



(12) **PATENT**

(19) **NO**

(11) **331682**

(13) **B1**

NORGE

(51) **Int Cl.**

A61K 38/12 (2006.01)

A61P 13/08 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20040731	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2002.08.20 PCT/JP2002/08355
(22)	Inng.dag	2004.02.20	(85)	Videreføringsdag	2004.02.20
(24)	Løpedag	2002.08.20	(30)	Prioritet	2001.08.21, JP, 250846/01
(41)	Alm.tilgj	2004.04.20			
(45)	Meddelt	2012.02.20			
(73)	Innehaver	Astellas Pharma Inc, 3-11, Nihonbashi-Honcho 2-chome, Chuo-ku, JP-103-8411 TOKYO, Japan			
(72)	Oppfinner	Yuka Sasakawa, c/o Fujisawa Pharmaceutical Co Ltd, 4-7, Doshomachi 3-chome, Chuo-ku, JP-541-8514 OSAKA-SHI, OSAKA, Japan Yoshinori Naoe, c/o Fujisawa Pharmaceutical Co Ltd, 4-7, Doshomachi 3-chome, Chuo-ku, JP-541-8514 OSAKA-SHI, OSAKA, Japan			
(74)	Fullmektig	Plougmann & Vingtoft, Postboks 1003 Sentrum, 0104 OSLO, Norge			
(54)	Benevnelse	Medisinsk anvendelse av histon-deacetylase inhibitor.			
(56)	Anførte publikasjoner	J.C.BYRD et al., Depsipeptide (FR901228): A Novel Therapeutic Agent With Selective, In Vitro Activity Against Human B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia Cells, Blood, 1999, Vol. 94 (4), side 1401-1408, H.UEDA et al., FR901228, A Novel Antitumor Bicyclic Depsipeptide Produced By Chromobacterium violaceum No. 968, The Journal of Antibiotics, 1993, Vol. 47 (3), side 315-323, A.A.GELDOF et al., Cytotoxicity and neurocytotoxicity of new marine anticancer agents evaluated using in vitro assays, Cancer Chemoter Pharmacol, 1999, Vol. 44, side 312-318			
(57)	Sammendrag				

Terapeutisk middel for prostatacancer og malignt lymfom inneholdende FK228 eller et salt derav som en aktiv ingrediens, og en fremgangsmåte for å evaluere en antitumoreffekt av en histondeacetylase-inhibitor som inkluderer minst ett trinn for å behandle en testcelle med en histondeacetylase-inhibitor, et trinn for å måle forandring i ekspresjonsmengden av et spesifikt gen i testcellen før og etter behandlingen med inhibitoren, og sammenligne begge ekspresjonsmengder.

Område for oppfinnelsen

Den foreliggende oppfinnelse vedrører anvendelse av et farmasøytisk materiale som omfatter en forbindelse representert ved
5 formel (I) eller et salt derav og en farmasøytisk akseptabel bærer, for fremstilling av et medikament som skal anvendes for å behandle prostatacancer som angitt i krav 1. Foreliggende oppfinnelse vedrører også anvendelse av en forbindelse representert med formelen (I) eller et salt derav for fremstilling av et middel
10 for behandling av prostatacancer som angitt i krav 3.

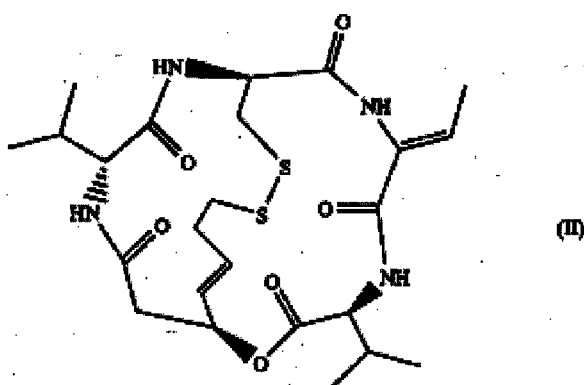
Bakgrunn og teknikkens stilling

I de siste år har «skreddersydde medisiner» fått anerkjennelse, hvilke tar hensyn til individuelle forskjeller
15 mellom pasienter, og en søken etter en markør for å skille en cancer som et farmasøytisk middel er effektivt mot fra en cancer som et farmasøytisk middel ikke er effektivt mot, vurderes som nødvendig. Det er et forsøk på å etisk og
20 medisinsk forbedre kostnadsytelse av medisineringsbehandling ved å administrere et farmasøytisk middel til pasienter etter å på forhånd ha verifisert sannsynligheten for midlets effekt, for dermed å forbedre effektiviteten og likeledes unngå det farmasøytiske middels toksisitet, og
25 for å redusere ikke-signifikant anvendelse av det farmasøytiske middel. I cancerbehandling har det vært ønskelig å utvikle en fremgangsmåte for å predikere anticancermidlenes effektivitet, fordi det kan være et viktig middel for å bygge bro over gapet mellom basisforsøk og klinisk applika-
30 sjon.

I tillegg er det blitt påpekt mht. en substans eller en forbindelse som generelt er rapportert å ha en antitumoraktivitet at når rapporten kun er basert på *in vitro*-

resultater, fører ikke slike resultater direkte til predikering av *in vivo*-resultater. Med andre ord er det et problem at en substans som viser en antitumoraktivitet *in vitro*, ikke nødvendigvis viser en antitumoraktivitet *in vivo*, og anvendelse av en substans som viser en antitumoraktivitet *in vitro* direkte som et anticancermiddel er vanskelig.

F.eks. er en forbindelse representert med formelen II



blitt rapportert å introdusere en potent antitumoraktivitet ved selektivt å inhibere histon-deacetylase (denne substans er også blitt rapportert å forårsake høy acetylering av histon i celler behandlet med denne substans, og som et resultat, induserer transkripsjonal kontrollaktivitet av forskjellige gener, cellesyklusinhibitorisk aktivitet og apoptoseinhibitorisk aktivitet (JP-B-7-64872, H. Nakajima et al., Exp.Cell Res., (1998), vol 241, s. 126-133)). Imidlertid har ingen rapport etablert en faktor som er i stand til å predikere en antitumoreffekt for denne forbindelse, og slik situasjonen står, er mange problemer fremdeles uløste, slik som om, eller ikke, *in vitro*-resultater kan appliseres direkte *in vivo*, om, eller ikke, forbindelsen viser en praktisk effekt *in vivo* i noen tumor, o.l.

Histon-deacetylase er et metallo-deacetylert enzym hvor Zn er koordinert som det aktive senter (M.S. Finnin et al., Nature, (1999), vol 401, s. 188-193). Dette enzym vurderes å forandre affiniteten for DNA for forskjellig acetylte histoner. Et direkte biologisk fenomen som fører til forandringer i kromatinstrukturen. Kromatinstrukturens minimumsenhet er et nukleosom hvor 146 bp DNA er bundet 1,8 ganger rundt, mot klokken, en histonoktamer (H2A, H2B, H3 og H4, hver 2 molekyler, kjernehiston). Kjernehistonet stabiliserer nukleosomstrukturen fordi den positive ladning ved N-terminalen av hvert histonprotein interagerer med DNA. Acetylering av histon reguleres ved balansen mellom acetyleringsreaksjonen hvor histon-acetyltransferase er involvert og deacetyleringsreaksjonen hvor histon-deacetylase er involvert. Acetyleringen av histon forekommer i en evolusjonsmessig godt preservert lysinenhet ved N-terminalen til histonproteinet, hvorved det antas at kjernehistonproteinet taper ladningen ved N-terminalen, interaksjonen med DNA attenueres, og nukleosomstrukturen blir ustabil. Således antas deacetyleringen av histonet å gå i revers, nemlig, mot stabiliseringen av nukleosomstrukturen. Imidlertid forblir det en del uklare aspekter så som graden acetyleringen forandrer kromatinstrukturen, og hvordan den relaterer seg til den sekundært induserte transkripsjonskontroll o.l.

J.C.BYRD et al., Blood, 1999, Vol. 94 (4), s. 1401-1408, beskriver at FR901228 har selektiv in vitro cytotoxiskitet mot human B-celle kronisk lymfocytteleukemi (CLL) celler og en tidlig introduksjon av FR901228 inn i kliniske forsøk for pasienter med CLL støttes av dette resultat.

H. UEDA et al., Journal of Antibiotics, 1993, Vol. 47 (3), s. 315-323, beskriver antitumoreffekter av FR901228 på

flere faste tumorer hos mus, men virkningen på prostata-cancer er ikke beskrevet.

5 A.A. GELDOLF et al., Cancer Chemoter Pharmacol, 1999, Vol. 44, s. 312-318, beskriver en ny klasse anticancermedika-
menter isolert fra marine organismer. Disse forbindelsene
er cyklodepsipeptider, men de har andre strukturer enn
FK228. Det verken beskrives eller foreslås at disse
forbindelsene har den samme HDAC-hemmende aktivitet og den
10 samme virkningsmekanisme som FK228.

Beskrivelse av oppfinnelsen

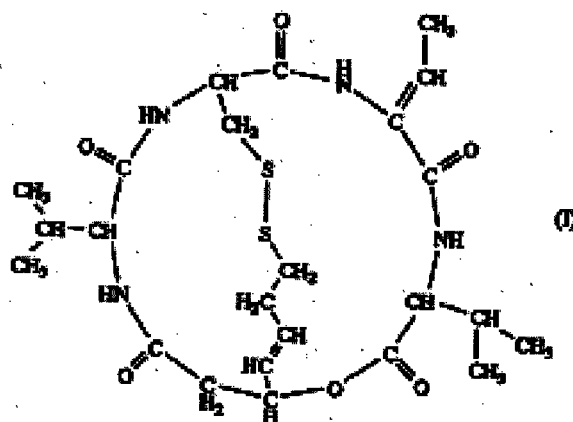
Et formål med foreliggende oppfinnelse er å tilveiebringe
15 et nytt terapeutisk middel for prostatacancer gjennom
anvendelse av et farmasøytisk materiale. Et formål med
foreliggende beskrivelse er å beskrive en fremgangsmåte for
å evaluere og predikere en antitumoreffekt av en histon-
deacetylase-inhibitor.

20

Oppfinnerne av foreliggende oppfinnelse har utført ut-
strakte forsøk i forsøk på å løse de ovenfor nevnte pro-
blemer og funnet et terapeutisk middel for prostatacancer
som muliggjør bekreftelse av *in vivo*-antitumoreffekt.
25 Videre har oppfinnerne av foreliggende oppfinnelse funnet
at en antitumoreffekt av en histondeacetylase-inhibitor
varierer avhengig av typen tumor, og at variasjonen
observeres i forbindelse med forandringer i ekspresjons-
formen av et spesifikt gen eller protein, og basert på en
30 slik observasjon, etablert en metode for å evaluere en
antitumoreffekt av en histondeacetylase-inhibitor, som
resulterte i fullføringen av foreliggende oppfinnelse.
Således tilveiebringer foreliggende oppfinnelse det
følgende.

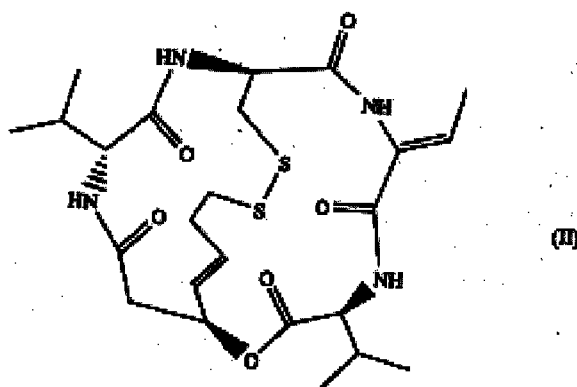
35

Anvendelse av et farmasøytisk materiale som omfatter en forbindelse representert med formel (I) (heretter også benevnt som FK228; SEKV ID NR 5)



5 eller et salt derav og en farmasøytisk akseptabel bærer, for fremstilling av et medikament som skal anvendes for å behandle prostatacancer.

Nærmere bestemt er forbindelsen representert ved formel (I)
 10 en forbindelse med formel (II) (heretter benevnt som FR901228),



15 Det farmasøytiske materiale for å behandle prostatacancer har en antitumorvirkning *in vivo*.

Medikamentet kan anvendes i en fremgangsmåte for å behandle prostatacancer som omfatter administrering av en effektiv mengde av FK228, fortrinnsvis formelen FR901228.

Foreliggende oppfinnelse vedrører videre anvendelse av FK228 eller et salt derav, fortrinnsvis formelen FR901228, for fremstilling av et middel for å behandle prostata-cancer.

5

Midlet for å behandle prostatacancer har en antitumor-virkning *in vivo*.

Kort beskrivelse av figurene

10

Fig. 1 er en graf som viser en antitumoreffekt av FK901228 på human prostatacancer, hvor den vertikale akse viser en tumorvekstrate, den tverrstilte akse viser antall dager fra den innledende administrering, og tumorvekstraten er uttrykt i en relativ andel av tumorvolum etter dag 0 i forhold til tumorvolumet på dag 0, tatt som 1.

15

Fig. 2 inkluderer grafer som viser en antitumoreffekt av FR901228 på humant lymfom, hvor de vertikale akser viser andelen overlevende mus, og de horisontale akser viser antall dager etter tumorcelleimplantering.

20

Fig. 3 inkluderer grafer som viser en antitumoreffekt av FR901228 på human prostatacancer ((a); PC-3) og nyrecancer ((b); ACHN), hvor de vertikale akser viser en tumorvekstrate, de horisontale akser viser antall dager etter den innledende administrering, og tumorvekstraten er uttrykt i et relativt forhold av tumorvolum etter dag 0 i forhold til tumorvolumet etter dag 0, tatt som 1.

25

30

Fig. 4 inkluderer grafer som viser en virkning av FR901228 på p21-genekspressjon *in vitro* (PC-3-celle, ACHN-celle).

(a), (b); den vertikale akse viser en relativ mengde av P21-genekspresjon, og den horisontale akse viser kontaktid (t) med FR901228.

(c); den vertikale akse viser en relativ mengde av
5 p21-genekspresjon.

Fig. 5 inkluderer grafer som viser en virkning av FR901228 på p21-genekspresjon og c-myc-genekspresjon *in vivo* (PC-3-celle, ACHN-celle), hvor den vertikale akse viser en
10 relativ mengde av p21- eller c-myc-genekspresjon, og den transverse akse viser antall dager etter administrering av FR901228.

Detaljert beskrivelse av oppfinnelsen

15

Det terapeutiske middel for prostatacancer omfatter som en aktiv ingrediens en forbindelse (FK228) representert med formel (I) eller et salt derav. Av forbindelsene med formelen (I) er en forbindelse (FR901228) representert med
20 formelen (II), som er en stereoisomer, foretrukket. Disse forbindelser har en sterkt histondeacetylasehemmende aktivitet (H. Nakajima, et al., *ibid.* (1998)) og FR901228 er spesielt foretrukket inneholdt i det terapeutiske middel for prostatacancer fordi det har en sterkere histon-
25 deacetylasehemmende aktivitet.

I foreliggende beskrivelse angir en referanse til FK228 en gruppe forbindelser som ikke tar hensyn til stereoisomeri, inkluderende forbindelsene representert med formelen (II),
30 med mindre annet er angitt.

FK228 og et salt derav er kjente og tilgjengelige substanser. F.eks. kan FR901228, som er én av stereoisomerene av FK228, oppnås ved å dyrke en stamme som er i stand til å

produsere FR901228 og som tilhører genus *Chromobacterium* under aerobe betingelser og å gjenvinne substansen fra dyrkningskaret. Som stammen som er i stand til å produsere FR901228 og som tilhører genus *Chromobacterium*, kan f.eks.

5 *Chromobacterium violaceum* WB968 (FERM BP-1968) nevnes. Nærmere bestemt kan FR901228 oppnås fra en FR901228-produserende stamme i samsvar med fremgangsmåten beskrevet i JP-B-7-64872 (korresponderende til US-Patent Nr 4.977.138). FR901228 gjenvinnes fortrinnsvis fra en stamme i stand til

10 å produsere FR901228 og som tilhører genus *Chromobacterium*, fordi den enkelt kan oppnås. Imidlertid er syntetisk eller semisyntetisk FR901228 også fordelaktig fordi ingen, eller kun få trinn med rensing er nødvendig. Likeledes kan FK228, andre enn FR901228, også semisyntetiseres eller total-

15 syntetiseres i samsvar med en konvensjonell kjent metode. Nærmere bestemt kan den produseres i samsvar med metoden rapportert av K.Li. Khan, et al., (J.Am.Chem. Soc., (1996) vol 118, s. 7237-7238)).

20 Saltet av FK228 er et biologisk akseptabelt, generelt ikke-toksisk salt, og eksempler derav inkluderer salter med en uorganisk base (f.eks. alkalimetallsalter så som natrium-salt, kaliumsalt, etc., alkaliske jordmetallsalter så som kalsiumsalt, magnesiumsalt og ammoniumsalt), salter med

25 organisk base (f. eks. organiske aminsalter så som trietyl-aminsalt, diisopropyletylaminsalt, pyridinsalt, pikolin-salt, etanolaminsalt, trietanolaminsalt, dicykloheksylamin-salt, N,N'-dibenzyletylendiaminsalt, etc.), uorganiske syreaddisjonssalter (f.eks. hydroklorid, hydrobromid,

30 hydrosulfat, fosfat, etc., organisk karboksylsyre, sulfon-syreaddisjonssalter (f.eks. format, acetat, trifluoracetat, maleat, tartrat, fumarat, metansulfonat, benzensulfonat, toluensulfonat, etc.), salter med en basisk eller sur

aminosyre (f.eks. arginin, asparaginsyre, glutaminsyre, etc.), salter med en base og syreaddisjonssalter.

FK228 kan ha en stereoisomer (f.eks. FR901228) så som en
5 optisk isomer eller geometrisk isomer basert på et asymmetrisk karbonatom eller en dobbeltbinding, og alle isomerene og blandningene derav er innen rammen av foreliggende oppfinnelse.

10 Solvatforbindelser av FK228, FR901228 og salter derav (f.eks. inklusjonsforbindelser (f.eks. hydrat etc.)) er også omfattet innenfor rammen av foreliggende oppfinnelse.

I foreliggende oppfinnelse angir *in vivo* og *in vitro* det
15 som vanligvis forstås innenfor feltet. Dvs. «*in vivo*» angir en tilstand hvor en biologisk funksjon eller reaksjon uttrykkes i en levende organisme, og «*in vitro*» angir en ekspresjon av en slik funksjon eller reaksjon i et testrør (vevskultursystem, cellekultursystem, cellefritt system,
20 etc.).

Tumoren som er målet i foreliggende oppfinnelse er en tumor hvorpå FK228, som er en histondeacetylase-inhibitor, utviser en antitumoreffekt, og eksempler derav inkluderer
25 prostatacancer, hvor *in vivo*-effekt er spesielt bemerkelsesverdig. Den foreliggende oppfinnelse viser god antitumoreffekt *in vivo*, spesielt mot denne tumoren.

Det terapeutiske midlet for prostatacancer ifølge
30 foreliggende oppfinnelse kan anvendes som et farmasøytisk materiale i form av et faststoff, semifaststoff eller væske inneholdende FK228 eller et salt derav som en aktiv ingrediens i samblanding med en organisk- eller uorganisk bærer eller eksipient egnet for oral- eller parenteral

applisering. Det aktive middel kan samblandes med en konvensjonell, ikke-toksisk, farmasøytisk akseptabel bærer, f.eks. pulver, tablett, pellet, kapsel, stikkpille, væske, emulsjon, suspensjon, aerosol, spray og andre former egnet
5 for bruk. Om nødvendig kan hjelpestoffer, stabiliserende midler, fortykningsmidler o.l. også inkluderes. Disse bærere og eksipienser kan anvendes etter en steriliseringsbehandling der hvor det er nødvendig, eller kan steriliseres etter formulering inn i et preparat. FK228 eller et
10 salt derav kan inneholdes i en mengde tilstrekkelig til å tilveiebringe en antitumoreffekt i det terapeutiske middel for prostatacancer.

Idet det farmasøytiske middel brukes til et menneske
15 anvendes det fortrinnsvis intravenøst, intramuskulært eller oralt. Selv om den terapeutiske effektive dose av FK228 eller et salt derav, som er aktive ingredienser, varierer avhengig av alderen og tilstanden til den individuelle pasient som skal behandles, og typen cancer, er den
20 generelt 0,1-100 mg, fortrinnsvis 1-50 mg, mer fortrinnsvis 5-30 mg, pr. dag i en mengde av FK228 pr. menneske pr. overflateareal (m^2) i tilfellet intravenøs administrering for behandling av tumor.

25 Den foreliggende beskrivelse beskriver også en evalueringsmetode av en antitumoreffekt av histondeacetylase-inhibitoren. Ved anvendelse av denne metode, kan en histondeacetylase-inhibitor som kan oppvise en antitumoreffekt på måltumorcellen finnes uten å faktisk administrere
30 inhibitoren til et menneskelig legeme.

Med termen «histondeacetylase-inhibitor» menes en forbindelse som binder til det aktive setet av histondeacetylase kompetitivt med substrat, eller en forbindelse som

binder til et sete som ikke er det aktive setet av histon-deacetylase og som har en virkning til å forandre enzym-aktiviteten til histondeacetylase, og det omfatter en forbindelse allerede kjent som en histondeacetylase-inhibitor
5 hvis anvendelse er kjent, alle forbindelser (syntetiske eller naturlige) rapportert å ha histondeacetylase-hemmende aktivitet og alle forbindelser som vil rapporteres i fremtiden. For å være spesifikk kan det ovenfor nevnte FK228, et salt derav og et derivat derav (f.eks. acetyliert
10 FK228, en tiolform hvor S-S-bindingen er blitt redusert etc.), nevnes. I tillegg er trikostatin A, natriumbutyrat, suberoylanilid-hydroksamsyre (SAHA), MS-275, cyklisk hydroksamsyre-inneholdende peptid, Apicidin, Trapoxin o.l. også forbindelser hvis histondeacetylase-hemmende aktivitet
15 er blitt rapportert.

Evalueringsmetoden for en antitumoreffekt av histon-deacetylase-inhibitoren ifølge beskrivelsen inkluderer minst (1) et trinn for å behandle en testcelle med en
20 histondeacetylase-inhibitor, og (2) et trinn for å måle forandringen i ekspresjonen av et spesifikt gen og/eller et protein i testcellen før og etter behandlingen med nevnte inhibitor, og sammenligne begge ekspresjonsmengder. Hvert trinn forklares detaljert i det følgende.

25
(1) Trinn for å behandle en testcelle med en histon-deacetylase-inhibitor.

I dette trinn dyrkes en testcelle i en løsning
30 inneholdende en histondeacetylase-inhibitor.

Selv om testcellen som kan anvendes ifølge foreliggende beskrivelse ikke er spesielt begrenset så lenge den har histondeacetylase, siden evaluering av en antitumoreffekt

av histondeacetylase-inhibitoren, fortrinnsvis tumor-sete-
spesifisitet av inhibitoren, er ett av problemene ved
foreliggende beskrivelse, er testcellen som kan anvendes
fortrinnsvis avledet fra en tumor hvorpå effekten ønskes
5 undersøkt. F.eks., når effekten på prostatacancer skal
undersøkes, anvendes PC-3-celle, som er en dyrket human
prostatacancer celle, o.l., og når effekten på nyrecancer
skal evalueres kan ACHN-celle, som er en dyrket human
nyrecancer celle o.l. anvendes. Forskjellig dyrkede humane
10 cancer celler som kan anvendes som testceller inkluderer de
cancer celler som er kommersielt tilgjengelig eller til-
gjengelig fra forskjellige cellebanker o.l. For under-
søkelse av en langtids behandlingseffekt, eller effektiv-
tet på individuelle pasienter, nemlig skreddersydd medisin,
15 er det mulig å dyrke en cancer celle som kan oppnås fra en
tumor hos pasienten og anvende cancer cellen som en test-
celle.

Histondeacetylase-inhibitoren som kan anvendes for dette
20 trinn er som angitt ovenfor.

Behandlingsbetingelsene for testcellen og histondeace-
tylase-inhibitoren er fri for enhver begrensning så lenge
effekten av histondeacetylase-inhibitoren kan utvises
25 fullstendig, og innstilles hensiktsmessig i samsvar med
faktorene så som typen testcelle som skal anvendes og typen
deacetylase-inhibitor som skal testes o.l.

Løsemidlet som skal gi en løsning av en histondeacetylase-
30 inhibitor er ikke spesielt begrenset så lenge det kan
oppløse histondeacetylase-inhibitoren og ikke viser toksi-
sitet mot testcellen. Generelt fremstilles en konsentrert
løsning med etanol, PEG400, 10 % HCO-60-løsning, dime-
tylsulfoksid o.l., et blandet løsemiddel derav, o.l., og

fortynnes til en ønsket konsentrasjon med dyrkningsmedium, fysiologisk buffer o.l., og anvendes. Konsentrasjonen av histondeacetylase-inhibitoren i løsningen er generelt 0,001-1000 nM, fortrinnsvis 0,01-100 nM, mer fortrinnsvis 0,1-10 nM, og i noen tilfeller seriefortynnes løsningen og en seriefortynningsserie fremstilles og anvendes.

I evalueringsmetoden ifølge beskrivelsen kan antallet testceller som skal inokuleres hensiktsmessig økes eller reduseres avhengig av behandlingstiden o.l. med en histondeacetylase-inhibitor. Det er generelt ca. 1×10^3 - 1×10^6 celler, fortrinnsvis ca. 1×10^4 - 1×10^5 celler, pr. 1 ml dyrkningsmedium.

Behandlingstiden (dyrkningstiden) av testcellen med en histondeacetylase-inhibitor settes hensiktsmessig i samsvar med typen og konsentrasjonen av testcellen og inhibitoren og andre dyrkningsbetingelser, og varierer avhengig av formålet med evaluering, men er generelt 1-100 t, fortrinnsvis 1-72 t. Dersom man ønsker bekreftet en vedvarende antitumoreffekt, settes en relativt lengre behandlingstid. Testcellen behandles (dyrkes) generelt ved 37 °C i nærværet av 5 % CO₂+95 % O₂.

(2) Trinn for å måle forandring i ekspresjonen av et spesifikt gen og/eller et spesifikt protein i testcellen før og etter behandling med nevnte inhibitor, og sammenligning av begge ekspresjonsmengder.

Dette trinn kan utføres ved enhver fremgangsmåte hvor ekspresjonsmengden av et spesifikt gen og/eller et spesifikt protein i en testcelle kan observeres. F. eks. kan prosedyrer beskrevet i det følgende nevnes.

(1) Et gen, fortrinnsvis mRNA, eller protein ekstraheres fra en testcelle før behandling med en histondeacetylase-inhibitor.

5 (2) Som beskrevet i detalj under det ovenfor nevnte (1)-trinn for å behandle en testcelle med en histondeacetylase-inhibitor, etter at testcellen er behandlet med histondeacetylase-inhibitoren og dyrket i en gitt tidsperiode, ekstraheres et gen, fortrinnsvis mRNA, eller protein fra den behandlede celle på samme måte som i det ovenfor nevnte
10 (1).

(3) ved å anvende en substans som har spesifikk affinitet for et spesifikt gen (eller spesifikt protein), detekteres det spesifikke gen (eller spesifikke protein). Her betyr det spesifikke gen (eller spesifikke protein) ett som viser
15 forandring i sin ekspresjonsmengde før og etter behandlingen med histondeacetylase-inhibitoren og viser en korrelasjon mellom forandringen i ekspresjonsmengden og antitumoreffekten av histondeacetylase-inhibitoren. Nærmere bestemt kan p21gen (protein) og c-myc-gen (protein) nevnes.
20 p21-genet er et cellesyklusregulerende gen involvert i undertrykkelse i cellesyklusprogresjon, og dets produkt er kjent for å inhibere aktiviteten av cyklin/cyklinavhengig kinasekompleks, og blokkerer dermed cellesyklusutviklingen. c-myc-genet koder for et intranukleært protein og dets
25 genekspresjon blir betydelig forandret med cellevekst, celleutvikling og utvikling av cancer. Således er involvering av genproduktet i cellevekst en attraktiv tilnærming.

30 For et spesifikt gen (eller spesifikt protein) som skal måles i foreliggende beskrivelse er én type måling spesielt nyttig, men når en mer detaljert antitumoreffekt må bli kjent, måles to eller flere spesifikke gener (eller spesifikke proteiner) fortrinnsvis samtidig.

En substans som har spesifikk affinitet for det spesifikke gen eller spesifikke protein er fri for enhver begrensning så lenge den har en slik sensitivitet som muliggjør detek-
5 sjon av ekspresjon i testcellene. Som anvendt heri angir termen «spesifikk affinitet» en egenskap til å hybridisere eller binde kun til et objektgen eller protein. Som substansen for å detektere det spesifikke gen kan en substans som er fullstendig komplement til hele eller en
10 del av nevnte gen, eller en substans som inneholder én eller flere mismatch'er innenfor graden som tilfredsstillen den ovenfor nevnte egenskap nevnes. Spesifikke eksempler inkluderer oligo- eller polynukleotid inneholdende en del eller hele basesekvensen til genet og komplementære
15 sekvenser derav, o.l., og en egnet substans velges avhengig av formen for gen som skal detekteres. Avledningen av substansen er ikke spesielt begrenset så lenge den har spesifikk affinitet for genet, og den kan syntetiseres eller formes ved å spalte en nødvendig del fra genet og
20 rense delen ved en konvensjonell metode. Substansen kan merkes med en fluorescerende substans, et enzym, en radioisotop o.l. Som substansen som kan anvendes for detektering av et spesifikt protein, kan f.eks. et antistoff som har spesifikk affinitet for proteinet eller et fragment derav
25 nevnes. Den spesifikke affinitet derav betyr en evne til spesifikt å gjenkjenne proteinet med en antigen-antistoffreaksjon og binde dertil. Antistoffet og fragmentet derav er ikke spesielt begrenset så lenge de spesifikt kan binde til proteinet, og kan være et vilkårlig av et poly-
30 klonalt antistoff, et monoklonalt antistoff og funksjonelle fragmenter derav. Disse antistoff og funksjonelle fragmenter derav kan produseres i samsvar med en metode generelt benyttet innenfor feltet. Disse antistoff og fragmenter

derav kan merkes med en fluorescerende substans, et enzym, en radioisotop o.l.

Ekstrahering av et gen, fortrinnsvis mRNA, og likeledes
5 ekstrahering av et protein fra testcellen kan utføres i samsvar med en fremgangsmåte som generelt benyttes innenfor feltet, eller ved en egnet kombinasjon av slike metoder. Ved ekstrahering av mRNA kan dets ekspresjon undersøkes i samsvar med en metode generelt benyttet innen feltet, så
10 som Northern blot, RT-PCR o.l., ved anvendelse av en substans som har spesifikk affinitet for det ovennevnte spesifikke gen. På den andre side, når et protein ekstraheres, undersøkes dets ekspresjon i samsvar med en metode generelt benyttet innen feltet, så som immunoblot, Western
15 blot o.l., ved anvendelse av en substans (antistoff, et fragment derav, etc.), som har en spesifikk affinitet for det ovennevnte spesifikke protein.

På denne måte måles forandringer i ekspresjonen av et
20 spesifikt gen (eller spesifikt protein) i en testcelle før og etter behandling med en histondeacetylase-inhibitor og sammenlignes for å bestemme om, eller ikke, den testede histondeacetylase-inhibitor effektivt har vist en antitumoraktivitet i den testede celle. Når p21-gen (eller
25 protein) anvendes som en indeks og behandlingen med en histondeacetylase-inhibitor øker ekspresjonsmengden, bestemmes inhibitoren til å ha en antitumoreffekt mot en tumor testcellen er avledet fra. Når c-myc-gen (eller protein) anvendes som en indeks og behandlingen med en
30 histondeacetylase-inhibitor reduserer ekspresjonsmengden, bestemmes inhibitoren til å ha en antitumoreffekt mot en tumor testcellen er avledet fra. Når en tumorcelle som klinisk er hentet fra en pasient anvendes som en testcelle,

er predikering av antitumoreffekt som reflekterer den individuelle pasients spesifisitet oppnålig.

Ifølge foreliggende beskrivelse kan en screeningsmetode for
5 histondeacetylase-inhibitor som har et tumorsete (type)
spesifikk antitumoraktivitet tilveiebringes ved å benytte
den ovenfor nevnte evalueringsmetode for en antitumoreffekt
av histondeacetylase-inhibitoren. Tumorsetespesifisiteten
til hver inhibitor kan bestemmes ved anvendelse av en test-
10 celle avledet fra en måltumor, behandling med en histon-
deacetylase-inhibitor hvis effekt skal undersøkes, og
bestemmelse av nærværet eller på annen måte antitumor-
effekten i samsvar med den ovenfor nevnte metode.

15 Den foreliggende beskrivelse beskriver ytterligere en
fremgangsmåte for å oppnå et gen som skal være en indeks
for å predikere effektiviteten av FK228. Ved å analysere
ekspresjonen av genet (gruppe) oppnådd ved en slik metode,
kan informasjonen om, eller ikke, FK228 er nyttig for
20 behandlingen, eller om, eller ikke, målcanceren påvirkes av
FK228 o.l. oppnås, som kan bidra til å «skreddersy
medisin».

Fremgangsmåten utføres nærmere bestemt som følger.

25

(1) Trinn for å behandle FK228-sensitiv tumorcelle og
FK228-resistent tumorcelle med FK228.

FK228-sensitiv tumorcelle betyr heri en tumorcelle av typen
30 der FK228 undertrykker dens vekst. F.eks. kan prostata-
cancer celle PC-3 nevnes som vist i eksemplene beskrevet
nedenfor. I tillegg er SC-6, som er en gastrisk cancer-
celle, en type FK228-sensitiv tumorcelle. På den andre side
er FK228-resistent tumorcelle en tumorcelle av typen der

FK228 unnlater å oppvise undertrykkelse av dens vekst og FK228 kan ikke tilveiebringe en tumorundertrykkende effekt derpå. F.eks. kan nyrecancerelle ACHN nevnes som vist i eksemplene beskrevet nedenfor. Videre er A498, som er en
5 nyrecancerelle, én type FK228-resistent tumorcelle.

Behandlingen av disse tumorceller med FK228 utføres på samme måte som i ovenfor nevnte «trinn for å behandle en testcelle med en histondeacetylase-inhibitor».

10

(2) Trinn for å selektene gener som har vist økt eller redusert ekspresjon ved behandlingen i trinn (1) ovenfor.

15 Dette trinn for å selektene gener kan utføres ved anvendelse av teknikker beskrevet i foreliggende beskrivelse og fremgangsmåter som generelt benyttes innenfor fagfeltet. En teknikk som anvender en gen-chip er fortrinnsvis benyttet i lys av fordelene med mulig analyse av et stort antall genekspresjoner av gangen.

20

(3) Trinn for å selektene, fra genene valgt i trinn (2) ovenfor.

(1) et gen som viser økt ekspresjon pga. behandling med FK228, høyere ekspresjon i FK228-sensitiv tumorcelle, og lavere ekspresjon i FK228-resistent tumorcelle,
25

(2) et gen som viser økt ekspresjon pga. behandling med FK228, lavere ekspresjon i FK228-sensitiv tumorcelle og høyere ekspresjon i FK228-resistent tumorcelle,
30

(3) et gen som viser redusert ekspresjon pga. behandling med FK228, høyere ekspresjon i FK228-sensitiv tumorcelle og lavere ekspresjon i FK228-resistent tumorcelle, eller

- (4) et gen som viser redusert ekspresjon pga. behandlingen med FK228, lavere ekspresjon i FK228-sensitiv tumorcelle og høyere ekspresjon i FK228-resistent tumorcelle.

5

Med andre ord har dette trinn til hensikt å selektere gener som viser noen forandringer i ekspresjonen (økning eller nedgang) pga. behandlingen med FK228 og viser en forskjellig ekspresjonsform avhengig av om den er sensitiv eller ikke-sensitiv til FK228. Analyse av ekspresjonstilstanden for genet (gruppe) kan være et nyttig middel for å predikere effektiviteten av FK228 uten administrering av FK228.

- 15 Fremgangsmåten for å finne økning eller nedgang i gen-
ekspresjon kan utføres i samsvar med metoder som generelt benyttes innenfor fagfeltet, og utføres ved anvendelse av teknikkene også beskrevet i foreliggende beskrivelse. En teknikk som anvender en gen-chip er foretrukket i lys av
20 fordelene med mulig analyse av et stort antall genekspre-
sjoner om gangen.

EKSEMPLER

Den foreliggende oppfinnelse forklares spesifikt detaljert i det påfølgende med henvisning til eksempler, som ikke skal anses som begrensende. Noen av disse eksemplene har
5 blitt inkludert kun for referanseformål.

Eksempel 1

10 (1) Fremstilling av farmasøytisk middel

En nødvendig mengde FR901228 ble veid og et løsemiddel (10 % HCO-60/saltløsning) ble tilsatt. Blandingen ble sonikert for å muliggjøre oppløsning. En positiv kontrollsubstans Paclitaxel ble oppløst i Cremophor EL/etanol (1:1)-løsning
15 til 24 mg/ml før testing, og preservert i et kjøleskap. Ved anvendelse ble den fortynnet med 9-gangers mengde av fysiologisk saltløsning til 2,4 mg/ml (løsemiddel-komponent: 5 % Cremophor EL-5 % etanol-90 % saltløsning).

20 (2) Testdyr

For antitumortest av det farmasøytiske middel ble BALB/cANnNCrj-nu/nu-mus (hannkjønn, 6 uker gamle) innkjøpt fra Charles River, Japan, og, etter akklimatisering i minst 1 uke, anvendt for testing. Musene ble alt opp under SPF-
25 omgivelser og ble gitt fri tilgang til vann og næringsstoffer.

(3) Testtumor

Dyrket human prostatacancer cellelinje (PC-3, tilgjengelig fra Japanese Foundation for Cancer Research, Cancer
30 Chemotherapy Center, Fundamental Research) ble subkutan implantert ved $2-3 \times 10^7$ celler i en naken mus. En vokst fast tumor ble subdyrket i ikke mindre enn 3 generasjoner og anvendt for testen.

(4) Eksperimentell implantering og gruppering

En fast tumor subdyrket i en naken mus ble subkutant implantert i musens høyre rygg , som et ca. 3 mm firkantet tumorvevfragment. Etter tumorimplanteringen, idet tumorvolumet ($1/2 \times \text{lengre diameter} \times \text{kortere diameter}^2$) nådde 100-300 mm³, ble musene gruppert i 6 mus pr. gruppe i forhold til nivået av tumorstørrelsen.

10 (5) Administrering

Administreringen startet på den dag musene ble gruppert (dag 0). FR901228 ble intravenøst administrert til en FR901228-administreringsgruppe 3 ganger hver 4. dag (q4dx3) (3,2 og 1,8 mg/kg). Paclitaxel (24 mg/kg) ble intravenøst administrert i 5 påfølgende dager (qdx5) til en positiv kontrollsubstans Paclitaxel-administreringsgruppe. Kun et løsemiddel (10 % HCO-60/saltløsning) ble administrert (q4dx3) til en kontrollgruppe. Mengden av væske for hver administrering ble beregnet (0,1 ml/10 g kroppsvekt) basert på kroppsvekten målt på administreringsdag. Bemerk at 3,2 mg/kg/dag (q4dx3) av FR901228 og 24 mg/kg/dag (qdx5) av Paclitaxel var de maks. tolererte doser (MTD) derav.

25 (6) Måling av tumorstørrelse og kroppsvekt

Tumorstørrelsen (lengre diameter, kortere diameter) og kroppsvekt ble målt 2 ganger i uken fra dag 0.

(7) Evaluering av antitumoreffekt

30 Nivået av tumorvekst ble evaluert basert på tumorvekstraten (relativt tumorvolum). Vekstundertrykkelsesraten ble uttrykt i et relativt forhold av tumorvolum etter dag 0 til tumorvolum ved dag 0 som 1. Antitumoreffekten ble bestemt på den 14. dag (dag 14) fra starten av administreringen av

det farmasøytiske middel. Da forholdet av tumorvekstraten for gruppen administrert farmasøytisk middel til kontrollgruppen (løsemiddeladministrering), (T/C%), ikke var mer enn 50 % og en signifikant forskjell ($P < 0,01$) ble funnet i
5 Mann Whitney-U-test, ble det farmasøytiske middel bestemt til å være effektivt.

Resultatene er vist i Fig. 1. FR901228 viser en anti-tumoreffekt *in vivo* mot humane prostatacancer.

10

Eksempel 2

(1) Fremstilling av farmasøytisk middel

En nødvendig mengde av FR901228 ble innveid og et løse-
15 middel (10 % HCO-60/saltløsning) ble tilsatt. Blandingen ble sonikert for å muliggjøre oppløsning.

(2) Testdyr

For antitumortest av det farmasøytiske middel ble Fox Chase
20 C.B-17/Icr-SCID.JCl-mus (hannkjønn, 6 uker gamle) innkjøpt fra CLEA JAPAN INC., og etter akklimatisering i ikke mindre enn 1 uke, anvendt for testen. Musene ble alet opp under en SPF-omgivelse og gitt fri tilgang til vann og næringsstoff.

25 (3) Testtumor

Dyrket human lymfomcellelinje (U937: tilgjengelig fra Dr. Minowada, Hayashibara Biochemical Laboratories, Inc.) ble dyrket i RPMI (inneholdende 10 % FCS) og subdyrket *in vitro*.

30

(4) Eksperimentell implantering og gruppering

Cyklofosfamid (Shionogi & Co., Ltd., 150 mg/kg) ble intraperitonealt administrert til mus. Lymfom (1×10^7 celler) subdyrket *in vitro* ble intraperitonealt implantert

den neste dag. Etter tumorimplantering ble musene gruppert i 6 (kontrollgruppe 12) mus pr. gruppe etter kroppsvekt.

(5) Administrering

5 Administreringen ble startet ved inndeling i grupper (dag 0). FR901228 ble intraperitonealt administrert til en FR901228-administreringsgruppe 1 eller 2 ganger i uken (0,1-1,0 mg/kg). Kun et løsemiddel (10 % HCO-60/salt-løsning) ble administrert til en kontrollgruppe.

10

(6) Evaluering

Som en antitumoreffekt ble musenes overlevelsesdager talt.

Resultatene er vist i Fig. 2. Fig. 2(a) viser resultatene
15 av administrering av FR901228 1 gang i uken, og Fig. 2(b) viser resultatene av administrering av FR901228 2 ganger i uken. FR901228 viser en antitumoreffekt *in vivo* mot humant lymfom.

20 Eksempel 3

(1) Fremstilling av farmasøytisk middel

En nødvendig mengde av FR901228 ble innveid og et løse-
middel (10 % HCO-60/saltløsning) ble tilsatt. Blandingen
25 ble sonikert for å muliggjøre oppløsning. En positiv kontrollsubstans Paclitaxel ble oppløst i Cremophor EL/etanol 1:1-løsning til 24 mg/ml før uttestingen, og konserverv i et kjøleskap. Ved anvendelse ble den fortynnet med en 9-gangers mengde av fysiologisk saltløsning til 2,4 mg/ml
30 (løsemiddelkomponent: 5 % Cremophor EL-5 % etanol-90 % salt-løsning).

(2) Testdyr

For antitumortest for det farmasøytiske middel, ble
BALB/cANnNCrj-nu/nu-mus (hannkjønn, 6 uker gamle) innkjøpt
fra Charles River, Japan, og, etter akklimatisering i ikke
mindre enn 1 uke, anvendt for testen. Musene ble oppalt
5 under en SPF-omgivelse og gitt fri tilgang til vann og
næringsstoffer.

(3) Testttumor

Dyrket human nyrecancercellelinje 1 (ACHN:tilgjengelig fra
10 ATCC) og dyrket human prostatacellelinje 1 (PC-3:til-
gjengelig fra ATCC) ble subkutanter implantert ved $2-3 \times 10^7$
celler i en naken mus. En dyrket fast tumor ble subdyrket i
ikke mindre enn 3 generasjoner og anvendt for testen.

15 (4) Eksperimentell implantering og gruppering

En fast tumor subdyrket i en naken mus ble subkutanter
implantert inn i musens høyre rygg som et 3 mm firkantet
tumorvevfragment. Etter tumorimplanteringen, idet
tumorvolumet ($1/2 \times \text{lengre diameter kortere diameter}^2$)
20 nådde $100-300 \text{ m}^3$, ble musene gruppert i 6 mus pr. gruppe
etter nivå av tumorstørrelse.

(5) Administrering

Administreringen startet den dagene musene ble gruppert
25 (dag 0). FR901228 ble intravenøst administrert til en
FR901228-administreringsgruppe 3 ganger hver 4. dag
(q4dx3) (3,2 og 1,8 mg/kg). Paclitaxel ble intravenøst ad-
ministrert (24 mg/kg) i 5 påfølgende dager (qdx5) til en
positiv kontrollsubstans Paclitaxel-administreringsgruppe.
30 Kun et løsningsmiddel (10 % HCO-60/saltløsning) ble
administrert (q4dx3) til en kontrollgruppe. Mengden væske
for hver administrering ble beregnet (0,1 mg/10 g kropps-
vekt) basert på kroppsvekten målt på administreringsdagen.

Bemerk at 3,2 mg/kg/dag (q4dx3) av FR901228 og 24 mg/kg/dag (qdx5) av Paclitaxel var MTD'er derav.

(6) Måling av tumorstørrelse og kroppsvekt

5 Tumorstørrelsen (lengre diameter, kortere diameter) og kroppsvekt ble målt 2 ganger i uken fra dag 0.

(7) Evaluering av antitumoreffekt

Nivået av tumorvekst ble evaluert basert på tumorvekstraten (relativt tumorvolum). Vekstundertrykkelsesraten ble uttrykt i en relativ andel av tumorvolum etter dag 0 til tumorvolum ved dag 0 som 1. Antitumoreffekten ble bestemt for den 14. dag (dag 14) fra starten av administreringen av et farmasøytisk middel. Idet forholdet av den farmasøytiske middeladministreringsgruppen til tumorvekstraten av kontrollgruppen (løsemiddeladministrering) (T/C%) ikke var mer enn 50 %, og en signifikant forskjell ($P < 0,01$) ble funnet i en Mann Whitney-U-test, ble det farmasøytiske middel bestemt å være effektivt.

20

Resultatene er vist i Fig. 3. FR901228 viste en potent antitumoreffekt mot PC-3 i en dosering av 3,2 mg/kg (Fig. 3(a)), men viste ikke en antitumoreffekt mot ACHN (Fig. 3(b)).

25

Eksempel 4

(1) Fremstilling av farmasøytisk middel

En nødvendig mengde FR901228 ble innveid og oppløst i et løsemiddel (99,5 % etanol) til konsentrasjonen på 1 mg/ml. Deretter ble løsningen fortynnet med dyrkningsmedium.

30

(2) Testtumor

Dyrket human cancercelle (PC-3 og ACHN) ble dyrket i DMEM (inneholdende 10 % FCS).

(3) Dyrkning og RNA-ekstrahering

5 Cellene ble inokulert ved 2×10^6 celler pr. dyrkningsskål, og dyrket i nærværet av FR901228 (5 ng/ml) i en gitt tid. Etter dyrkning ble RNA ekstrahert med en TRIZOL-reagens (GIBCO BRL) i samsvar med operasjonsmanualen.

10 (4) Sanntids-PCR

RNA ble underlagt revers transkripsjon ved anvendelse av Taqman revers transkripsjonsreagens (PE Biosystem) i samsvar med operasjonsmanualen. Deretter ble p21-gen mangfoldiggjort ved anvendelse av en SYBR-grønn PCR-master-
 15 mix (PE Biosystem) og primer 5'-GGC AGA CCA GCA TGA CAC ATT-3' (p21-oppstrøm) (SEKV ID NR 1), 5'-GGA TTA GGG CTT CCT GGA G-3' (SEKV ID NR 2) i samsvar med operasjonsmanualen, og detektert med API 7700 PRISM sekvensdetektor (PE Biosystem). Ekspresjonsmengden av p21-genet ble be-
 20 regnet fra en standardkurve, delt med ekspresjonsmengden av β -aktingen, som ble anvendt som en intern standard, og uttrykt i en standardisert relativ ekspresjonsmengde.

Resultatene er vist i Fig. 4. Etter å være satt i forbindelse med FR901228 *in vitro*, viste PC-3 (Fig. 4(a)) en økt ekspresjon av p21-genet i forhold til tiden. I motsetning viste ACHN ingen økt ekspresjon av p21-genet (Fig. 4(b)). Ubehandlet viste p21-genet liten ekspresjon i PC-3 men viste ekspresjon i ACHN (Fig. 4(c)).

30

Eksempel 5

Human prostatacancer PC-3 eller nyrecancer-ACHN ble subkutan implantert i en naken mus, og idet størrelsen av

tumoren nådde 100-300 mg, ble FR901228 (3,2 mg/kg) intravenøst administrert. Tumoren ble fjernet med tiden, og etter ekstrahering av RNA ble ekspresjonsmengden av p21-genet og c-myc-genet undersøkt med sanntids-PCR på samme måte som i Eks. 4. c-myc-genet ble mangfoldiggjort ved anvendelse av SYBR-grønn PCR-mastermix (PE Biosystem) og primer 5'-GAC AGA TCA GCA ACA ACC GAA A-3' (human c-myc-oppstrøm) (SEKV ID NR 3), 5'-TTG TGT GTT CGC CTC TTG ACA T-3' (human c-myc-nedstrøm) (SEKV ID NR 4) i samsvar med operasjonsmanualen, og detektert med ABI 7700 PRISM sekvensdetektor (PE Biosystem).

Resultatene er vist i Fig. 5. PC-3 viste økt ekspresjon av p21-genet *in vivo* med en topp ved 3 t etter administrering av FR901228 (Fig. 5(a)). I motsetning viste ACHN ingen økt ekspresjon av p21-genet (Fig. 5(a)). Mens c-myc-genet viste redusert ekspresjon i PC-3 viste den økt ekspresjon i ACHN (Fig.(b)).

Eksempel 6

Analyse (*in vitro*) av genekspresjon med FK228 i tumorcelle ved anvendelse av en gen-chip

Effekten av FK228 på *in vitro*-genekspresjon i human tumorcelle ble analysert ved anvendelse av en gen-chip.

Material og prosedyre

(1) Testmaterialer

Farmasøytisk middel FK228 (FR901228).

Konsentrasjon ved bruk: 50 ng/ml.

Fremstillingsmetode: En 10 mg/ml løsning ble fremstilt med etanol på forhånd, og seriefortynnet med et dyrkningsmedium for å gi 50 ng/ml løsninger.

- Doseringsform: løsning (fremstilt ved bruk).
- Celler anvendt: human prostatacancer (PC-3), humant lymfom (U937), human nyrecancer (ACHN).
- Dyrkningsmedium: DMEM (for PC-3, ACHN), RPMI1640 (for
- 5 U937).
- Begge tilgjengelig fra Nikken Biomedical Laboratory, og inneholder ytterligere FCS (Moregate) og Penicillin-Streptomycin (ICN Biomedicals Inc.).
- RNA-ekstrahering: RNeasy Mini Kit (50) (Qiagen).
- 10 RNase, DNase fritt vann (Life Technologies).
- DNA-syntese: Superskript Choice System (Life Technologies).
- Ethachinmate (Nippon-gen).
- T⁷-(dT)₂₄ Primer (Amersham Pharmacia).
- cRNA-syntese: BioArray RNA-Transcript Labeling Kit
- 15 (Amersham Pharmacia).
- cRNA-fragmentering: Trizma Base (SIGMA).
- Iseddiksyre (SIGMA).
- Magnesiumacetat (SIGMA).
- Kaliumacetat (SIGMA).
- 20 Hybridisering: Eukaryotisk Hybridiseringskontrollkit (Amersham Pharmacia).
- 0,5 M EDTA-løsning (SIGMA).
- MES natriumsalt (SIGMA).
- MES fri syremonohydrat (SIGMA).
- 25 Sildespermgener DNA (Promega).
- Acetylert bovinserum-albuminløsning (Life Technologies).
- Farging: Fykoerytrin-Streptavidin (Molecular Probes).
- Geit IgG, reagensgradering (SIGMA).
- Anti-streptavidin ab (geit), biotinyllert (Vector Lab).
- 30 Chip som ble brukt: HuGeneFl array (Amersham Pharmacia).

(2) Cellepreparering og RNA-ekstrahering

Humane tumorceller (PC-3, U937, ACHN) som nådde konfluens i F75-flasker ble underlagt en trypsinbehandling for å gi

enkelcellesuspensjon, som ble inokulert til 5 F75flasker og dyrket i 24 t. Dyrkningsmedium ble kastet, og et ferskt dyrkningsmedium (18 ml) og en 10-gangers konsentrasjon (50 ng/ml) av en FR901228-løsning (2 ml) ble tilsatt.

5 Blandingen ble dyrket i en CO₂-inkubator ved 37 °C i en gitt tid (0, 1, 3, 12 og 24 t). Etter fullføringen av dyrkningen ble dyrkningsmedium kastet og total-RNA ble ekstrahert i samsvar med protokollen til RNeasy Mini Kit (50) (Qiagen). RNA ble kvantifisert og konfirmert med
10 elektroforese.

(3) Syntese av cRNA

I samsvar med gen-chip-manualen, Kapittel 2-4, og manualene for RNeasy Mini Kit og RNA Transcript Labeling
15 Kit ble RNA rensset, cDNA syntetisert, cRNA syntetisert og cRNA fragmentert.

(4) Hybridisering, vasking-farging, scanning.

Hybridisering, vasking-farging og scanning ble utført
20 i samsvar med GeneChip manual Kapittel 5-7.

(5) Analyse

Analysert ved anvendelse av GeneSpring (microarray data-analyseprogram: produsert av Silicon Genetics).

25

Resultater

Human prostatacancer PC-3 og humant lymfom U937, som er FK228-sensitive tumorceller, og human nyrecancer ACHN, som er en FK228-resistent tumorcelle, ble brakt i kontakt *in*
30 *vitro* med FK228 i et tidsforløp, og RNA ble ekstrahert deretter, og 7070-gener som var detekterbare ved anvendelse av GeneChip ble undersøkt for gener som viser forandring i ekspresjonen pga. FK228. Slike gener ble analysert i samsvar med følgende prosedyrer.

Analyse 1: Seleksjon av gen som viser forandring i ekspresjon pga. inhibering av histondeacetylase.

- 5 For å begrense genene som viser forandring i ekspresjon pga. FK228, ble et gen som viste lineær forandring av ekspresjon selektert (analysebetingelse av GeneSpring: gen som viser forandring i ekspresjon ved 0,5 ganger eller mer, eller 0,5 ganger eller mindre ved enhver tid).

10

Analyse 2: Seleksjon av gen involvert i effektivitet.

- Etter kontakt med FK228 i 72 t var vekstundertrykkelses-effekt på PC-3, U937 og ACHN i IC_{50} -verdi henholdsvis 3,17, 3,20 og 4,25 ng/ml, noe som viser omtrent den samme grad av vekstundertrykkende effekt på disse tumorceller. Fra disse resultater ble genene som var relatert til vekstundertrykkelse vurdert å i alminnelighet vise forandring i ekspresjon i enhver celle. Det ble funnet 105 gener som vanligvis viste økt ekspresjon i disse 3 typer humane tumorceller og 100 gener som vanligvis viste økt ekspresjon i disse 3 typer humane tumorceller.

- Eksempel 7: Analyse av genekspresjon (*in vivo*) av FK228 i tumorcelle ved anvendelse av en gen-chip.

Effekten av FK228 på *in vivo*-genekspresjon i human tumorcelle ble analysert ved anvendelse av en gen-chip.

- 30 Material og prosedyre

(1) Testmaterialer

Farmasøytisk middel FK228 (FR901228).

Dosering: 10 mg/kg.

Administreringsdosering: 10 ml/kg.

Løsemiddel: 10% HCO-60/saltløsning.

Doseringsform: løsning (fremstilt ved bruk).

Tumorcelle: human prostatacancer PC-3 (tumorfragment
3 mm x 3 x 3 mm/musimplanteringssete s.c.) human
5 gastrisk cancer SC-6; tilgjengelig fra Central
Institute for Experimental Animals (tumorfragment
3 mm x 3 mm x 3 mm/musimplanteringssted s.c.), human
nyrecancer ACHN (tumorfragment 3 mm x 3 mm x 3
mm/musimplanteringssted s.c.),

10 human nyrecancer A498; tilgjengelig fra ATCC (tumor-
fragment 3 mm x 3 mm x 3 mm/musimplanteringssted
s.c.).

Subdyrket dyr: hannkjønn BALB c/nu/nu.

RNA-ekstrahering: RNeasy Mini Kit (50) (Qiagen).

15 RNase, DNase-fritt vann (Life Technologies).

DNA-syntese: Superscript Choice System
(Life Technologies).

Ethachinmate (Nippon gene).

T⁷-(dT)24 Primer (Amersham Pharmacia).

20 cRNA-syntese: BioArray RNA-transkript Labeling Kit
(Amersham Pharmacia).

cRNA-fragmentering: Trizma Base (SIGMA).

Iseddiksyre (SIGMA).

Magnesiumacetat (SIGMA).

25 Kaliumacetat (SIGMA).

Hybridisering: Eukaryotisk hybridisering Kontroll Kit
(Amersham Pharmacia).

0,5 M EDTA-løsning (SIGMA).

MES-natriumsalt (SIGMA).

30 MES fritt syremonohydrat (SIGMA).

Sildesperm-DNA (Promega).

Acetylert bovin serumalbuminløsning. (Life Techno-
logies).

Chip som ble brukt: HuGeneFL array (Amersham Pharmacia).

(2) Cellepreparering og RNA-ekstrahering

5 Et 3 mm firkantet tumorfragment (PC-3, SC-6, ACHN, A498) ble subkutan implantert i en naken mus, og, idet tumoren nådde ca. 100 mg (lengre diameter 9 mm, kortere diameter 8 mm), ble FR901228 (10 mg/kg) intravenøst administrert. Ved 0, 0,5, 1, 2 og 4 t etter administrering av FR901228 ble
10 tumoren fjernet, og total RNA ble ekstrahert i samsvar med protokollen til RNeasy Mini Kit (50) (Qiagen). RNA ble kvantifisert og konfirmert med elektroforese.

(3) Syntese av cRNA

15 I samsvar med GeneChip-manualen, Kapittel 2-4, og manualene for RNeasy Mini Kit og RNA Transcript Labeling Kit, ble RNA rensset, cDNA syntetisert, cRNA syntetisert og cRNA fragmentert.

20 (4) Hybridisering, vasking-farging, scanning

Hybridisering, vasking-farging og scanning ble utført i samsvar med GeneChip manual Kapittel 5-7. Analysert ved anvendelse av GeneChip (microarray data-analyseprogram: produsert av Silicon Genetics).

25

Resultater

FR901228 (10 mg/kg) ble intravenøst administrert til human prostatacancer PC-3, human gastrisk cancer SC-6, human nyrecancer ACHN og human nyrecancer A498-bærende cancermus
30 og tumor ble fjernet med forløpet av tiden (0, 0,5, 1, 2 og 4 t). RNA ble deretter ekstrahert og 7070-gener detekterbare ved anvendelse av GeneChip ble undersøkt for gener som viser forandring i ekspresjon pga. FR901228.

Vekstundertrykkelseraten for human prostatacancer

PC-3, human gastrisk cancer SC-6, human nyrecancer ACHN og human nyrecancer A498 ved administreringen av FR901228 (3,2 mg/kg) var henholdsvis 98 %, 84 %, 20 % og 29 %. Derfor ble

- 5 PC-3 og SC-6 bestemt å være FK228-sensitive tumorer, og ACHN og A498 ble bestemt å være FK228-resistente tumorer.

Eksempel 8:

- 10 Modus av genekspresjon i FK228-sensitiv tumor og FK228-resistent tumor

- Korrelasjonen mellom modus av genekspresjon og effektiviteten av FK228 ble undersøkt i tumoren bekreftet å være sensitiv eller resistent i Eks. 7. Genene (105 gener) som
- 15 viste økt ekspresjon av FK228-behandling og gener (100 gener) som viste redusert ekspresjon som ble vist i *in vitro*-testen i Eks. 6 ble nøye studert, og korrelasjonen mellom disse gener og effektivitet ble undersøkt. Videre ble det søkt etter et gen som viste høy ekspresjon i en
- 20 sensitiv tumor og lav ekspresjon i en resistent tumor, og et gen som viste lav ekspresjon i en sensitiv tumor og høy ekspresjon i en resistent tumor. Som et resultat, av de 105 genene som viste økt ekspresjon *in vitro* med behandling med FR901228, ble 6 gener funnet å vise høy ekspresjon i en
- 25 sensitiv tumor og lav ekspresjon i en resistent tumor, og 4 gener ble funnet å vise lave ekspresjon i en sensitiv tumor og høy resistent i en resistent tumor (Tabell 1). I tillegg, av de 100 gener som viste redusert ekspresjon *in vitro* med behandling med FR901228 ble 4 gener funnet å vise
- 30 høy ekspresjon i en sensitiv tumor og lav ekspresjon i en resistent tumor, og 9 gener ble funnet å vise lav ekspresjon i en sensitiv tumor og høy ekspresjon i en resistent tumor (Tabell 2).
-

Tabell 1: Gener som viste høy ekspresjon i en sensitiv tumor og lav ekspresjon i en resistent tumor, eller gener som viste lav ekspresjon i en sensitiv tumor og høy ekspresjon i en resistent tumor (gener som viste økt ekspresjon *in vitro* ved behandling med FR901228).

Sensitiv tumor (høy) og resistent tumor (lav)

M13686_s_at (SFTP1) lungesurfaktantassosiert protein
 U68111_at (PPP1R2) kilde: Human proteinfosfataseinhibitor
 10 2 (PP1R2) gen, ekson 6 og komplett cds.
 U60521_at (CASP9) caspase 9, apoptose-relatert cysteinprotease
 L19783_at (PIGH) fosfatidylinositolglykan, klasse H
 X60487_at (H4/h)
 15 J04056_at (CBR1) karbonylreduktase 1

Sensitiv tumor (lav) og resistent tumor (høy)

U56998_at (CNK) cytokin-induserbar kinase
 X68277_at (DUSP1) dual-spesifisitetsfosfatase 1
 20 U65092_at (MSG1) melanocyt-spesifikt gen 1
 X01703_at kilde: humant gen for alfa-tubulin (b alfa 1).

Tabell 2: Gener som viste høy ekspresjon i en sensitiv tumor og lav ekspresjon i en resistent tumor, eller gener som viste lav ekspresjon i en sensitiv tumor og høy ekspresjon i en resistent tumor (gener som viste redusert ekspresjon *in vitro* etter behandling med FR901228).

Sensitiv tumor (høy) og resistent tumor (lav)

30 X74987_s_at (RNASELI) ribonuklease L (2',5'-oligoisoade-nylatsyntetase-avhengig) inhibitor
 J03801_f_at (LYZ) lysozym (renal amyloidose)
 U09578_at (MAPKAPK3) mitogen-aktivert proteinkinase-aktivert proteinkinase 3

D50676_at (LRP8) lav tetthet lipoprotein reseptor-relatert protein 8

Sensitiv tumor (lav) og resistent tumor (høy)

- 5 Y10375_s_at (SIRP-alfa 1)
Z14982_rnal_at (MHC-kodet proteasom-subenhet-gen LAMP7-E1)
alternativ spleising
X62048_at (WEE1) weel + (S. pombe) homolog
X71874_cdsl_at (PSMB10) proteasom (prosom, makropain)
- 10 subenhet, betatype, 10
U32848_at (NMR) N-myc (og STAT) interaktor
D55716_at (Plcdc47) kilde: human mRNA for Plcdc47, komplett cds.
M98045_at (FPGS) folylpolyglutamatsyntase U21551_at (ECA39)
- 15 Kilde: Human ECA39 mRNA, komplett cds.
U06681_at
U07620_at (PRKM10) proteinkinase mitogen-aktivert 10 (MAP-kinase).
- 20 Disse gener antyder korrelasjon med effektivitet av FK228, og korrelasjon med sensitivitet eller resistens til FK228, og indikerer således muligheten for at disse gener kan utnyttes som en effektivitetspredikerende markør.
- 25 Industriell appliserbarhet

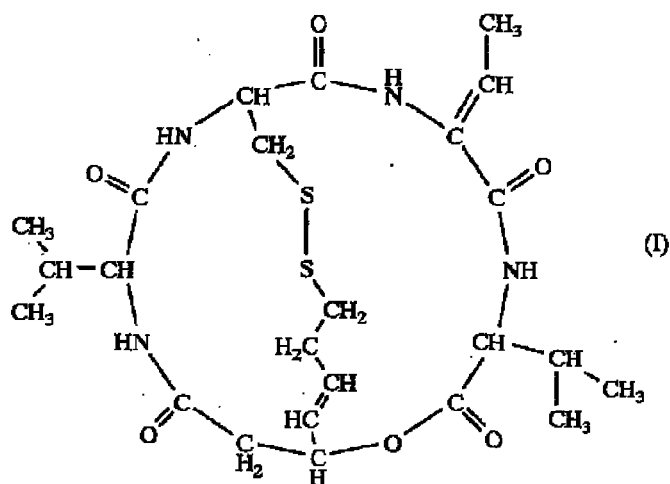
- Det terapeutiske middel for prostatacancer omfatter som en aktiv ingrediens FK228 (fortrinnsvis FR901228) eller et salt derav har en histondeacetylase-inhibitorisk aktivitet,
- 30 som har en overlegen antitumorvirkning ikke kun *in vitro*, men også *in vivo*. Derfor kan de anvendes klinisk, og er spesielt egnet for cancerbehandling.

Sekvenslisting fritekst

- SEKV ID NR 1: oligonukleotid konstruert for å virke som en primer for PCR av p21 mRNA.
- 5
- SEKV ID NR 2: oligonukleotid designet for å virke som en primer for PCR av p21 mRNA.
- SEKV ID NR 3: oligonukleotid designet for å virke som en primer for PCR av c-myc-mRNA.
- 10
- SEKV ID NR 4: oligonukleotid designet for å virke som en primer for PCR av c-myc-mRNA.
- 15 SEKV ID NR 5: Xaa er en aminosyre representert med formelen $\text{NH}_2\text{C}(\text{CHCH}_3)\text{COOH}$.
- Karboksylgruppen med formelen $\text{COOHCH}_2\text{CH}(\text{CHCHC}_2\text{H}_4\text{SH})\text{OH}$ er bundet med en aminogruppe i Val, som er den første aminosyre, en hydroksylgruppe er bundet med en karboksylgruppe i Val, som er den 4. aminosyren, og en SH-gruppe er disulfidbundet med en SH-gruppe i Cys, som er den 2. aminosyre.
- 20
- 25 Denne søknad er basert på en patentsøknad Nr 2001-250846 innsendt i Japan.

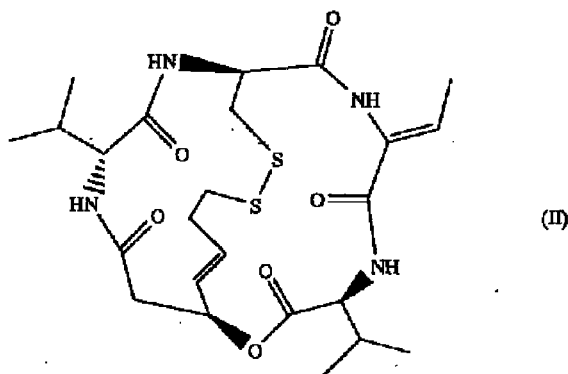
P A T E N T K R A V

1. Anvendelse av et farmasøytisk materiale som omfatter en forbindelse representert ved formel (I)

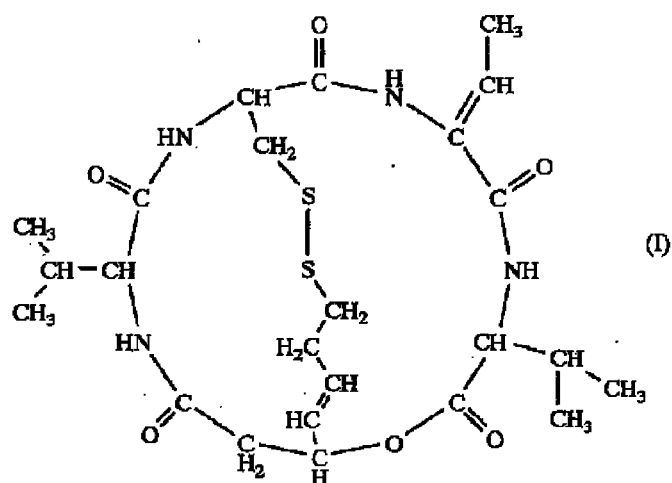


eller et salt derav og en farmasøytisk akseptabel bærer, for fremstilling av et medikament som skal anvendes for å behandle prostatacancer.

2. Anvendelse ifølge krav 1, hvori forbindelsen representert ved formel (I) er en forbindelse representert med formel (II)



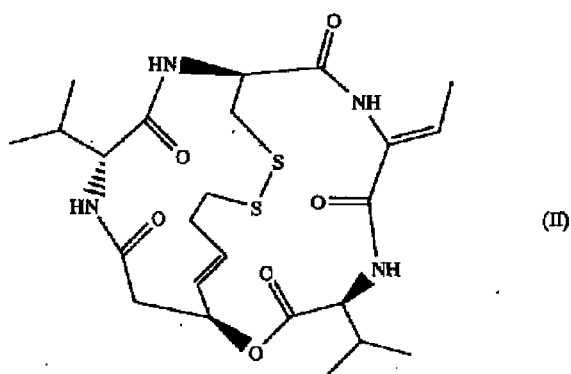
3. Anvendelse av en forbindelse representert med formelen (I)



eller et salt derav for fremstilling av et middel for
behandling av prostatacancer.

4. Anvendelse ifølge krav 3, hvori forbindelsen representert ved
formel (I) er en forbindelse representert ved formel (II)

5



SEQUENCE LISTING

<110> FUJISAWA PHARMACEUTICAL CO., LTD.

<120> Pharmaceutical use of histone deacetylase inhibitor
and evaluation method of its antitumor effect

<130> 09491

<150> JP 2001-250846

<151> 2001-8-21

<160> 5.

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as primer for PCR of
p21 mRNA.

<400> 1

ggcagaccag catgacacat t

21

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as primer for PCR of

p21 mRNA.

<400> 2

ggattagggc ttctcttgg ag

22

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as primer for PCR of
c-myc mRNA.

<400> 3

gacagatcag caacaaccga aa

22

<210> 4

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as primer for PCR of
c-myc mRNA.

<400> 4

ttgtgtgttc gcctcttgac at

22

<210> 5

<211> 4

<212> PRT

<213> Chromobacterium sp.

<220>

<221> SITE

<222> (3)

<223> Xaa is an amino acid represented by the formula
 $\text{NH}_2\text{C}(\text{CHCH}_3)\text{COOH}$.

<220>

<221> SITE

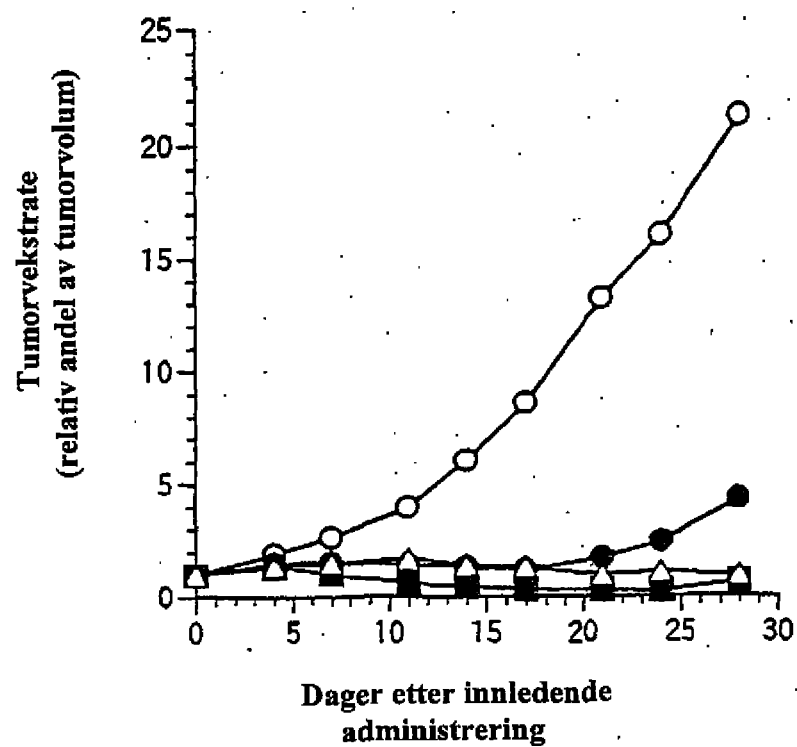
<222> (1), (2), (4)

<223> In the formula $\text{COOHCH}_2\text{CH}(\text{CHCHC}_2\text{H}_4\text{SH})\text{OH}$, the carboxylic group is bonded with the amino group of the first amino acid Val, the hydroxyl group is bonded with the carboxylic group of the fourth amino acid Val, and the SH group is bonded with the SH group of the second amino acid Cys via a disulfide bond.

<400> 5

Val Cys Xaa Val

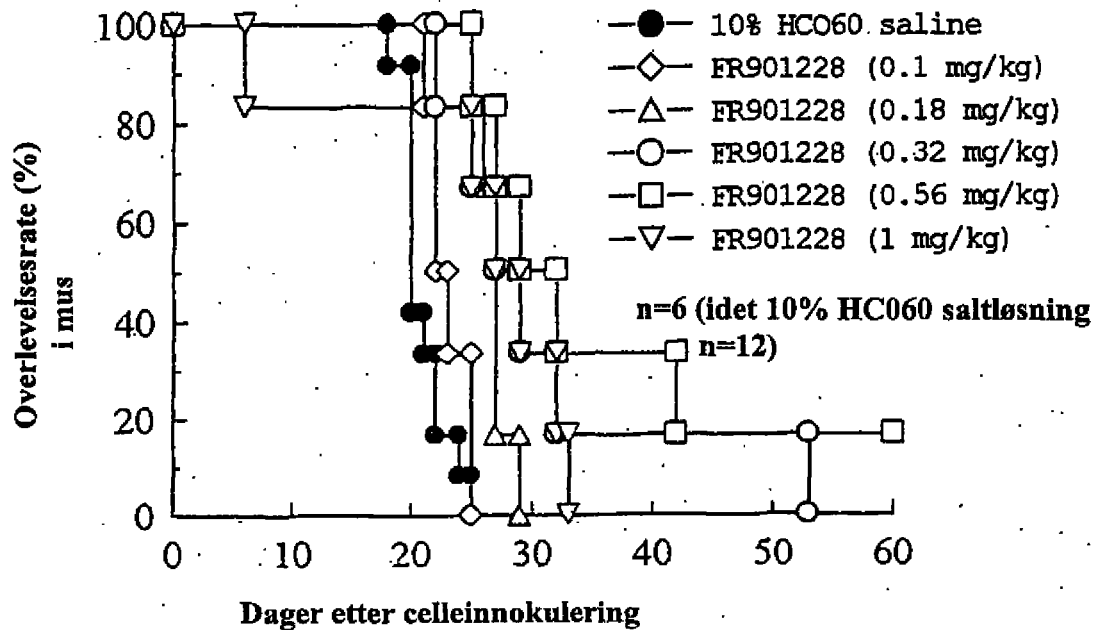
FIG. 1



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

FIG. 2

(a)



(b)

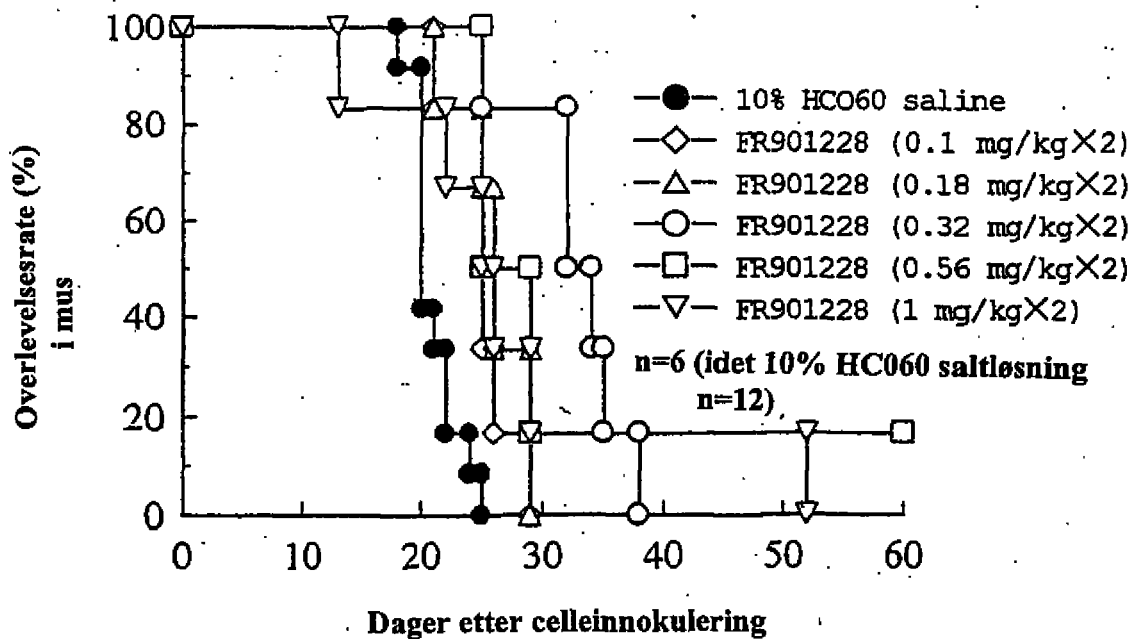


FIG. 3

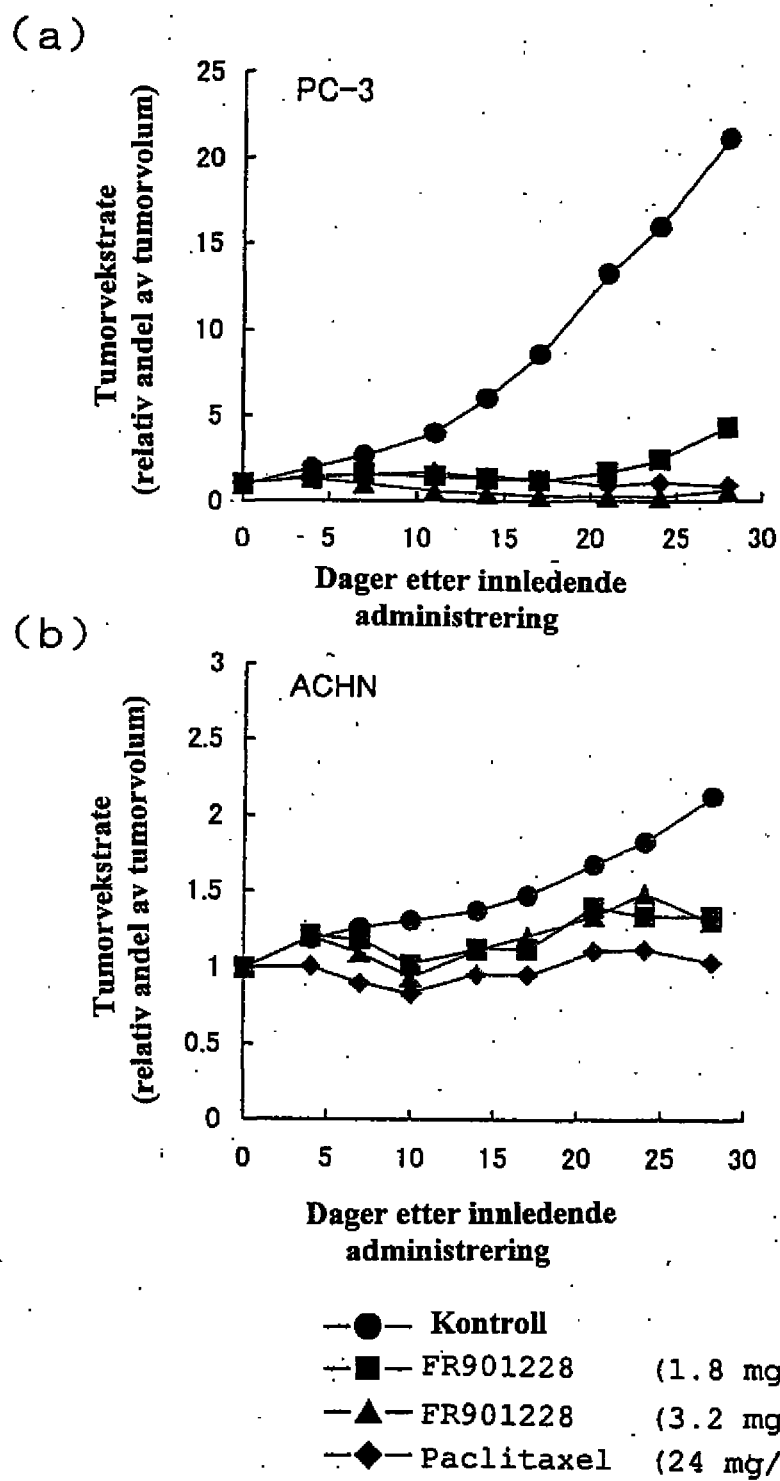


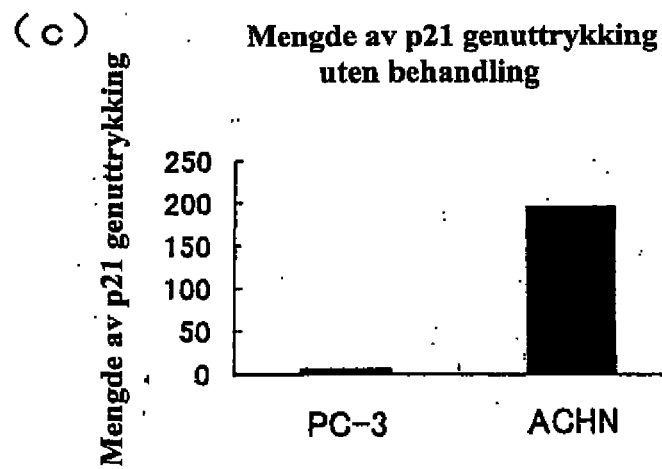
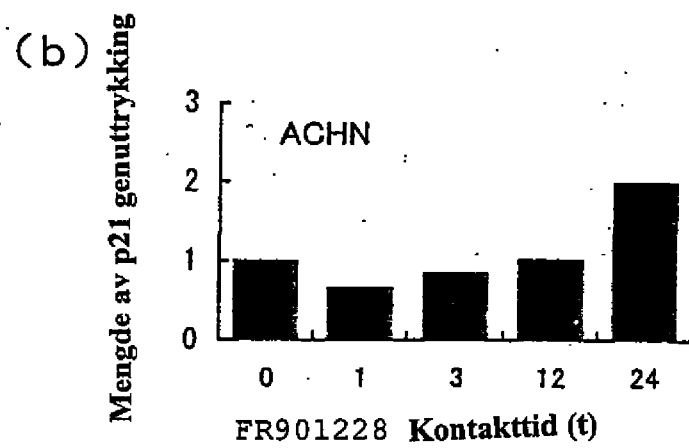
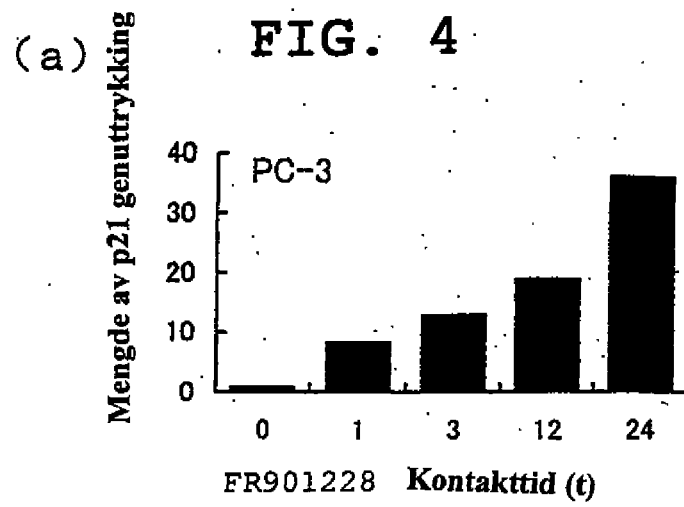
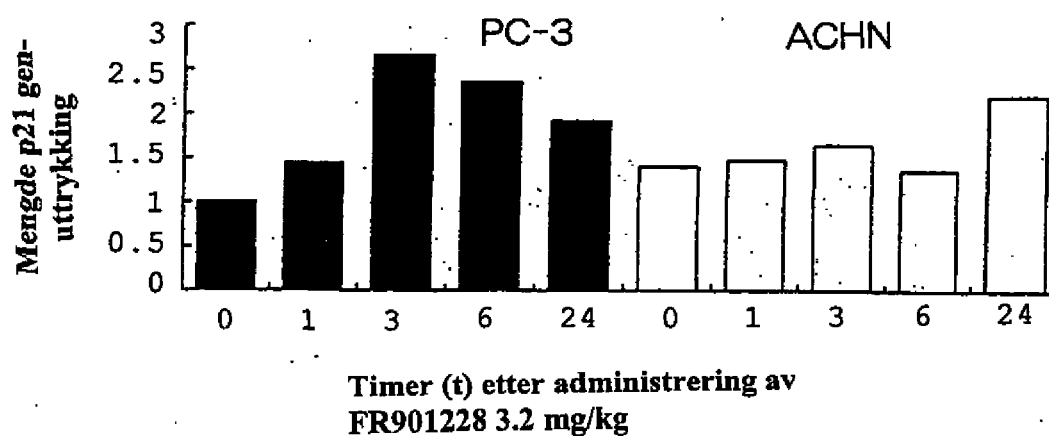
FIG. 4

FIG. 5**(a)****(b)**