica de FK228 y una de sus sales varía y se determina dependiendo de la edad y el estado del paciente individual que ha de tratarse y, cuando se usa como un potenciador de la expresión o un promotor de la reactivación de un transgén, del tipo del transgén y el tipo de enfermedad en la que se requieren la potenciación de la expresión y la promoción de la reactivación de un transgén.

El método de administración de un agente farmacéutico que contiene la forma tiólica de FK228 de la presente invención o una de sus sales como un ingrediente activo está libre de cualquier limitación particular con tal de que pueda proporcionar el efecto deseado y, por ejemplo, el agente puede administrarse oralmente o parenteralmente una vez al día o varias veces al día. Cuando se usa para una terapia génica, la ruta de administración más adecuada para la expresión y la reactivación del transgén se selecciona apropiadamente teniendo en cuenta la naturaleza de uso específica. Por ejemplo, cuando se usa para una terapia génica de un tumor, es preferible la administración directa a la célula tumoral (por ejemplo, método liposómico).

El potenciador de la expresión y el promotor de la reactivación de un transgén de la presente invención se caracteriza por la potenciación de la expresión de un transgén, así como la liberación de la supresión de la expresión del transgén, en donde la interacción con el transgén es un factor importante para ejercer el efecto. Por lo tanto, la cronología de la administración del transgén y la administración (*in vivo*, *in vitro*) al sujeto del potenciador de la expresión o promotor de la reactivación de la presente invención se determinan apropiadamente de acuerdo con el efecto deseado. Cuando se busca la potenciación de la expresión de un transgén, por ejemplo, el potenciador de la expresión del transgén de la invención se administra preferiblemente junto con o después de la administración del transgén. Cuando se busca la promoción de la reactivación de un gen ya transducido, el promotor de la reactivación de un transgén de la invención se administra preferiblemente cuando la reactivación es necesaria después de la administración del transgén. Cuando el potenciador de la expresión o promotor de la reactivación de un transgén de la presente invención ha de administrarse después de la administración del transgén, la cronología de la administración se determina apropiadamente de acuerdo con el efecto deseado y su nivel y el estado de expresión del gen previamente transducido (nivel de expresión, posición del transgén).

En particular, el potenciador de la expresión y promotor de la reactivación de un transgén de la presente invención pueden aplicarse beneficiosamente a una terapia génica. Para la terapia génica del cáncer, por ejemplo, transferencia de un gen suicida, puede aplicarse una vacuna de DNA. Como la transferencia de un gen suicida, se ejemplifica la transferencia de gen de citosina desaminasa (enzima para convertir un agente anticanceroso, 5-fluorocitosina (5-FC), desde un compuesto de tipo inactivo hasta uno de tipo activo) en células cancerosas. La expresión de este gen en una célula cancerosa puede potenciarse mediante la presente invención (inducción de efecto antitumoral mediante la conversión específica para células cancerosas y eficaz de 5-FC en una 5-FC de tipo activo). Como la vacuna de DNA, se ejemplifica un gen antigénico asociado a tumores expresado específicamente en una célula cancerosa. La transferencia del gen a un paciente con cáncer, o la reactivación de un gen antigénico endógeno asociado, cuya expresión se suprime,

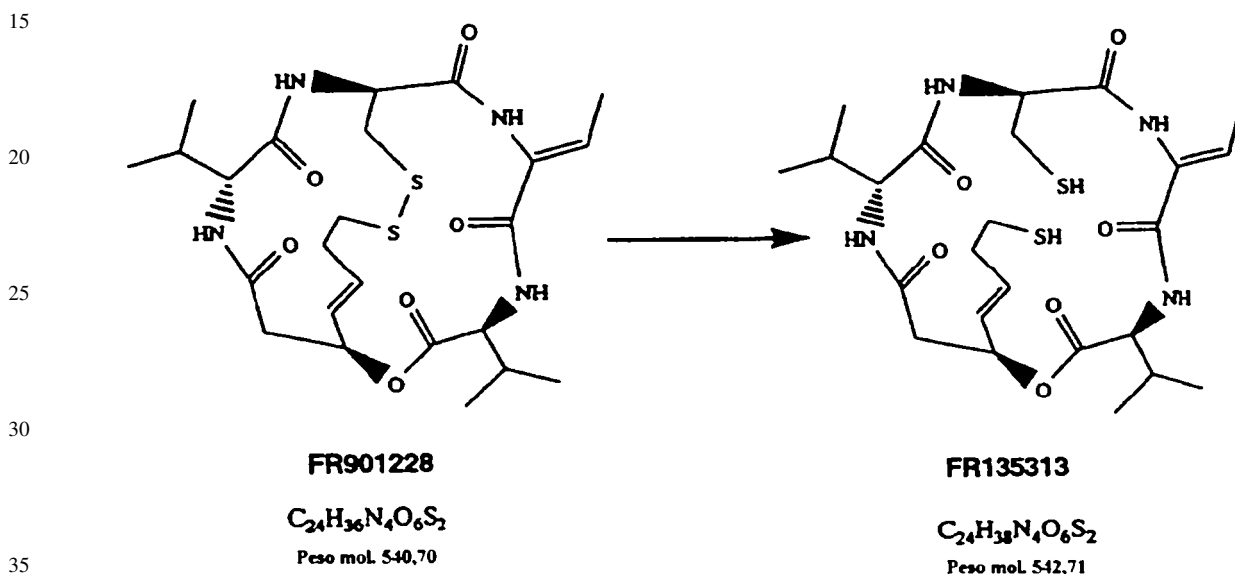
o ambas, proporcionan la potenciación de la expresión de la función del gen antigénico asociado a tumores, lo que a su vez mejora la inmunidad al cáncer del paciente.

En una terapia génica del cáncer, también se usan gen de p53, gen de citoquina (por ejemplo, gen de IL2, IL12), gen antisentido (K-ras antisentido) y similares. Para la terapia génica de la fibrosis quística, puede usarse el gen de CFTR, y para la terapia génica de la hemofilia, puede usarse un gen de factor anticoagulante.

Ejemplos

La presente invención se explica con más detalle en lo siguiente por medio de Ejemplos. Es innecesario decir que la presente invención no está limitada por estos Ejemplos.

Ejemplo de Producción: Producción de FR135313



FR901228 aislada y purificada de acuerdo con la descripción del documento JP-B-7-64872 se usó como una sustancia de partida. A una mezcla de FR901228 (51,6 mg, 95 μ mol), agua (40 ml) y acetonitrilo (10 ml) se añadió ditioneitol (412 mg, 2,66 mmol) y la mezcla se dejó reposar durante la noche a temperatura ambiente. El acetonitrilo se separó por destilación y la mezcla se purificó mediante HPLC preparativa (el lavado se efectuó usando solución acuosa de acetonitrilo al 20%/ácido trifluoroacético al 0,05% y la elución se efectuó usando una solución acuosa de acetonitrilo al 50%/ácido trifluoroacético al 0,05%).

Las fracciones que contienen el compuesto buscado como objetivo se recuperaron y se liofilizaron para dar FR135313 como un polvo (14,8 mg, rendimiento 28,7%)

1H -NMR (500 MHz, DMF- d_7) δ : 9,35 (1H, s an, intercambiable), 8,15 (1H, d an, J=9 Hz, intercambiable), 8,01 (1H, d an, J=7 Hz, intercambiable), 6,83 (1H, d, J=7 Hz, intercambiable), 6,81 (1H, q, 5 Hz), 4,55 (1H, m), 4,15 (1H, dd, J=9 Hz, 8 Hz), 2,97-2,88 (2H, m), 2,73-2,63 (2H, m), 2,55 (2H, m), 2,44 (1H, t, J=8 Hz, intercambiable), 2,34-2,27 (3H, m), 2,20 (1H, m), 2,08 (1H, t, J=8 Hz, intercambiable), 1,72 (3H, d, J=7 Hz), 0,98 (3H, d, J=7 Hz), J=7 Hz), 5,72 (1H, m), 5,61-5,54 (2H, m), 4,60 (1H, dd, J=10 Hz), 0,95 (3H, d, J=7 Hz), 0,88 (3H, d, J=7 Hz), 0,87 (3H, d, J=7 Hz).

MS m/e 654 (M+TFA).

La pureza del compuesto elegido como objetivo se confirmó mediante HPLC bajo las siguientes condiciones.

Condiciones de HPLC

columna: YMC-PACK ProC18 (YMS. Co., Ltd), 4,6 X 150 mm elución: solución acuosa de acetonitrilo al 50%/ácido trifluoroacético al 0,05%

caudal: 1 ml/min

detección: 214 nm, 254 nm

tiempo de retención: 4,01 min (el tiempo de retención de la sustancia de partida sustancia FR901228 es 4,27 min).

ES 2 321 584 T3

Ejemplo Experimental: ensayo de actividad de histona desacetilasa

Se examinó la actividad inhibidora de histona desacetilasa de la sustancia FR135313 sintetizada en el Ejemplo de Producción 1.

1. Material de prueba • Método de prueba

(1) Célula

FM3A de cáncer de mama de ratón fue suministrada por el Dr. Dai Ayusawa del Medical Department, Yokohama City University. Esta célula se subcultivó en un medio que contenía FBS (Flow Laboratories, en lo sucesivo denominado en la presente memoria medio ES) al 2% a 37°C, en CO₂ al 5%.

(2) Agente farmacéutico

El butirato sódico se adquirió de Waco Pure Chemical Industries, Ltd. y el acetato sódico [³H] se adquirió de Amersham.

(3) Tampón

Tampón de lisis (pH 6,5): Tris-HCl (Sigma) 10 mM, bisulfito sódico (Nakarai Chemical, Ltd) 50 mM, Triton X-100 (Nakarai Chemical, Ltd) al 1%, cloruro magnésico (Nakarai Chemical, Ltd) 10 mM, sacarosa (Nakarai Chemical, Ltd) al 8,6%

Tampón de lavado (pH 7,4): Tris-HCl 10 mM, EDTA (Sigma) 13 mM

Tampón de HDA (pH 7,5): fosfato potásico (Nakarai Chemical, Ltd) 15 mM, glicerol al 5%, EDTA 0,2 mM

(4) Preparación de histona acetilada [³H]

La histona acetilada [³H] que ha de ser el sustrato de histona desacetilasa se preparó al cultivar 1 X 10⁸ células de célula FM3A (suspendida en 50 ml de medio ES) en presencia de 0,5 mCi/ml de acetato sódico [³H] y butirato sódico 5 mM a 37°C en CO₂ al 5% durante 30 min, y extraer inmediatamente la fracción de histona de las células tratadas de acuerdo con el siguiente método. La radiactividad específica era 0,45 μCi/mg de histona.

(5) Extracción de proteína de histona de la célula

La extracción de proteína de histona de la célula de cultivo se efectuó de acuerdo con el método de Yoshida *et al.* (M. Yoshida *et al.*, J. Biol. Chem. 265, 17174-17179 (1990)). 1 x 10⁸ células de células FM3A marcadas con acetato sódico [³H] se recuperaron y se lavaron una vez con PBS. Las células lavadas se suspendieron en 1 ml de tampón de lisis enfriado con hielo y se rompieron mediante un homogeneizador Dounce. El núcleo se recogió mediante centrifugación a 1000 rpm durante 10 min y se lavó 3 veces con el tampón de lisis y a continuación una vez con el tampón de lavado. El residuo se suspendió en 0,1 ml de agua destilada enfriada con hielo y ácido sulfúrico concentrado (Waco Pure Chemical Industries, Ltd.) se añadió a la concentración final de 0,4 N, y la mezcla se mantuvo a 4°C durante 1 h. La suspensión se centrifugó en una máquina microcentrífuga a 15.000 rpm durante 5 min, el sobrenadante se recuperó, a lo que se añadió 1 ml de acetona, y el sobrenadante se dejó reposar durante la noche a 20°C. El precipitado se recuperó mediante centrifugación en una máquina microcentrífuga a 15.000 rpm durante 10 min y se secó.

(6) Extracción de histona desacetilasa en bruto de la célula

Histona desacetilasa de ratón se prepurificó de células FM3A. Células FM3A cultivadas suspendidas (concentración de 1 X 10⁶ células/ml en medio ES, 4 l) en un matraz giratorio de 8 l se recuperaron mediante centrifugación y se suspendieron en 40 ml de tampón de HDA. Las células se rompieron mediante un homogeneizador Dounce y el núcleo celular se recuperó mediante centrifugación a 35.000 X g durante 10 min y se rompió adicionalmente en 20 ml de solución de sulfato amónico 1 M. Una suspensión turbia de ruptura se sometió a ultrasonidos y se centrifugó para dar un extracto transparente, al que se añadió sulfato amónico, y la concentración de sulfato amónico se elevó hasta 3,5 M, con lo que la histona desacetilasa precipitaba. El precipitado se disolvió en 10 ml de tampón de HDA y se dializó frente a 4 l del mismo tampón. El dializado se tamponó con tampón de HDA. Se aplicó a DEAE-celulosa (DE52, 25 X 85 mm, Whatman) y se eluyó con 300 ml de NaCl mediante un gradiente lineal (0-0,6 M). La actividad de histona desacetilasa se eluyó como una actividad de un solo pico en la fracción de elución de NaCl 0,2-0,3 M. Como resultado, la histona desacetilasa se purificaba hasta aproximadamente 60 veces la actividad específica.

ES 2 321 584 T3

(7) *Reacción de acetilación de histona in vitro*

Se mezclaron 4 μl histona acetilada [^3H] (2500 cpm/5 μg) y 96 μl de fracción de histona desacetilasa en bruto. Una solución en etanol (1 μl) de sustancia FR135313 preparada de acuerdo con el Ejemplo de Producción mencionado anteriormente se añadió a la mezcla a diversas concentraciones finales y la mezcla se hizo reaccionar a 37°C durante 10 min. La reacción se terminó mediante la adición de 10 μl de ácido clorhídrico concentrado y el ácido acético [^3H] liberado se extrajo con 1 ml de acetato de etilo, del que se añadieron 0,9 ml a 5 ml de solución de centelleo de tolueno y se midió la radiactividad.

(8) *Resultado*

La sustancia FR135313, que está en una forma reducida (forma tiólica), mostraba actividad inhibidora de histona desacetilasa según se muestra en el valor de IC_{50} de no más de 1 ng/ml.

El grupo tiol mostraba una fuerte acción quelante y, por lo tanto, se considera que la sustancia FR901228 que se convertía en una forma tiólica bajo el ambiente de reducción inhibe la actividad de histona desacetilasa por su capacidad de orientación hacia esta enzima, que es una metaloenzima.

Aplicabilidad industrial

El compuesto de la fórmula (I), que es una forma reducida (forma tiólica) de FK228, particularmente la sustancia FR135313, que es una forma reducida (forma tiólica) de la sustancia FR901228, y sus sales tienen una fuerte actividad inhibidora de histona desacetilasa y son útiles como un inhibidor de histona desacetilasa o un agente para la profilaxis o el tratamiento de un trastorno inflamatorio, diabetes, una complicación diabética, talasemia homocigótica, fibrosis, cirrosis, leucemia promielocítica aguda (APL, por sus siglas en inglés), rechazo de trasplante de órganos o una enfermedad autoinmune, y además como un potenciador de la expresión o un promotor de la reactivación de un transgén.

Al controlar la actividad del grupo tiol, puede controlarse la actividad inhibidora de histona desacetilasa, permitiendo de ese modo el desarrollo de un agente farmacéutico adecuado para diversas aplicaciones clínicas.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto representado por la fórmula (I)

5

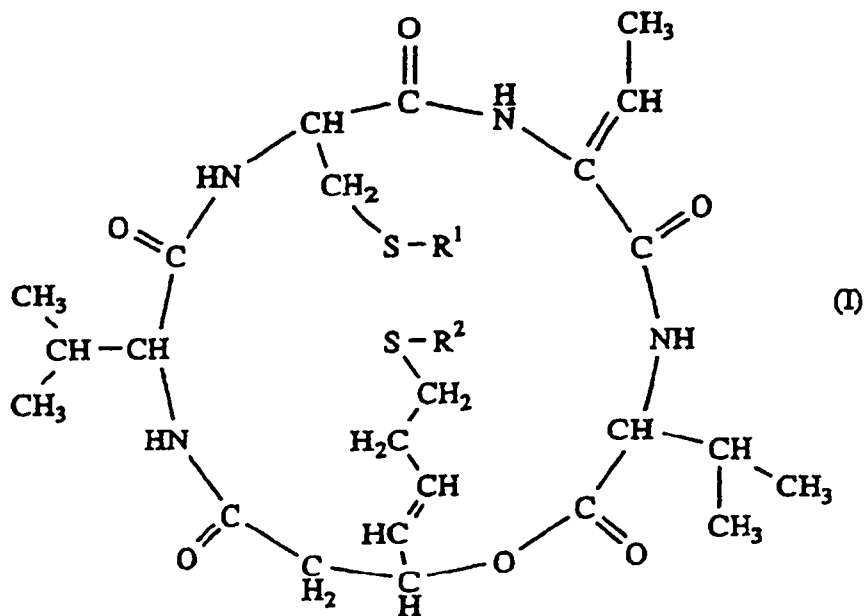
10

15

20

25

30



en el que R¹ y R² son iguales o diferentes y cada uno es un átomo de hidrógeno o un grupo protector de tiol, o una de sus sales.

2. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que R¹ y R² son cada uno un átomo de hidrógeno, o una de sus sales.

3. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 2, que está representado por la fórmula (II)

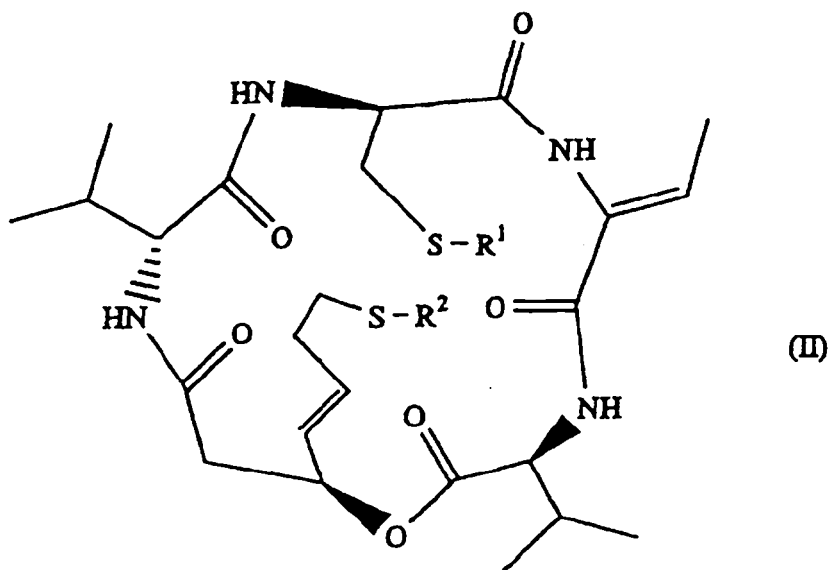
40

45

50

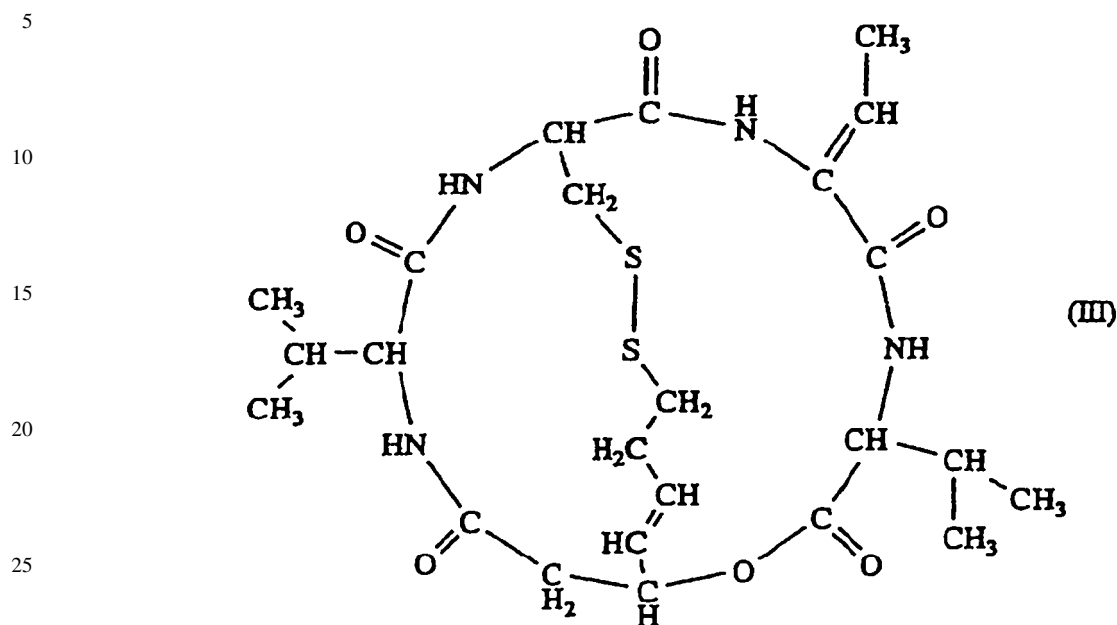
55

60

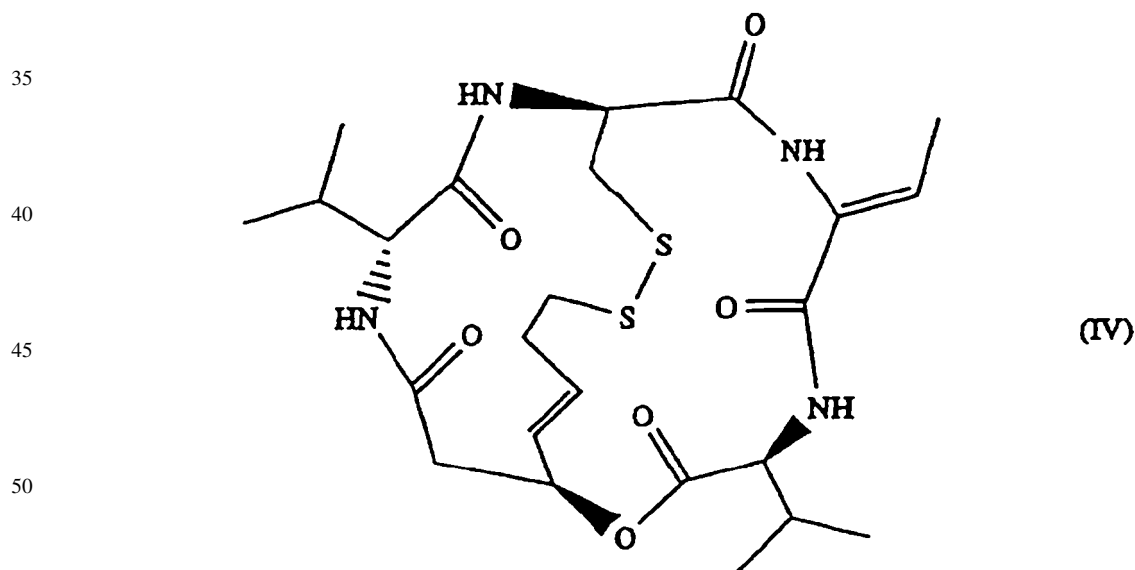


en el que R¹ y R² son cada uno un átomo de hidrógeno, o una de sus sales.

4. Un método de producción de un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o una de sus sales, que comprende una etapa para segmentar un enlace de disulfuro en un compuesto representado por la fórmula (III)



5. El método de producción de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el compuesto de la fórmula (III) está representado por la fórmula (IV)



55 6. El método de producción de acuerdo con la reivindicación 5, que comprende una etapa para cultivar una cepa bacteriana perteneciente al género *Chromobacterium*, que es capaz de producir un compuesto de la fórmula (IV), en un medio nutritivo acuoso bajo condiciones aeróbicas y recuperando el compuesto, y una etapa para segmentar un enlace de disulfuro en el compuesto recuperado de la fórmula (IV).

60 7. Un inhibidor de histona desacetilasa que comprende un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o una de sus sales.

65 8. Una composición farmacéutica para el tratamiento o la profilaxis de un tumor, trastornos inflamatorios, diabetes, una complicación diabética, talasemia homocigótica, fibrosis, cirrosis, leucemia promielocítica aguda (APL, por sus siglas en inglés), rechazo de trasplante de órganos o una enfermedad autoinmune, que comprende un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o una de sus sales, como un ingrediente activo.

ES 2 321 584 T3

9. Un potenciador de la expresión o promotor de la reactivación de un transgén, que comprende un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o una de sus sales, como un ingrediente activo.

5 10. El potenciador de la expresión o promotor de la reactivación de un transgén de acuerdo con la reivindicación 9, que es un agente farmacéutico.

11. El potenciador de la expresión o promotor de la reactivación de un transgén de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el agente farmacéutico es para terapia génica.

10 12. Uso de un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o una de sus sales, para la producción de una composición farmacéutica para el tratamiento o la profilaxis de un tumor, trastornos inflamatorios, diabetes, una complicación diabética, talasemia homocigótica, fibrosis, cirrosis, leucemia promielocítica aguda (APL, por sus siglas en inglés), rechazo de trasplante de órganos o una enfermedad autoinmune.

15 13. Uso de un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o una de sus sales, para la producción de un potenciador de la expresión de un transgén o un promotor de la reactivación de un transgén.

20 14. El uso de acuerdo con la reivindicación 13, en el que el potenciador de la expresión de un transgén o el promotor de la reactivación de un transgén es para terapia génica.

25

30

35

40

45

50

55

60

65