



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 601 10 912 T2 2005.10.20

(12)

## Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 301 184 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 601 10 912.0

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/EP01/07704

(96) Europäisches Aktenzeichen: 01 962 831.2

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 02/007722

(86) PCT-Anmeldetag: 05.07.2001

(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: 31.01.2002

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 16.04.2003

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: 18.05.2005

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 20.10.2005

(51) Int Cl.<sup>7</sup>: A61K 31/19  
A61P 35/00

(30) Unionspriorität:

00114088 07.07.2000 EP

(73) Patentinhaber:

Chemotherapeutisches Forschungsinstitut  
Georg-Speyer-Haus, 60596 Frankfurt, DE

(74) Vertreter:

Lederer & Keller, 80538 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,  
LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR

(72) Erfinder:

GÖTTLICHER, Martin, 76297 Stutensee, DE;  
HEINZEL, Thorsten, 60529 Frankfurt am Main, DE;  
GRONER, Bernd, 60322 Frankfurt am Main, DE;  
HERRLICH, Peter, 76229 Karlsruhe, DE

(54) Bezeichnung: VALPROINSÄURE UND DEREN DERIVATE ALS HISTONDEACETYLASEINHIBTOREN

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelebt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

## Beschreibung

**[0001]** Die vorliegende Erfindung betrifft die in-vitro-Verwendung des Arzneistoffes Valproinsäure und Derivate davon als Inhibitoren von Enzymen mit Histondesacetylaseaktivität. Die Erfindung betrifft auch die Verwendung von jenen Verbindungen zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Erkrankungen, die mit Hypoacetylierung von Histon verbunden sind, oder bei denen Induktion von Hyperacetylierung eine günstige Wirkung, beispielsweise durch Induktion von Differenzierung und/oder Apoptose in transformierten Zellen, hat.

**[0002]** Lokales Remodelling von Chromatin ist ein wichtiger Schritt bei der transkriptionalen Aktivierung von Genen. Dynamische Änderungen in der nukleosomalen Packung von DNA müssen stattfinden, damit transkriptionale Proteine mit dem DNA-Templat kontaktieren. Einer der wichtigsten Mechanismen, der zu Chromatin-Remodelling beiträgt, ist die post-translationale Modifizierung von Histon durch Acetylierung. Eine Änderung in elektrostatischer Anziehung für DNA und sterische Hinderung, eingeführt durch die hydrophobe Acetylgruppe, führt zu Destabilisierung der Wechselwirkung von Histon mit DNA. Im Ergebnis zerstört Acetylierung von Histon Nucleosome und gestattet, dass die DNA für die transkriptionale Maschinerie zugänglich wird. Die Entfernung der Acetylgruppen gestattet den Histon, fester an die DNA und an benachbarte Nucleosomen zu binden und somit die transkriptional reprimierte Chromatinstruktur aufrecht zu erhalten. Acetylierung wird durch eine Reihe von Enzymen mit Histonacetyltransferase-(HAT)-Aktivität vermittelt. Im umgekehrten Fall werden Acetylgruppen durch spezielle Histondesacetylase-(HDAC)-Enzyme entfernt. Die Zerstörung dieser Mechanismen gibt Anlass zu transkriptionaler Disregulierung und kann zu leukämischer Transformation führen.

**[0003]** Nukleare Hormonrezeptoren sind Liganden-abhängige Transkriptionsfaktoren, die die Entwicklung und Homeostase durch sowohl positive als auch negative Kontrolle von Genexpression kontrollieren. Mängel bei diesen regulatorischen Vorgängen unterliegen den Ursachen von vielen Erkrankungen und spielen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Krebs.

**[0004]** Es wurde berichtet, dass einige Mitglieder der nuklearen Rezeptor-superfamilie mit basalen Transkriptionsfaktoren in Wechselwirkung stehen, einschließlich TFIIB. Zahlreiche Nachweislinien zeigen allerdings an, dass nukleäre Rezeptoren mit zusätzlichen Faktoren in Wechselwirkung treten müssen, um sowohl Aktivierung als auch Repression von Targetgenen zu vermitteln. Eine Vielzahl von Cofaktoren, die mit den Ligandenbindungsdomänen von Oestrogen (ER), Retinsäure (RAR), Thyroidhormon

(T3R), Retinoid X (RXR) und anderen nuklearen Rezeptoren in Verbindung stehen, wurden kürzlich identifiziert. Vermutliche Coaktivatorproteine umfassen SRC-1 / NCoA-1, GRIP1 / TIF2 / NCoA-2, p/CIP / ACTR / AIB1, CBP und eine Vielzahl von anderen Faktoren (übersichtlich mitgeteilt von Xu et al., 1999, Curr Opin Genet Dev 9, 140–147). Interessanterweise hat sich gezeigt, dass SRC-Proteine sowie CBP intrinsische Histonacetyltransferaseaktivität aufweisen und in einem Komplex mit der Histonacetylase P/CAF vorliegen. Viele Nuklearrezeptoren, einschließlich T3R, RAR und PPAR, können mit den Corepressoren N-CoR und SMRT in Abwesenheit von Ligand in Wechselwirkung treten und dadurch die Transkription inhibieren. Außerdem wurde mitgeteilt, dass N-CoR mit Antagonisten-besetzten Progesteron- und Oestrogenrezeptoren in Wechselwirkung tritt. N-CoR und SMRT liegen in großen Proteinkomplexen vor, die auch mSin3-Proteine und Histondesacetylase enthalten. Somit reflektiert die Liganden-induzierte Umschaltung von nuklearen Rezeptoren von Repression auf Aktivierung den Austausch von Corepressor- und Coaktivatorkomplexen mit antagonistischen enzymatischen Aktivitäten.

**[0005]** Der N-CoR-Corepressorkomplex vermittelt nicht nur die Repression durch Nuklearrezeptoren, sondern tritt auch mit zusätzlichen Transkriptionsfaktoren in Wechselwirkung, einschließlich Mad-1, BCL-6 und ETO. Viele von diesen Proteinen spielen eine wichtige Rolle bei Erkrankungen von Zellproliferation und Differenzierung. T3R wurde beispielsweise ursprünglich auf der Basis seiner Homologie mit viralem Onkogen v-erbA identifiziert, das im Gegensatz zu dem Wildtyprezeptor keinen Liganden bindet und als ein konstitutiver Repressor der Transkription dient. Außerdem wurden Mutationen in RAR mit einer Vielzahl von Krebsformen beim Menschen in Verbindung gebracht, insbesondere mit akuter promyelozytärer Leukämie (APL) und Hepatozellkarzinom. Bei APL-Patienten beziehen RAR-Fusionsproteine, die von chromosomal Translokationen stammen, entweder das promyelozytäre Leukämieprotein (PML) oder das promyelozytäre Zinkfingerprotein (PLZF) ein. Obwohl beide Fusionsproteine mit Komponenten des Corepressorkomplexes in Wechselwirkung treten können, entbindet die Addition von Retinsäure den Corepressorkomplex von PML-RAR, während PLZF-RAR konstitutiv in Wechselwirkung tritt. Diese Erkenntnisse liefern eine Erklärung, warum PML-RAR APL-Patienten eine vollständige Remission nach Retinsäurebehandlung erzielen; wohingegen PLZF-RAR APL-Patienten nur sehr mangelhaft ansprechen. Die Hypothese, dass Corepressor-vermittelte, aberrante Repression für die Pathogenese bei APL ursächlich sein kann, wird durch das Auffinden gestützt, dass Trichostatin A, welches Histondesacetylase-(HDAC)-Funktion inhibiert, in der Lage ist, den Differenzierungsblock in Zellen, die das PLZF-RAR-Fusionsprotein enthalten, zu überwin-

den. Außerdem wurde ein PML-RAR-Patient, dem ein mehrfacher Rückfall nach Behandlung mit Retinsäure widerfuhr, kürzlich mit dem HDAC-Inhibitor Phenylbutyrat behandelt, was zu einem vollständigen Rückgang der Leukämie führte (Warrell et al., 1998, J. Natl. Cancer Inst. 90, 1621–1625).

**[0006]** Ein zusätzlicher Nachweis, dass Histonacetylierung eine Rolle bei Krebs spielt, stammt aus den Untersuchungen an dem AML1-ETO-Onkprotein und an chromosomal Umlagerungen, die in den MLL-locus einbezogen sind (Redner et al., 1999, Blood 94, 417–428).

**[0007]** WO 99/37150 offenbart eine Transkriptionstherapie gegen Krebs, umfassend Verabreichen eines retinoiden Stoffes und eines Inhibitors von Histondesacetylase.

**[0008]** Verschiedene Verbindungen sind als HDAC-Inhibitoren bekannt. Buttersäure oder Butyrat war der erste HDAC-Inhibitor, der identifiziert wurde. In millimolaren Konzentrationen ist Butyrat für HDAC nicht spezifisch; es inhibiert ebenso Phosphorylierung und Methylierung von Nukleoproteinen sowie DNA-Methylierung. Sein Analoges, Phenylbutyrat, wirkt in ähnlicher Weise. Spezifischer sind Trichostatin A (TSA) und Trapoxin (TPX). TPX und TSA haben sich als starke Inhibitoren von Histondesacetylasen herausgestellt. TSA inhibiert reversibel, während TPX irreversibel bindet und HDAC-Enzyme inaktiviert. Im Gegensatz zu Butyrat wurde eine unspezifische Inhibierung von anderen Enzymsystemen für TSA oder TPX noch nicht mitgeteilt. TSA und TPX zeigen jedoch starke Toxizität und sind mangelhaft bioverfügbar. Daher sind sie von begrenztem therapeutischem Nutzen.

**[0009]** Es ist eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, Substanzen bereitzustellen, die Differenzierung und/oder Apoptose in einem breiten Bereich von transformierten Zellen induzieren können und daher bei der Behandlung von Krebs nützlich sind.

**[0010]** Die Erfindung beruht auf den neuen Erkenntnissen, dass Valproinsäure (VPA; 2-n-Propyl-pentansäure) in der Lage ist, Histondesacetylase zu inhibieren. Valproinsäure ist ein bekannter Arzneistoff mit vielfachen biologischen Aktivitäten, die in der Wirkung von verschiedenen molekularen Mechanismen abhängen.

- VPA ist ein antiepileptischer Arzneistoff.
- VPA ist teratogen. Bei Verwendung als antiepileptischer Arzneistoff während der Schwangerschaft kann VPA Geburtsfehler (Neuralrohr-Verschlussdefekte und andere Fehlbildungen) bei einem geringen Prozentsatz von Neugeborenen induzieren. Bei Mäusen ist VPA bei der Mehrheit von Mausembryonen teratogen, wenn geeignet dosiert.

– VPA aktiviert einen Nuklearhormonrezeptor (PPAR $\delta$ ). Verschiedene zusätzliche Transkriptionsfaktoren werden auch dereprimiert, aber einige Faktoren sind nicht signifikant dereprimiert (Glucocorticoidrezeptor, PPAR $\alpha$ ).

– VPA ist hepatotoxisch, was von mangelhaft metabolisierten Estern mit Coenzym A abhängen mag.

**[0011]** Die Verwendung von VPA-Derivaten hat es ermöglicht zu bestimmen, dass die verschiedenen Aktivitäten durch verschiedene molekulare Wirkungsmechanismen vermittelt werden. Teratogenität und antiepileptische Wirkung folgen unterschiedlichen Wirkungsweisen, da Verbindungen isoliert werden konnten, die entweder bevorzugt teratogen oder bevorzugt antiepileptisch sind (Nau et al., 1991, Pharmacol. Toxicol. 69, 310–321). Aktivierung von PPAR $\delta$  zeigte sich streng korreliert mit Teratogenität (Lampen et al., 1999, Toxicol. Appl. Pharmacol. 160, 238–249), was vermuten lässt, dass sowohl PPAR $\delta$ -Aktivierung als auch Teratogenität dieselbe molekulare Aktivität von VPA erfordern. Differenzierung von F9-Zellen korreliert auch stark mit PPAR $\delta$ -Aktivierung und Teratogenität, wie von Lampen et al., 1999, vermutet und dokumentiert durch die Analyse der Differenzierungsmarker (Werling et al., 2001, Mol. Pharmacol. 59, 1269–1276).

**[0012]** Es wurde in der vorliegenden Anmeldung gezeigt, dass PPAR $\delta$ -Aktivierung durch die HDAC-inhibitorische Wirkung von VPA und seinen Derivaten verursacht wird. Außerdem wurde gezeigt, dass der bekannte HDAC-Inhibitor TSA PPAR $\delta$  aktiviert und denselben Typ von F9-Zelle Differenzierung wie VPA induziert. Aus diesen Ergebnissen schlussfolgern wir, dass nicht nur Aktivierung von PPAR $\delta$ , sondern auch Induktion von F9-Zellendifferenzierung und Teratogenität von VPA oder VPA-Derivaten, höchstwahrscheinlich durch HDAC-Inhibition verursacht werden.

**[0013]** Die vorliegende Erfindung basiert auf der Erkenntnis, dass VPA und die in dieser Anmeldung beschriebenen Derivate Inhibitoren von Histondesacetylasen sind. Das Auffinden dieses neuen Wirkungsmechanismus von VPA und davon abgeleiteten Verbindungen; d.h. die Inhibition von Enzymen mit Histondesacetylaseaktivität, führte uns zu dem Vorschlag, dass VPA aufgrund ihrer HDAC-inhibitorischen Aktivität zum Induzieren von Differenzierung und/oder Apoptose in einer großen Vielzahl von Krebszellen aus zweierlei Gründen nützlich sein sollte: (1) Diese Enzyme liegen in allen Zellen vor und (2) Pilotuntersuchungen mit Modellverbindungen, wie Butyrat oder TSA, die von jenen in dieser Erfindung beschriebenen verschieden sind, haben gezeigt, dass HDAC-Inhibitoren Differenzierung in einer großen Vielzahl von Zellen induzieren.

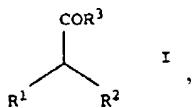
**[0014]** Die Aktivität, Differenzierung und/oder Apoptose in einer Vielzahl von transformierten Zellen zu erzeugen, ist eine viel komplexere biologische Aktivität, als nur die Inhibierung von Proliferation. Im letzteren Falle würde es nicht nachweisbar sein, warum nur die Proliferation von transformierten (Tumor-), jedoch nicht von normalen Zellen, inhibiert werden sollte. Die Induktion von Apoptose, Differenzierung oder insbesondere Re-Differenzierung in dedifferenzierten Tumorzellen liefert eine logische Grundlage, warum die erfindungsgemäßen Verbindungen nützliche Wirkungen auf eine große Vielzahl von Tumoren durch Induktion von Differenzierung und/oder Apoptose ausüben. Dieser Vorschlag bzw. diese Vermutung wurde in einer großen Vielzahl von Tumorzellen (siehe Beispiele) bestätigt.

**[0015]** Antiepileptische und sedierende Wirkungen folgen verschiedenen Struktur-Aktivitäts-Beziehungen und hängen somit offenbar von einer primären VPA-Aktivität im Unterschied zur HDAC-Inhibierung ab.

**[0016]** Der Mechanismus der Hepatotoxizität wird unzureichend verstanden und es ist unbekannt, ob er mit einer Bildung des VPA-CoA-Esters einhergeht. Die erfindungsgemäße Verwendung, beispielsweise HDAC-Inhibierung, scheint allerdings keine CoA-Esterbildung zu erfordern.

**[0017]** US-Patent Nr. 5 672 746 und WO 96/06821 offenbaren die Verwendung von VPA und Derivaten davon zur Behandlung von neurodegenerativen und neuroproliferativen Erkrankungen.

**[0018]** Ein Aspekt der vorliegenden Erfindung ist die in-vitro-Verwendung von VPA, S-4-in-Valproinsäure oder 2-Ethylhexansäure, als Inhibitor von Enzymen mit Histondesacetylaseaktivität. Derivate von VPA sind  $\alpha$ -Kohlenstoffatom-verzweigte Carbonsäuren, wie durch Formel I beschrieben,



worin R<sup>1</sup> und R<sup>2</sup> unabhängig voneinander eine lineare oder verzweigte, gesättigte oder ungesättigte, aliphatische C<sub>2-25</sub>, vorzugsweise C<sub>3-25</sub>-Kohlenwasserstoffkette darstellen, die gegebenenfalls eines oder einige Heteroatome enthalten kann und die substituiert sein kann, R<sup>3</sup> eine Hydroxyl-, Halogen-, Alkoxy- oder eine gegebenenfalls alkylierte Aminogruppe darstellt. Unterschiedliche R<sup>1</sup>- und R<sup>2</sup>-Reste ergeben chirale Verbindungen. Gewöhnlich weist eines der Stereoisomeren stärkere teratogene Wirkung auf als das andere (Nau et al., 1991, Pharmacol. Toxicol. 69, 310-321), und das teratogenere Isomer aktiviert wirksamer PPAR $\delta$  (Lampen et al., 1999). Daher kann erwartet werden, dass dieses Isomer HDAC stärker inhibiert (diese Erfindung). Die vorliegende Erfindung

umfasst die racemischen Gemische der jeweiligen Verbindungen, die weniger aktiven Isomere, und insbesondere die aktiveren Isomere.

**[0019]** R<sup>1</sup> und R<sup>2</sup> können substituiert sein. Mögliche Substituenten schließen Hydroxyl-, Amino-, Carbonsäure- und Alkoxygruppen sowie Aryl- und heterocyclische Gruppen ein.

**[0020]** Vorzugsweise umfassen R<sup>1</sup> und R<sup>2</sup> unabhängig voneinander 2 bis 10, bevorzugter 3 bis 10 oder 5 bis 10 Kohlenstoffatome. Es ist auch bevorzugt, dass R<sup>1</sup> und R<sup>2</sup> unabhängig voneinander gesättigt sind oder eine Doppelbindung umfassen oder eine Dreifachbindung umfassen. Insbesondere kann eine der Seitenketten (R<sup>1</sup>) vorzugsweise sp<sup>1</sup>-hybridisierte Kohlenstoffatome in Position 2 und 3 oder Heteroatome, die eine ähnliche Struktur erzeugen, enthalten. Diese Seitenkette sollte 3 Kohlenstoff- oder Heteroatome umfassen, aber längere Ketten können auch HDAC-inhibierende Moleküle erzeugen. Auch wird der Einschluss von aromatischen Ringen oder Heteroatomen in R<sup>2</sup> angesehen, dass er Verbindungen mit HDAC-inhibitorischer Aktivität erzeugt, weil die katalytische Stelle des HDAC-Proteins scheinbar eine große Vielzahl von Bindungsmolekülen aufnimmt. Mit der neuen Beobachtung, dass teratogene VPA-Derivate HDAC-Inhibitoren darstellen, werden auch Verbindungen, die früher als geeignete antiepileptische Mittel nicht Beachtung fanden, als HDAC-Inhibitoren unter dieser Erfindung angesehen. Insbesondere, jedoch nicht ausschließlich, werden Verbindungen mit einem Propinylrest als R<sup>1</sup> und Resten von 7 oder mehr Kohlenstoffatomen als R<sup>2</sup> in Betracht gezogen (Lampen et al., 1999).

**[0021]** Vorzugsweise ist die Gruppe „COR<sup>3</sup>“ eine Carbonsäuregruppe. Derivatisierung der Carbonsäuregruppe wurde für die Erzeugung von Verbindungen mit potenzieller HDAC-inhibitorischer Aktivität auch in Betracht gezogen. Solche Derivate können Halogenide (beispielsweise Chloride), Ester oder Amide sein. Wenn R<sup>3</sup> Alkoxy bedeutet, umfasst die Alkoxygruppe 1 bis 25, vorzugsweise 1 bis 10, Kohlenstoffatome. Wenn R<sup>3</sup> eine mono- oder dialkylierte Aminogruppe ist, umfassen die Alkylsubstituenten 1 bis 25, vorzugsweise 1 bis 10, Kohlenstoffatome. Eine unsubstituierte Aminogruppe ist allerdings bevorzugt.

**[0022]** Gemäß der vorliegenden Erfindung können auch pharmazeutisch verträgliche Salze einer Verbindung der Formel I verwendet werden. Gemäß der vorliegenden Erfindung können auch Stoffe verwendet werden, die zu einer Verbindung, wie in Formel 1 definiert, im menschlichen Organismus metabolisiert werden oder die zu einer Freisetzung einer Verbindung, wie in Formel 1 definiert, beispielsweise durch Esterhydrolyse, führen können.

**[0023]** Die erfindungsgemäß verwendeten Verbin-

dungen sind VPA, S-4-in-VPA, 2-EHXA (2-Ethyl-heксансäure). Die Verbindungen sind nützlich zum Inhibieren bei Säugern (zur Verwendung von Zelllinien in in-vitro-Assays und Tiermodellsystemen) und insbesondere beim Menschen (in vivo und in vitro) von Histondesacetylaseren HDAC 1-3 (Klasse 1) und HDAC 4-8 (Klasse II).

**[0024]** Die Verbindungen können zum Induzieren der Differenzierung und/oder Apoptose von Zellen, wie undifferentierte Tumorzellen, verwendet werden. Vermutlich reflektiert dies einen allgemeinen Mechanismus, weil Differenzierung in F9-Teratocarcinoma-zellen, MT 450 Brustkrebszellen, HAT-29 Colon-carcinomazellen und verschiedenen Leukämiezelllinien induziert werden kann, wie durch morphologische Änderungen und spezifisches Markergen oder Proteinexpression bewertet. Außerdem können beispielsweise MT450-Zellen induziert werden, dass sie Apoptose unterliegen (siehe Beispiel 6).

**[0025]** Die Erfindung betrifft auch die Verwendung vorstehend genannter Verbindungen zur Induktion von Differenzierung und/oder Apoptose von transformierten Zellen.

**[0026]** Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung der vorstehend genannten Verbindungen zur Herstellung eines Arzneimittels für die Behandlung einer Erkrankung, wie in Anspruch 1 definiert, die mit Gen-spezifischer Hypoacetylierung von Histonen in Verbindung steht. Es gibt eine Vielzahl von Erkrankungen, die mit aberranter Repression von speziellen Genen, die mit einem lokalen Spiegel von Histonacetylierung unterhalb des regulären Spiegels korreliert, in Verbindung sind.

**[0027]** Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist die Verwendung einer Verbindung der Formel 1 zur Herstellung eines Arzneimittels für die Behandlung einer Krankheit, bei der die Induktion von Hyperacetylierung von Histonen eine nützliche Wirkung hat, die Differenzierung und/oder Apoptose von Tumorpatientenzellen und eine klinische Verbesserung des Zustands des Patienten hervorruft, wobei die Krankheit ausgewählt ist aus Hautkrebs, Oestrogenrezeptor-abhängigem und -unabhängigem Brustkrebs, Eierstockkrebs, Prostatakrebs, Nierenkrebs, Dickdarm- und Darmkrebs, Bauchspeicheldrüsenkrebs, Kehlkopfkrebs, Kleinzelligem und nichtkleinzelligem Lungentumoren. Die Induktion von Hyperacetylierung kann auch zur Umkehr von ungeeigneter Genexpression bei Krankheiten nützlich sein, die auf aberranter Rekrutierung von Histondesacetylaseaktivität basieren, wie Thyroidresistenzsyndrom.

**[0028]** Die Verbindungen und Salze davon können als pharmazeutische Zusammensetzungen formuliert werden (beispielsweise Pulver, Granulat, Tabletten, Pillen, Kapseln, Injektionen, Lösungen, Schäu-

me, Klistiere und dergleichen), umfassend mindestens eine solche Verbindung einzeln oder in Anmischung mit pharmazeutisch verträglichen Trägern, Exzipienten und/oder Verdünnungsmitteln. Die pharmazeutischen Zusammensetzungen können gemäß üblichem Verfahren formuliert werden. Spezielle Dosisspiegel für einen bestimmten Patienten werden in Abhängigkeit von einer Vielzahl von Faktoren eingesetzt, einschließlich der Aktivität der verwendeten speziellen Verbindungen, dem Alter, Körpergewicht, allgemeinem Gesundheitszustand, Geschlecht, Ernährung, Zeit der Verabreichung, Weg der Verabreichung, Ausscheidungsrate, Arzneistoffkombination und dem Grad der jeweiligen Krankheit, die einer Therapie unterzogen wird. Der Wirkstoff wird vorzugsweise in einer geeigneten Menge verabreicht, beispielsweise ausgewählt aus dem Bereich von etwa 10 mg/kg bis 100 mg/kg Körpergewicht in einem Tag oral oder intravenös. Die Dosisspiegel sind nicht speziell eingeschränkt, solange Serumspiegel von 0,05 mM bis 3 mM, vorzugsweise etwa 0,4 mM bis 1,2 mM, erreicht werden.

**[0029]** Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist ein Verfahren zur Identifizierung von Stoffen mit Histondesacetylaseinhibitorischer Aktivität, umfassend die Bereitstellung eines Derivats von Valproinsäure, Ermittlung seiner Histondesacetylase-inhibitorischen Aktivität und Auswahl des Stoffes, wenn der Stoff eine Histondesacetylase-inhibitorische Aktivität aufweist. Valproinsäure kann als Leitsubstanz für die Identifizierung von anderen Verbindungen, die Histondesacetylase-inhibitorische Wirkung zeigen, dienen. Dadurch können Verbindungen ausgewählt werden, die erhöhte HDAC-inhibitorische Wirkung bei geringeren Dosen und Serumspiegeln zeigen und verminderte Wirkung auf das zentrale Nervensystem, wie sedierende Wirkung, aufweisen. Ein weiterer Parameter, der optimiert werden kann, ist das Auftreten der hepatotoxischen Effekts. Verbindungen können ausgewählt werden, die eine verminderte Lebertoxizität zeigen. Die Derivate können durch Syntheseverfahren bereitgestellt werden, die zusätzlich und/oder modifizierte Substituenten bereitstellen. Die HDAC-inhibitorische Aktivität kann durch eine bekannte Technologie vermittelt werden, wie Transkriptionsrepressions-assay, Western-Blot, welches Acetylierung von Histon H3 und/oder Histon H4 nachweist, oder durch ein enzymatisches Assay.

**[0030]** Das transkriptionale Assay für Repressoraktivität nutzt Aktivierung und Derepression von einem Ga14-abhängigen Reporteren. Dieses Assay kann entweder durch transiente Transfektion von Säugierzelllinien (beispielsweise HeLa, 293T, CV-1) oder mit speziell konstruierten, permanenten Zelllinien ausgeführt werden. Transkriptionsfaktoren, wie Thyroidhormonrezeptor, PPAR $\delta$ , Retinsäurerezeptor, N-CoR und AML/ETO, reprimieren Transkription, wenn sie an einen Promotor binden, der UAS-Elemente als Fu-

sionsproteine enthält, mit der heterologen DNA-Bindungsdomäne des Hefe-Ga14-Proteins. In Abwesenheit des Ga14-Fusionsproteins weist das Reporteren aufgrund der Gegenwart von Bindungsstellen für andere Transkriptionsfaktoren in dem Thymidinkinasepromoter eine hohe basale transkriptionale Aktivität auf. Die Ga14-Fusionsproteine reprimieren diese Aktivität um das 140-fache. HDAC-Inhibitoren induzieren den Rückgang dieser Repression, was als Erhöhung in der Reporteraktivität (beispielsweise durch Luciferaseassay) nachgewiesen werden kann.

**[0031]** Histondesacetylaseinhibitoren induzieren die Akkumulation von N-terminal hyperacetylierten Histonen H3 und H4. Diese acetylierten Histone können durch Western-Blot-Analyse von Extrakten ganzer Zellen oder von Histonpräparaten aus Histondesacetylaseinhibitor-behandelten Zellen, unter Verwendung von Antikörpern, die für die acetylierten N-terminalen Lysinreste von Histonen H3 und H4 spezifisch sind, nachgewiesen werden.

**[0032]** Das enzymatische Assay für HDAC-Aktivität zeichnet die Freisetzung von  $^3\text{H}$ -markierter Essigsäure aus hyperacetylierten Substraten auf. Quellen der HDAC-Aktivität können Co-Immunopräzipitate mit Antikörpern, gerichtet gegen N-CoR (oder andere Repressoren, die bekannt sind, dass sie HDAC rekrutieren), oder rohe Zellextrakte, enthaltend Histondesacetylase (beispielsweise HeLa, 293T, F9), sein. Substrate können entweder chemisch  $^3\text{H}$ -acetylierte Peptide, entsprechend den N-Termini von Histonen H3 oder H4, oder Histonproteine, isoliert aus metabolisch markierten Zellen, die mit HDAC-Inhibitoren behandelt wurden, sein. Nach Extraktion mit Essigsäureethylester wird die Freisetzung von  $^3\text{H}$ -markierter Essigsäure durch Flüssigszintillationszählung nachgewiesen.

**[0033]** Ein noch weiterer Aspekt der Erfindung ist ein Verfahren zum Profilieren der HDAC-Isoenzymspezifität einer Verbindung, definiert in Formel I, wobei das Binden der Verbindung an HDAC und/oder die Konkurrenz zum Binden an HDAC gemessen wird.

**[0034]** Das Verfahren kann die nachstehenden Schritte umfassen: HDAC werden entweder immunpräzipitiert mit HDAC Isoform-spezifischen Antikörpern, mit Antikörpern, gerichtet gegen Corepressorkomplexe, oder mit speziellen Antikörpern, gerichtet gegen rekombinante HDAC, überexprimiert in transgenen Zellen. Das Verfahren kann außerdem die Bestimmung von individuellen HDAC, die in diesen Immunpräzipitaten vorliegen, durch Western-Blot-Analyse einbeziehen. Radiomarkierte VPA oder Verbindungen gemäß der Formel I werden an die Immunpräzipitate gebunden. Die Menge an gebundener Verbindung wird durch Messung der gebundenen Radioaktivität nach geeigneten Waschschritten er-

mittelt. Eine Variante dieses Aspekts bezieht Binden von einem markierten HDAC-Inhibitor, wie VPA, TSA oder Trapoxin, und Konkurrenz der Bindung durch eine Verbindung gemäß Formel I ein. Eine weitere Variante des Verfahrens bezieht die Verwendung von alternierenden Markierungs- und/oder Detektionsverfahren ein.

**[0035]** Es ist bevorzugt, dass Verbindungen ausgewählt werden, die spezifisch nur einen Subset von HDAC inhibieren.

**[0036]** Beschrieben wird die Verwendung von VPA oder Derivaten davon zum Definieren von Genen, die durch die Verbindungen in Zellen, wie primären Human- oder Nagerzellen, leukämischen Zellen, oder anderen Krebs- oder Tumorzelllinien, induziert werden. Verfahren zum Definieren solcher Gene, die durch VPA induziert werden, schließen etablierte Technologien zum Absuchen großer Arrays von cDNA, exprimierte Sequenztags oder so genannte unigene Sammlungen ein. Die Verwendung von subtraktiven Hybridisierungstechniken ist auch geeignet, um Gene zu definieren, die durch VPA oder Derivate davon induziert werden. Die Verwendung von diesen Verfahren zur Identifizierung von potenziellen Zielen für die Arzneistoffentwicklung stromabwärts der HDAC-Inhibition, und außerdem die Verwendung von diesen Verfahren zum Definieren diagnostischer Maßnahmen, um die therapeutische Behandlung von Patienten mit geeigneten Verbindungen zu erleichtern, wird beschrieben. Unter Berücksichtigung der geringen allgemeinen Toxizität von VPA in dem Organismus, verglichen mit anderen HDAC-Inhibitoren, ist ein spezieller Aspekt der Erfindung, VPA oder Derivate davon zum Definieren von Targetgenen, die durch VPA selektiv reguliert oder nicht reguliert werden, insbesondere auch im Vergleich zu anderen HDAC-Inhibitoren, wie Trichostatin A, zu verwenden. Die vorliegende Erfindung beschreibt auch ein diagnostisches Verfahren zur Identifizierung von Tumoren, umfassend den Schritt des Testens, ob ein Tumor für die Behandlung mit Verbindungen, die durch Formel I definiert werden, empfänglich ist. Das Verfahren umfasst vorzugsweise das Verfahren zur Identifizierung von Genen, induziert durch VPA oder ein Derivat davon, das vorstehend beschrieben wurde. In einer besonderen Ausführungsoform umfasst das diagnostische Verfahren die Verwendung von Nukleinsäuretechnologie, vorzugsweise von Hybridisierung oder Polymerasekettenreaktion, zur Detektion. Andere Arten von Nukleinsäuretechnologie können jedoch angewendet werden. In einer weiteren Ausführungsform umfasst das Verfahren die Verwendung von spezifischen Antikörpern gegen differenziell regulierte Proteine zum Nachweis. Für diesen Zweck würden die Proteine, codiert durch die Gene, die Deregulation ihrer Expression nach VPA-Behandlung zeigen, exprimiert werden, beispielsweise in rekombinanten Expressionssystemen, und Antikörper, gerichtet ge-

gen diese Proteine, würden generiert werden. Folglich könnten solche Antikörper verwendet werden (oder Muster von Antikörpern), um den Status eines Tumors oder Tumorzellen für diagnostische und/oder prognostische Gründe zu charakterisieren.

**[0037]** Die vorliegende Erfindung stellt neue Möglichkeiten zur Behandlung verschiedener Krebserkrankungen zur Verfügung. Die Anmelder fanden, dass VPA und Derivate davon starke HDAC-Inhibitoren sind. Die HDAC-Inhibitoren, die bislang bekannt sind, sind entweder unspezifisch, wie Butyrat, oder toxisch oder im gesamten Organismus mangelhaft bioverfügbar, wie TSA und TPX. VPA hat den Vorteil, dass es bereits ein zugelassener Arzneistoff ist und über Jahrzehnte zur Behandlung von Epilepsie beim Menschen verwendet wird. Eine große Menge von Daten betrifft somit pharmazeutische Verträglichkeit und Fehlen ernsthafter Nebeneffekte. Somit sollte VPA ein geeigneter Arzneistoff zur Verwendung beim Menschen zum Induzieren von Differenzierung und/oder Apoptose bei transformierten Zellen und bei jenen zum Ausüben vorteilhafter Wirkungen bei einer Vielzahl von Patienten, die an Krebs leiden, sein.

**[0038]** [Fig. 1](#) beschreibt die Histondesacetylaseinhibitor-ähnliche Aktivierung von PPAR $\delta$  durch VPA (Beispiel 1).

**[0039]** [Fig. 2](#) zeigt, dass VPA-aktivierte verschiedene Transkriptionsfaktoren bei Zusatz zu PPAR $\delta$  (Beispiel 2).

**[0040]** [Fig. 3](#) zeigt VPA-induzierte Akkumulation von hyperacetylierten Histonen H3 und H4 (Beispiel 3).

**[0041]** [Fig. 4](#) zeigt die biochemische Analyse von Histondesacetylaseaktivität in Abwesenheit oder Gegenwart von VPA (Beispiel 4).

**[0042]** [Fig. 5](#) zeigt Indikatoren von VPA-induzierter Differenzierung in HT-29-Coloncarcinomzellen, F9-Teratocarcinomzellen und RenCa-renalen Carcinomzellen. Die Phenotypen von F9-Teratocarcinomzellen, differenziert von VPA oder dem Histondesacetylaseinhibitor Trichostatin A, scheinen identisch (Beispiel 5).

**[0043]** [Fig. 6](#) zeigt Induktion von Apoptose in MT450-Brustkrebszellen (Beispiel 6).

**[0044]** [Fig. 7](#) zeigt den Verlust an lebensfähigen Zellen nach Behandlung mit Valproinsäure. Renca-lacZ, Renca-lacZ/EGFR, Renca-lacZ/EGFRvIII und Renca-lacZ/ErbB2 renale Karzinomzellen (A) oder SKOV3 Eierstockzellen, SKBR3, MCF7, MDA-MB453 und MDA-MB468 Brustkrebszellen und A431 squamöse Zell-Karzinomzellen (B) wurden mit den angegebenen Konzentrationen von Valproinsäure (VPA) inkubiert. Die relative Zahl an lebensfähigen Zellen wurde unter Verwendung des enzymatischen MTT-Assays ermittelt, wobei deren zelluläre metabolische Aktivität gemessen wurde, wie in Beispiel 7 beschrieben. Jeder Punkt gibt den Mittelwert eines Datensatzes, ermittelt in Triplikaten, wieder (Beispiel 7).

**[0045]** [Fig. 8](#) zeigt die Reduktion in der Zellbiomasse nach Behandlung von Zellkulturen mit VPA (Beispiel 8). Die nachstehenden Beispiele erläutern die Erfindung.

### Beispiel 1

#### Aktivierung eines PPAR $\delta$ -Gluco-corticoiden Rezeptorhybridproteins durch VPA

**[0046]** Eine Reportergenzelllinie zur Aktivierung der PPAR $\delta$ -Ligandenbindungsdomäne wurde in CHO-Zellen konstruiert. Ein Subklon von CHO-Zellen wurde verwendet, der ein transgenes Reportergen enthielt, das eine sekretierte Form der human-plazentalen alkalischen Phosphatase, unter Steuerung des Glucocorticoiden Rezeptor-abhängigen LTR-Promotors des Maus-Mammatumorvirus exprimiert (Göttlicher et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, Seiten 4653–4657). Ein Hybridrezeptor, umfassend den Aminoterminus des Glucocorticoiden Rezeptors, fusioniert an die Ligandenbindungsdomäne von PPAR $\delta$ , wurde in diese Zellen, im Wesentlichen wie für die Expression des entsprechenden Hybrids von PPAR $\alpha$  beschrieben, exprimiert (Göttlicher et al., 1992, ebenda). Die Ligandenbindungsdomäne von PPAR $\delta$  wurde, beginnend bei Aminosäure 138, als deduzierte Form aus der Sequenz, veröffentlicht durch Amri et al. (J. Biol. Chem. 270 (1995) Seiten 2367–2371), verwendet. Aktivierung der PPAR $\delta$ -Ligandenbindungsdomäne in diesen Zellen induziert Expression des alkalischen Phosphatasereportergens, das durch ein enzymatisches Assay aus dem Zellkulturüberstand nachweisbar ist. Ähnliche Zellen, die für den Glucocorticoiden Rezeptor in voller Länge exprimieren, dienten als negative Kontrollen für Spezifität der Rezeptoraktivierung. Für das in [Fig. 1](#) gezeigte Experiment wurden die PPAR $\delta$ -Hybridrezeptor-exprimierenden Zellen bei 20% Zusammensetzung in 24-Vertiefungs-Kulturschalen beimpft und für 40 Stunden mit dem PPAR $\delta$ -Liganden-carbo-cyclischen Prostaglandin I<sub>2</sub> (cPGI, 5  $\mu$ M), VPA (1 oder 2 mM) oder den Histondesacetylaseinhibitoren, Natriumbutyrat (0,2–5 mM) und Trichostatin A (TSA, 300 nM), behandelt. Reportergenaktivität wurde durch ein enzymatisches Assay verfolgt (alkalische Phosphatase). Werte, ausgenommen für Butyrat, sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus Dreifachbestimmungen in 2 unabhängigen Versuchen, die gemäß cPGI-induzierter Aktivität normalisiert wurden ([Fig. 1](#)). Die stark synergistische Aktivierung des Reportergens durch VPA, zusammen mit dem PPAR $\delta$ -Liganden cPGI (P+V), was zu der synergisti-

schen Aktivierung durch Trichostatin A ähnlich ist, zusammen mit cPGI (P+T), und das Fehlen von Synergie mit Trichostatin (T+V) oder Butyrat (nicht dargestellt), zeigen an, dass VPA nicht wie ein bona-fide-Ligand zu PPAR $\delta$  wirkt. VPA beeinflusst stattdessen PPAR $\delta$ -Aktivität durch einen Mechanismus, der in der gleichen Sequenz von Vorfällen liegt, die auch die Inhibitoren von Corepressor-verbundenen Histondesacetylase-transkriptionaler Aktivität von PPAR $\delta$  induzieren.

### Beispiel 2

#### Aktivierung von transkriptionalen Repressoren durch VPA

**[0047]** Die Transkriptionsfaktoren, Thyroidhormonrezeptor (TR), Peroxisomproliferator-aktivierter Rezeptor  $\delta$  (PPAR $\delta$ ), Retinsäurerezeptor (RAR), der Corepressor N-CoR und das AML/ETO-Fusionsprotein reprimieren Transkription, wenn sie an einen Promotor binden, der UAS-Stellen enthält (Ga14 Response-Element), als Fusionsproteine mit der heterologen DNA-Bindungsdomäne von Hefe-Ga14-Protein. In Abwesenheit von dem Ga14-Fusionsprotein wird ein Luciferase-Reportergen einen hohen basalen Spiegel aufgrund der Anwesenheit von Bindungsstellen für andere Transkriptionsfaktoren in dem Thymidinkinase-(TK)-Promotor transkribieren. Hela-Zellen wurden mit einem UAS-TK-Luciferase-Reporterplasmid (Heinzel et al., 1997, Nature 387, Seiten 43–48) und Expression von Plasmiden für die ausgewiesenen Ga14-Fusionsproteine unter Verwendung des Calciumphosphat-Präzipitatsverfahrens transfiziert. Nach 24 Stunden wurde das Medium gewechselt und die Zellen wurden mit Histondesacetylaseinhibitoren für weitere 24 Stunden inkubiert. Transkriptionale Repression wird als Luciferaseaktivität, in Bezug auf die Grundlinie von Zellen, die mit einem Expressionsplasmid für die Ga14 DNA-Bindungsdomäne allein transfiziert wurden (Fig. 2), gemessen. Die Ga14-Fusionsproteine reprimieren diese Grundlinienaktivität bis zum 140-fachen. VPA, bei einer Konzentration von 1 mM (nahe den Serumspiegeln, die während einer therapeutischen Verwendung erreicht werden), induziert einen Rückgang dieser Expression, die durch ein Ansteigen der Reportergenaktivität angezeigt wird. Ein Rückgang von Repression findet man auch nach Behandlung mit bekannten Histondesacetylaseinhibitoren (10 nM Trichostatin A, 100 nM TSA) sowie nach partieller Aktivierung von TR und PPAR $\delta$  durch deren jeweiligen Liganden. Eine Kombination von Ligand und HDAC-Inhibitoren (einschließlich VPA) führt zu einem synergistischen Effekt, was ausweist, dass verschiedene molekulare Mechanismen einbezogen sind. Fig. 2 zeigt, dass VPA die Aktivität von verschiedenen unterschiedlichen Transkriptionsfaktoren und Cofaktoren beeinflusst. Dieses Auffinden lässt vermuten, dass VPA als ein gemeinsamer Faktor in der Regulierung von Ge-

nexpression wirkt, wie Corepressor-verbundene Histondesacetylase, anstatt auf individuelle Transkriptionsfaktoren oder Rezeptoren (beispielsweise als ein Ligand).

### Beispiel 3

#### Akkumulierung von hyperacetylierten Histonen in VPA-behandelten Zellen

**[0048]** VPA und bekannte Histondesacetylaseinhibitoren, wie Natriumbutyrat (NaBu) und Trichostatin A (TSA), induzieren die Akkumulation von hyperacetylierten Histonen H3 und H4. Diese acetylierten Histon können durch Western-Blot-Analyse in Zellextrakten von geeignet behandelten Zellen nachgewiesen werden. Fig. 3 zeigt die Ergebnisse einer solchen Analyse aus einem repräsentativen Experiment. In diesem Experiment wurden sowohl der Zeitverlauf von VPA-induzierter Hyperacetylierung (A) als auch die erforderliche VPA-Konzentration (B) bestimmt.

**[0049]** (A) Für die Zeitverlaufsanalyse wurden F9-Zellen in 6-Vertiefungs-Kulturschalen 30 Stunden vor dem beabsichtigten Zeitpunkt der Analyse beimpft. Einzelne Kulturen wurden an ausgewiesenen Zeitpunkten vor der Analyse durch Zugabe der 10-fach konzentrierten Stammlösungen in Kulturmedium von VPA oder Trichostatin A behandelt. Ganzzellenextrakte wurden durch Spülen der Zellkulturen zweimal in eiskalter, Phosphat-gepufferter Salzlösung und Lyse von Zellen in 250  $\mu$ l Proben-puffer für denaturierende SDS-Gel-Elektrophorese hergestellt. DNA von gesammelten Proben wurden durch Be- schallung Scherwirkung ausgesetzt und die Proben wurden auf einem 15% denaturierenden Polyacrylamidgel getrennt. Acetylierte Histon H3 und Histon H4 wurden durch Western-Blot-Analyse, unter Verwendung von handelsüblichen Antikörpern, nachgewiesen (Upstate Biotechnology), die für die acetylierten Formen von Histon spezifisch sind (Ac-H3, Katalog Nr.: 06-599; Ac-H4, Katalog Nr.: 06-598). Gleiche Beladung der Bahnen wurde durch Anfärben eines Teils des Polyacrylamidgels durch Coomasie-Blau bestätigt.

**[0050]** (B) Zum Nachweis der erforderlichen VPA-Dosis wurden F9-Zellen in 6-Vertiefungen-Kulturschalen für 8 Stunden, vor der Zugabe von VPA bei den ausgewiesenen Konzentrationen, gezüchtet. Ganzzellenextrakte wurden 16 Stunden nach Behandlung, wie vorstehend beschrieben, präpariert. Die Analyse für acetylierte Histon H3 und H4 wurde wie in (A) beschrieben ausgeführt. VPA-Konzentrationen im Bereich von Blutserumspiegeln erreichten, während therapeutischer Verwendung von VPA als antiepileptisches Mittel, beim Menschen Induzieren von Hyperacetylierung von Histon H3 und H4. Bei Serumspiegeln, die jene, beabsichtigt für antiepilepti-

sche Therapie, nur leicht überschreiten, induziert Histonhyperacetylierung so wirksam wie Natriumbutyrat oder Trichostatin A, die bei Konzentrationen verwendet werden, von denen erwartet wird, dass sie eine maximale Wirkung aufweisen. Dieser Versuch zeigt an, dass VPA oder eine Metabolitform in F9-Zellen Histondesacetylaseaktivität inhibiert.

#### Beispiel 4

##### VPA und Derivate inhibieren Histondesacetylaseaktivität in vitro

**[0051]** Immunpräzipitate aus Ganzzellenextrakte, unter Verwendung von Antikörpern gegen den Corepressor N-CoR oder mSin3, enthalten Histondesacetylaseaktivität. Diese enzymatische Aktivität wird durch Inkubieren der Immunpräzipitate mit radioaktiv acetylierten Histonsubstraten aus Zellen, in denen Histone hyperacetyliert wurden, in Gegenwart von  $^3\text{H}$ -Acetat, gemessen. Die Freisetzung von  $^3\text{H}$ -Acetat wird durch eine Messung der enzymatischen Aktivität durch Extraktion mit Essigsäureethylester und anschließender Flüssigkeits-Szintillationszählung ([Fig. 4](#)) nachgewiesen. Addition des Histondesacetylaseinhibitors Trichostatin A (TSA,  $10^{-7}$  M) zu der Reaktion in vitro inhibiert stark die enzymatische Aktivität. VPA (von links nach rechts, 0,2 mM, 1 mM, 5 mM) und die verwandten Verbindungen Ethylhexansäure (EHXA, von links nach rechts, 0,008 mM, 0,04 mM, 0,2 mM, 1 mM, 5 mM), R-4-in-VPA (von links nach rechts, 0,2 mM, 1 mM, 5 mM) und S-4-in-VPA (von links nach rechts, 0,2 mM, 1 mM, 5 mM) wurden hinsichtlich ihrer HDAC-Inhibitoraktivität getestet. Die Assays wurden mit N-CoR-Immunopräzipitaten aus 293T-Zellen im Duplikat ausgeführt. Immunopräzipitate wurden mit HDAC-Inhibitoren für 15 Minuten vor der Zugabe von Substrat vorbehandelt und anschließend erfolgte Inkubation für 2,5 Stunden bei  $37^\circ\text{C}$  (die unbehandelte Enzymaktivität 2205 cpm = 100%). Präzipitate eines Preimmunserums diente als negative Kontrolle.  $\text{EC}_{50}$ -Werte sind 0,6 mM für VPA, 0,2 mM für EHXA und 0,3 mM für S-4-in-VPA; wohingegen das Stereoisomer R-4-in-VPA inaktiv ist. Diese Daten zeigen, dass VPA selbst, eher als ein zellulärer Metabolit, Histondesacetylaseaktivität inhibiert.

#### Beispiel 5

##### Induktion von Zelldifferenzierung in F9-Teratokarzinomen, HT-29-Colonkrebs und RenCa-Renalkarzinomzellen.

**[0052]** Histondesacetylaseinhibitoren und VPA induzieren insbesondere Differenzierung von dedifferenzierten tumorigen Zellen. Zelldifferenzierung ist mit Zellzyklusstillstand, morphologischen Änderungen und dem Auftreten von Expression von Markern des differentiierten Phänotyps verbunden. Morphologische Änderungen wurden durch mikroskopische

Bewertung von F9- und HT-29-Zellen ermittelt. Ein Parameter der Differenzierung, der Zellzyklusstillstand, wurde in F9-Teratokarzinomen, Oestrogen-abhängigen MT-450-Brustkrebs- und HT-29-Colonkarzinomzellen mit Hilfe des reduzierten Einbaus von  $^3\text{H}$ -Thymidin in gezüchtete Zellen gezeigt. F9- und HT-29-Zellen wurden für 36 Stunden in Abwesenheit oder in Gegenwart von 1 mM VPA in 96-Vertiefungs-Kulturschalen gezüchtet. 37 kBq von  $^3\text{H}$ -Thymidin wurden für zusätzliche 12 Stunden Kultur zugegeben. MT-450-Zellen wurden für 72 Stunden vor einer 1-Stunden- $^3\text{H}$ -Thymidin-Markierungsperiode gezüchtet. Einbau von  $^3\text{H}$ -Thymidin in DNA wurde durch automatisches Zellernten und Flüssigszintillationszählung ermittelt. VPA-Vorbehandlung reduzierte die Rate von Thymidineinbau um  $48\pm 5\%$ ,  $63\pm 8\%$  und  $52\pm 8\%$  in F9-, MT-450- bzw. HT-29-Zellen. Die Dosisantwort für die Reduktion von Thymidineinbau in HT-29-Zellen ([Fig. 5A](#)) wurde mit demselben experimentellen Vorgang ermittelt. Außerdem war die Induktion eines Zelldifferenzierungsmarkers in F9-Teratokarzinomzellen gezeigt worden ([Fig. 5B](#)). F9-Teratokarzinomzellen wurden für 48 Stunden mit VPA (1 mM), Natriumbutyrat (B, 1 mM) und Trichostatin A (TSA, 30 nM) behandelt. Differenzierung folgte nach morphologischen Kriterien, eine reduzierte Rate bei der Erhöhung der Zellzahl (beispielsweise Zellzyklusstillstand, Daten nicht dargestellt), der Abfall von  $^3\text{H}$ -Thymidineinbau bei 48% während 12 Stunden Pulsmarkierungsperiode (siehe vorstehend) und das Auftreten von nuklearem AP-2-Protein ([Fig. 5B](#)) als spezifischer Marker von Histondesacetylaseinhibitor-induzierter Differenzierung von F9-Zellen. Nuklear-AP-2-Protein wurde im nuklearen Extrakt nachgewiesen, der durch milde Detergenzyse (25 mM Tris, pH 7,5; 1 mM EDTA, 0,05% NP40) von behandelten oder nichtbehandelten F9-Zellen, Gewinnung der Kerne durch Zentrifugierung (3000  $\times$  G, 5 Minuten) und Lyse der Kerne in Probenpuffer durch denaturierende SDS-Gel-Elektrophorese hergestellt wurde. Nuklearextrakte wurden auf einem 9% SDS-Polyacrylamidgel getrennt. AP-2-Protein wurde durch Western-Blot-Analyse unter Verwendung von polyclonalem Kaninchen-Antikörper (Santa Cruz, Katalog Nr.: SC-184), bei einer Verdünnung von 1/1000 in Tris-gepufferter Salzlösung, enthaltend 3% nicht fette Trockenmilch und 0,05% Tween 20 nachgewiesen. Sowohl VPA als auch Trichostatin A induzieren nukleares AP-2-Protein; wohingegen die Aktivität von Butyrat bei der ausgewählten Konzentration schwach ist. Da das Auftreten von AP-2 ein verzögerter Effekt ist, der nur nach 36 bis 40 Stunden VPA-Behandlung nachweisbar ist, kann die schwache Aktivität von Butyrat auf einen effizienten Metabolismus der Verbindung zurückzuführen sein. Trotzdem induziert VPA Differenzierung der epithelialen F9-Zelllinie in einer Weise, die nicht ist von der Differenzierung durch andere Histondesacetylaseinhibitoren unterscheidbar.

**[0053]** Induktion von Differenzierung in Ren-

Ca-LacZ-Zellen durch VPA wurde durch Änderungen in der Zellmorphologie ermittelt. RenCa-LacZ-Zellen wurden für 36 Stunden, entweder in Abwesenheit oder in Gegenwart von 1 mM VPA, gezüchtet. Morphologische Änderungen wurden durch Phasenkontrastmikroskopie beobachtet, und Mikrographien der repräsentativen Gebiete wurden genommen ([Fig. 5C](#)).

#### Beispiel 6

##### Induktion von Apoptose in MT-450-Brustkrebszellen

**[0054]** MT-450-Zellen wurden für 72 Stunden in Abwesenheit oder in Gegenwart von 1 mM VPA gezüchtet. Apoptotische Zellen wurden durch Flow-zytometrische Analyse nach Anfärben der Zelloberfläche nachgewiesen, Phosphatidylserin mit FITC-konjugiertem Annexin V (Becton Dickinson) gemäß den Anweisungen des Herstellers ausgesetzt. Tote Zellen wurden durch Propidiumjodidanfärbung ausgeschlossen. Für die für Annexin-V positiven und für die Propidiumjodidaufnahme negativen Zellen (unterer rechter Quadrant in [Fig. 6](#)) wurden beurteilt und als apoptotische Zellen gezählt.

#### Beispiel 7

##### Verlust an lebensfähigen Tumorzellen nach Behandlung mit Valproinsäure (MTT-Tests)

##### Zelllinien und Zellkultur

**[0055]** Human-MDA-MB468-, MDA-MB453- und SKBR3-Brustkarzinomzellen, A431-squamöse Zellkarzinomzellen und SKOV3-Eierstockkarzinomzellen wurden in Dulbecco's modifiziertem Eagle-Medium gehalten (DMEM, BioWhittaker, Verviers, Belgien), ergänzt mit 10% heiß inaktiviertem fötalem Rinderseum (FBS), 2 mM L-Glutamin, 100 Einheiten/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin. Human-MCF7-Brustkarzinomzellen wurden in RPMI-Medium, ergänzt wie vorstehend beschrieben, gezüchtet.

**[0056]** Renalzellkarzinom-(RenCa)-Zellen, stabil transfiziert mit Plasmid pZeoSV2/lacZ, codierend E. coli β-Galactosidase (Renca-lacZ-Zellen) (Maurer-Gebhard et al., Cancer Res. 58: 2661–2666, 1998), wurden in RPMI-1640-Medium, ergänzt mit 8% FBS, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 0,25 mg/ml Zeocin, gezüchtet. Renca-lacZ-Zellen, cotransfiziert mit Plasmiden pSV2erbB2N und pSV2neo, codierend c-erbB2 und Neomycinresistenz (Renca-lacZ/ErbB2) (Maurer-Gebhard et al., Cancer Res. 58: 2661–2666, 1998), oder Plasmide pLTR-EGFR oder pLTR-EGFRvIII und pSV2neo, codieren epidermalen Wachstumsfaktor-(EGF)-Rezeptor, die onkogen aktivierte EGF-Rezeptorvariante EGFRvIII, und Neomycinresistenz

(Renca-lacZ/EGFR und Renca-lacZ/EGFRvIII) (Schmidt et al., Oncogene 18: 1711–1721, 1999), wurden im selben Medium, das weiterhin 0,48 mg/ml G418 enthielt, gezüchtet.

##### Zelllebensfähigkeitsassays

**[0057]** Tumorzellen wurden in 96-Vertiefungs-Platten mit einer Dichte von  $1 \times 10^4$  Zellen/Vertiefung in normalem Wachstumsmedium beimpft. Valproinsäure wurde bei Endkonzentrationen von 1 oder 3 mM zu Dreifachproben gegeben und die Zellen wurden für 40 Stunden (Renca-lacZ-, Renca-lacZ/ErbB2-, Renca-lacZ/EGFR-, Renca-lacZ/EGFRvIII-, SKBR3- und SKOV3-Zellen) oder 70 Stunden (A431-, MCF7-, MDA-MB453- und MDA-MB468-Zellen) inkubiert. Kontrollzellen wurden in Abwesenheit von Valproinsäure gezüchtet. Zehn µl von 10 mg/ml 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) in PBS wurden zu jeder Vertiefung gegeben und die Zellen wurden für weitere 3 Stunden inkubiert. Die Zellen wurden durch Zugabe von 90 µl Lysepuffer lysiert (20% SDS in 50% Dimethylformamid, pH 4,7). Nach Solubilisierung des Formazanprodukts wurde die Absorption bei 590 nm in einem Mikroplattenleser bestimmt (Dynatech, Denkendorf Deutschland) und die relative Menge der lebensfähigen Zellen, im Vergleich zu Zellen, gewachsen ohne Zugabe von Valproinsäure, wurde berechnet.

##### Ergebnisse

**[0058]** Die Ergebnisse, dargestellt in [Fig. 7](#), zeigen, dass Valproinsäure die Lebensfähigkeit von Brustkarzinomzellen, Eierstockkarzinomzellen, squamösen Zellkarzinomzellen, renalen Karzinomzellen und renalen Karzinomzellen, die bei hohen Spiegeln die ErbB2- und EGF-Rezeptor-Protooncogene exprimieren, oder die onkogen aktivierte EGF-Rezeptorvariante EGFRvIII in einer Konzentrations-abhängigen Weise vermindert. Diese Ergebnisse zeigen, dass Valproinsäure stark die Anzahl und/oder Lebensfähigkeit einer großen Vielzahl von Tumorzellen, abgeleitet von soliden Tumoren von epithelialem Ursprung, vermindert. Der Verlust an Lebensfähigkeit konnte eine Reduktion in der Zellzahl nach Induktion von zellulärer Differenzierung und/oder Induktion von Zelltod nachweisen. Die Beobachtung der Änderungen der Zellmorphologie lässt vermuten, dass Zelldifferenzierung mindestens für einen Teil der Wirkung verantwortlich ist. Diese Induktion von Differenzierung und/oder Induktion von Zelltod lässt vermuten, dass Valproinsäure und Derivate davon für die Therapie von solchen Tumoren verwendet werden können.

## Beispiel 8

Verminderung in der Zellbiomasse nach Behandlung von Humankrebszellkulturen mit Valproinsäure (siehe Figur 8).

**[0059]** VPA induziert Differenzierung und/oder Zelltod bei einer Reihe von Humankrebszellen und reduziert die Gesamtzellbiomasse von Humankrebszellkulturen. Die Verminderung in der Biomasse konnte Zellverlust aufgrund Zelltod und/oder Differenzierung, verbunden mit Zellzyklusstillstand, assoziieren. Quantitative Parameter, beispielsweise der Verlust an Biomasse, wurde in 30 Humankrebszelllinien bestimmt ([Fig. 8e](#)) und zwölf Beispiele von Dosisreaktionskurven sind dargestellt; beispielsweise BR-549 Brustkrebszellen (1), Östrogen-abhängige ZR-75 Brustkrebszellen (2), DMS-114 kleinzellige Lungenkrebszellen (3), NCI-H226 nicht-kleinzellige Lungenkrebszellen (4), SK-MEL-28 Hautkrebszellen (5), OVCAR-3 Eierstockkrebszellen (6), HUP-T3 Pankreaskrebszellen (7), DU-145 Prostatakrebszellen (8), DETROIT-562 Kehlkopfkrebszellen (9), LS-174 Dickdarmkrebszellen (10), A-172 Hirnkrebszellen (11) und HL-60 Leukämiezellen (12) ([Fig. 8a](#)-[Fig. d](#)). Alle Zellen wurden hinsichtlich morphologischer Anzeichen von Zelltod und/oder Differenzierung bewertet. Alle Kulturen enthielten eine erhöhte Zahl an sterbenden Zellen bei der höchsten getesteten VPA-Konzentration und in einigen Kulturen, wie SW-1116 Dickdarmkrebszellen ([Fig. 8e](#)), waren die meisten Zellen bereits bei 1 mM VPA während des Versuchs abgestorben. PC-3- ([Fig. 8e](#)) und DU-145- ([Fig. 8c](#))-Zellen ändern ihre normale runde Morphologie zu langen Fibroblasten-ähnlicher Form. Auch U87MG- ([Fig. 8e](#)) -Zellen erhöhen sich in der Länge und entwickeln spinnenähnliche, filamentöse Verlängerungen.

**[0060]** Zellen in Tafeln 1 bis 9 ([Fig. 8a](#)-[Fig. c](#)) wurden in 96-Vertiefungs-Kulturschalen bei Dichten zwischen 3000 und 8000 pro Vertiefung beimpft. Nach Ablauf von 24 Stunden wurden Zellen für 48 Stunden in Abwesenheit oder Gegenwart der ausgewiesenen Konzentrationen an VPA gezüchtet. Kulturen wurden mit TCA durch Überschichtung von 50 µl kalter 50%iger TCA auf das Obere des Wachstumsmediums in jeder Vertiefung zur Erzeugung einer End-TCA-Konzentration von 10% fixiert. Nach 1 Stunde Inkubation bei 4°C wurden die Zellen fünfmal mit Leitungswasser gewaschen und luftgetrocknet. Fixierte Zellen wurden 30 Minuten mit 0,4% (Gewicht/Volumen) Sulforhodamin B, gelöst in 1% Essigsäure, gefärbt und viermal mit 1% Essigsäure gewaschen, um nichtgebundenen Farbstoff zu entfernen. Nach Lufttrocknen wurde gebundener Farbstoff mit 10 mM ungepufferter Tris-Base (pH 10,5) für 5 Minuten auf einem Drehschüttler solubilisiert. Optische Dichten wurden abgelesen auf einem Titertek Multiskan Plus Plattenleser bei einer einzigen Wellenlänge

von 550 nm. Sechs Testvertiefungen für jede Dosisantwort wurden parallel mit 12 Kontrollvertiefungen pro Zelllinie eingestellt. Eine Messung der Zellpopulationsdichte zum Zeitpunkt 0 ( $T_0$ ; die Zeit, bei der der Arzneistoff zugegeben wurde) wurde ebenfalls aus 12 Extra-Referenzvertiefungen von Zellen, fixiert mit TCA, unmittelbar vor der Arzneimittelzugabe zu den Testplatten gemacht. Hintergrund OD von vollständigem Medium mit 5% FBS, fixiert und gefärbt wie vorstehend beschrieben, wurde auch in 12 gesonderten Vertiefungen bestimmt.

**[0061]** Aus den nicht verarbeiteten OD-Daten wurden die Hintergrund-OD-Messungen (d.h. OD des vollständigen Mediums plus Färbung und OD von Zellen bei  $T_0$ ) subtrahiert, wodurch eine Verminderung der Gesamtzellbiomasse der Zellen erhalten wurde.

**[0062]** Zellen in Tafeln 10 bis 12 ([Fig. 8d](#)) wurden 36 bis 50 Stunden gezüchtet, wie ausgewiesen in Abwesenheit oder Gegenwart der ausgewiesenen Konzentrationen von VPA in 96-Vertiefungs-Schalen. 37 kBq von  $^3$ H-Thymidin wurden zugegeben für zusätzliche 12 Stunden der Kultur. Einbau von  $^3$ H-Thymidin in DNA wurde durch automatisches Zellernten und Flüssig-Szintillationszählen ermittelt.

**[0063]** Die Kurven in [Fig. 8a](#)-[Fig. d](#) zeigen Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung für sechsfache Bestimmungen. Zusätzlich wurden Krebszellen weiterer Organursprünge mit Valproinsäure in gleicher Weise, wie für die in [Fig. 8a](#)-[Fig. c](#) dargestellten Versuche beschrieben, behandelt. [Fig. 8e](#) fasst die Reduktion der gesamten Zellbiomasse von verschiedenen Humankrebszellen durch Behandlung mit 1 mM VPA zusammen. Diese Verminderung könnte Differenzierung, verbunden mit Zellzyklusstillstand, und/oder die Induktion von Zelltod ausweisen. Die Zellen wurden 48 Stunden VPA-behandelt. Die Inhibition wurde aus sechs Antworttests, parallel ausgeführt, berechnet, und die Verminderungen von Zellbiomasse sind in Prozent an unbehandelten Zellen mit Standardabweichungen angegeben.

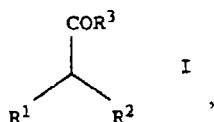
## Patentansprüche

1. Verwendung von Valproinsäure, S-4-in-Valproinsäure, 2-Ethylhexansäure oder einem pharmazeutisch verträglichen Salz davon zur Herstellung eines Arzneimittels für die Behandlung einer Krankheit, bei der die Induktion von Hyperacetylierung von Histonen einen vorteilhaften Effekt aufweist, wobei die Krankheit ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus Hautkrebs, Östrogenrezeptor-abhängigem oder -unabhängigem Brustkrebs, Eierstockkrebs, Prostatakrebs, Nierenkrebs, Colon- oder colorektalem Krebs, Pankreaskrebs, Kopf- und/oder Halskrebs, kleinzelligem und nicht kleinzelligem Lungenkrebs und Thyroidresistenzsyndrom.

2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei VPA Differenzierung von transformierten Zellen induziert.

3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, wobei VPA Apoptose von transformierten Zellen induziert.

4. Verfahren zur Identifizierung von Substanzen mit Histondesacetylase-inhibitorischer Aktivität, umfassend Bereitstellen eines VPA-Derivats der Formel I,



worin R<sup>1</sup> und R<sup>2</sup> unabhängig voneinander eine lineare oder verzweigte, gesättigte oder ungesättigte, aliphatische C<sub>2-25</sub>-Kohlenwasserstoffkette, die mit einer Hydroxyl-, Amino-, Alkoxy-, Aryl- oder heterocyclischen Gruppe substituiert sein kann, bedeuten; R<sup>3</sup> eine Hydroxyl-, Halogen-, Alkoxy- oder eine gegebenenfalls alkylierte Aminogruppe darstellt, oder eines pharmazeutisch verträglichen Salzes davon; Bestimmen der Histondesacetylase-inhibitorischen Aktivität des Derivats; Auswählen der Substanz, wenn die Substanz Histondesacetylase-inhibitorische Aktivität aufweist.

5. Verfahren nach Anspruch 4, wobei das Verfahren die Schritte umfasst von Bestimmen der sedierenden Wirkung des VPA-Derivats und Auswählen der Substanz, wenn die Substanz Histondesacetylase-inhibitorische Aktivität und eine geringere sedierende Wirkung als Valproinsäure aufweist.

6. Verfahren nach Anspruch 4 oder 5, wobei die Histondesacetylase-inhibitorische Aktivität ermittelt wird durch ein Transkriptionsrepressionsassay, ein Western-Blot zum Nachweis von Acetylierung von Histon H3 oder Histon H4, oder durch ein enzymatisches Desacetylaseassay.

7. Verfahren zur Erstellung eines Profils der HDAC-Isoenzym-Spezifität einer Verbindung, wie in Anspruch 4 definiert, wobei die Bindung der Verbindung an HDAC und/oder die Konkurrenz für die Bindung aus HDAC gemessen wird.

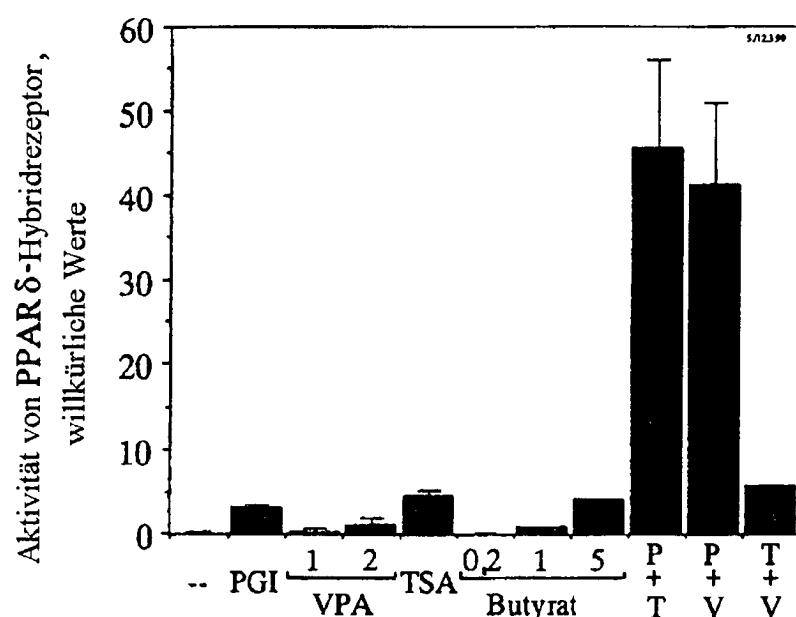
8. Verfahren nach Anspruch 7 zur Auswahl von Verbindungen, die nur einen Subset von HDAC spezifisch inhibieren.

9. Verwendung von Valproinsäure, S-4-in-Valproinsäure und/oder 2-Ethylhexansäure als einen Histondesacetylaseinhibitor in vitro.

Es folgen 14 Blatt Zeichnungen

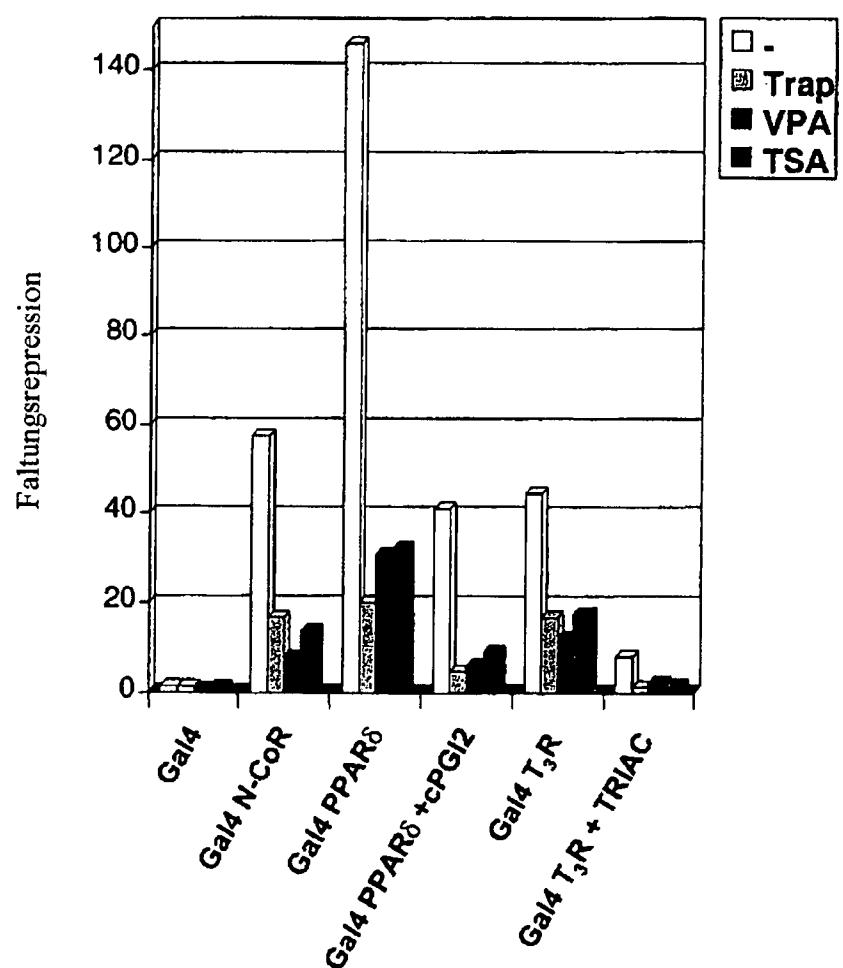
Anhängende Zeichnungen

Figur 1

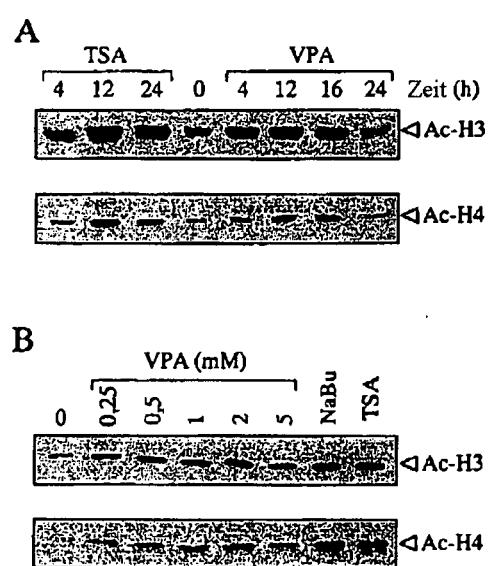


Figur 2

Repressionsrückgang  
durch HDAC-Inhibitoren



Figur 3



Figur 4

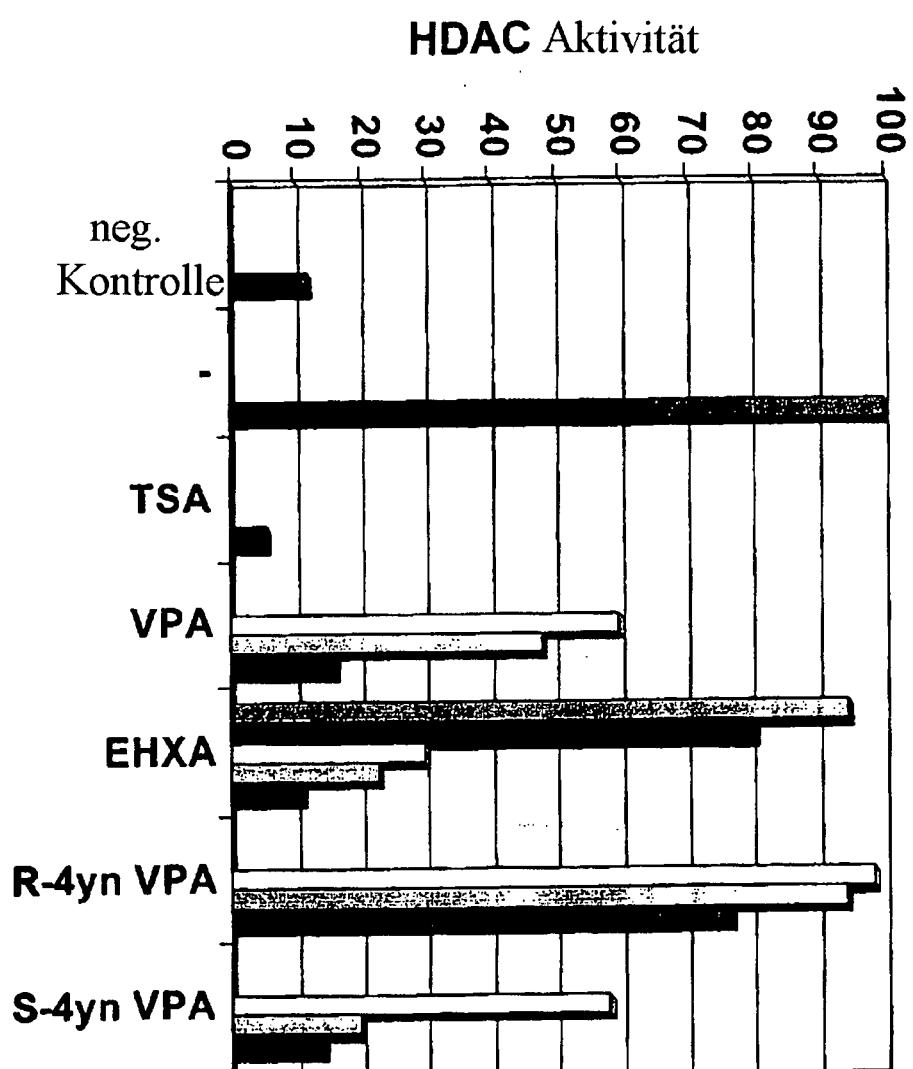
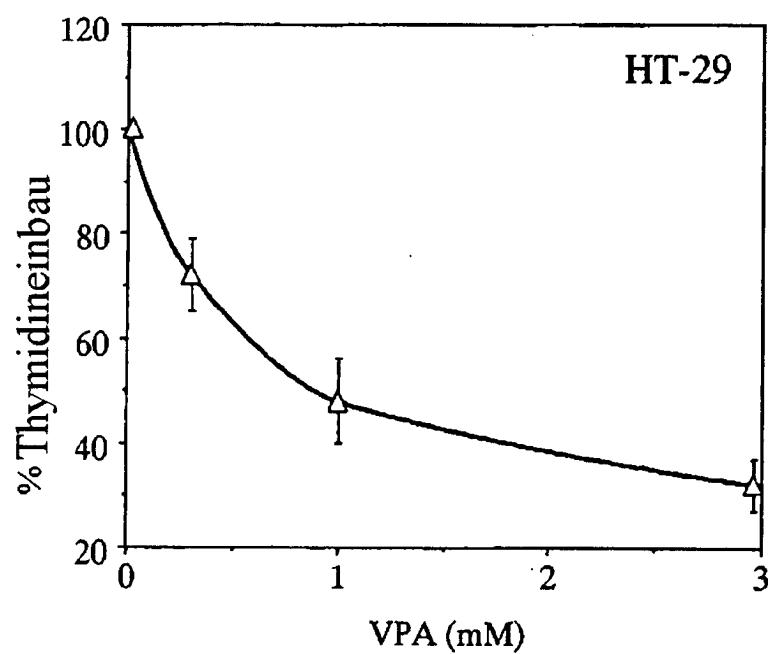
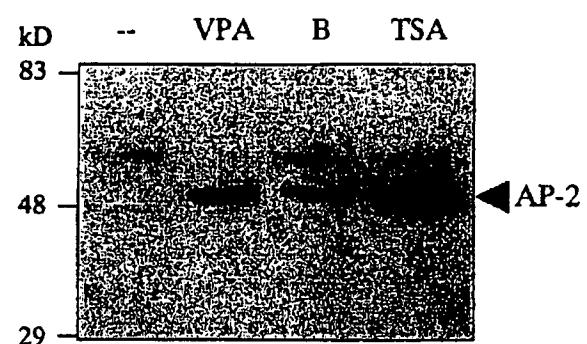


Figure 5A



Figur 5B



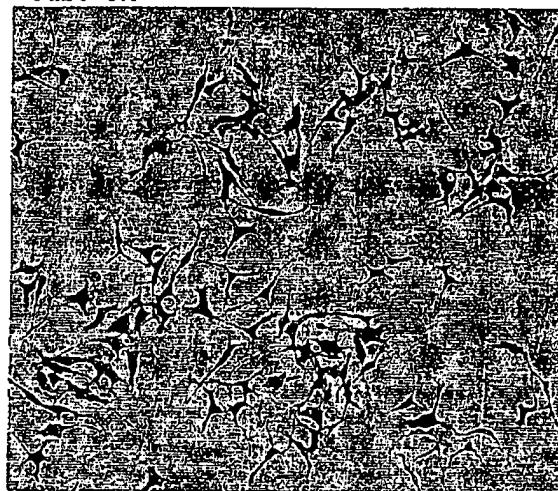
**Figur 5c**

Induktion von Differentiation in RenCa-LacZ-Zellen durch VPA

**Kontrolle**



**1 mM VPA**



Figur 6

Induktion von Apoptose in MT450 Brustkrebszellen

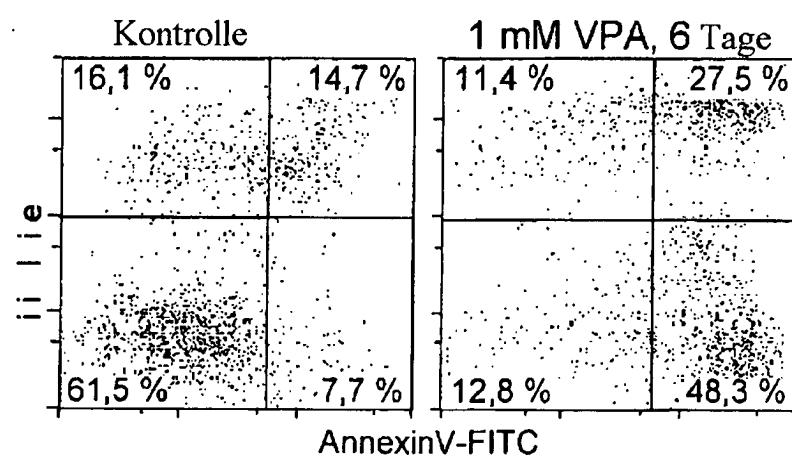
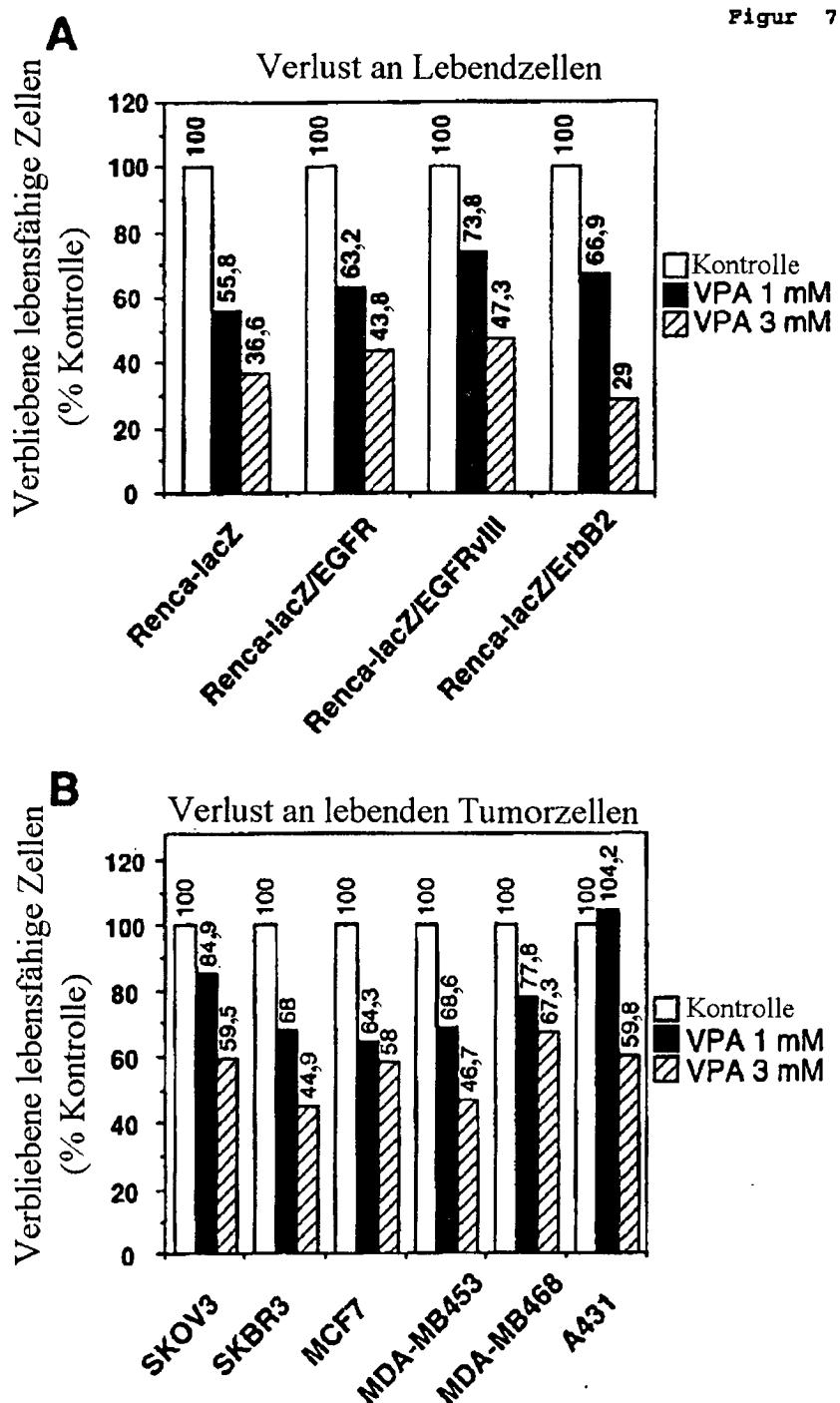
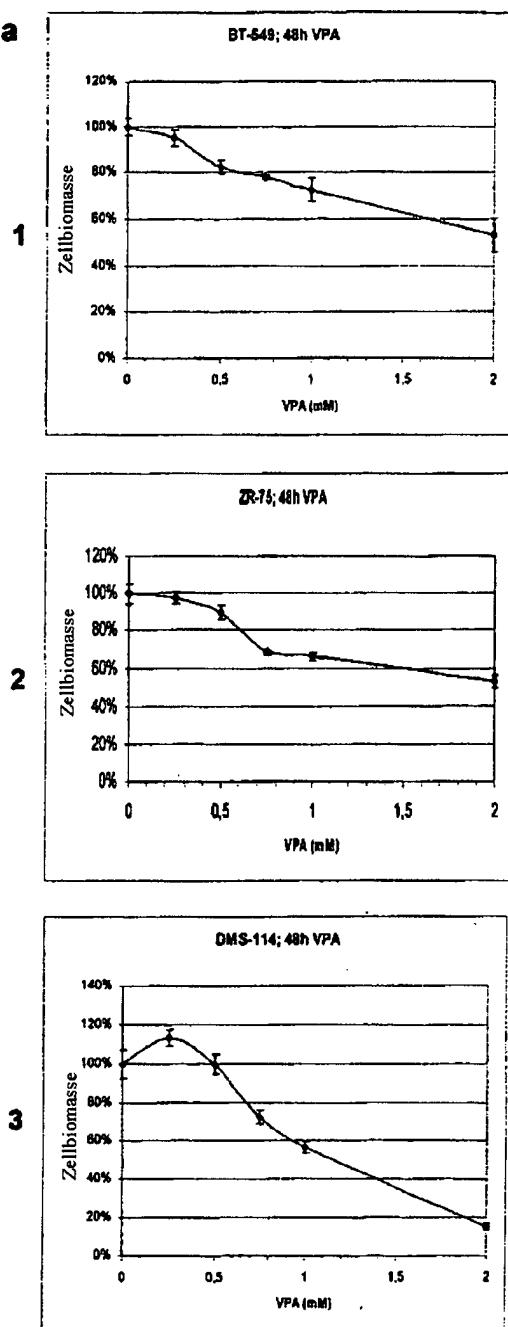


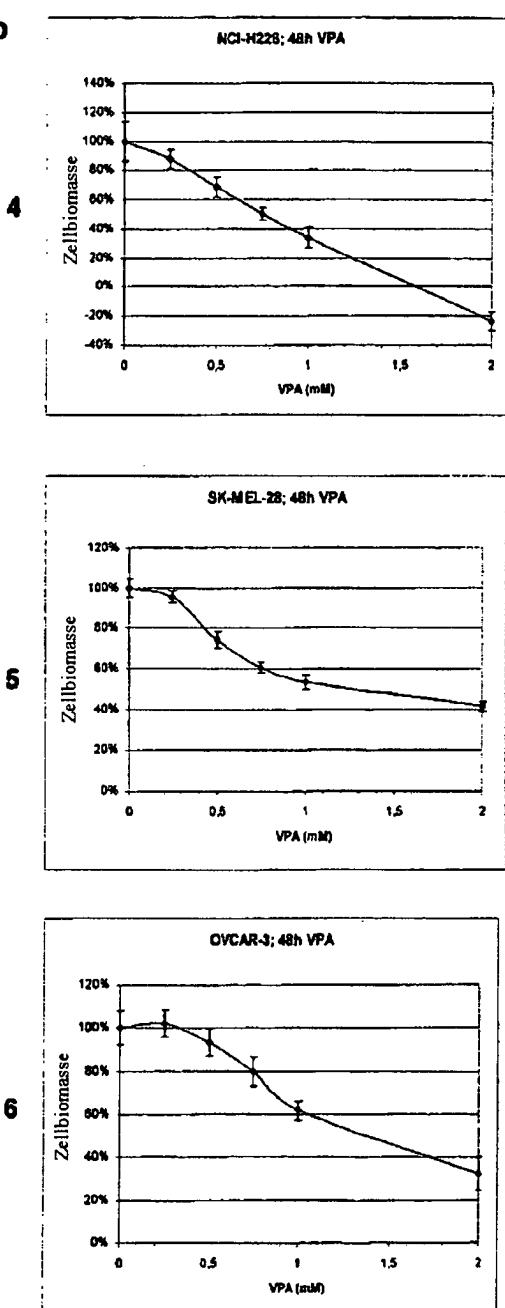
Figure 7



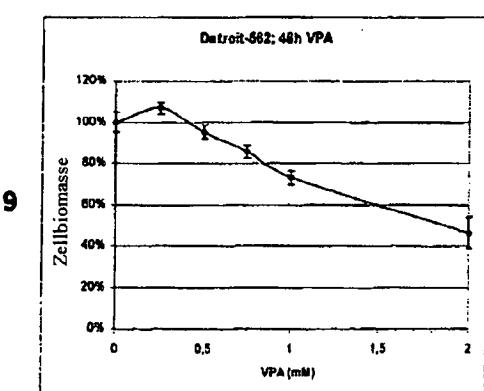
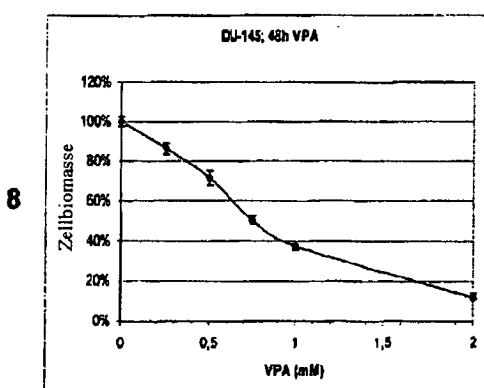
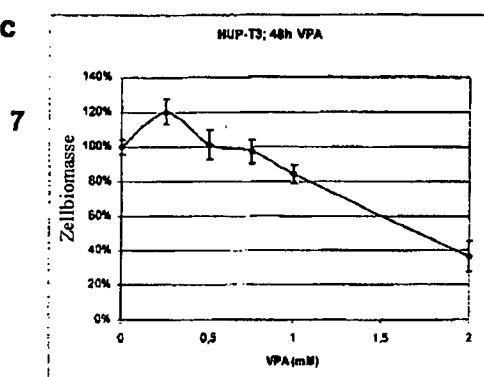
**Figur 8 a**



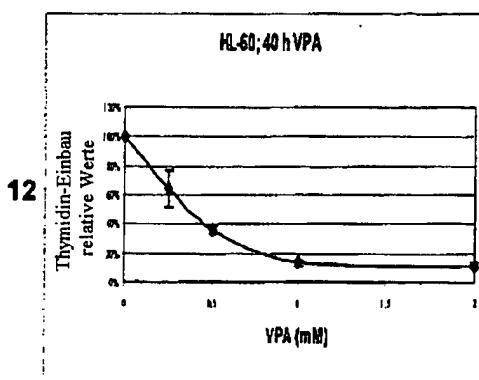
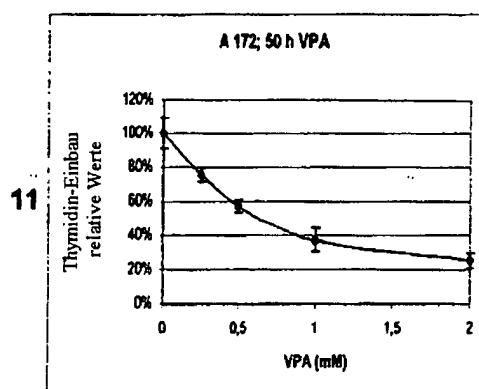
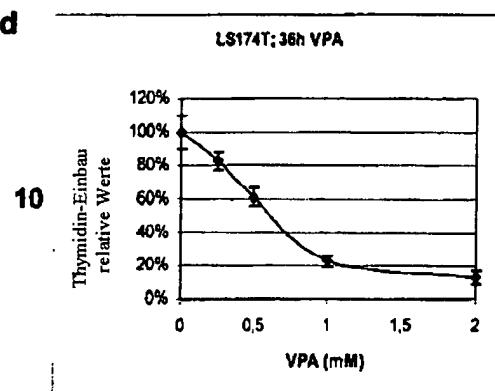
Figur 8 b



**Figur 8 c**



Figur 8 d



**Figur 8 e**

Zelllinie	Organherkunft	Verminderung an Zellbiomasse bei 1mM VPA
PC-3	Prostata	51 % ± 3 %
DU-145	Prostata	67 % ± 2 %
T47-D	Brust, duktal	70 % ± 2 %
ZR-75	Brust, duktal	38 % ± 9 %
ZR-75-30	Brust, duktal	20 % ± 2 %
MCF-7	Brust	13 % ± 4 %
BT-549	Brust	27 % ± 5 %
HT-29	Kolon	43 % ± 2 %
LS174T	Kolon	77 % ± 4 %
SW-1116	Kolon	84 % ± 1 %
HCT-15	Kolon	26 % ± 2 %
COLO320DM	Kolon	62 % ± 11 %
NCI-H23	nichtkleinzellige Lunge	38 % ± 3 %
NCI-H226	nichtkleinzellige Lunge	66 % ± 6 %
A-549	nichtkleinzellige Lunge	12 % ± 5 %
DMS-114	kleinzellige Lunge	43 % ± 3 %
SHP-77	kleinzellige Lunge	36 % ± 5 %
SK-MEL-28	Melanom	47 % ± 2 %
MALME-3M	Melanom	105 % ± 5 %
OVCAR-3	Ovarium	38 % ± 4 %
SK-OV-3	Ovarium	17 % ± 7 %
CAPAN-1	Pankreas	27 % ± 7 %
HUP-T3	Pankreas	16 % ± 6 %
DETROIT-562	Kopf und Hals	27 % ± 3 %
FADU	Kopf und Hals	29 % ± 2 %
A-172	Glioblastom	62 % ± 7 %
U87MG	Glioblastom	27 % ± 9 %
HL-60	Leukämie	87 % ± 2 %
NB-4	Leukämie	100 % ± 1 %
NB-4R	Leukämie	87 % ± 1 %