



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 341 857**

51 Int. Cl.:
C07D 401/04 (2006.01)
A61K 31/506 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04707852 .2**
96 Fecha de presentación : **04.02.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1590340**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.11.2005**

54 Título: **Inhibidores de histona desacetilasa.**

30 Prioridad: **04.02.2003 US 358556**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
29.06.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
29.06.2010

73 Titular/es: **Methylgene, Inc.**
7220 Frederick Banting
Saint-Laurent, Quebec H4S 2A1, CA

72 Inventor/es: **Delorme, Daniel y**
Zhou, Zhihong

74 Agente: **Zuazo Araluze, Alexander**

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

DESCRIPCIÓN

Inhibidores de histona desacetilasa.

- 5 Esta invención se refiere a la inhibición de la histona desacetilasa. Más particularmente, la invención se refiere a compuestos útiles para inhibir la actividad enzimática de la histona desacetilasa.

Sumario de la técnica relacionada

- 10 En células eucariotas, el ADN nuclear se asocia con histonas para formar un complejo compacto denominado cromatina. Las histonas constituyen una familia de proteínas básicas que generalmente están sumamente conservadas en todas las especies eucariotas. Las histonas centrales, denominadas H2A, H2B, H3 y H4, se asocian para formar un núcleo de proteína. El ADN se enrolla alrededor de este núcleo de proteína, interaccionando los aminoácidos básicos
15 de las histonas con los grupos fosfato cargados negativamente del ADN. Aproximadamente 146 pares de bases de ADN envuelven una histona central constituyendo una partícula de nucleosoma, el motivo estructural de repetición de la cromatina.

- 20 Csordas, *Biochem. J.*, 286: 23-38 (1990) enseña que las histonas se someten a acetilación postraduccional de los grupos α -amino de los residuos de lisina N-terminales, una reacción que está catalizada por la histona acetil transferasa (HAT1). La acetilación neutraliza la carga positiva de la cadena lateral de la lisina, y se piensa que tiene un impacto sobre la estructura de la cromatina. De hecho, Taunton *et al.*, *Science*, 272: 408-411 (1996), enseñan que el acceso de factores de transcripción a moldes de cromatina se potencia mediante la hiperacetilación de histonas. Taunton *et al.* enseñan además que se ha encontrado un enriquecimiento en histona H4 infraacetilada en regiones
25 transcripcionalmente silenciosas del genoma.

- La acetilación de histonas es una modificación reversible, estando catalizada la desacetilación por una familia de enzimas denominada histona desacetilasas (HDAC). Grozinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 4868-4873 (1999), enseñan que las HDAC se dividen en dos clases, la primera representada por proteínas de tipo Rpd3 de levaduras, y la segunda representada por proteínas de tipo Hdal de levaduras. Grozinger *et al.* también enseñan que
30 las proteínas HDAC1, HDAC2 y HDAC3 humanas son miembros de la primera clase de HDAC, y dan a conocer nuevas proteínas, denominadas HDAC4, HDAC5 y HDAC6, que son miembros de la segunda clase de HDAC. Kao *et al.*, *Genes & Dev.*, 14: 55-66 (2000), dan a conocer HDAC7, un nuevo miembro de la segunda clase de HDAC. Van den Wyngaert, *FEBS*, 478: 77-83 (2000) da a conocer HDAC8, un nuevo miembro de la primera clase de HDAC.
35

- Richon *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 3003-3007 (1998), dan a conocer que la actividad HDAC se inhibe por tricostatina A (TSA), un producto natural aislado de *Streptomyces hygroscopicus*, y por un compuesto sintético, ácido hidroxámico suberoilánilida (SAHA).
40

- Yoshida y Beppu, *Exper. Cell Res.*, 177: 122-131 (1988), enseñan que TSA provoca la detención de los fibroblastos de rata en las fases G₁ y G₂ del ciclo celular, lo que implica a HDAC en la regulación del ciclo celular. De hecho, Finnin *et al.*, *Nature*, 401: 188-193 (1999), enseñan que TSA y SAHA inhiben el crecimiento celular, inducen la diferenciación terminal y previenen la formación de tumores en ratones. Suzuki *et al.*, patente estadounidense número 6.174.905, documento EP 0847992, documento JP 258863/96 y solicitud japonesa número 10138957, dan a conocer
45 derivados de benzamida que inducen la diferenciación celular e inhiben HDAC. Delorme *et al.*, documentos WO 01/38322 y PCT IB01/00683, dan a conocer compuestos adicionales que sirven como inhibidores de HDAC.

- La clonación molecular de secuencias génicas que codifican para proteínas con actividad HDAC ha establecido
50 la existencia de un conjunto de isoformas de enzimas HDAC diferenciadas. Grozinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 4868-4873 (1999), enseñan que las HDAC pueden dividirse en dos clases, la primera representada por proteínas de tipo Rpd3 de levaduras, y la segunda representada por proteínas de tipo Hdal de levaduras. Grozinger *et al.* también enseñan que las proteínas HDAC-1, HDAC-2 y HDAC-3 humanas son miembros de la primera clase de HDAC, y dan a conocer nuevas proteínas, denominadas HDAC-4, HDAC-5 y HDAC-6, que son miembros de la
55 segunda clase de HDAC. Kao *et al.*, *Gene & Development* 14: 55-66 (2000), dan a conocer un miembro adicional de esta segunda clase, denominado HDAC-7. Más recientemente, Hu, E. *et al. J. Bio. Chem.* 275: 15254-13264 (2000) dan a conocer el miembro más nuevo de la primera clase de histona desacetilasas, HDAC-8. No ha quedado claro qué papeles desempeñan estas enzimas HDAC individuales.

- 60 Estos hallazgos sugieren que la inhibición de la actividad HDAC representa un enfoque novedoso para intervenir en la regulación del ciclo celular y que los inhibidores de HDAC tienen un gran potencial terapéutico en el tratamiento de estados o enfermedades proliferativas celulares. Hasta la fecha, se conocen en la técnica unos pocos inhibidores de histona desacetilasa. Por tanto, hay una necesidad de identificar inhibidores de HDAC adicionales y de identificar las características estructurales requeridas para lograr una potente actividad inhibidora de HDAC.
65

Breve resumen de la invención

La invención proporciona compuestos útiles para tratar enfermedades proliferativas celulares. La invención proporciona nuevos inhibidores de la actividad enzimática de la histona desacetilasa.

En un primer aspecto, la invención proporciona compuestos que son útiles como inhibidores de histona desacetilasa.

En un segundo aspecto, la invención proporciona una composición que comprende un inhibidor de histona desacetilasa según la invención y un vehículo, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.

En un tercer aspecto, la invención proporciona un uso de tal compuesto para preparar un medicamento para inhibir la histona desacetilasa en una célula.

Lo anterior simplemente resume ciertos aspectos de la invención y no debe interpretarse que es de naturaleza limitativa. Estos aspectos y otros aspectos y realizaciones se describen de manera más completa a continuación.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es una gráfica que muestra la actividad antitumoral del compuesto 106 en un modelo de tumor colorrectal humano HCT 116.

Las figuras 2-11 muestran datos adicionales para otros compuestos usados en el experimento *in vivo* descrito en el ejemplo de ensayo 2.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

La invención proporciona compuestos y métodos para inhibir la actividad enzimática de la histona desacetilasa. La invención también proporciona composiciones y medicamentos para tratar estados y enfermedades proliferativas celulares. La bibliografía científica y de patentes a la que se hace referencia en el presente documento establece el conocimiento que está disponible para los expertos en la técnica.

Para los fines de la presente invención, se usaran las siguientes definiciones (a menos que se establezca expresamente otra cosa):

Tal como se usa en el presente documento, las expresiones “histona desacetilasa” y “HDAC” pretenden referirse a una cualquiera de una familia de enzimas que eliminan grupos acetilo de los grupos α -amino de residuos de Usina en el extremo N-terminal de una histona. A menos que se indique otra cosa por el contexto, el término “histona” pretende referirse a cualquier proteína histona, incluyendo H1, H2A, H2B, H3, H4 y H5, de cualquier especie. Las histona desacetilasas preferidas incluyen enzimas de clase I y clase II. Preferiblemente, la histona desacetilasa es una HDAC humana, incluyendo, pero sin limitarse a, HDAC-1, HDAC-2, HDAC-3, HDAC-4, HDAC-5, HDAC-6, HDAC-7 y HDAC-8. En algunas otras realizaciones preferidas, la histona desacetilasa se deriva de una fuente fúngica o protozoaria.

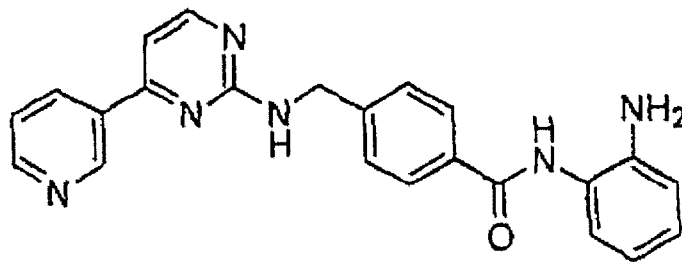
Las expresiones “inhibidor de histona desacetilasas” e “inhibidor de histona desacetilasa” se usan para identificar un compuesto que tiene una estructura tal como se define en el presente documento, que puede interactuar con una histona desacetilasa e inhibir su actividad enzimática. “Inhibir la actividad enzimática de la histona desacetilasa” significa reducir la capacidad de una histona desacetilasa para eliminar un grupo acetilo de una histona. En algunas realizaciones preferidas, tal reducción de la actividad histona desacetilasa es de al menos aproximadamente el 50%, más preferiblemente al menos aproximadamente el 75% y todavía más preferiblemente al menos aproximadamente el 90%. En otras realizaciones preferidas, la actividad histona desacetilasa se reduce en al menos el 95% y más preferiblemente en al menos el 99%.

Preferiblemente, tal inhibición es específica, es decir, el inhibidor de histona desacetilasas reduce la capacidad de una histona desacetilasa para eliminar un grupo acetilo de una histona a una concentración que es inferior a la concentración del inhibidor que se requiere para producir otro efecto biológico no relacionado. Preferiblemente, la concentración del inhibidor requerida para la actividad inhibidora de la histona desacetilasa es al menos 2 veces inferior, más preferiblemente al menos 5 veces inferior, incluso más preferiblemente al menos 10 veces inferior y lo más preferiblemente al menos 20 veces inferior que la concentración requerida para producir un efecto biológico no relacionado.

Compuestos

En un primer aspecto, la invención proporciona inhibidores novedosos de la histona desacetilasa.

En particular, la invención se refiere a un inhibidor de histona desacetilasa de fórmula (1):



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Composiciones farmacéuticas

En un segundo aspecto, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un inhibidor de histona desacetilasa según la invención y un vehículo, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable. Pueden formularse compuestos de la invención mediante cualquier método bien conocido en la técnica y pueden prepararse para su administración mediante cualquier vía, incluyendo, sin limitación, parenteral, oral, sublingual, transdérmica, tópica, intranasal, intratecal o intrarrectal. En ciertas realizaciones preferidas, los compuestos de la invención se administran por vía intravenosa en un entorno hospitalario. En ciertas otras realizaciones preferidas, la administración puede ser preferiblemente por vía oral.

Las características del vehículo dependerán de la vía de administración. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "farmacéuticamente aceptable" significa un material no tóxico que es compatible con un sistema biológico tal como una célula, un cultivo celular, un tejido o un organismo, y que no interfiere con la eficacia de la actividad biológica del/de los principio(s) activo(s). Por tanto, las composiciones según la invención pueden contener, además del inhibidor, diluyentes, cargas, sales, tampones, estabilizadores, solubilizantes y otros materiales bien conocidos en la técnica. La preparación de formulaciones farmacéuticamente aceptables se describe en, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Edición, ed. A. Gennaro, Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión sales farmacéuticamente aceptables se refiere a sales que conservan la actividad biológica deseada de los compuestos identificados anteriormente y que no presentan efectos toxicológicos indeseados o estos son mínimos. Los ejemplos de tales sales incluyen, pero no se limitan a sales de adición de ácido formadas con ácidos inorgánicos (por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido nítrico y similares) y sales formadas con ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido málico, ácido ascórbico, ácido benzoico, ácido tánico, ácido pamoico, ácido alginico, ácido poliglutámico, ácido naftalenosulfónico, ácido naftalenodisulfónico y ácido poligalacturónico. Los compuestos también pueden administrarse como sales cuaternarias farmacéuticamente aceptables conocidas por los expertos en la técnica, que incluyen específicamente la sal de amonio cuaternario de fórmula $-NR^+ + Z^-$, en la que R es hidrógeno, alquilo o bencilo, y Z es un contraión, incluyendo cloruro, bromuro, yoduro, -O-alquilo, toluenosulfonato, metilsulfonato, sulfonato, fosfato o carboxilato (tal como benzoato, succinato, acetato, glicolato, maleato, malato, citrato, tartrato, ascorbato, benzoato, cinamato, mandelato, bencilato y difenilacetato).

El compuesto activo se incluye en el vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable en una cantidad suficiente para administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente eficaz sin provocar efectos tóxicos graves en el paciente tratado. Una dosis preferida del compuesto activo para todos los estados mencionados anteriormente está en el intervalo de desde aproximadamente 0,01 hasta 300 mg/kg, preferiblemente de 0,1 a 100 mg/kg al día, más generalmente de 0,5 a aproximadamente 25 mg por kilogramo de peso corporal del receptor al día. Una dosificación tópica típica oscilará desde 0,01-3% p/p en un vehículo adecuado. El intervalo de dosificación eficaz de los derivados farmacéuticamente aceptables puede calcularse basándose en el peso del compuesto original que a administrarse. Si el derivado presenta actividad en sí mismo, puede estimarse la dosificación eficaz como anteriormente usando el peso del derivado, o por otros medios conocidos por los expertos en la técnica.

Inhibición de la histona desacetilasa

En un tercer aspecto, la invención proporciona un medicamento para inhibir la histona desacetilasa en una célula, que comprende un inhibidor de histona desacetilasa según la invención. Debido a que los compuestos de la invención inhiben la histona desacetilasa, son herramientas de investigación útiles para el estudio *in vitro* del papel de la histona desacetilasa en procesos biológicos. Además, los compuestos de la invención inhiben selectivamente ciertas isoformas de HDAC.

La medición de la actividad enzimática de una histona desacetilasa puede lograrse usando metodologías conocidas. Por ejemplo, Yoshida *et al.*, J. Biol. Chem., 265: 17174-17179 (1990), describen la evaluación de la actividad enzimática de la histona desacetilasa mediante la detección de histonas acetiladas en células tratadas con tricostatina A. Taunton *et al.*, Science, 272: 408-411 (1996), describen de manera similar métodos para medir la actividad enzimática de la histona desacetilasa usando HDAC-1 endógena y recombinante.

En algunas realizaciones preferidas, el inhibidor de histona desacetilasas interacciona con y reduce la actividad de todas las histona desacetilasas en la célula. En algunas otras realizaciones preferidas según este aspecto de la invención, el inhibidor de histona desacetilasas interacciona con y reduce la actividad de menos de todas las histona desacetilasas en la célula. En ciertas realizaciones preferidas, el inhibidor interacciona con y reduce la actividad de una histona desacetilasa (por ejemplo, HDAC-1), pero no interacciona con ni reduce las actividades de otras histona desacetilasas (por ejemplo, HDAC-2, HDAC-3, HDAC-4, HDAC-5, HDAC-6, HDAC-7 y HDAC-8). Tal como se trata a continuación, ciertos inhibidores de histona desacetilasas particularmente preferidos son aquellos que interaccionan con y reducen la actividad enzimática de una histona desacetilasa que está implicada en la tumorigénesis. Ciertos otros inhibidores de histona desacetilasas preferidos interaccionan con y reducen la actividad enzimática de una histona desacetilasa fúngica.

Preferiblemente, el medicamento según el tercer aspecto de la invención provoca una inhibición de la proliferación celular de las células que se han puesto en contacto. La frase “inhibir la proliferación celular” se usa para indicar la capacidad de un inhibidor de histona desacetilasa para retrasar el crecimiento de células que se han puesto en contacto con el inhibidor en comparación con las células que no se han puesto en contacto. Puede realizarse una evaluación de la proliferación celular contando las células que se han puesto en contacto y las que no se han puesto en contacto usando un contador de células Coulter (Coulter, Miami, FL) o un hemacitómetro. Cuando las células están en un crecimiento sólido (por ejemplo, un órgano o tumor sólido), puede realizarse una evaluación de la proliferación celular de este tipo midiendo el crecimiento con calibres y comparando el tamaño del crecimiento de células que se han puesto en contacto con células que no se han puesto en contacto.

Preferiblemente, el crecimiento de las células puestas en contacto con el inhibidor está retrasado en al un 50% en comparación con el crecimiento de las células que no se han puesto en contacto. Más preferiblemente, la proliferación celular se inhibe en un 100% (es decir, las células que se han puesto en contacto no aumentan en número). Lo más preferiblemente, la frase “inhibir la proliferación celular” incluye una reducción en el número o tamaño de las células que se han puesto en contacto, en comparación con las células que no se han puesto en contacto. Por tanto, un inhibidor de histona desacetilasa según la invención que inhibe la proliferación celular en una células que se ha puesto en contacto puede inducir que la célula que se ha puesto en contacto experimente retraso del crecimiento, que experimente detención del crecimiento, que experimente muerte celular programada (es decir, que sufra apoptosis), o que experimente muerte celular necrótica.

La capacidad de inhibición de la proliferación celular de los inhibidores de histona desacetilasas según la invención permite la sincronización de una población de células que crecen de manera asíncrona. Por ejemplo, los inhibidores de histona desacetilasa de la invención pueden usarse para detener una población de células no neoplásicas hechas crecer *in vitro* en la fase G1 o G2 del ciclo celular. Tal sincronización permite, por ejemplo, la identificación de un gen y/o productos génicos expresados durante la fase G1 o G2 del ciclo celular. Tal sincronización de células en cultivo también puede ser útil para someter a prueba la eficacia de un nuevo protocolo de transfección, en el que la eficacia de transfección varía y depende de la fase del ciclo celular particular de la célula que va a transfectarse. El uso de los inhibidores de histona desacetilasas de la invención permite la sincronización de una población de células, ayudando de ese modo a la detección de una eficacia de transfección potenciada.

En algunas realizaciones preferidas, la célula que se ha puesto en contacto es una célula neoplásica. La expresión “célula neoplásica” se usa para indicar una célula que muestra un crecimiento celular aberrante. Preferiblemente, el crecimiento celular aberrante de una célula neoplásica es un aumento del crecimiento celular. Una célula neoplásica puede ser una célula hiperplásica, una célula que muestra una falta de inhibición por contacto del crecimiento *in vitro*, una célula tumoral benigna que no puede experimentar metástasis *in vivo*, o una célula cancerosa que puede experimentar metástasis *in vivo* y que puede experimentar recidiva tras intentarse su eliminación. El término “tumorigénesis” se usa para indicar la inducción de la proliferación celular que conduce al desarrollo de un crecimiento neoplásico. En algunas realizaciones, el inhibidor de histona desacetilasas induce la diferenciación celular en la célula que se ha puesto en contacto. Por tanto, puede inducirse que una célula neoplásica, cuando se pone en contacto con un inhibidor de histona desacetilasa, se diferencie, dando como resultado la producción de una célula hija no neoplásica que es filogenéticamente más avanzada que la célula que se ha puesto en contacto.

En algunas realizaciones preferidas, la célula que se ha puesto en contacto está en un animal. Por tanto, la invención proporciona un medicamento para tratar un estado o una enfermedad proliferativa celular en un animal, que comprende administrar a un animal que necesita tal tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de histona desacetilasas de la invención. Preferiblemente, el animal es un mamífero, más preferiblemente un mamífero domesticado. Lo más preferiblemente, el animal es un ser humano.

La expresión “estado o enfermedad proliferativa celular” pretende referirse a cualquier estado caracterizado por un crecimiento celular aberrante, preferiblemente aumento de la proliferación celular de manera anómala. Los ejemplos de tales estados o enfermedades proliferativas celulares incluyen, pero no se limitan a, cáncer, reestenosis y

psoriasis. En realizaciones particularmente preferidas, la invención proporciona un método para inhibir la proliferación de células neoplásicas en un animal que comprende administrar a un animal que tiene al menos una célula neoplásica presente en su cuerpo una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de histona desacetilasas de la invención.

Se contempla que algunos compuestos de la invención tengan actividad inhibidora contra una histona desacetilasa de una fuente protozoaria. Por tanto, la invención también proporciona un método para tratar o prevenir una infección o enfermedad protozoaria, que comprende administrar a un animal que necesita tal tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de histona desacetilasas de la invención. Preferiblemente, el animal es un mamífero, más preferiblemente un ser humano. Preferiblemente, el inhibidor de histona desacetilasas usado según esta realización de la invención inhibe una histona desacetilasa protozoaria en un grado mayor del que inhibe histona desacetilasas de mamífero, particularmente histona desacetilasas humanas.

La presente invención proporciona además un medicamento para tratar una infección o enfermedad fúngica que comprende administrar a un animal que necesita tal tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de histona desacetilasas de la invención. Preferiblemente, el animal es un mamífero, más preferiblemente un ser humano. Preferiblemente, el inhibidor de histona desacetilasas usado según esta realización de la invención inhibe una histona desacetilasa fúngica en un grado mayor del que inhibe histona desacetilasas de mamífero, particularmente histona desacetilasas humanas.

La expresión “cantidad terapéuticamente eficaz” pretende indicar una dosificación suficiente para provocar la inhibición de la actividad histona desacetilasa en las células del sujeto, o una dosificación suficiente para inhibir la proliferación celular o para inducir la diferenciación celular en el sujeto. La administración puede ser mediante cualquier vía, incluyendo, sin limitación, parenteral, oral, sublingual, transdérmica, tópica, intranasal, intratecal o intrarrectal. En ciertas realizaciones particularmente preferidas, los compuestos de la invención se administran por vía intravenosa en un entorno hospitalario. En ciertas otras realizaciones preferidas, la administración puede ser preferiblemente por vía oral.

Cuando se administran de manera sistémica, el inhibidor de histona desacetilasas se administra preferiblemente a una dosificación suficiente para lograr un nivel sanguíneo del inhibidor de desde aproximadamente 0,01 μM hasta aproximadamente 100 μM , más preferiblemente desde aproximadamente 0,05 μM hasta aproximadamente 50 μM , todavía más preferiblemente desde aproximadamente 0,1 μM hasta aproximadamente 25 μM , y aún todavía más preferiblemente desde aproximadamente 0,5 μM hasta aproximadamente 25 μM . Para administración localizada, pueden ser eficaces concentraciones mucho más bajas que esta, y pueden tolerarse concentraciones mucho más altas. Un experto en la técnica apreciará que la dosificación de inhibidor de histona desacetilasas necesario para producir un efecto terapéutico variará considerablemente dependiendo del tejido, órgano o paciente o animal particular que va a tratarse.

En ciertas realizaciones preferidas del tercer aspecto de la invención, el tratamiento comprende además poner en contacto la célula con un oligonucleótido antisentido que inhibe la expresión de una histona desacetilasa. El uso combinado de un inhibidor al nivel del ácido nucleico (por ejemplo, un oligonucleótido antisentido) y un inhibidor a nivel de la proteína (es decir, un inhibidor de la actividad enzimática de la histona desacetilasa) da como resultado un efecto inhibidor mejorado, reduciendo de ese modo las cantidades de inhibidores requeridas para obtener un efecto inhibidor dado en comparación con las cantidades necesarias cuando se usa cualquiera individualmente. Los oligonucleótidos antisentido según este aspecto de la invención son complementarios a regiones de ARN o ADN bicatenario que codifica para HDAC-1, HDAC-2, HDAC-3, HDAC-4, HDAC-5, HDAC-6, HDAC7 y/o HDAC-8 (véase, por ejemplo, el número de registro de GenBank U50079 para HDAC-1, el número de registro de GenBank U31814 para HDAC-2 y el número de registro de GenBank U75697 para HDAC-3).

Para los fines de la invención, el término “oligonucleótido” incluye polímeros de dos o más desoxirribonucleósidos, ribonucleósidos o residuos de ribonucleósido 2'-sustituídos, o cualquier combinación de los mismos. Preferiblemente, tales oligonucleótidos tienen de desde aproximadamente 6 hasta aproximadamente 100 residuos de nucleósido, más preferiblemente desde aproximadamente 8 hasta aproximadamente 50 residuos de nucleósido y lo más preferiblemente desde aproximadamente 12 hasta aproximadamente 30 residuos de nucleósido. Los residuos de nucleósido pueden acoplarse entre sí mediante cualquiera de los numerosos enlaces internucleosídicos conocidos. Tales enlaces internucleosídicos incluyen sin limitación enlaces internucleosídicos de fosforotioato, fosforoditioato, alquilfosfonato, alquilfosfonotioato, fosfotriéster, fosforamidato, siloxano, carbonato, éster carboximetílico, acetamidato, carbamato, tioéter, fosforamidato puente, metilfosfonato puente, fosforotioato puente y sulfona. En ciertas realizaciones preferidas, estos enlaces internucleosídicos pueden ser enlaces fosfodiéster, fosfotriéster, fosforotioato o fosforamidato, o combinaciones de los mismos. El término oligonucleótido también abarca tales polímeros que tienen azúcares o bases modificadas químicamente y/o que tienen sustituyentes adicionales, incluyendo sin limitación grupos lipófilos, agentes intercalantes, diaminas y adamantano.

Para los fines de la invención, la expresión “ribonucleósido 2'-sustituído” incluye ribonucleósidos en los que el grupo hidroxilo en la posición 2' del resto pentosa está sustituido para producir un ribonucleósido 2'-O-sustituído. Preferiblemente, tal sustitución es con un grupo alquilo inferior que contiene 1-6 átomos de carbono saturados o insaturados o con un grupo arilo o alilo que tiene 2-6 átomos de carbono, en el que tal grupo alquilo, arilo o alilo puede estar no sustituido o puede estar sustituido, por ejemplo, con grupos halo, hidroxilo, trifluorometilo, ciano,

nitro, acilo, aciloxilo, alcoxilo, carboxilo, carbalcoxilo o amino. La expresión “ribonucleósido 2'-sustituido” también incluye ribonucleósidos en los que el grupo 2'-hidroxilo está reemplazado por un grupo amino o por un grupo halo, preferiblemente flúor.

- 5 Los oligonucleótidos antisentido particularmente preferidos utilizados en este aspecto de la invención incluyen oligonucleótidos quiméricos y oligonucleótidos híbridos.

Para los fines de la invención, un “oligonucleótido quimérico” se refiere a un oligonucleótido que tiene más de un tipo de enlace internucleosídico. Un ejemplo preferido de un oligonucleótido quimérico de este tipo es un oligonucleótido quimérico que comprende una región de fosforotioato, fosfodiéster o fosforoditioato, que comprende preferiblemente desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 12 nucleótidos, y una región de alquifosfonato o alquifosfonotioato (véase por ejemplo, Pederson *et al.* patentes estadounidenses números 5.635.377 y 5.366.878). Preferiblemente, tales oligonucleótidos quiméricos contienen al menos tres enlaces internucleosídicos consecutivos seleccionados de enlaces fosfodiéster y fosforotioato, o combinaciones de los mismos.

15 Para los fines de la invención, un “oligonucleótido híbrido” se refiere a un oligonucleótido que tiene más de un tipo de nucleósido. Un ejemplo preferido de un oligonucleótido híbrido de este tipo comprende un ribonucleótido o región de ribonucleótidos 2'-sustituidos, que comprende preferiblemente desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 12 nucleótidos 2'-sustituidos, y una región de desoxirribonucleósidos. Preferiblemente, un oligonucleótido híbrido de este tipo contiene al menos tres desoxirribonucleósidos consecutivos y también contiene ribonucleósidos, ribonucleósidos 2'-sustituidos, preferiblemente ribonucleósidos 2'-O-sustituidos o combinaciones de los mismos (véase por ejemplo, Metelev y Agrawal, patente estadounidense número 5.652.355).

20 La estructura química y la secuencia de nucleótidos exacta de un oligonucleótido antisentido utilizado en la invención pueden variar, siempre que el oligonucleótido conserve su capacidad para inhibir la expresión del gen de interés. Esto se determina fácilmente sometiendo a prueba si el oligonucleótido antisentido particular es activo. Los ensayos útiles para este fin incluyen cuantificar el ARNm que codifica para un producto del gen, un ensayo de análisis de inmunotransferencia de tipo Western para el producto del gen, un ensayo de actividad para un producto génico enzimáticamente activo o un ensayo de crecimiento en agar blando, o un ensayo de constructo de gen indicador, o un ensayo de crecimiento tumoral *in vivo*, todos los cuales se describen en detalle en esta memoria descriptiva o en Ramchandani *et al.* (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 684-689.

Los oligonucleótidos antisentido utilizados en la invención pueden sintetizarse convenientemente en un soporte sólido adecuado usando enfoques químicos bien conocidos, incluyendo química de H-fosfonato, química de fosforamidita o una combinación de química de H-fosfonato y química de fosforamidita (es decir, química de H-fosfonato para algunos ciclos y química de fosforamidita para otros ciclos). Los soportes sólidos adecuados incluyen cualquiera de los soportes sólidos convencionales usados para la síntesis de oligonucleótidos en fase sólida, tal como vidrio de poro controlado (CPG) (véase, por ejemplo, Pon, R. T. (1993) Methods in Molec. Biol. 20: 465-496).

40 Oligonucleótidos particularmente preferidos tienen secuencias de nucleótidos de desde aproximadamente 13 hasta aproximadamente 35 nucleótidos que incluyen las secuencias de nucleótidos mostradas en la tabla 1. Oligonucleótidos particularmente preferidos aún adicionales tienen secuencias de nucleótidos de desde aproximadamente 15 hasta aproximadamente 26 nucleótidos de las secuencias de nucleótidos mostradas en la tabla 1.

(Tabla pasa a página siguiente)

Tabla 1

Oligo	Diana	Número de registro	Posición de nucleótidos	Secuencia	posición dentro del gen
HDAC1 AS1	HDAC1 humana	U50079	1585-1604	5'-GAAACGTGAGGACTCAGCA-3'	3'-UTR
HDAC1 AS2	HDAC1 humana	U50079	1565-1584	3-GGAAGCCAGAGCTGGAGAG-3'	3'-UTR
HDAC1 MM	HDAC1 humana	U50079	1585-1604	5'-GTTAGGTGAGGCACTGAGGA-3'	3'-UTR
HDAC2 AS	HDAC2 humana	U31814	1643-1622	5'-GCTGAGCTGTTCTGATTGG-3'	3'-UTR
HDAC2 MM	HDAC2 humana	U31814	1643-1622	5'-CGTGAGCACTTCTCATTTCC-3'	3'-UTR
HDAC3 AS	HDAC3 humana	AF039703	1276-1295	5'-CGCTTTCCTTGTTCATTGACA-3'	3'-UTR
HDAC3 MM	HDAC3 humana	AF039703	1276-1295	5'-GCCTTTCCTACTCATTTGTGT-3'	3'-UTR
HDAC4 AS1	HDAC4 humana	AB006626	514-33	5-GCTGCCTGCCGTGCCCACCC-3'	5'-UTR
HDAC4 MM1	HDAC4 humana	AB006626	514-33	5'-CGTGCCCTGCCGTGCCCCACGG-3'	5'-UTR
HDAC4 AS2	HDAC4 humana	AB006626	7710-29	5'-TACAGTCCATGCAACCTCCA-3'	3'-UTR
HDAC4 MM4	HDAC4 humana	AB006626	7710-29	5'-ATCAGTCCAACCAACCTCGT-3'	3'-UTR
HDAC5 AS	HDAC5 humana	AF039691	2663-2682	5-CTTCGGTCTCACCTGCTTGG-3'	3'-UTR
HDAC6 AS	HDAC6 humana	AJ011972	3791-3810	5'-CAGGCTGGAATGAGCTACAG-3'	3'-UTR
HDAC6 MM	HDAC6 humana	AJ011972	3791-3810	5'-GACGCTGCAATCAGGTAGAC-3'	3'-UTR
HDAC7 AS	HDAC7 humana	AF239243	2896-2915	5'-CTTCAGCCAGGATGCCACACA-3'	3'-UTR

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

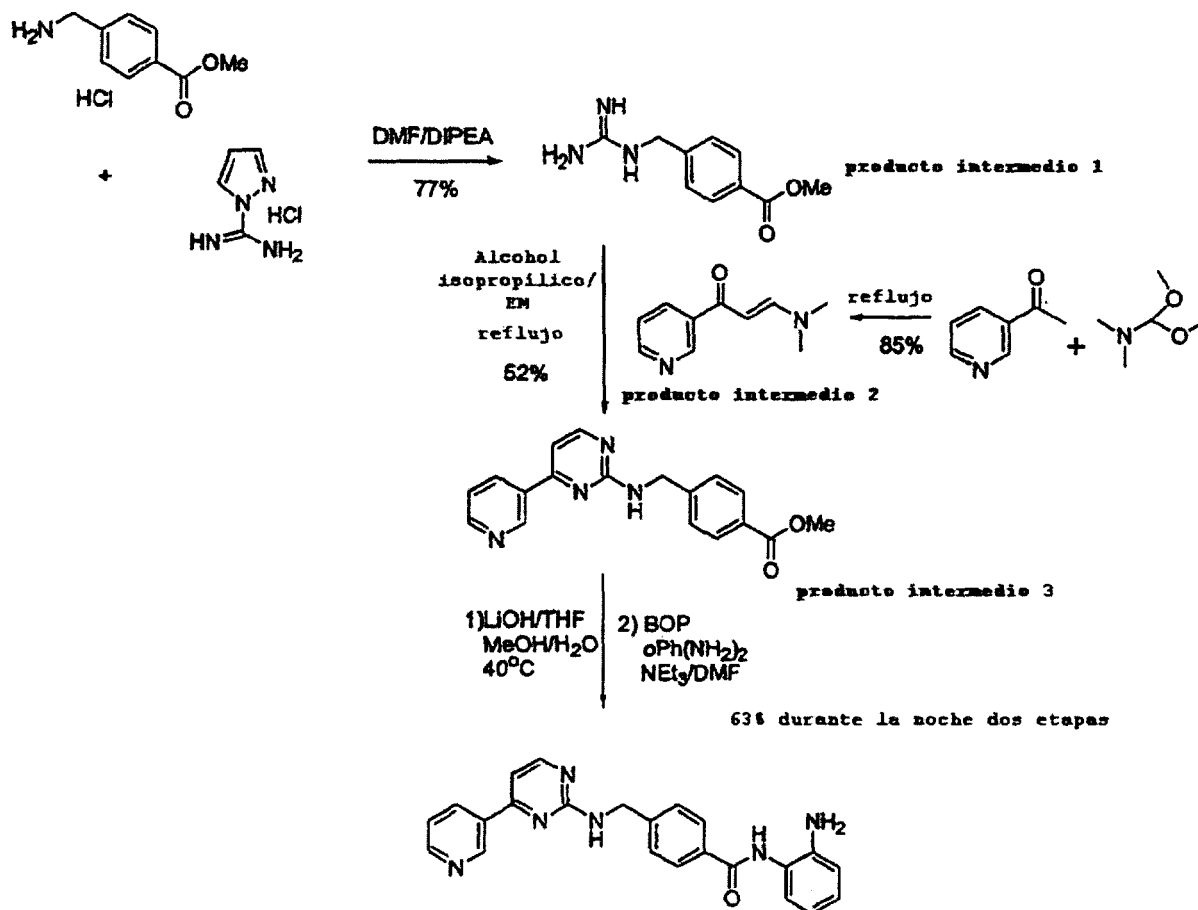
HDAC8 AS1	HDAC8 humana	AF230097	51-70	5'-CTCCGGCTCCTCCATCTTCC-3'	5'-UTR
HDAC8 AS2	HDAC8 humana	AF230097	1328-1347	5'-AGCCAGCTGCCACTTGATGC-3'	3'-UTR

Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar adicionalmente la invención.

Ejemplo 426

Síntesis de N-(2-amino-fenil)-4-[(4-piridin-3-il-pirimidin-2-ilamino)-metil]-benzamida

Esquema 66



Etapas 1

Síntesis del producto intermedio 1 éster metílico del ácido 4-guanidinometil-benzoico

Se agitó la mezcla de éster metílico del ácido 4-aminometil-benzoico HCl (15,7 g, 77,8 mmoles) en DMF (85,6 ml) y DIPEA (29,5 ml, 171,2 mmoles) a ta durante 10 min. Se añadió pirazol-1-carboxamidina HCl (12,55 g, 85,6 mmoles) a la mezcla de reacción y entonces se agitó a ta durante 4 h dando una disolución transparente. Se evaporó la mezcla de reacción hasta sequedad a vacío. Se añadió disolución de NaHCO₃ saturada (35 ml) dando una buena suspensión. Se filtró la suspensión y se lavó la torta de filtración con agua fría. Se evaporó el líquido madre hasta sequedad y entonces se filtró. Se combinaron los dos sólidos y se resuspendieron sobre H₂O destilada (50 ml). Se lavó entonces la torta de filtración con cantidades mínimas de H₂O fría y éter dando 12,32 g de sólido cristalino blanco del producto intermedio 1 (rendimiento del 77%, M+1: 208 en EM).

Etapas 2

Síntesis del producto intermedio 2 3-dimetilamino-1-piridin-3-il-propenona

Se mezclaron entre si 3-acetil-piridina (30,0 g, 247,6 mmoles) y DMF dimetil acetal (65,8 ml, 495, 2 minóles) y entonces se calentaron hasta reflujo durante 4 h. Se evaporó la mezcla de reacción hasta sequedad y entonces se añadieron 50 ml de dietil éter dando una suspensión marrón. Se filtró la suspensión dando 36,97 g de producto cristalino de color naranja (rendimiento del 85%, M+1: 177 en EM).

ES 2 341 857 T3

Etapa 3

Síntesis del producto intermedio 3 éster metílico del ácido 4-[(4-piridin-3-il-pirimidin-2-ilamino)-metil]-benzoico

5 Se mezclaron el producto intermedio 1 (0,394 g, 1,9 mmoles) y el producto intermedio 2 (0,402 g, 2,3 mmoles) y tamices moleculares (0,2 g, 4A, polvo, >5 micrómetros) con alcohol isopropílico (3,8 ml). Se calentó la mezcla de reacción hasta reflujo durante 5 h. Se añadió MeOH (50 ml) y entonces se calentó hasta reflujo. Se filtró la disolución turbia sobre una almohadilla de Celite. Se evaporó el líquido madre hasta sequedad y se trituró el residuo con 3 ml de EtOAc. Se filtró la suspensión dando 0,317 g de sólido cristalino blanco del producto intermedio 3 (52%, M+1: 321 en EM).

Etapa 4

Síntesis de N-(2-amino-fenil)-4-[(4-piridin-3-il-pirimidin-2-ilamino)-metil]-benzamida

15 Se mezcló el producto intermedio 3 (3,68 g, 11,5 mmoles) con THF (23 ml), MeOH (23 ml) y H₂O (11,5 ml) a ta. Se añadió LiOH (1,06 g, 25,3 mmoles) a la mezcla de reacción. Se calentó la mezcla de reacción resultante hasta 40°C durante la noche. Se añadió disolución de HCl (12,8 ml, 2 N) para ajustar el pH=3 cuando la mezcla se enfrió hasta ta. Se evaporó la mezcla hasta sequedad y entonces se lavó el sólido con una cantidad mínima de H₂O tras la filtración. Se secó la torta de filtración sobre una liofilizadora dando 3,44 g de ácido del compuesto del título (95%, M+1: 307 en EM).

25 Se disolvieron ácido (3,39 g, 11,1 mmoles) del compuesto del título, BOP (5,679 g, 12,84 mmoles) y o-Ph (NH₂)₂ (2,314 g, 21,4 mmoles) en la mezcla de DMF (107 ml) y Et₃N (2,98 ml, 21,4 mmoles). Se agitó la mezcla de reacción a ta durante 5 h y entonces se evaporó hasta sequedad. Se purificó el residuo mediante columna ultrarrápida (EtOAc puro frente a MeOH/EtOAc al 5%) y entonces se concentraron las fracciones interesantes. Se trituró el producto final con EtOAc dando 2,80 g del producto del título (66%, MS+1: 397 en EM). ¹H RMN (400 MHz, DMSO-D₆) δ (ppm): 9,57 (s, 1H), 9,22 (s, 1H), 8,66 (d, J= 3,5 Hz, 1H), 8,39 (d, J= 5,1 Hz, 2H), 8,00 (t, J= 6,5 Hz, 1H), 7,90 (d, J= 8,2 Hz, 2H), 7,50 (m, 3H), 7,25 (d, J= 5,1 Hz, 1H), 7,12 (d, J= 7,4 Hz, 1H), 6,94 (dd, J= 7,0, 7,8 Hz, 1H), 6,75 (d, J= 8,2 Hz, 1H), 6,57 (dd, J= 7,0, 7,8 Hz, 1H), 4,86 (s, 2H), 4,64 (d, J= 5,9 Hz, 2H).

Ejemplo de ensayo 1

Inhibición de la actividad enzimática de la histona desacetilasa

1. HDAC-1 humana

40 Se examinaron los inhibidores de HDAC frente a una enzima HDAC-1 humana recombinante clonada expresada y purificada a partir de un sistema de expresión de células de insecto de baculovirus. Para los ensayos de desacetilasa, se incubaron 20.000 cpm del sustrato histona acetilada marcada metabólicamente con [³H] (M. Yoshida *et al.*, J. Biol. Chem. 265 (28): 17174-17179 (1990)) con 30 µg de la hHDAC-1 recombinante clonada durante 10 minutos a 37°C. Se detuvo la reacción añadiendo ácido acético (0,04 M, concentración final) y HCl (250 mM, concentración final). Se extrajo la mezcla con acetato de etilo y se cuantificó el [³H]-ácido acético liberado mediante recuento de centelleo. Para estudios de inhibición, se preincubó la enzima con compuestos a 4°C durante 30 minutos antes del inicio del ensayo enzimático. Se determinaron los valores de CI₅₀ para los inhibidores de la enzima HDAC realizando curvas de dosis-respuesta con compuestos individuales y determinando la concentración de inhibidor que producía el cincuenta por ciento de la inhibición máxima. Se presentan los valores de CI₅₀ para los compuestos relacionados en la tercera columna de la tabla 5.

2. Ensayo de MTT

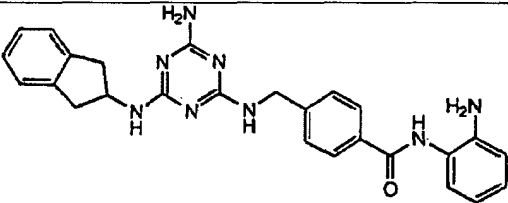
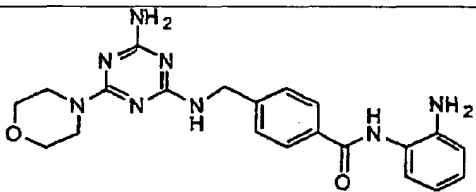
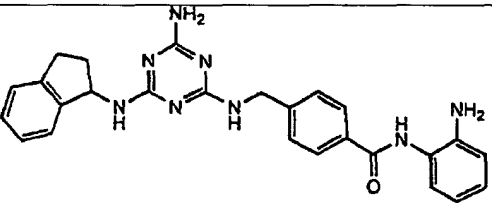
55 Se sembraron en placa células HCT116 (2000/pocillo) en placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos un día antes del tratamiento con compuestos. Se añadieron compuestos a diversas concentraciones a las células. Se incubaron las células durante 72 horas a 37°C en un incubador de CO₂ al 5%. Se añadió MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio, Sigma) a una concentración final de 0,5 mg/ml y se incubó con las células durante 4 horas antes de añadir un volumen de tampón de solubilización (N,N-dimetilformamida al 50%, SDS al 20%, pH 4,7) sobre las células cultivadas. Tras la incubación durante la noche, se cuantificó el tinte solubilizado mediante lectura colorimétrica a 570 nM usando una referencia a 630 nM usando un lector de placas MR700 (Dynatech Laboratories Inc.). Se convirtieron los valores de DO en número de células según una curva de crecimiento patrón de la línea celular relevante. Se determina la concentración que reduce el número de células hasta el 50% del de las células tratadas con disolvente como CI₅₀ de MTT. Se presentan los valores de CI₅₀ para compuestos relacionados en la cuarta columna de la tabla 5.

3. Acetilación de la histona H4 en células completas mediante inmunotransferencias

Se incubaron células de cáncer de vejiga humanas T24 que crecían en cultivo con inhibidores de HDAC durante 16 h. Se extrajeron las histonas de las células tras el periodo de cultivo tal como se describe por M. Yoshida *et al.* (J. Biol. Chem. 265 (28): 17174-17179 (1990)). Se cargaron 20 g de proteína histona total sobre SDS/PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Se estudiaron con sonda las membranas con anticuerpos policlonales específicos para histona H-4 acetilada (Upstate Biotech Inc.), seguido por anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa del rábano (Sigma). Se realizó la detección de la quimioluminiscencia potenciada (ECL) (Amersham) usando películas Kodak (Eastman Kodak). Se cuantificó la señal de H-4 acetilada mediante densitometría. Se presentan datos representativos en la quinta columna de la tabla 5. Se presentan los datos como la concentración eficaz para reducir la señal de H-4 acetilada en un 50% (CE₅₀).

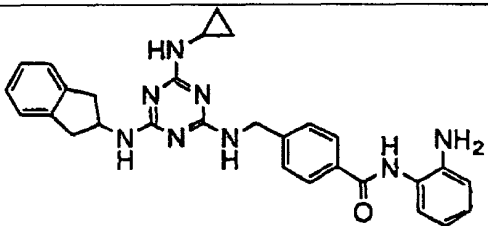
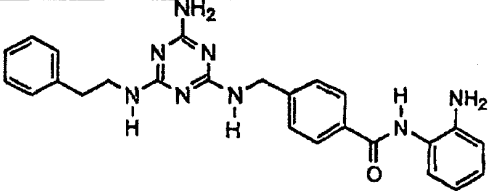
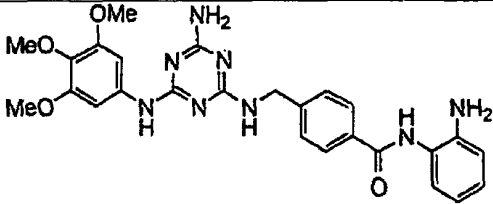
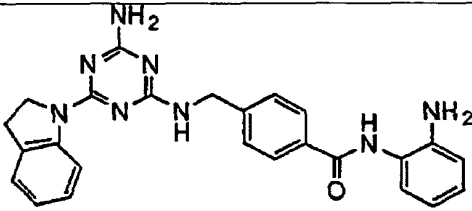
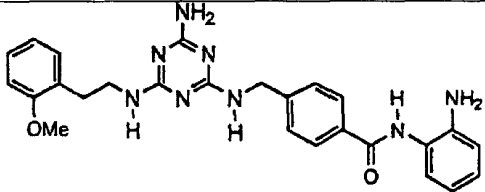
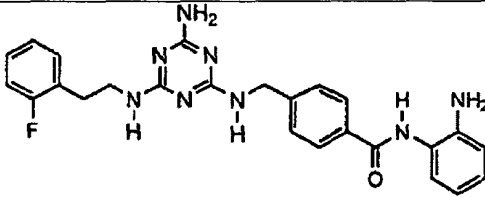
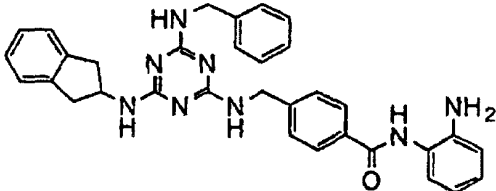
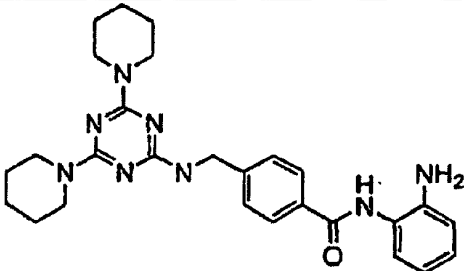
TABLA 5a

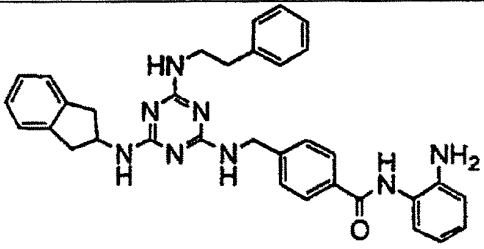
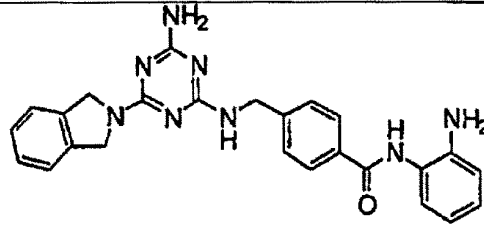
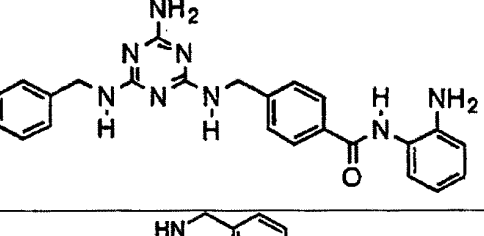
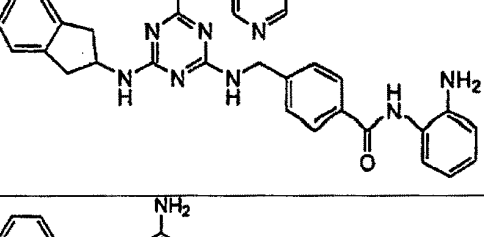
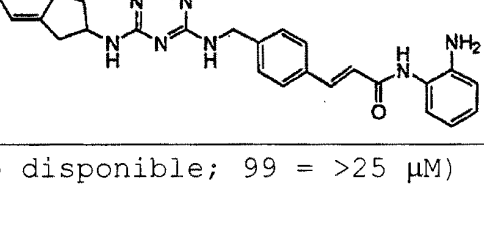
Inhibición de la histona desacetilasa

Comp.	Estructura	CI ₅₀ (μM) de HDAC-1 humana	CI ₅₀ (μM) de MTT (HCT116)	CE ₅₀ (μM) de H4Ac (T24)
8		0,4	0,5	1
9		2	0,7	5
10		2	0,6	1

11		2	0, 6	2
12		2	2	5
14		0, 3	1	5
15		0, 5	0, 2	3
16		1	0, 4	1
17		0, 9	1	2
18		0, 8	0, 6	3
18b		0, 6	5	10

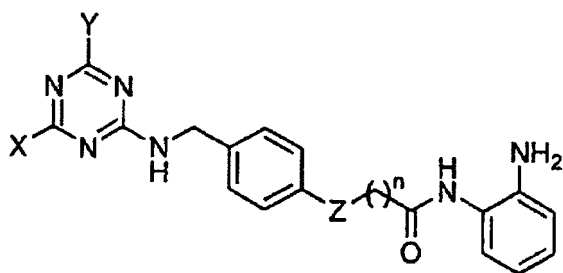
ES 2 341 857 T3

19		0,9	1	1
20		0,5	0,3	1
21		4	4	25
22		3	0,8	1
23		2	0,7	1
24		3	0,6	1
25		0,8	0,3	5
26		0,5	2	nd

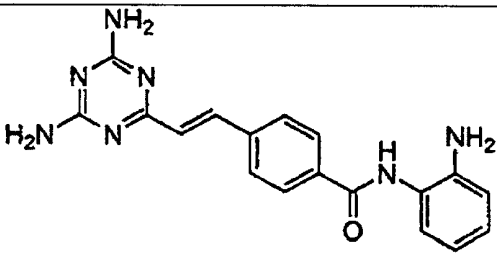
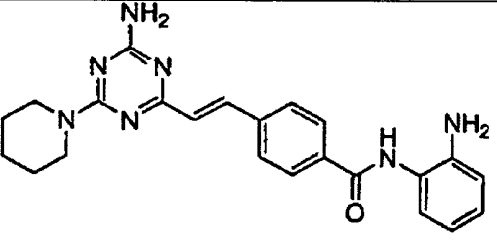
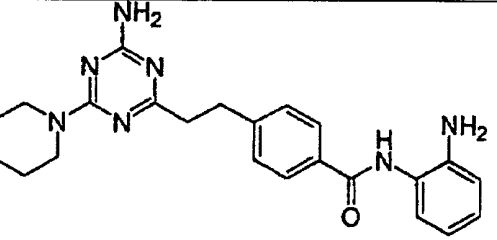
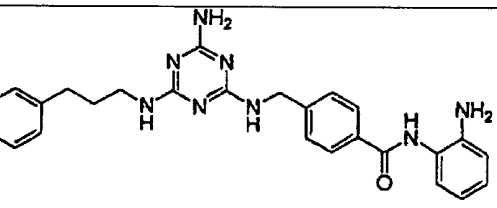
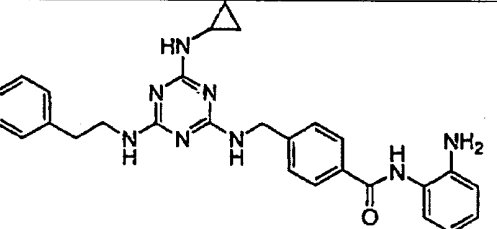
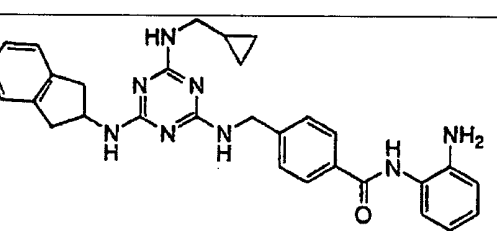
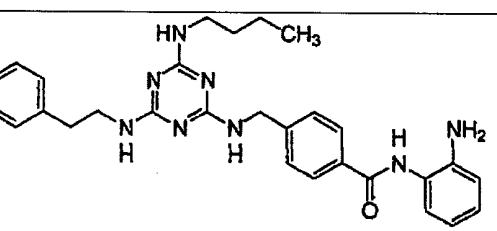
27		0,4	2	nd
28		2	0,5	1
29		2	2	1
30		1	3	1
83		3	5	5

(nd = no disponible; 99 = >25 μ M)

TABLA 5b



Ej.	Comp.	Estructura	CI ₅₀ (μM) de HDAC-1 humana	CI ₅₀ (μM) de MTT (HCT116)	CE ₅₀ (μM) de H4Ac (T24)
135	204		4	nd	5
136	207		0,4	0,6	2
137	210		3	0,9	1
138	212		3	1	1
139	214		3	0,9	1
140	216		0,5	0,4	2
141	218		0,1	0,5	nd

5	142	220		7	6	nd
10	143a	223		11	2	nd
15	143b	224		5	3	nd
20	329	470		2	0, 7	3
25	330	471		0, 4	1	3
30	331	472		3	1	1
35	332	473		4	3	nd

5	333	474		3	1	1
10	334	475		0, 6	2	nd
15	335	476		2	1	2
20	336	477		1	0, 7	nd
25	337	478		3	0, 7	nd
30	338	479		0, 4	0, 6	nd
35	339	480		0, 8	0, 5	nd

ES 2 341 857 T3

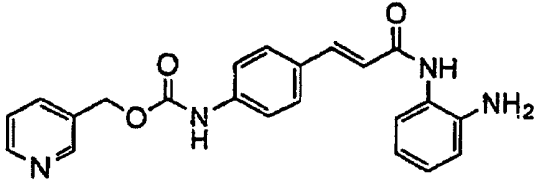
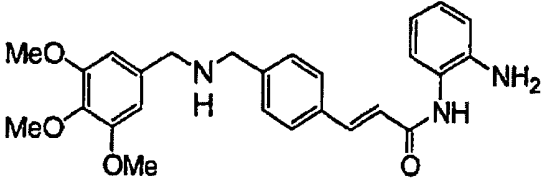
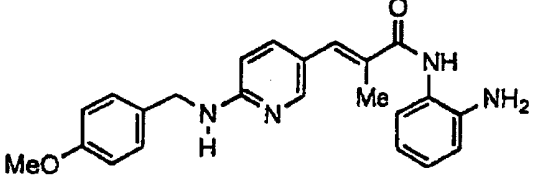
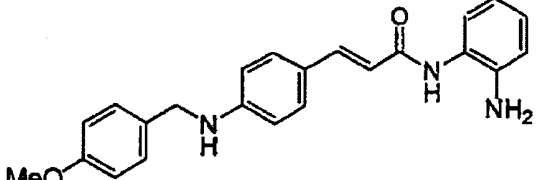
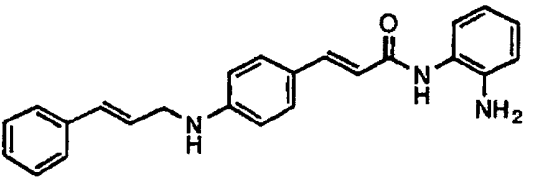
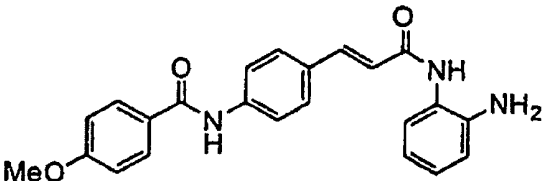
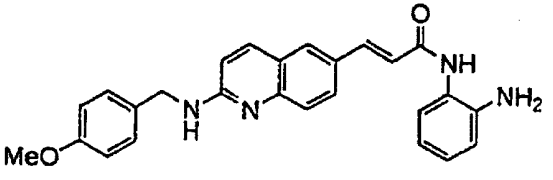
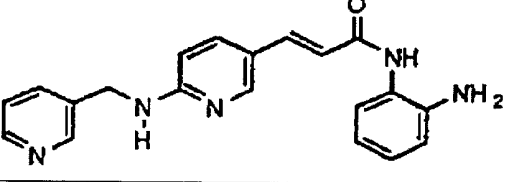
340	481		6	0,7	nd
341	482		0,1	0,7	nd
342	483		4	nd	nd
343	484		2	0,3	nd
344	485		0,4	3	nd

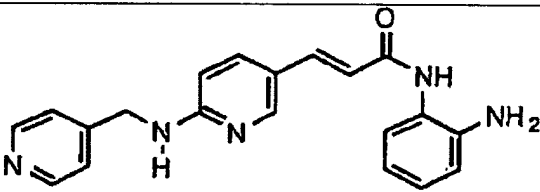
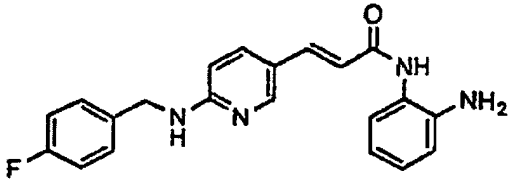
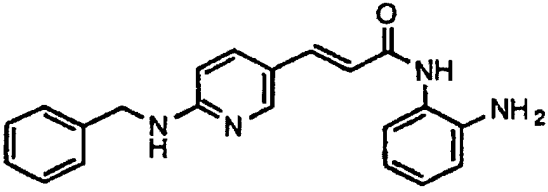
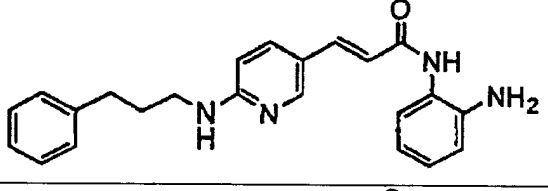
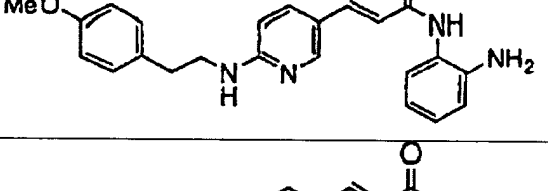
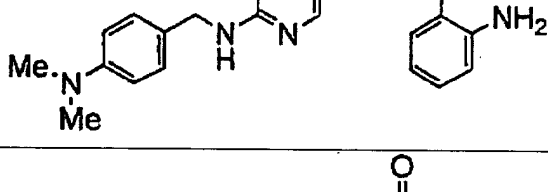
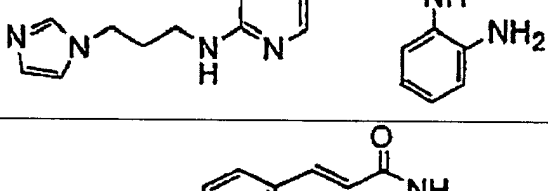
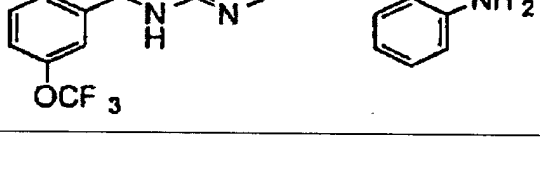
(nd = no disponible)

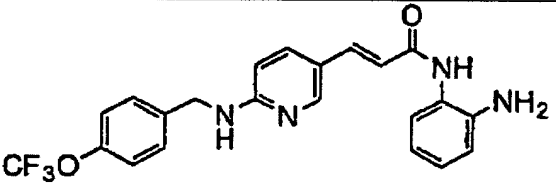
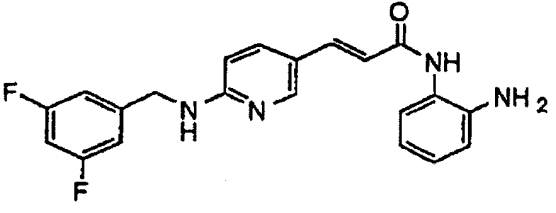
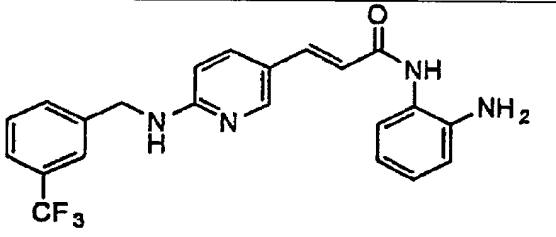
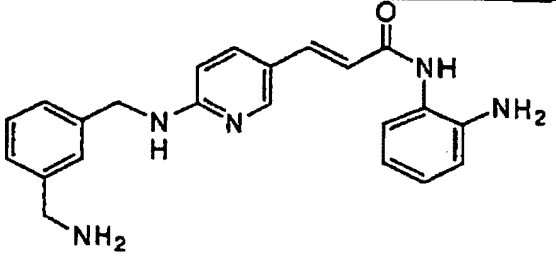
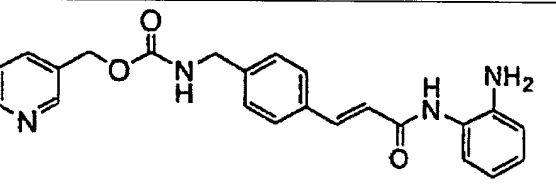
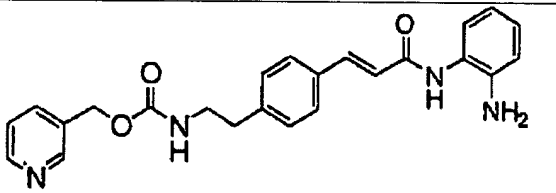
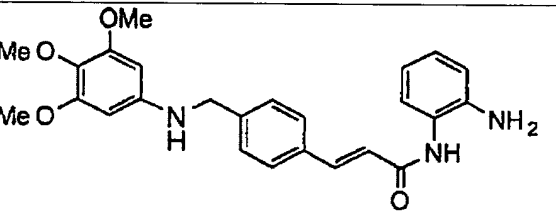
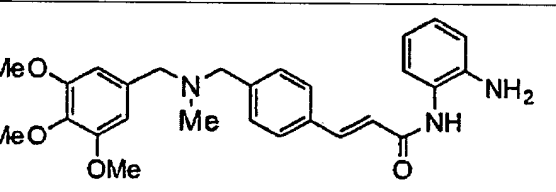
TABLA 5c

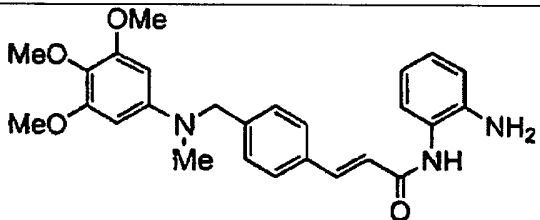
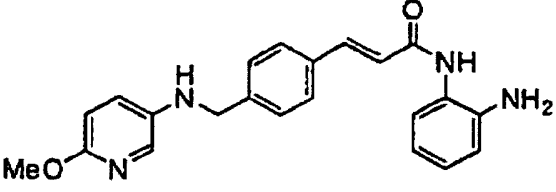
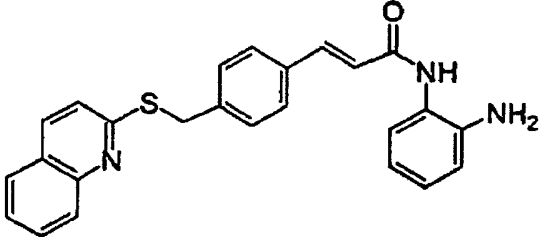
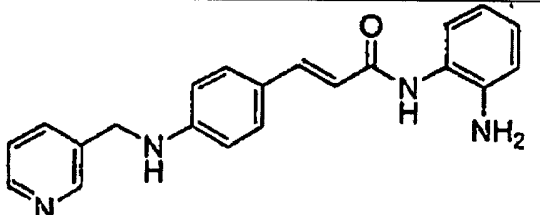
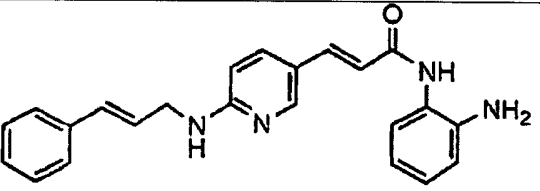
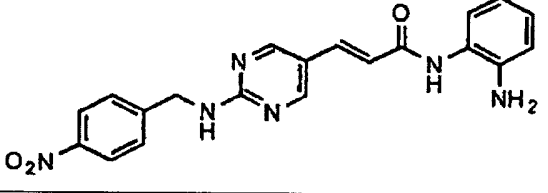
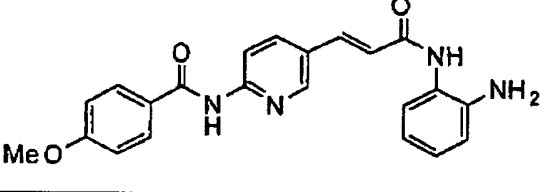
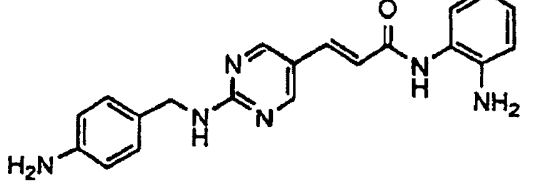
Comp.	Estructura	CI ₅₀ (μM) de HDAC-1 humana	CI ₅₀ (μM) de MTT (HCT116)	CE ₅₀ (μM) de H4Ac (T24)
51		22	4	nd

ES 2 341 857 T3

5	55b		3	8	3
10	59		12	22	nd
20	61b		7	12	nd
25	65		4	37	nd
35	71		10	44	nd
45	72		16	21	nd
50	88		nd	>39	nd
60	90		10	5	5

5	91		4	7	5
10	92		5	2	3
15	93		3	1	5
20	94		3	2	5
25	95		3	2	10
30	96		4	3	25
35	97		10	12	nd
40	98		0, 4	2	15

99		2	5	10
100		4	3	5
101		3	0, 9	5
102		20	6	nd
104		10	9	5
105		16	14	nd
106		2	2	1
107		15	17	nd

5	108		3	5	5
10	109		5	8	15
15	110		3	999	nd
20	111		10	2	99
25	112		2	5	5
30	113			0, 3	5
35	114		25	0, 5	99
40	115		15	9	nd
45					
50					
55					
60					
65					

ES 2 341 857 T3

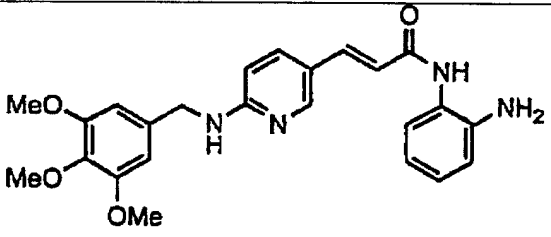
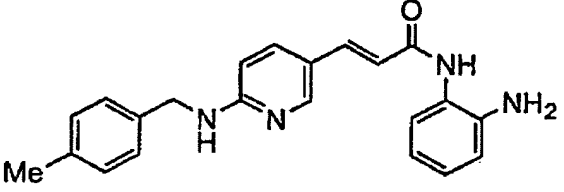
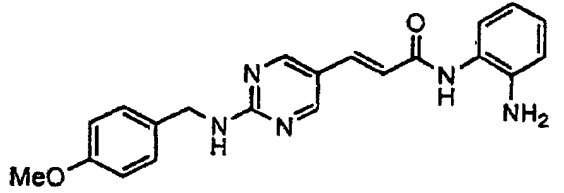
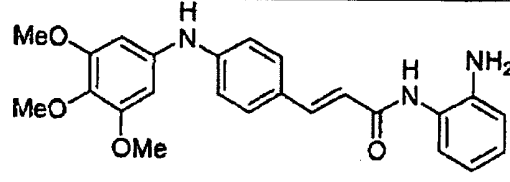
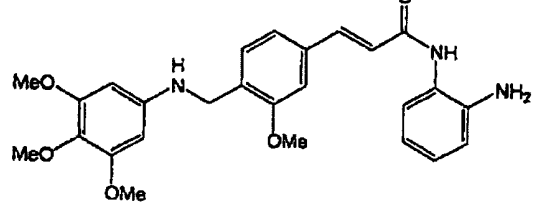
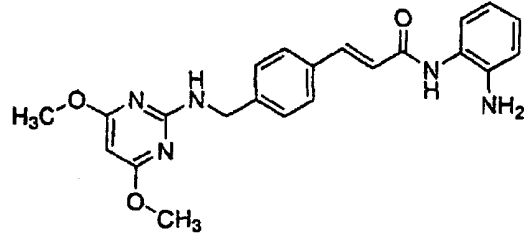
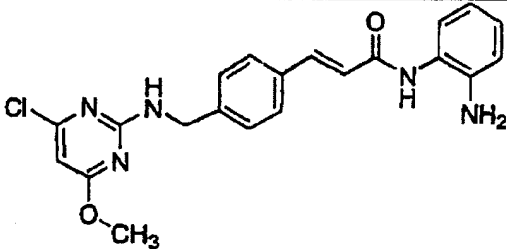
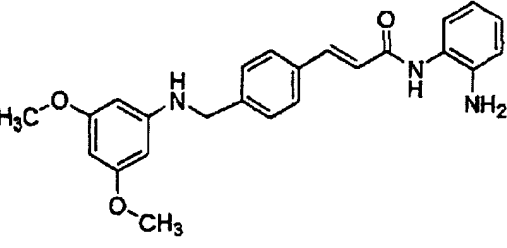
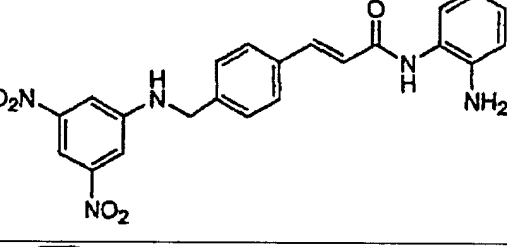
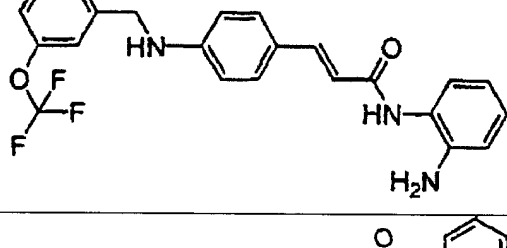
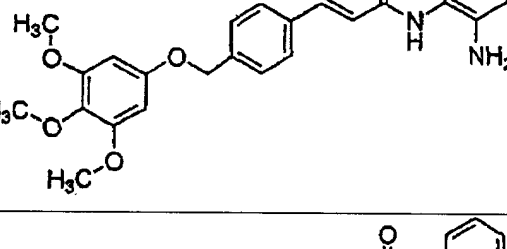
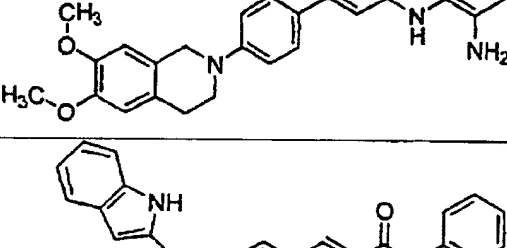
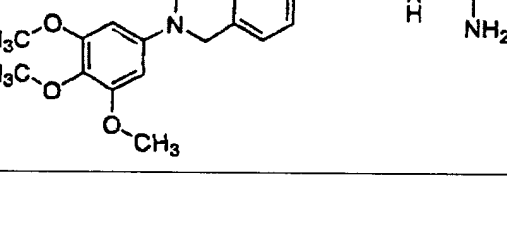
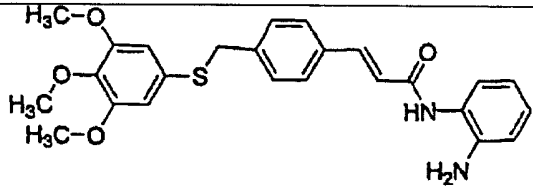
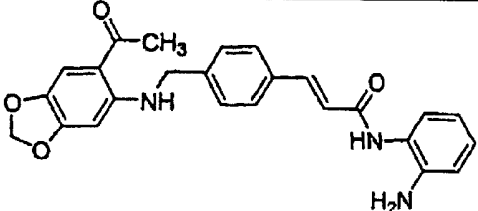
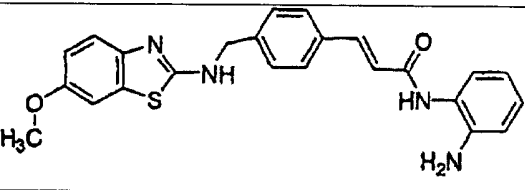
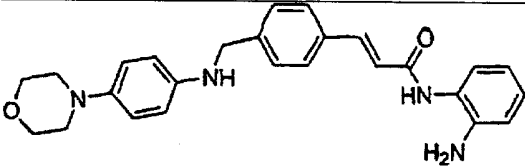
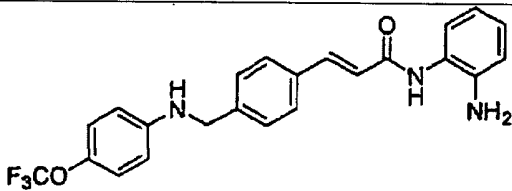
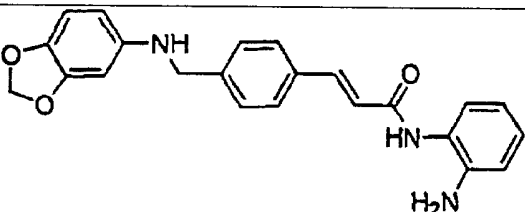
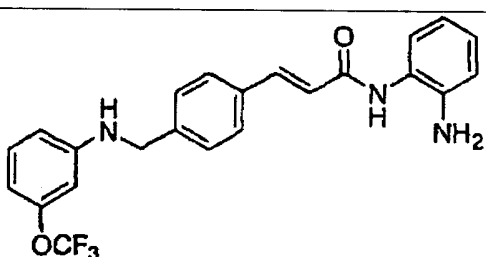
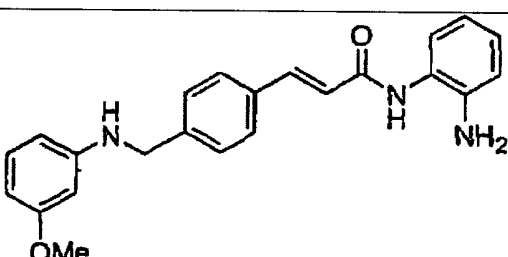
116		4	2	5
117		7	3	nd
118		11	8	nd

TABLA 5d

Ej.	Comp.	Estructura	CI ₅₀ (μM) de HDAC-1 humana	CI ₅₀ (μM) de MTT (HCT116)	CE ₅₀ (μM) de H4Ac (T24)
338	481		22	10	-
339	484		20	12	-
347	492		4	9	10

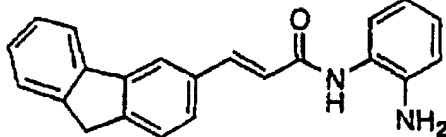
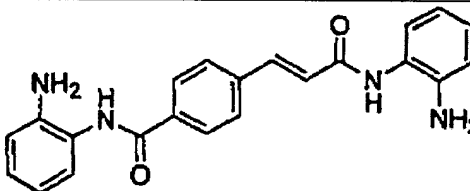
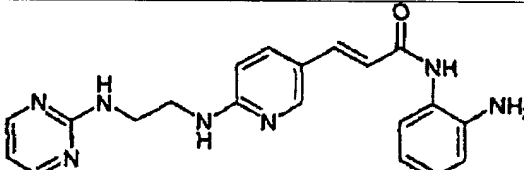
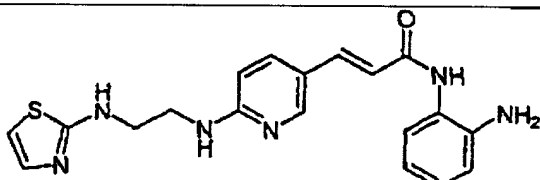
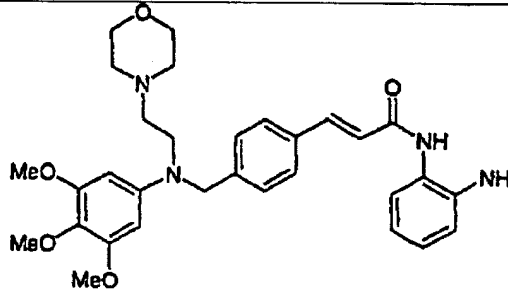
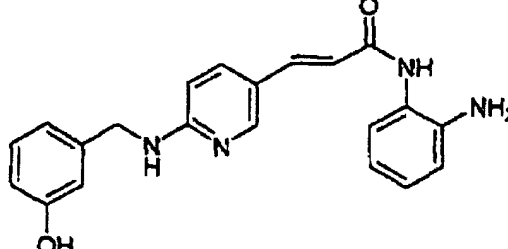
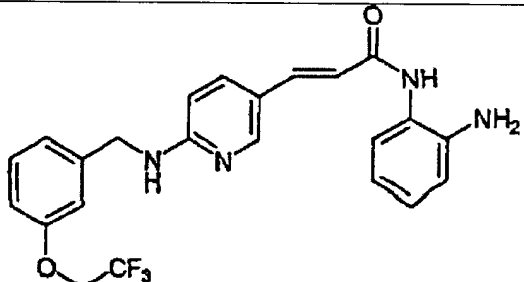
5	348	493		4	5	-
10						
15	349	494		3	4	-
20						
25	350	495		4	7	-
30						
35	351	496		8	13	-
40						
45	352	497		15	6	-
50						
55	353	498		>25	-	-
60						
65	354	499		>25	2	>25

ES 2 341 857 T3

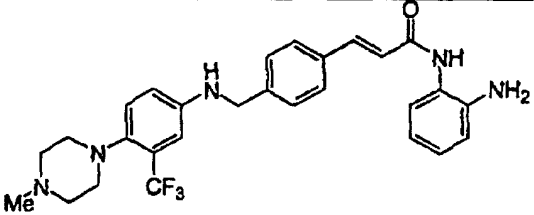
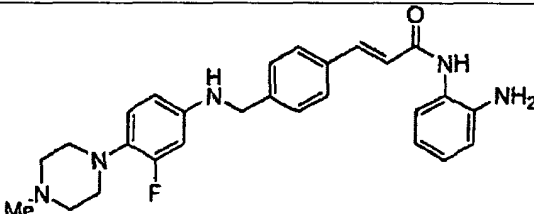
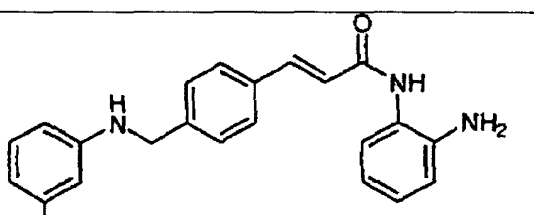
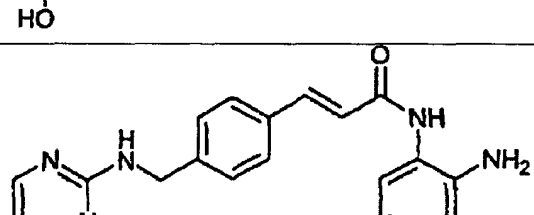
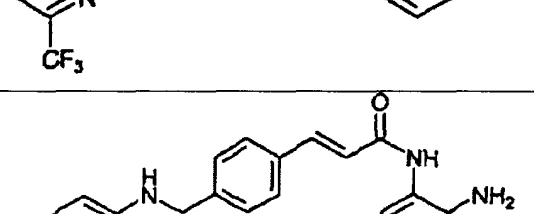
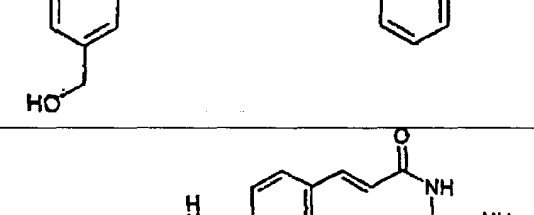
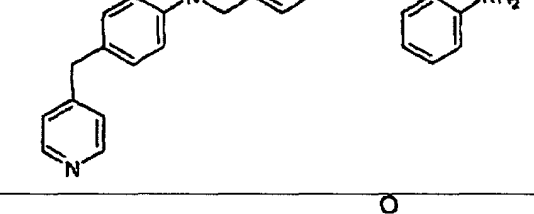
5	355	500		23	37	-
10	356	501		4	10	-
15	357	502		3	>25	-
20	358	503		5	>25	-
25	359	504		5	>25	-
30	360	505		3	6	-
35	361	506		15	11	-
40	362	507		17	10	-

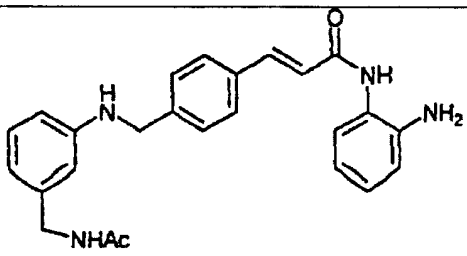
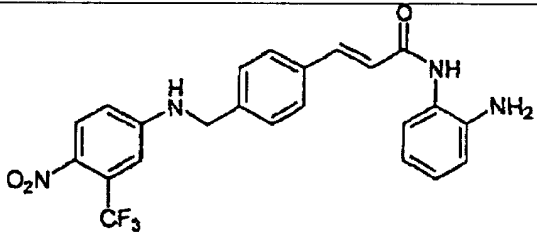
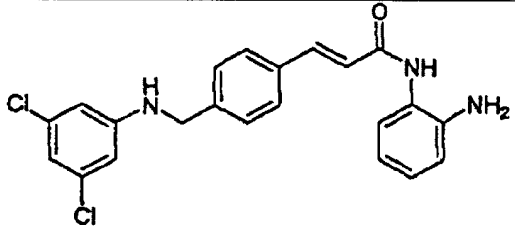
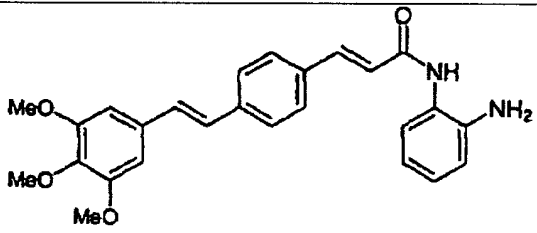
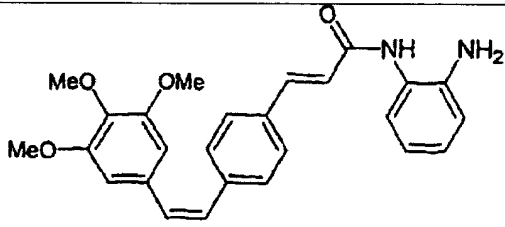
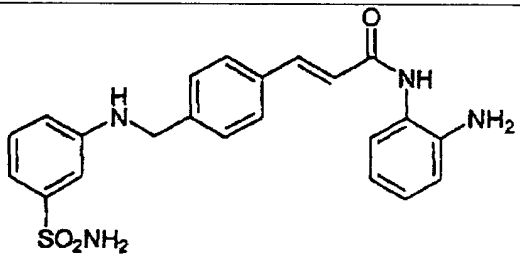
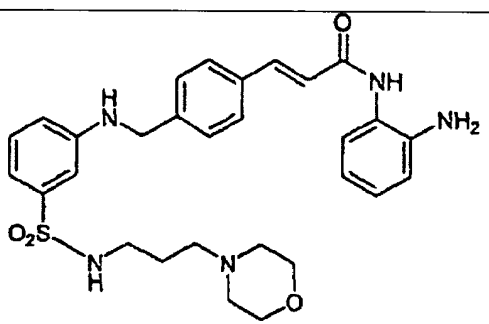
5	363	508		22	11	-
10	364	509		17	11	-
15	365	510		6	5	-
20	366	511		4	>25	-
25	367	512		3	3	5
30	371	516		15	15	-
35	372	517		6	5	-
40	373	518		4	2	5

ES 2 341 857 T3

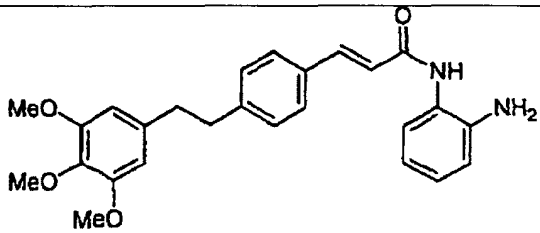
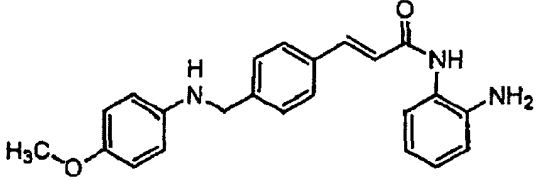
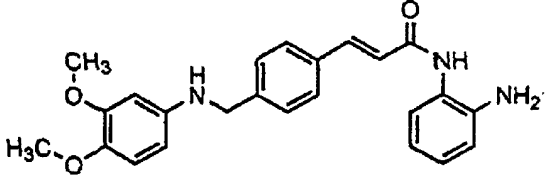
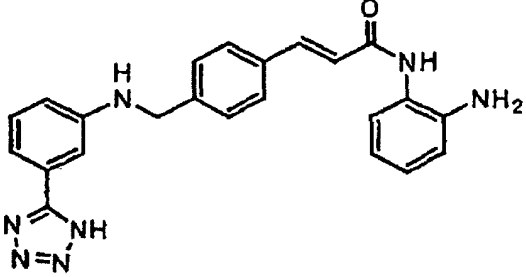
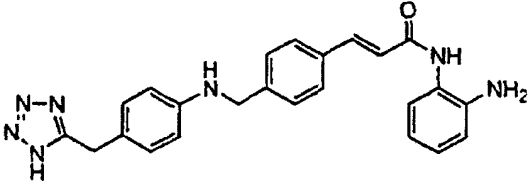
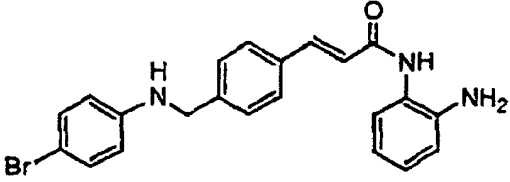
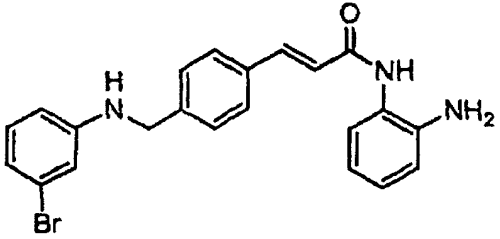
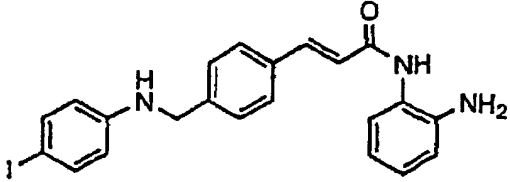
5	374	519		99	6	-
10	375	520		5	3	-
15	376	521		5	2	10
20	377	522		17	30	-
25	378	523		8	6	10
30	379	524		3	2	3
35	380	525		3	4	5

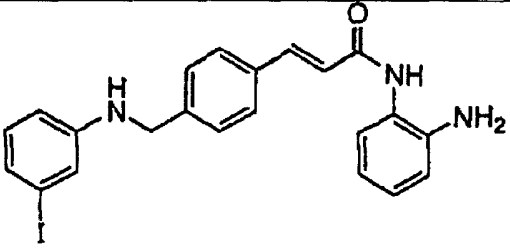
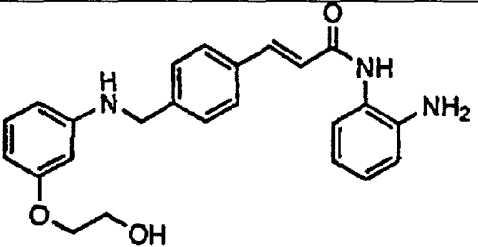
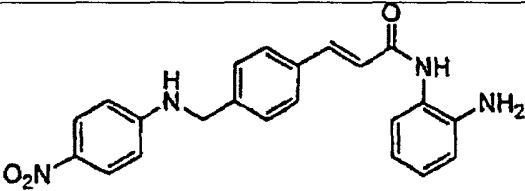
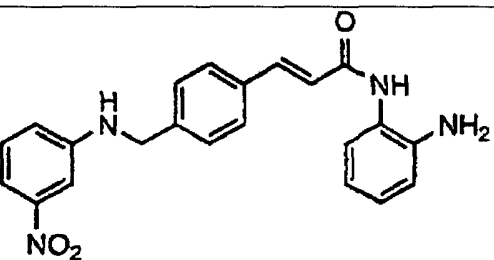
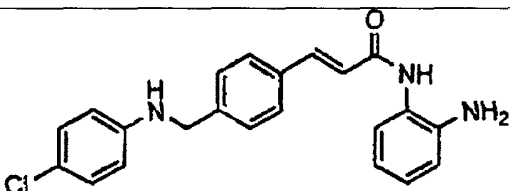
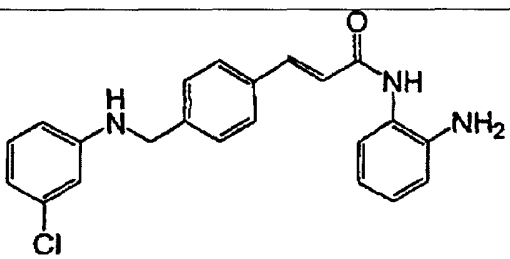
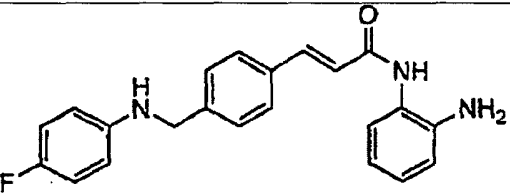
ES 2 341 857 T3

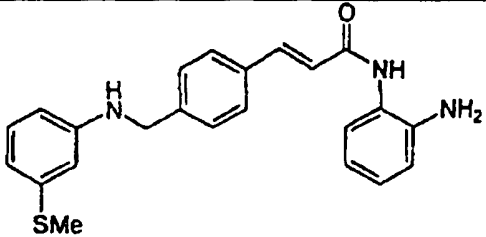
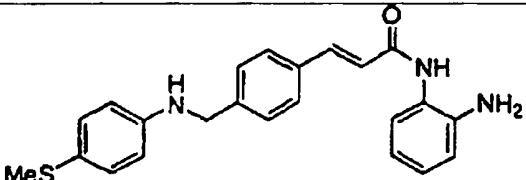
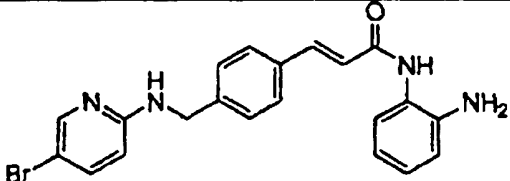
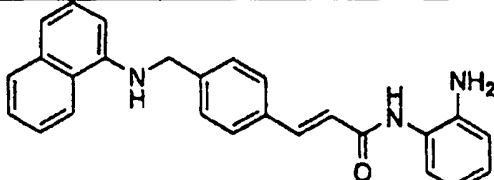
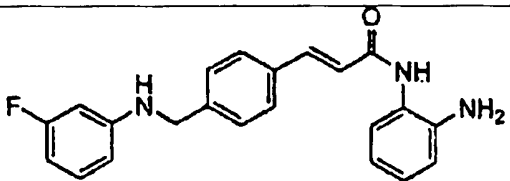
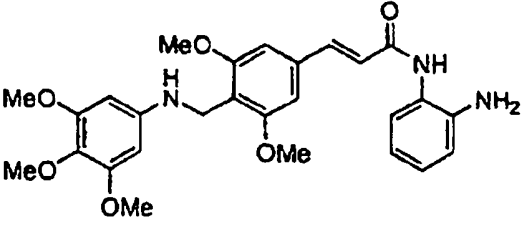
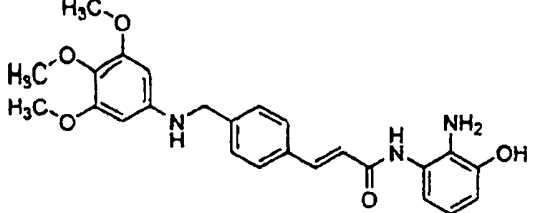
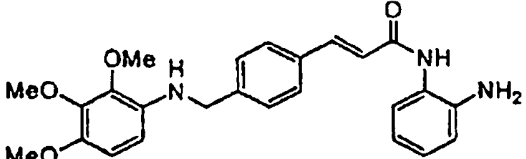
5	381	526		2	0,8	1
10	382	527		4	3	-
15	383	528		20	32	-
20	384	529		5	17	-
25	385	530		8	9	-
30	386	531		3	2	20
35	387	532		3	5	-
40						
45						
50						
55						
60						
65						

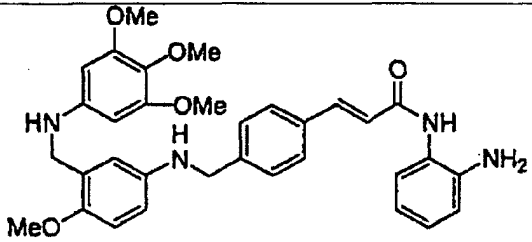
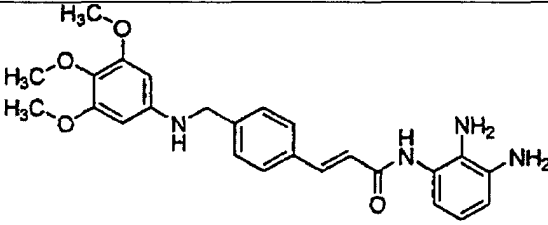
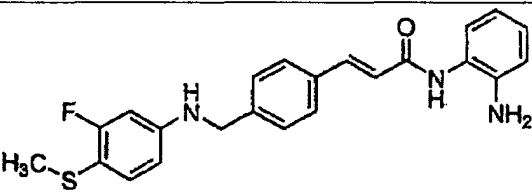
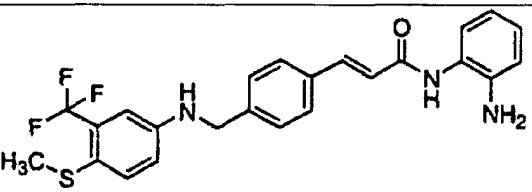
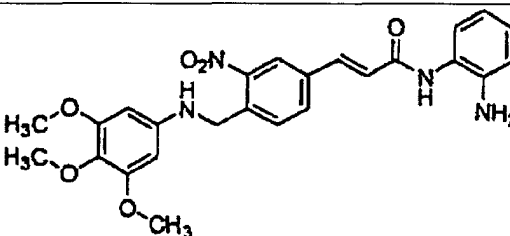
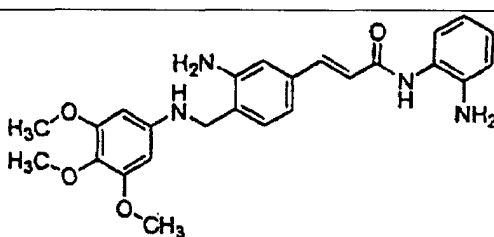
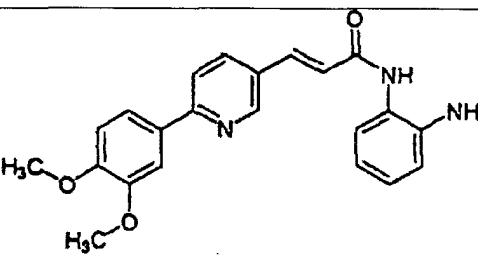
388	533		5	11	-
389	534		3	5	-
390	535		4	6	-
391	536		18	9	-
392	537		11	2	>25
393	538		4	12	-
394	539		2	10	-

ES 2 341 857 T3

5	395	540		10	10	-
10	396	541		4	12	-
15	397	542		2	5	4
20	398	543		15	>25	-
25	399	544		17	45	-
30	400	545		2	12	-
35	401	546		3	10	-
40	402	547		4	8	-

5	403	548		3	9	-
10	404	549		4	19	-
15	405	550		4	15	-
20	406	551		24	9	-
25	407	552		4	22	-
30	408	553		4	12	-
35	409	554		15	12	-

5	410	555		14	7	-
10	411	556		1	0, 4	15
15	412	557		4	6	-
20	413	558		7	10	-
25	414	559		4	11	-
30	415	560		21	6	-
35	416	561		>25	>25	-
40	417	562		5	5	-

5	418	563		24	6	-
10	419	564		>25	>25	-
20	420	565		5	17	-
25	421	566		3	16	-
30	422	567		13	3	-
35	423	568		>25	39	-
40	424	569		18	6	-
45						
50						
55						
60						

ES 2 341 857 T3

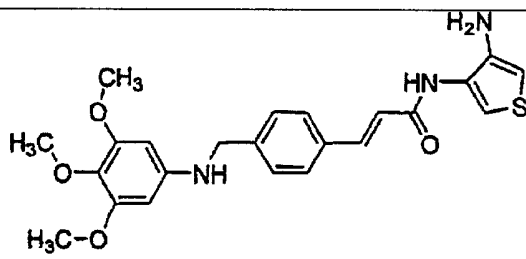
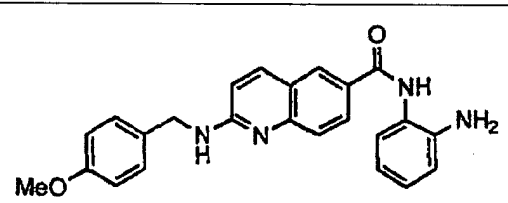
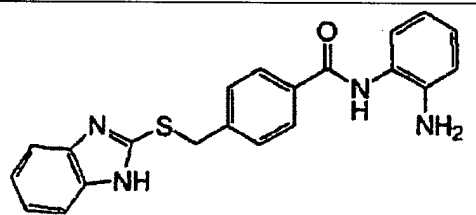
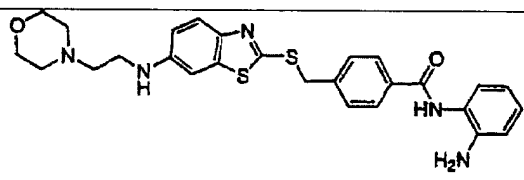
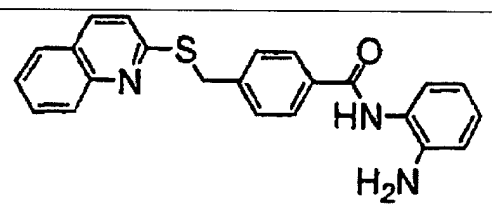
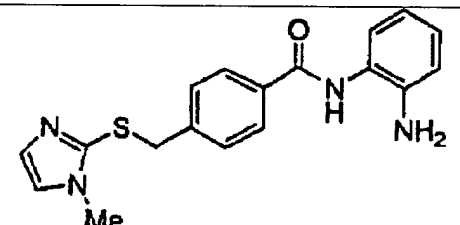
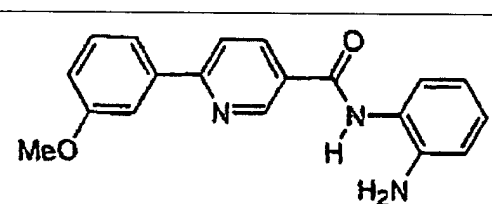
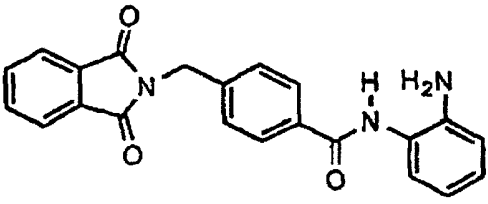
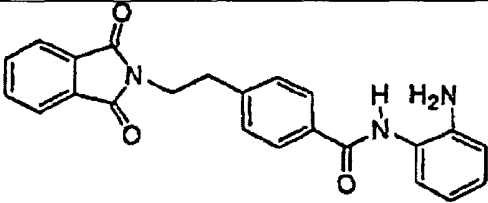
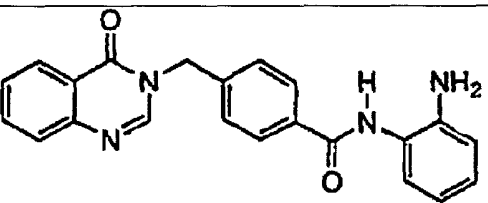
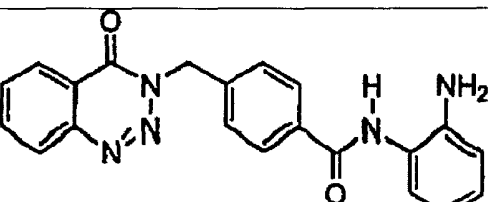
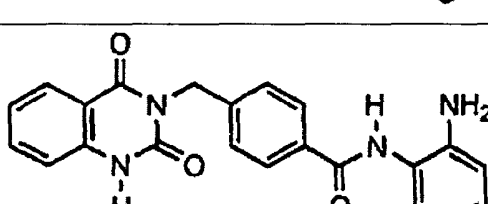
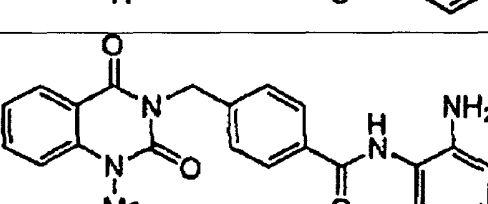
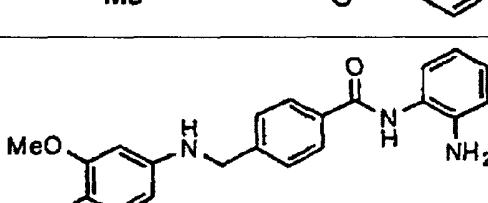
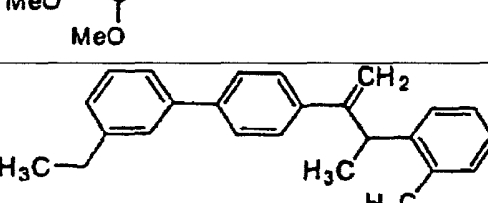
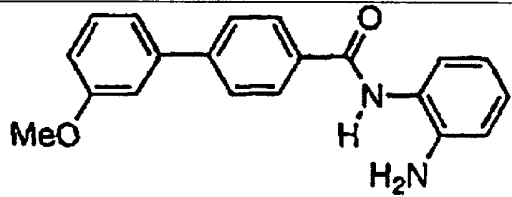
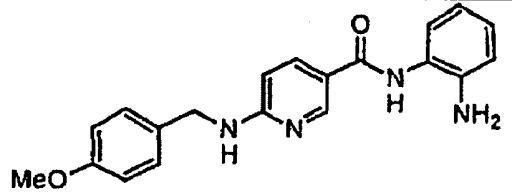
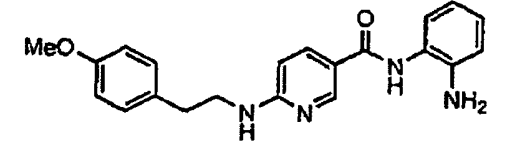
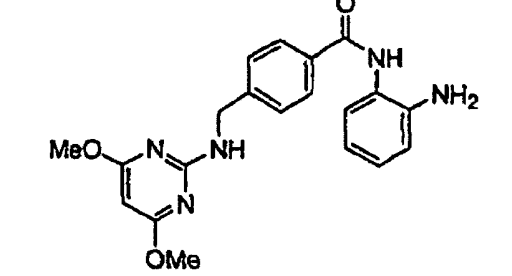
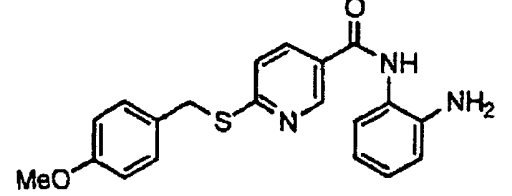
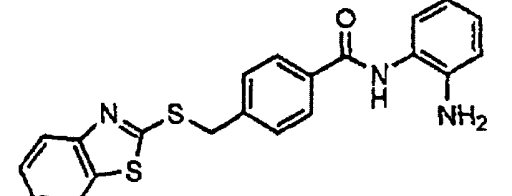
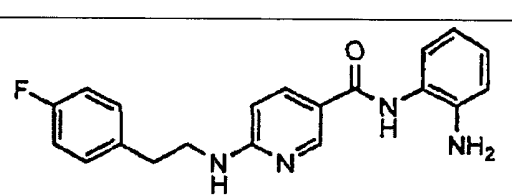
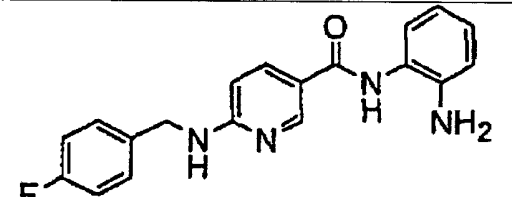
425	570		6	0,6	2
-----	-----	---	---	-----	---

TABLA 5e

Comp.	Estructura	CI ₅₀ (μM) de HDAC-1 humana	CI ₅₀ (μM) de MTT (HCT116)	CE ₅₀ (μM) de H4Ac (T24)
87		2	1	5
126		0,3	0,2	1
128		1	0,3	5
131		0,3	0,9	2
139		3	3	5
141		7	10	nd

149		1	5	5
152		0,3	11	nd
154		0,3	0,4	<1
155		0,4	0,4	1
157		2	0,6	1
158		0,4	0,2	1
164		3	2	3
165		9	4	25

5	166		2	5	5
10	167		4	0, 5	2
15	168		3	0, 8	2
20	169		0, 3	0, 7	1
25	171		8	3	25
30	172		0, 4	1	3
35	174		4	0, 4	5
40	175		4	0, 5	3

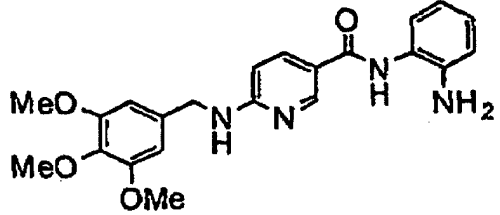
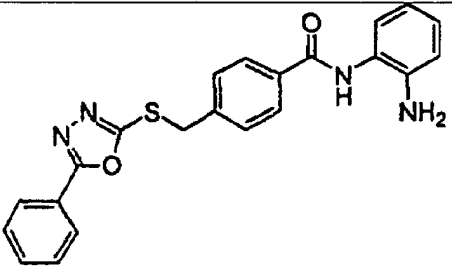
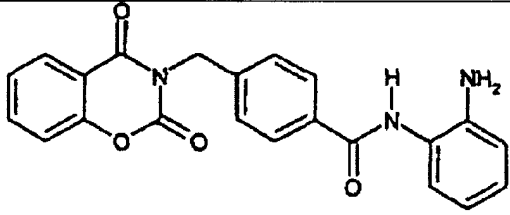
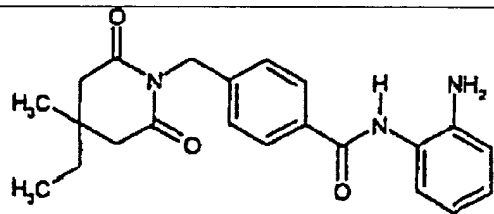
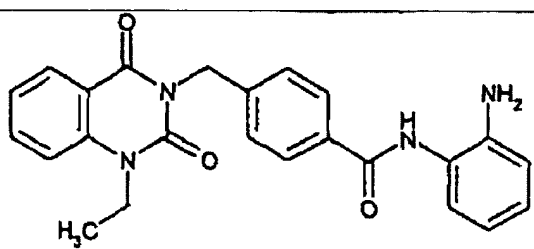
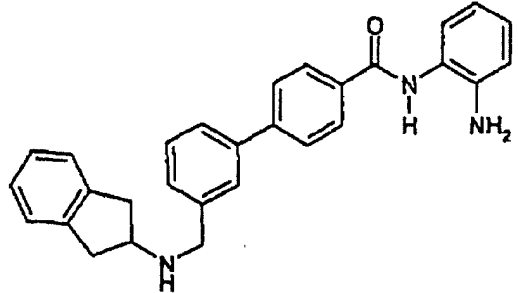
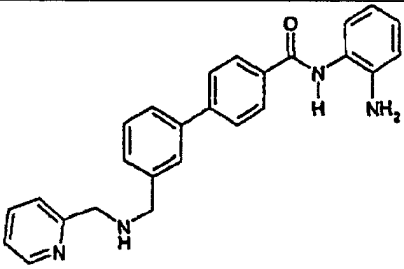
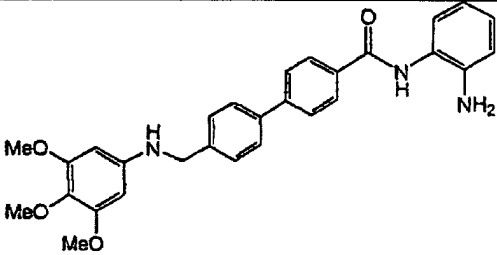
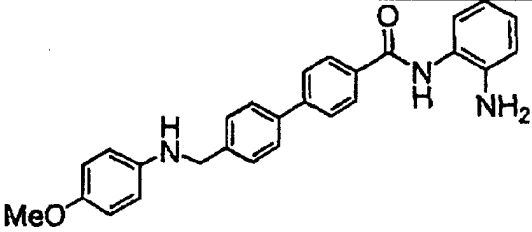
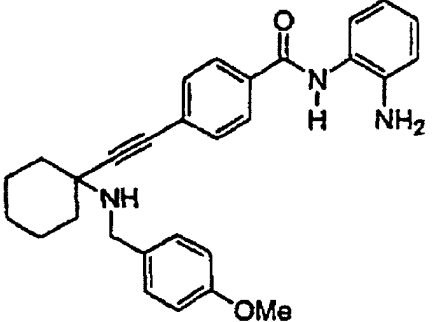
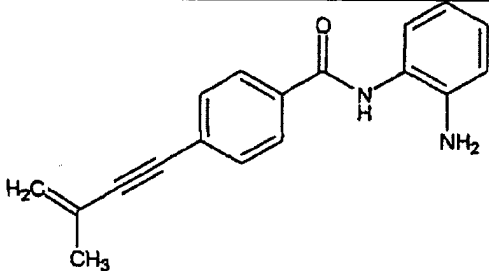
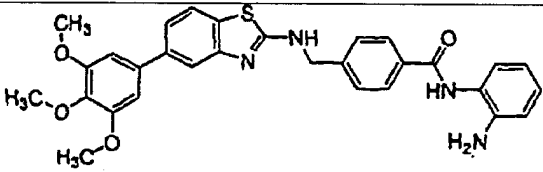
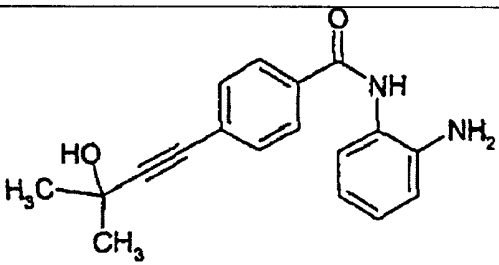
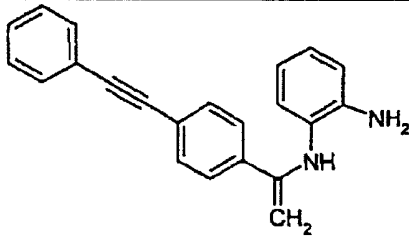
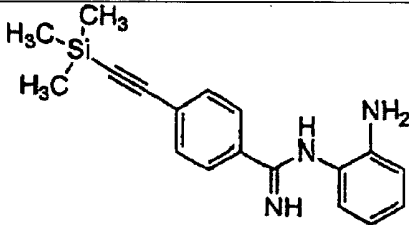
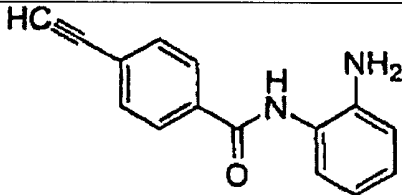
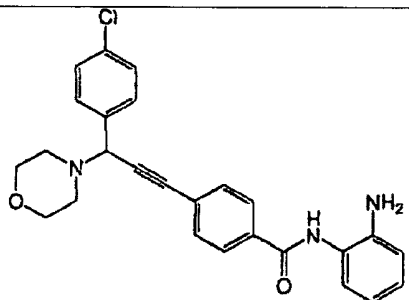
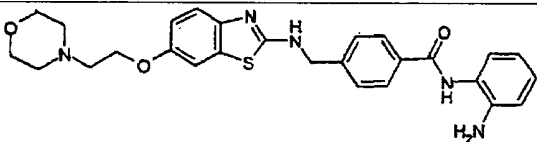
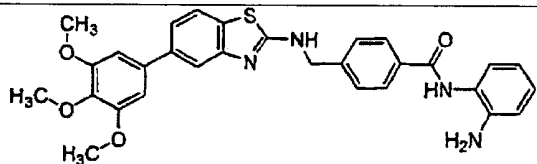
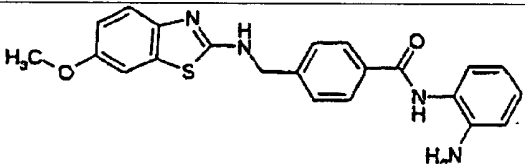
176		5	1	3
177		1	0, 4	1

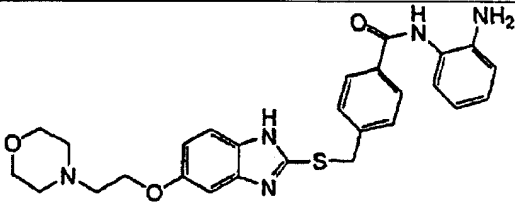
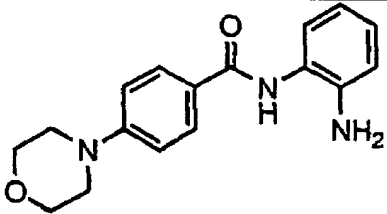
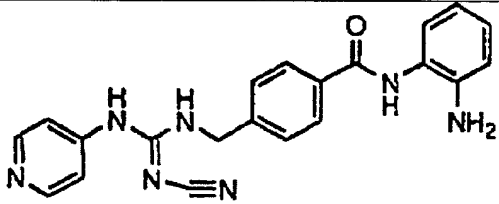
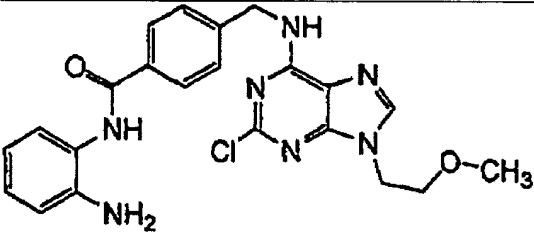
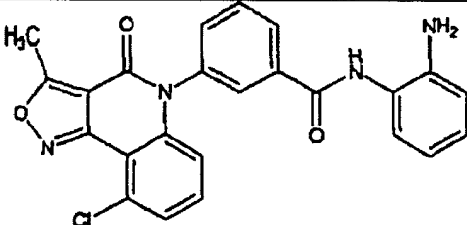
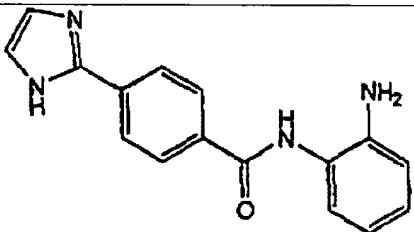
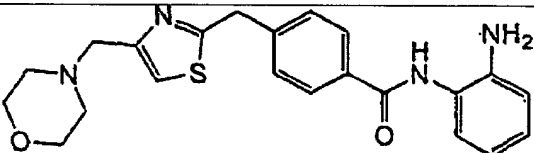
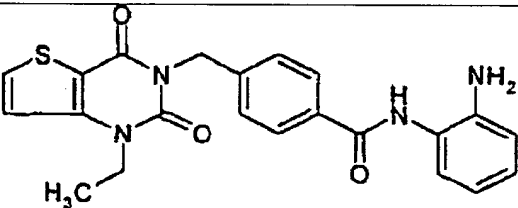
TABLA 5f

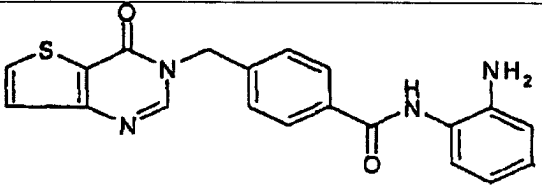
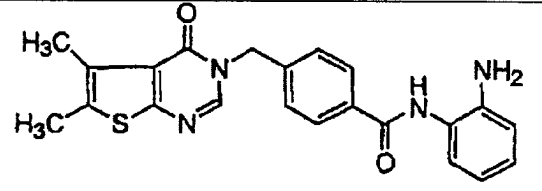
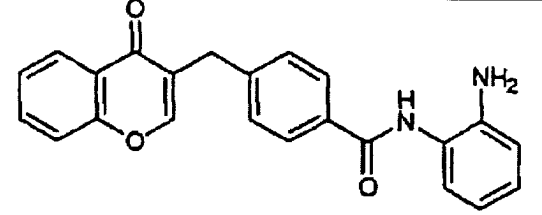
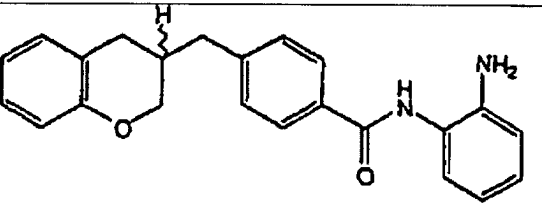
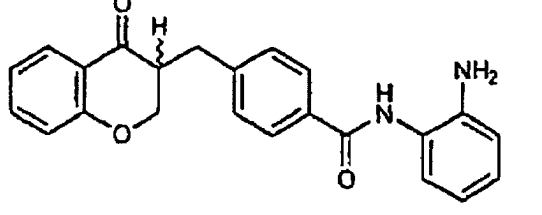
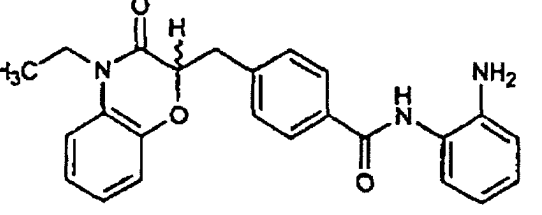
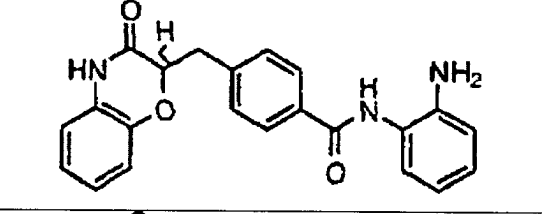
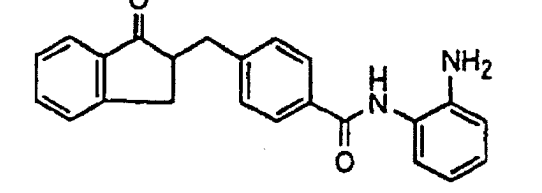
Ej.	Comp.	Estructura	CI ₅₀ (μM) de HDAC-1 humana	CI ₅₀ (μM) de MTT (HCT116)	CE ₅₀ (μM) de H4Ac (T24)
117	179		1	0, 3	1
118	180		3	2	5
119	181		0, 5	0, 4	1
122	186		2	2	2

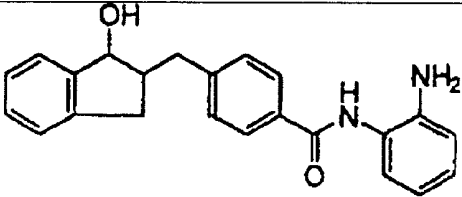
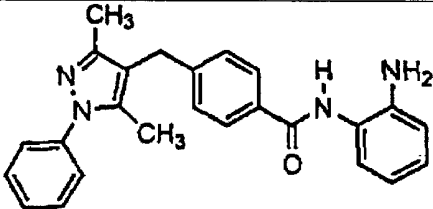
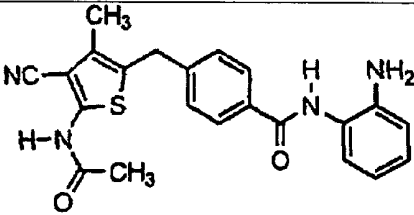
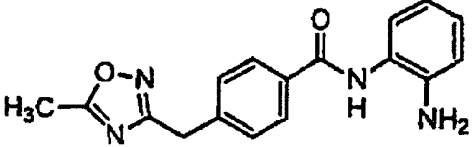
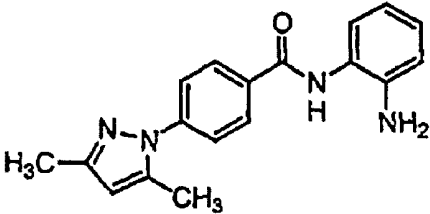
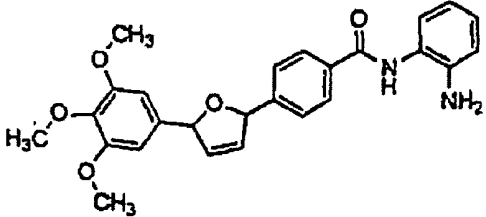
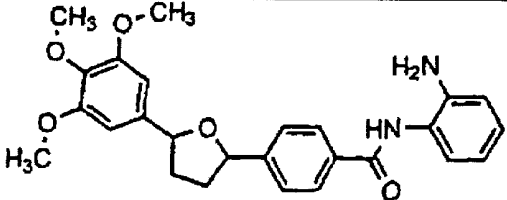
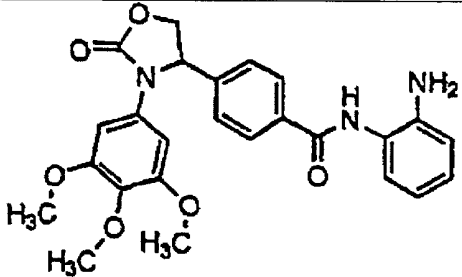
5	123	187		2	5	2
10						
15	125	189		3	2	5
20						
25	126	190		3	1	>5
30						
35	127	192		2	1	3
40						
45	128	193		4	16	
50						
55	129	194		3	11	
60						

130	195		7	9	
131	196		4	3	
132	198		24	14	
133	199		7	9	
134	201		11	5	
144	228		3	0, 3	1
145	231		4	1	3
146	233		0, 9	0, 3	1

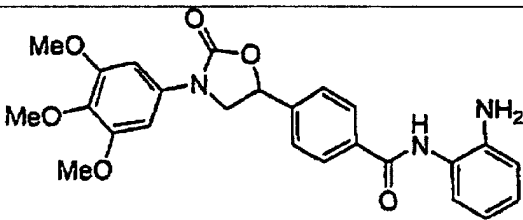
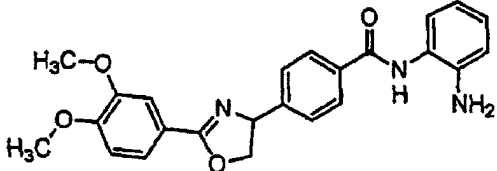
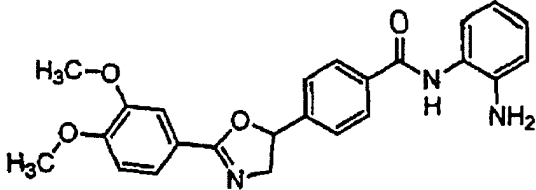
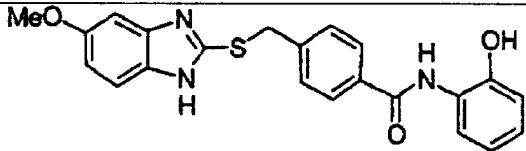
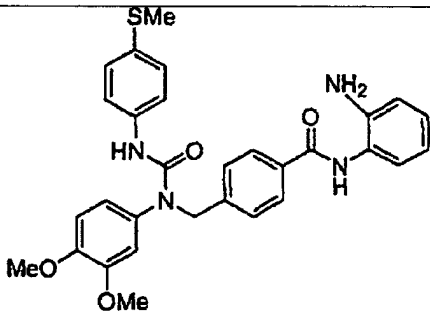
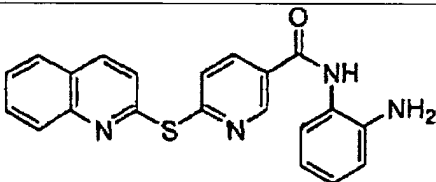
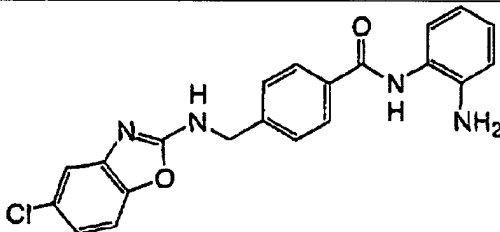
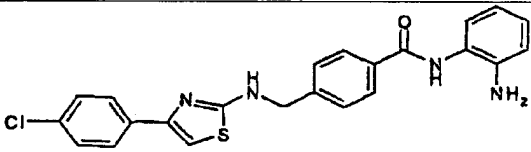
ES 2 341 857 T3

5	147	236		5	6	
10	148	238		3	6	
20	149	240		1, 8	10	
30	150	243		2	0, 8	1
40	151	247		3	0, 6	2
50	152	249		4	1	2
55	153	252		8	1	2
65	154	255		2	0, 8	1

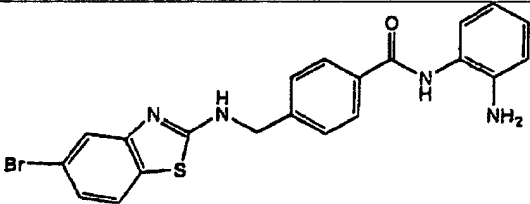
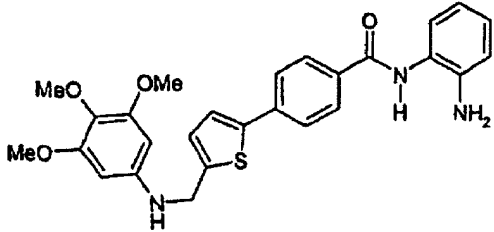
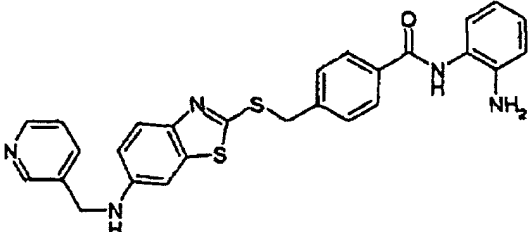
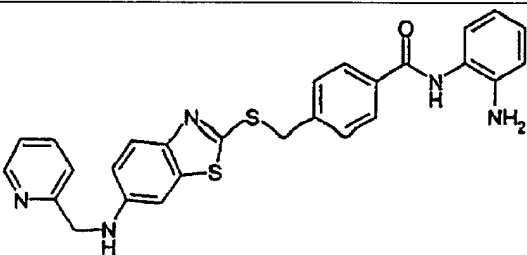
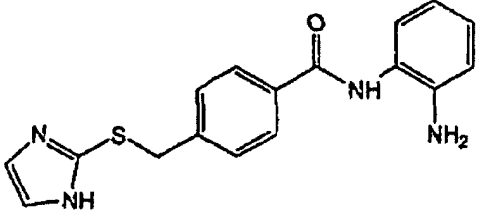
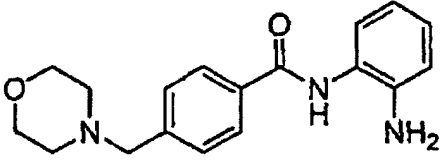
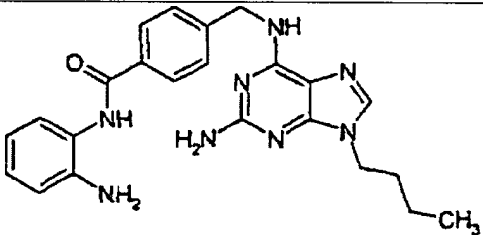
5	155	257		0, 4	0, 4	1
10	156	259		3	0, 3	1
15	157	262		0, 5	0, 3	1
20	158	265		2	2	3
25	159	266		0, 4	0, 9	2
30	160	269		9	4	
35	161	270		4	1	5
40	162	272		2	0, 6	<1

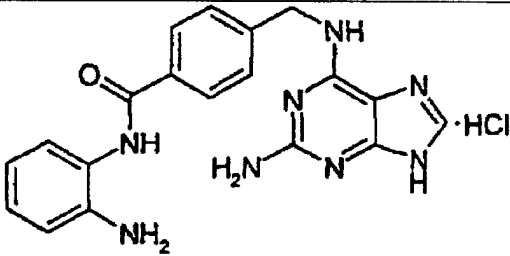
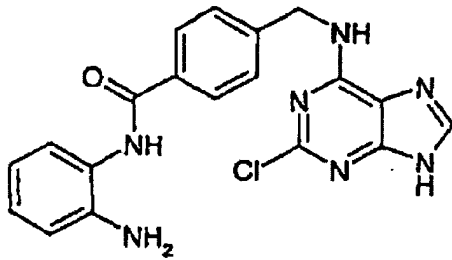
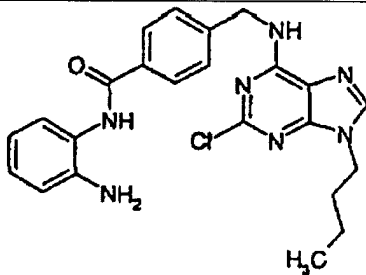
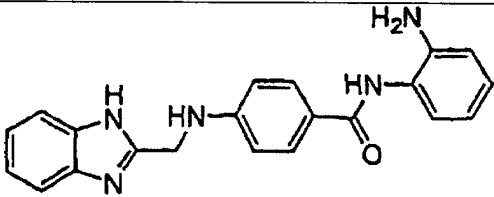
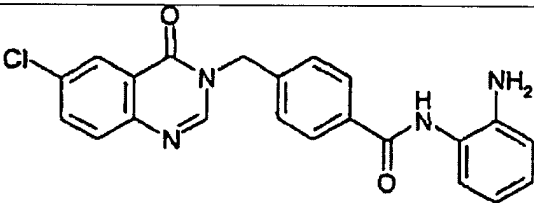
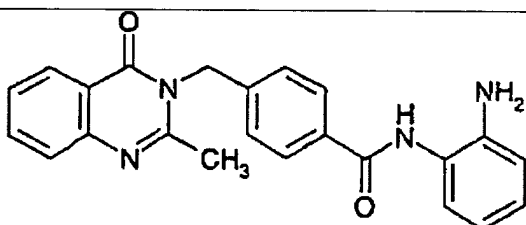
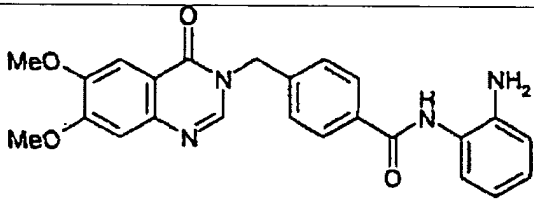
5	163	275		4	0,9	2
10	164	277		4	0,3	1
15	165	281		0,5	0,6	1
20	166	284		3	5	
25	167	286		5	2	
30	168	289		17	5	
35	169	290		11	3	
40	170	296		20	7	
45						
50						
55						
60						
65						

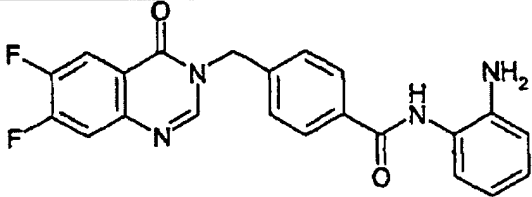
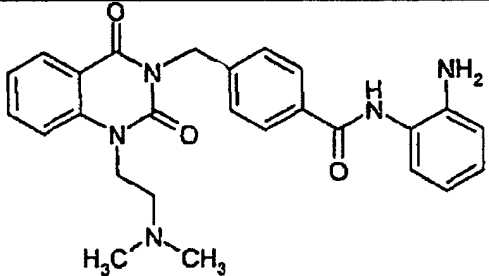
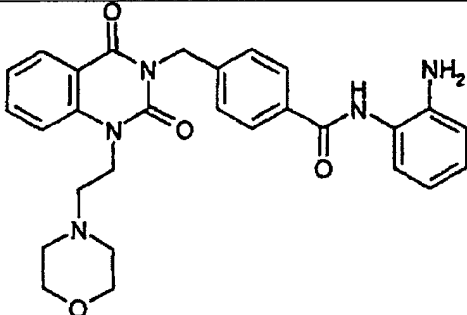
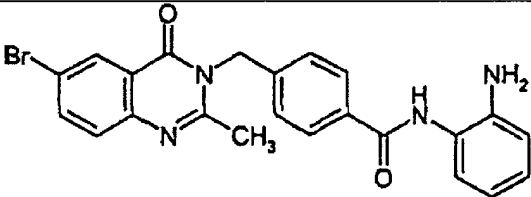
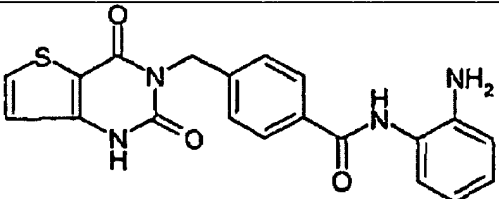
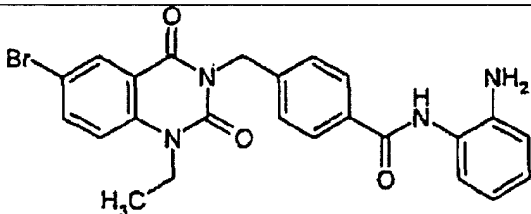
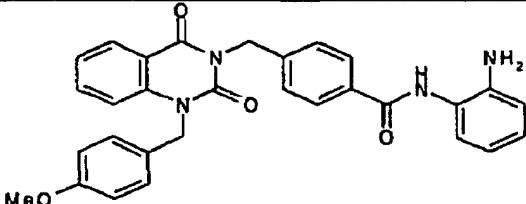
ES 2 341 857 T3

5	171	297		7	0, 4	1
10	172	301		3	3	
15	173	305		4	2	
20	174	311		0, 9	0, 7	1
25	178	317		2	0, 3	1
30	179	319		4	8	
35	180	320		2		1
40	181	321		0, 5	0, 3	5

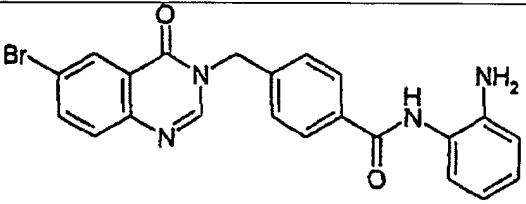
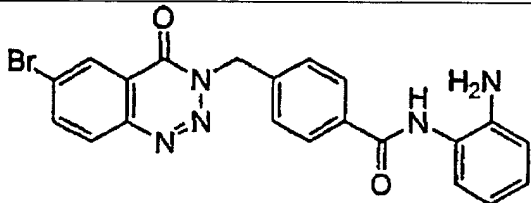
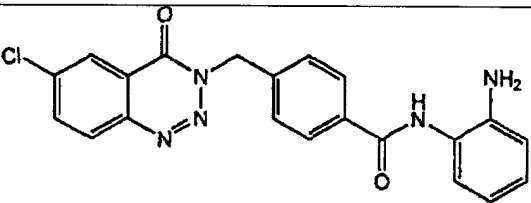
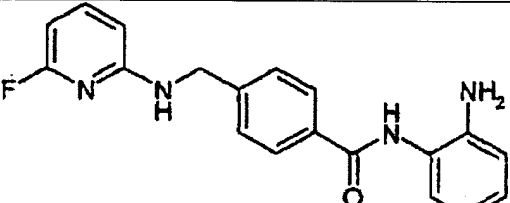
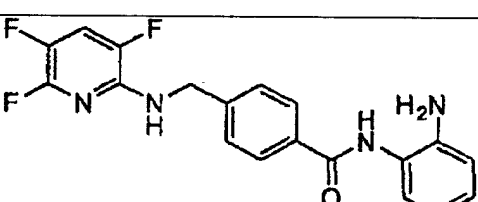
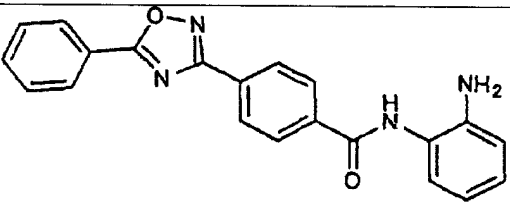
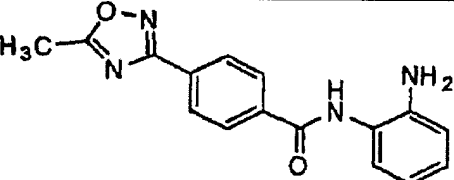
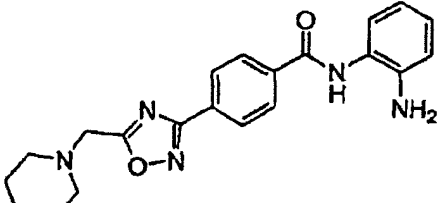
ES 2 341 857 T3

5	182	322		0, 7	0, 4	2
10	183	323		1	0, 6	1
20	184	325		0, 3	1	2
30	185	326		1	1	3
40	186	327		2	5	3
50	187	328		17	10	
55	189	330		3	2	1

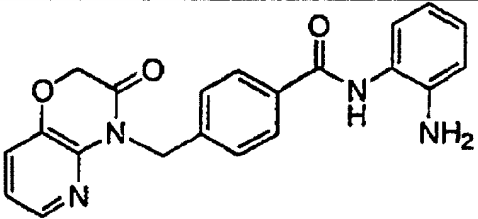
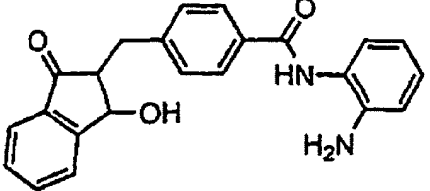
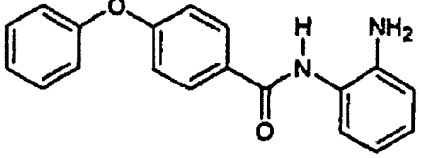
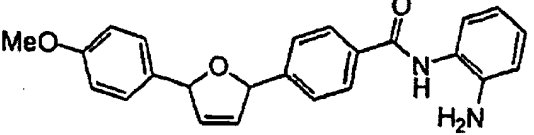
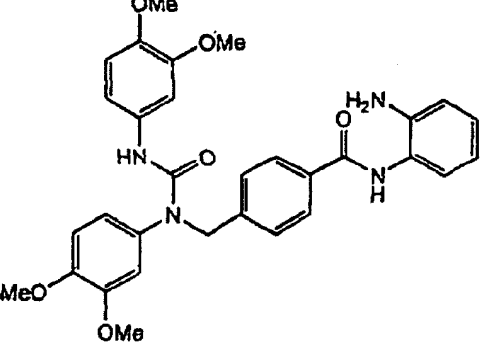
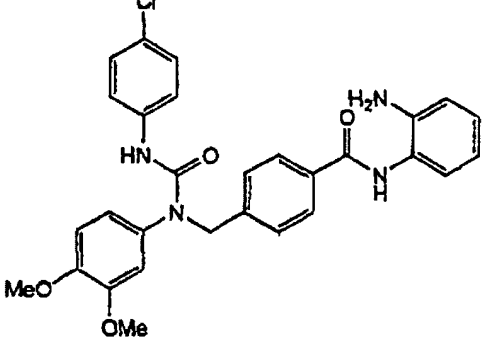
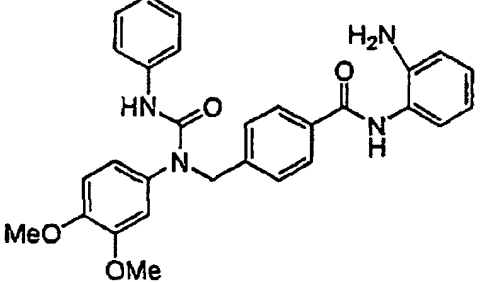
190	331		4	10	
191	332		0, 4	1	5
192	333		2	0, 1	1
193	334		8	0, 2	1
195	336		1	0, 4	<1
196	337		3	0, 6	1
197	338		2	0, 5	3

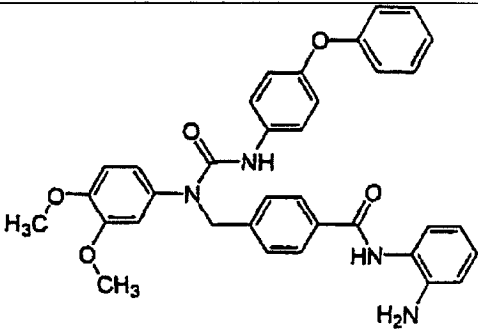
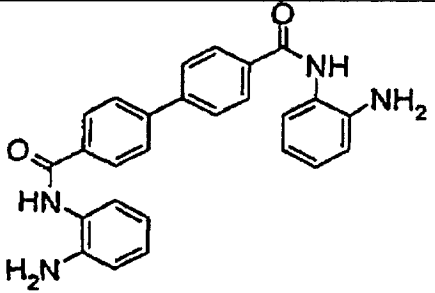
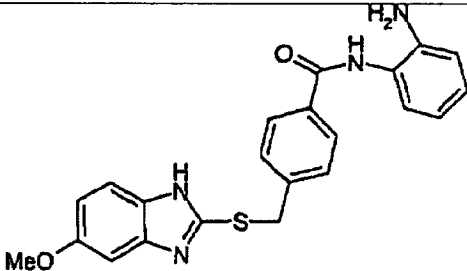
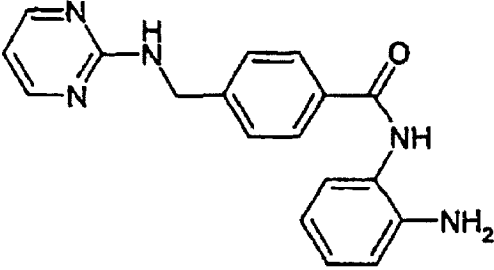
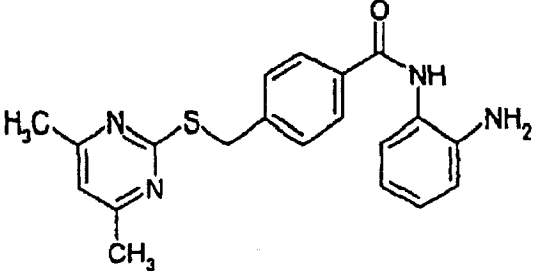
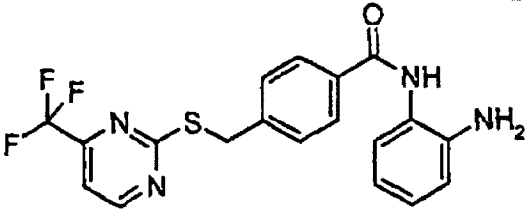
198	339		4	3	
199	340		2	1	1
200	341		4	1	3
201	342		3	0, 4	1
202	343		0, 5	0, 3	1
203	344		0, 5	0, 2	1
204	345		0, 4	0, 8	1

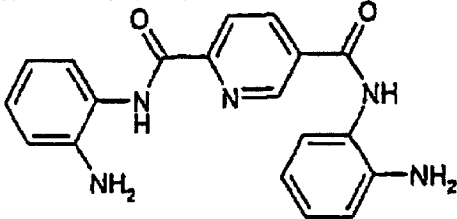
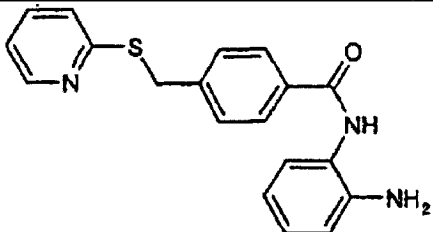
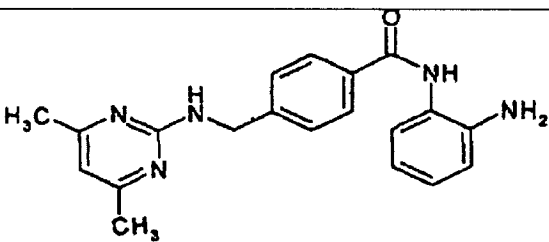
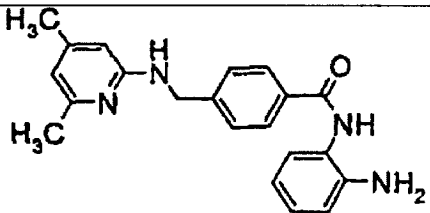
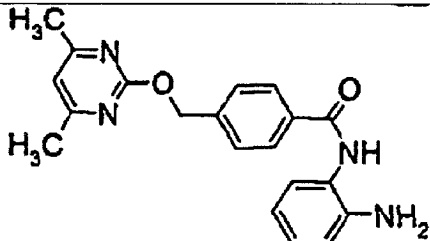
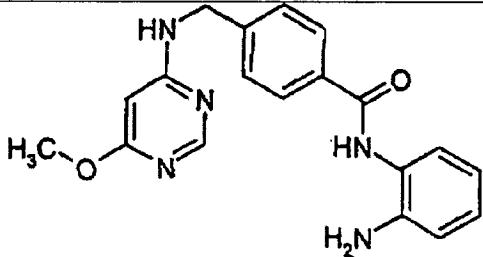
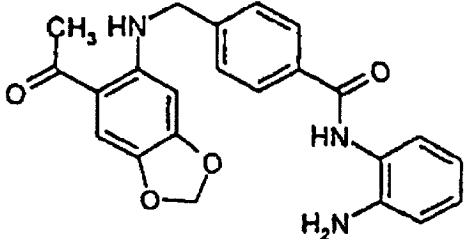
ES 2 341 857 T3

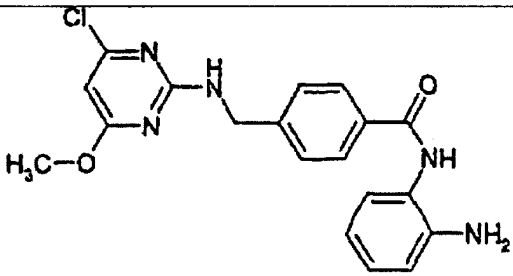
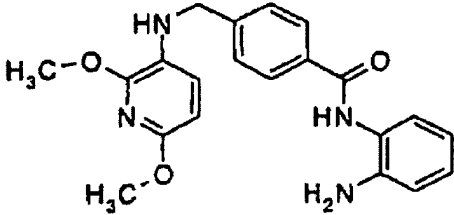
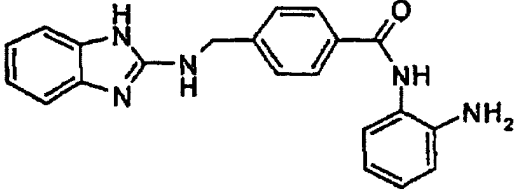
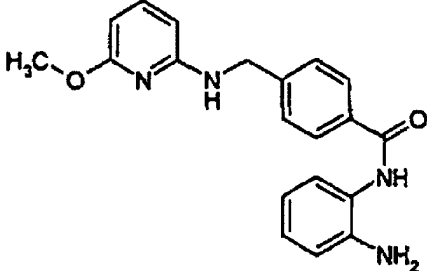
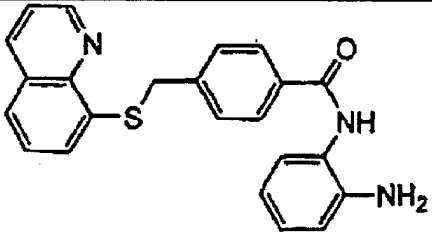
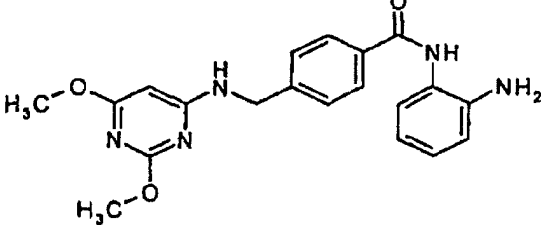
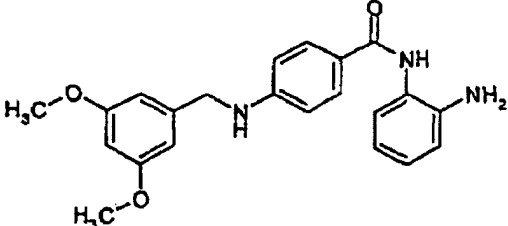
5	205	346		3	0,5	<1
10	206	347		2	0,6	2
15	207	348		2	0,3	1
20	208	349		13	1	3
25	209	350		2	1	5
30	211	352		16	9	
35	212	353		3	10	
40	213	354		15	5	
45						
50						
55						
60						
65						

214	355		25	10	
215	356		5	2	
216	357		4	0, 4	2
217	358		3	1	2
218	359		2	0, 3	1
219	360		5	0, 2	1
220	361		2	0, 5	1
221	362		2	0, 7	1
222	363		1	0, 3	3

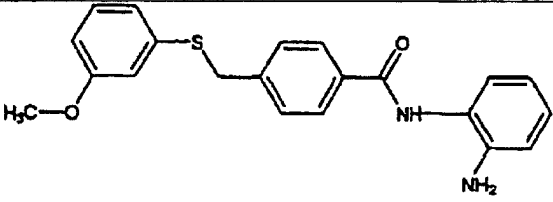
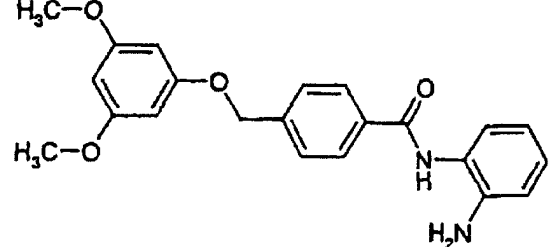
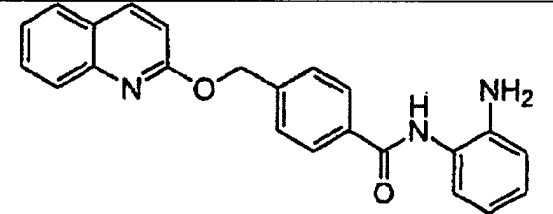
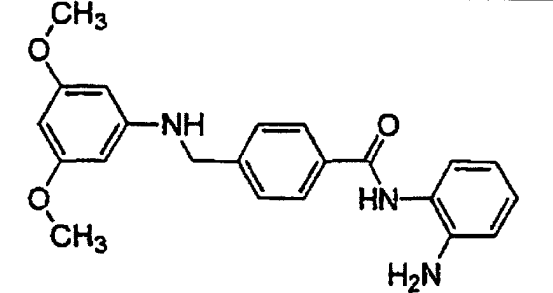
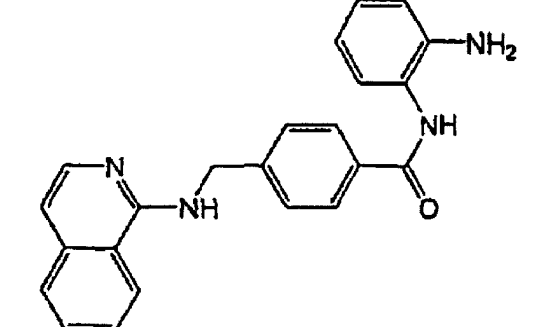
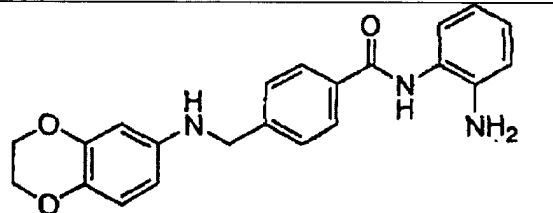
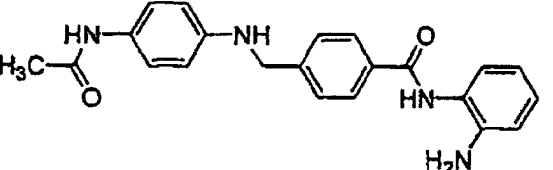
5	223	364		4	0, 6	
10	224	365		3	0, 6	3
20	225	366		14	10	
25	226	367		6	2	5
30	230	371		4	0, 5	2
45	231	372		2	0, 2	1
60	232	373		4	0, 4	1

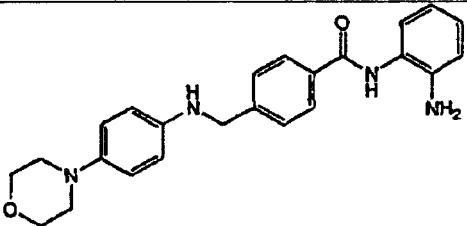
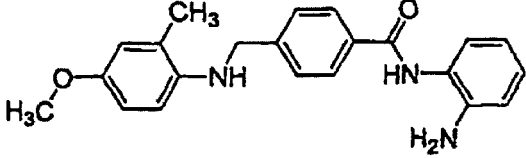
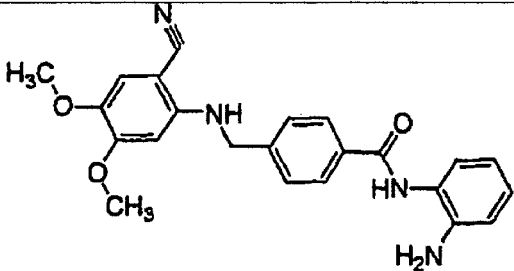
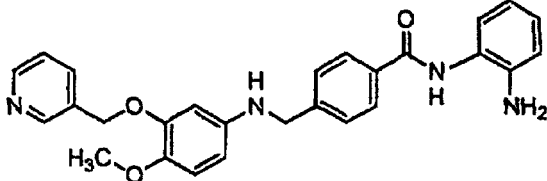
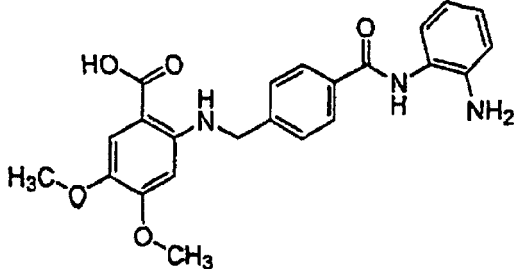
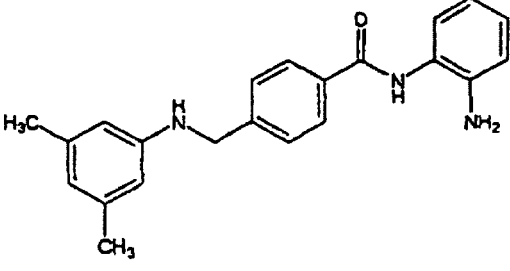
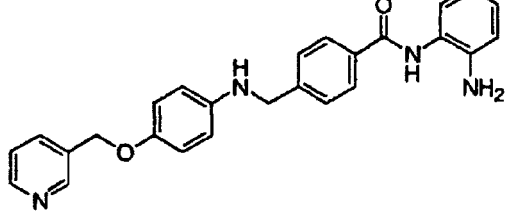
233	374		2, 5	0, 3	1
234	375		3	4	25
235	376		3	0, 1	1
236	377		4	2	3
237	378		2	0, 7	2
238	379		2	0, 6	15

5	239	380		6	8	
10	240	381		2	1	2
15	241	382		3	1	3
20	242	383		2	0, 5	2
25	243	384		3	2	5
30	244	385		3	1	2
35	245	386		3	1	1
40						
45						
50						
55						
60						
65						

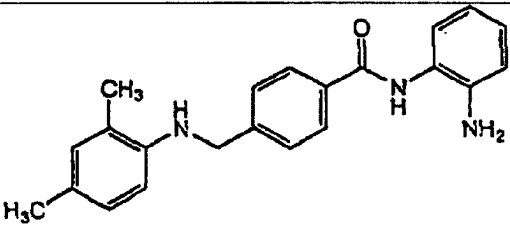
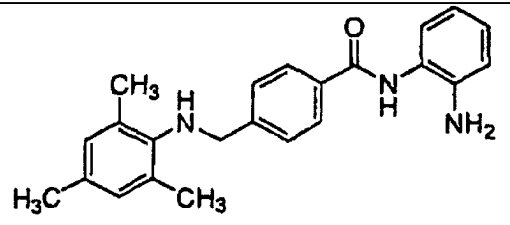
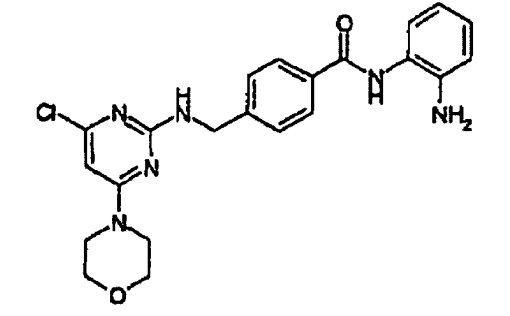
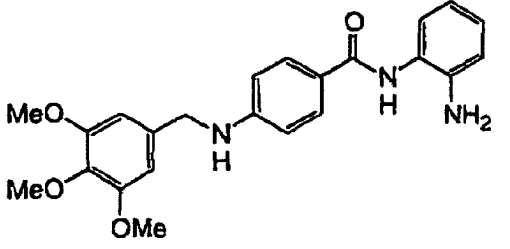
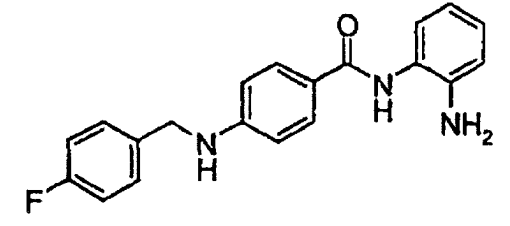
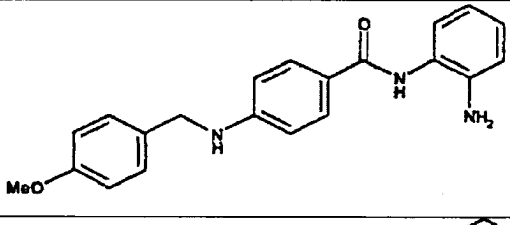
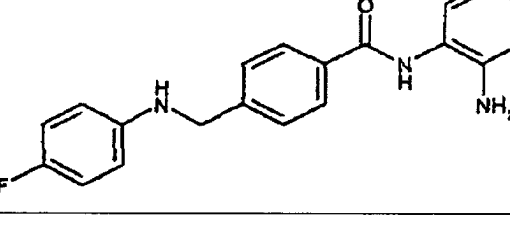
5	246	387		2	1	1
10						
15	247	388		3	0, 4	5
20						
25	248	389		3	0, 2	1
30						
35	249	390		2	0, 8	5
40						
45	250	391		1	0, 9	3
50						
55	251	392		4	1	1
60						
65	252	393		4	0, 6	1

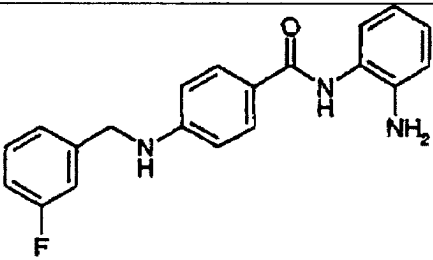
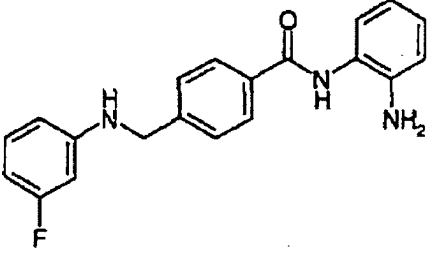
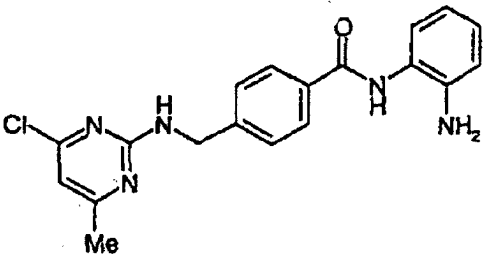
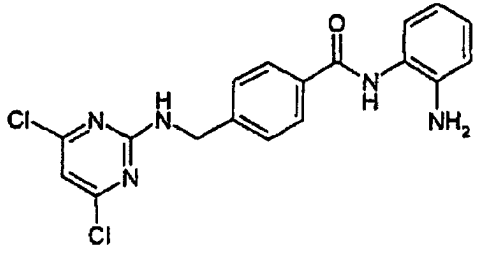
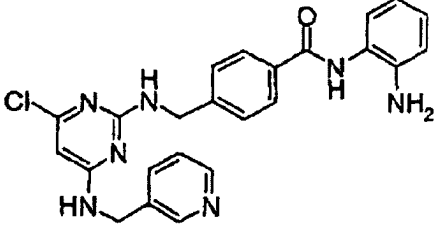
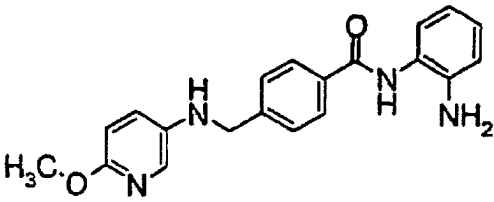
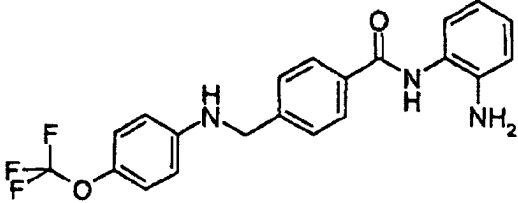
ES 2 341 857 T3

5	253	394		4	2	25
10	254	395		2	1	5
20	255	396		2	0, 7	5
30	256	397		1	0, 6	4
40	258	399		14	9	
55	259	400		8	0, 3	2
60	260	401		6	0, 3	2

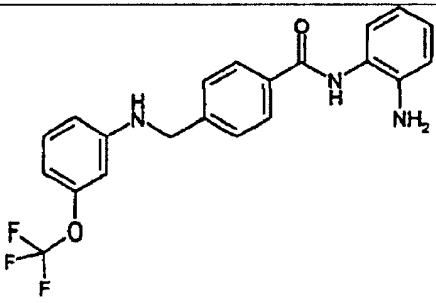
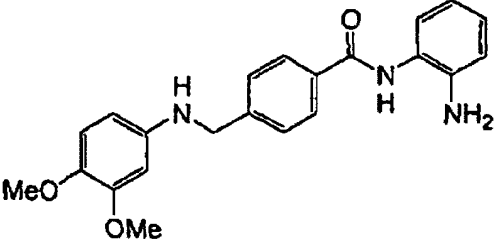
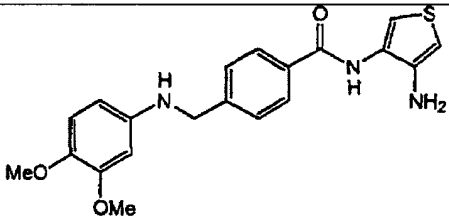
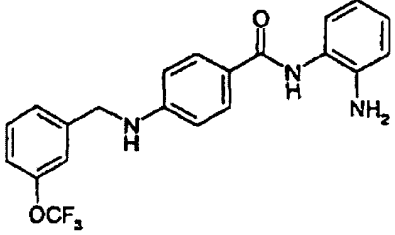
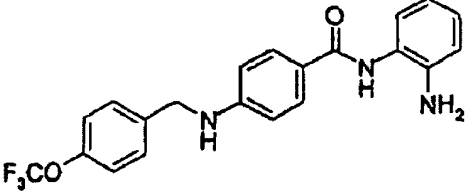
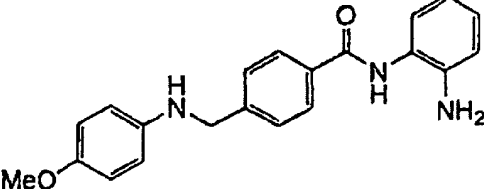
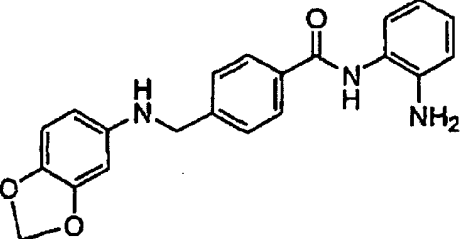
5	261	402		14	0, 4	1
10	262	403		1	0, 2	1
15	263	404		3	0, 6	5
20	264	405		5	1	5
25	265	406		3	11	
30	266	407		3	2	
35	267	408		4	2	

ES 2 341 857 T3

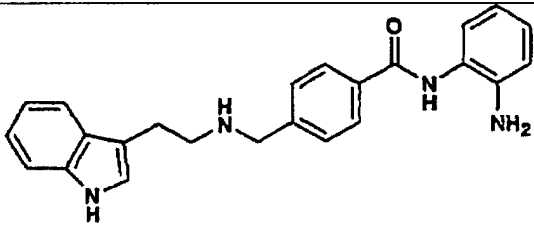
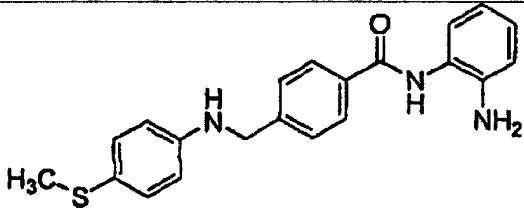
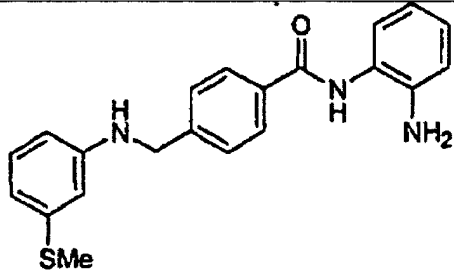
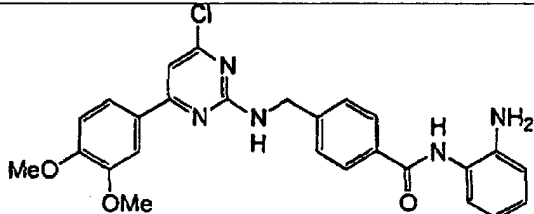
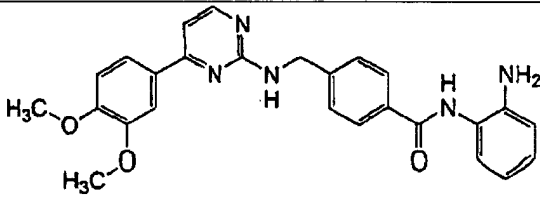
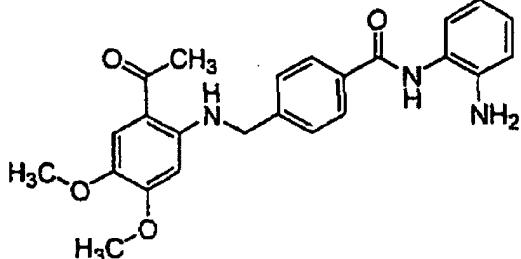
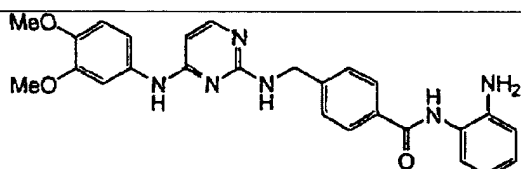
5	268	409		3	1	9999
10	269	410		0, 9	0, 1	>5
15	270	411		2		1
20	271	412		3	2	3
25	272	413		2	2	3
30	273	414		3	1	1
35	274	415		3	1	3

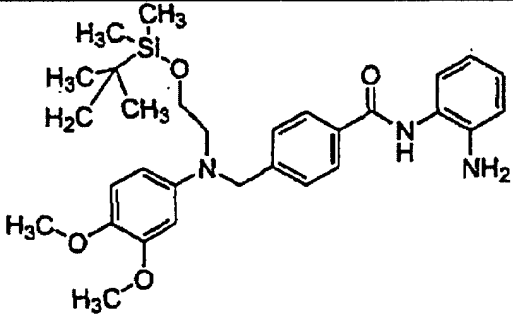
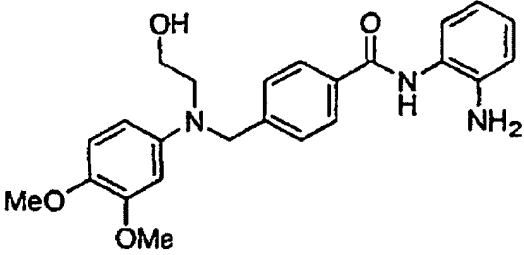
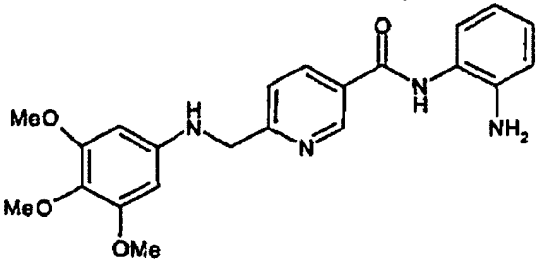
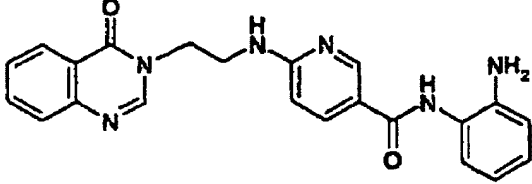
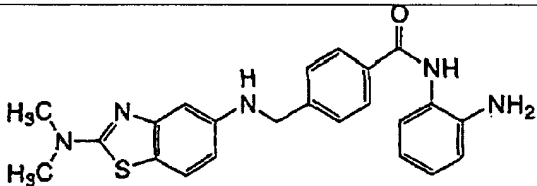
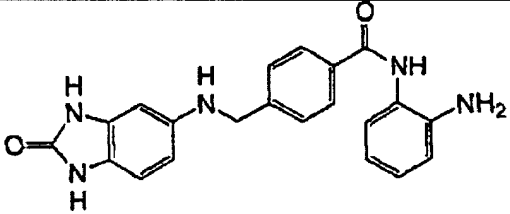
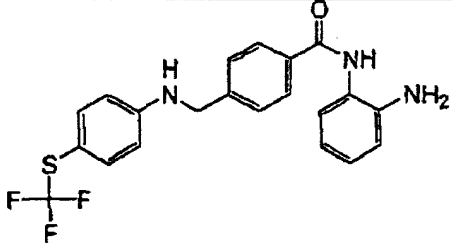
5	275	416		3	0,6	1
10						
15	276	417		3	1	1
20						
25	277	418		3	0,9	2
30						
35	278	419		2	1	5
40						
45	279	420		3	0,7	1
50						
55	280	421		4	0,6	1
60						
65	281	422		<0,05	0,9	5

ES 2 341 857 T3

282	423		0,5	1	3
283a	424b		2	0,4	1
283b	424c		3	0,8	3
284	425		2	0,6	5
285	426		2	1	10
286	427		0,6	2	1
287	428		0,7	0,7	1

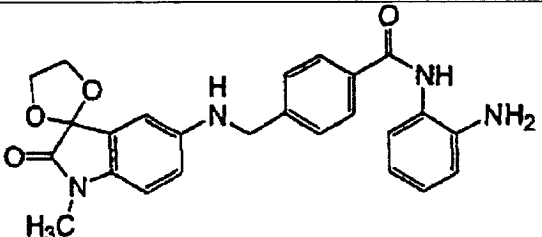
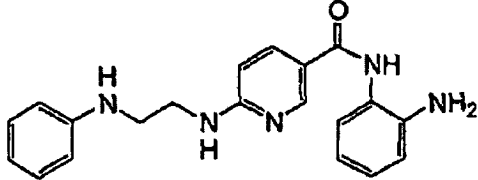
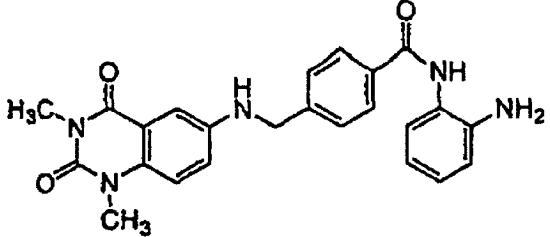
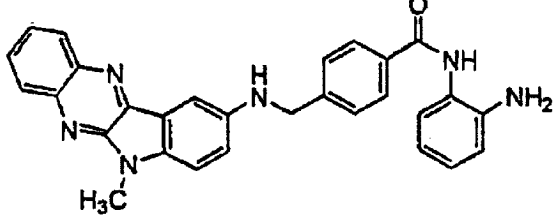
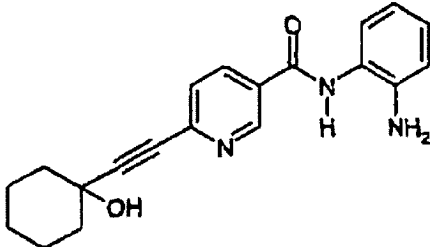
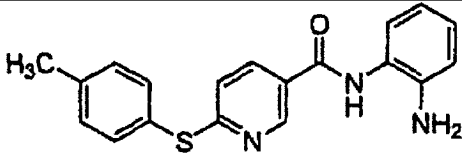
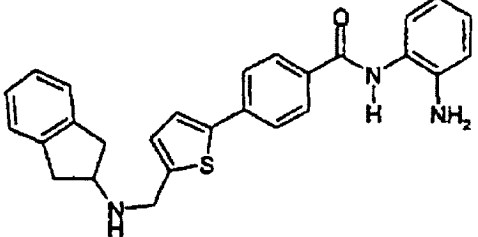
288	429		4	0,9	1
289	430		5	0,7	1
290	431		5	5	
291	432		2	1	3
292	432		2	0,6	1
293	434		4	0,6	2
294	435		3	0,6	1

5	295	436		5	0,8	5
10	296	437		3	0,4	1
15	297	438		5	0,6	1
20	298	439		3	0,4	1
25	299	440		4	0,1	2
30	300	441		2	0,8	2
35	301	442		17	0,4	1

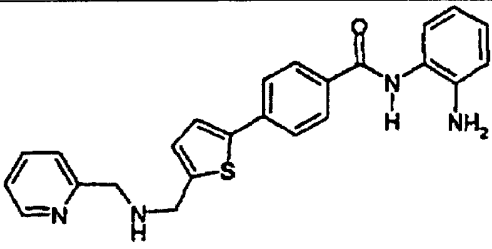
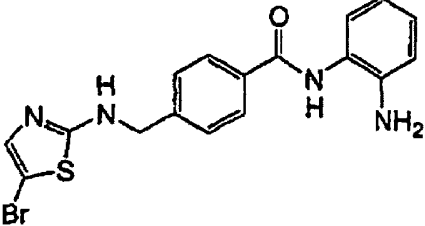
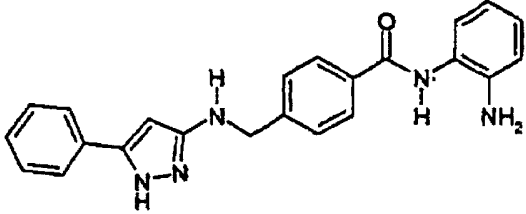
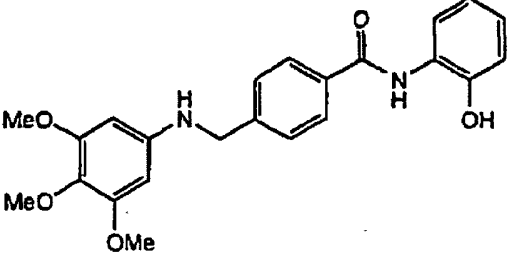
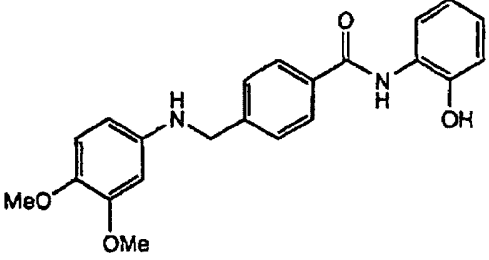
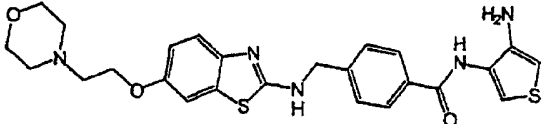
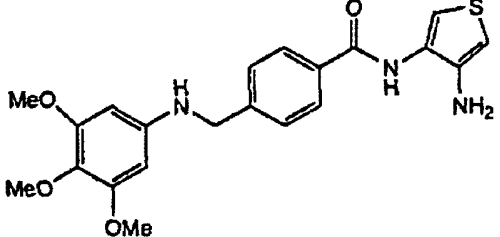
302	443				
303	444				
304	445		16	6	
305	446		21	7	
307	448		3	0, 2	2
308	449		1	6	
309	450		3	2	

ES 2 341 857 T3

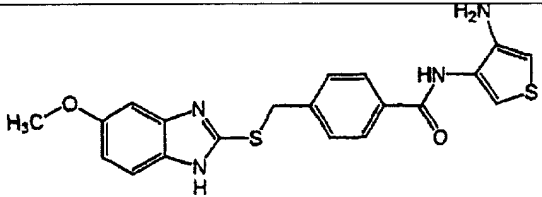
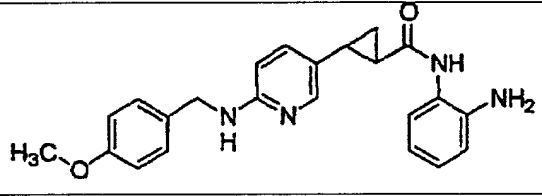
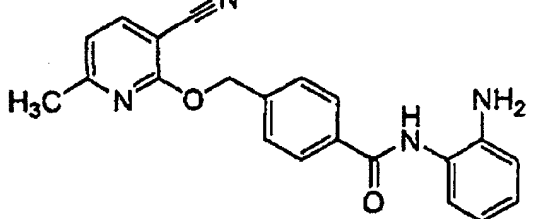
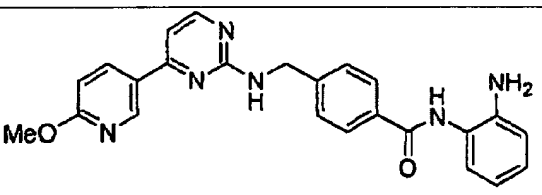
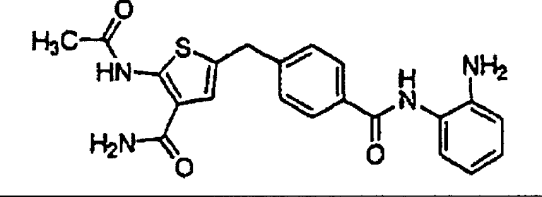
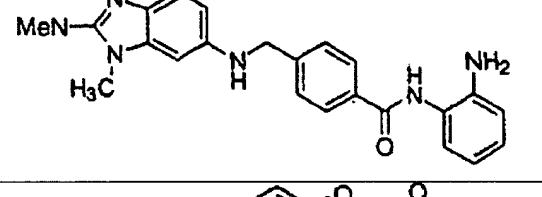
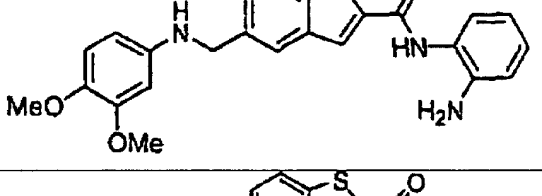
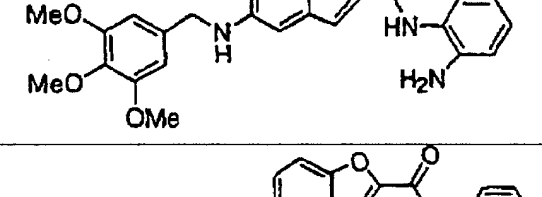
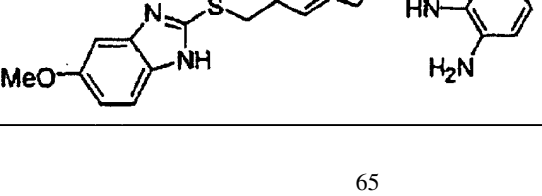
5	310	451		4	0, 2	3
10	311	452		3	0, 3	2
15	312	453		9999	37	
20	313	454		4	2	5
25	314	455		4	0, 7	1
30	315	456		3	0, 4	8888
35	316	457		9999	9999	
40	317	458		3	0, 3	2

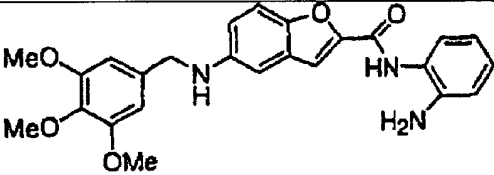
5	318	459		4	0, 3	1
10	319	460		3	1	1
15	320	461		1, 4	0, 3	1
20	321	462		4	0, 3	1
25	322	463		12	6	
30	323	464		4	11	
35	324	465		2	9999	9999

ES 2 341 857 T3

5	325	466		3	2	1
10	326	467		4	0, 4	2
15	327	468		2	8	<1
20	426	571		4	11	
25	427	572		1, 5	5	5
30	428	573		7	0, 4	1
35	429	574		13	0, 7	3

ES 2 341 857 T3

5	430	575		2	0, 2	1
10	431	576		5	6	
15	432	577		2	0, 5	2
20	433	578		0, 6	0, 1	1
25	434	579		2	0, 5	1
30	435	580		4	0, 3	<1
35	436	587		5	0, 8	2
40	437	590		2	2	3
45	438	591		4	0, 3	<1

439	592		5	0,4	<1
-----	-----	---	---	-----	----

Ejemplo de ensayo 2

Efectos antineoplásicos de los inhibidores de histona desacetilasas sobre xenoinjertos de tumores humanos in vivo

Se inyectaron por vía subcutánea a ratones desnudos BALB/c hembra de ocho a diez semanas de edad (Taconic Labs, Great Barrington, NY) en la zona del flanco 2×10^6 células de carcinoma colorrectal humano HCT116 preacondicionadas. Se realizó el preacondicionamiento de estas células mediante un mínimo de tres trasplantes de tumores consecutivos en la misma cepa de ratones desnudos. Posteriormente, se cortaron fragmentos de tumores de aproximadamente 30 mg y se implantaron subcutáneamente en ratones, en la zona del flanco izquierdo, bajo anestesia con Forene (Abbott Labs, Ginebra, Suiza). Cuando los tumores alcanzaron un volumen medio de 100 mm^3 , se trataron los ratones por vía intravenosa, por vía subcutánea o por vía intraperitoneal mediante inyección diaria, con una disolución del inhibidor de histona desacetilasas en un vehículo apropiado, tal como PBS, DMSO/agua o Tween 80/agua, a una dosis de partida de 10 mg/kg. Se estableció la dosis óptima del inhibidor de HDAC mediante experimentos de dosis-respuesta según protocolos convencionales. Se calculó el volumen tumoral cada segundo día tras la infusión según métodos convencionales (por ejemplo, Meyer *et al.*, Int. J. Cáncer 43: 851-856 (1989)). El tratamiento con los inhibidores de HDAC según la invención provocó una reducción significativa en el volumen y peso tumorales en relación con los controles tratados con vehículo solamente (es decir, sin inhibidor de HDAC). Además, el nivel de acetilación de histonas cuando se midió estaba significativamente elevado en relación con los controles. Los datos para los compuestos seleccionados se presentan en la tabla 6. La figura 1 muestra los resultados experimentales completos para el compuesto 106, que inhibe el crecimiento tumoral en un 80%. Las figuras 2-10 muestran los resultados de compuestos adicionales sometidos a prueba.

TABLA 6

Actividad antitumoral en el modelo de tumor colorrectal HCT 116 in vivo

Compuesto	% de inhibición del crecimiento tumoral
106	80 ^a
126	62 ^b
9	51 ^b
87	30 ^b
157	66 ^a
167	58 ^a
15	26 ^b
168	26 ^b
16	50 ^b
154	23 ^a
98	52 ^a

a: 20 mg/kg i.p.

b: 40 mg/kg i.p.

TABLA 7

Efectos antineoplásicos de inhibidores de histona desacetilasas sobre modelos de xenoinjertos en ratones desnudos

Comp.	% de inhibición del crecimiento tumoral				
	A 549 (v.o.)	SW 48 (v.o.)	A 549 (i.p.)	HCT 116 (i.p.)	SW 48 (i.p.)
106	40% (70 mg/kg)	16% (60 mg/kg)	-	-	-
164	42% (70 mg/kg)	62% (60 mg/kg)	-	37% (20 mg/kg)	99% (25 mg/kg)
228	45% (70 mg/kg)	25% (60 mg/kg)	64% (20 mg/kg)	45% (20 mg/kg)	68% (20 mg/kg)
424b	67% (50 mg/kg)	78% (30 mg/kg)	60% (50 mg/kg)	77% (75 mg/kg)	68% (25 mg/kg)

Ejemplo de ensayo 3

Efecto antineoplásico combinado de inhibidores de histona desacetilasas y oligonucleótidos antisentido de histona desacetilasas sobre células tumorales in vivo

El fin de este ejemplo es ilustrar la capacidad del uso combinado de un inhibidor de histona desacetilasas y un oligonucleótido antisentido de histona desacetilasas para potenciar la inhibición del crecimiento tumoral en un mamífero. Preferiblemente, el oligonucleótido antisentido y el inhibidor de HDAC inhiben la expresión y actividad de la misma histona desacetilasa.

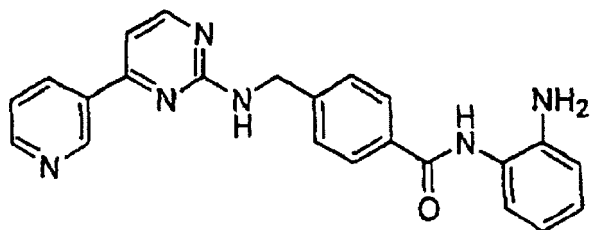
Tal como se describió en el ejemplo 126, se tratan diariamente ratones que llevan tumores HCT116 implantados (volumen medio de 100 mm³) con preparaciones salinas que contienen desde aproximadamente 0,1 mg hasta aproximadamente 30 mg por kg de peso corporal de oligonucleótido antisentido de histona desacetilasa. Se trata diariamente un segundo grupo de ratones con preparaciones farmacéuticamente aceptables que contienen desde aproximadamente 0,01 mg hasta aproximadamente 5 mg por kg de peso corporal de inhibidor de HDAC.

Algunos ratones reciben tanto el oligonucleótido antisentido como el inhibidor de HDAC. De estos ratones, un grupo puede recibir el oligonucleótido antisentido y el inhibidor de HDAC simultáneamente por vía intravenosa a través de la vena de la cola. Otro grupo puede recibir el oligonucleótido antisentido a través de la vena de la cola, y el inhibidor de HDAC por vía subcutánea. Todavía otro grupo puede recibir tanto el oligonucleótido antisentido como el inhibidor de HDAC por vía subcutánea. Se establecen de manera similar grupos control de ratones que no reciben tratamiento (por ejemplo, solución salina solamente), un oligonucleótido antisentido de apareamiento erróneo solamente, un compuesto control que no inhibe la actividad histona desacetilasa y un oligonucleótido antisentido de apareamiento erróneo con un compuesto control.

El volumen tumoral se mide con calibres. El tratamiento con el oligonucleótido antisentido más el inhibidor de la proteína histona desacetilasa provoca una reducción significativa en el volumen y peso tumorales en relación con los controles.

REIVINDICACIONES

1. Inhibidor de histona desacetilasas de fórmula (1):



o sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

2. Composición que comprende un compuesto según la reivindicación 1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

3. Uso del compuesto según la reivindicación 1 para la producción de un medicamento para inhibir la histona desacetilasa en una célula.

4. Uso de la composición según la reivindicación 2 para la producción de un medicamento para inhibir la histona desacetilasa en una célula.

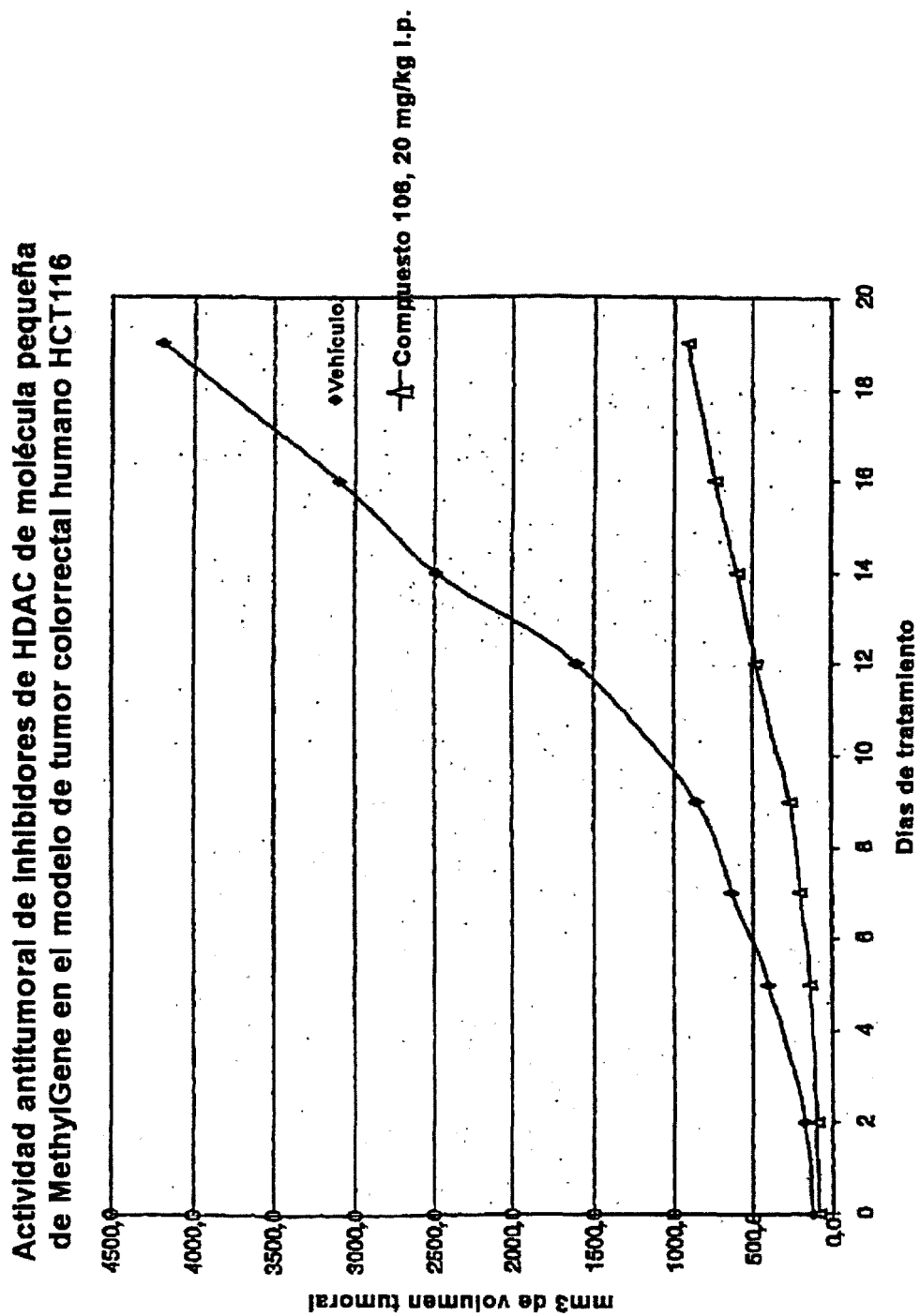


FIG. 1

Inhibición del crecimiento del tumor de cáncer de pulmón humano A549 mediante el compuesto 106 tras administración intraperitoneal

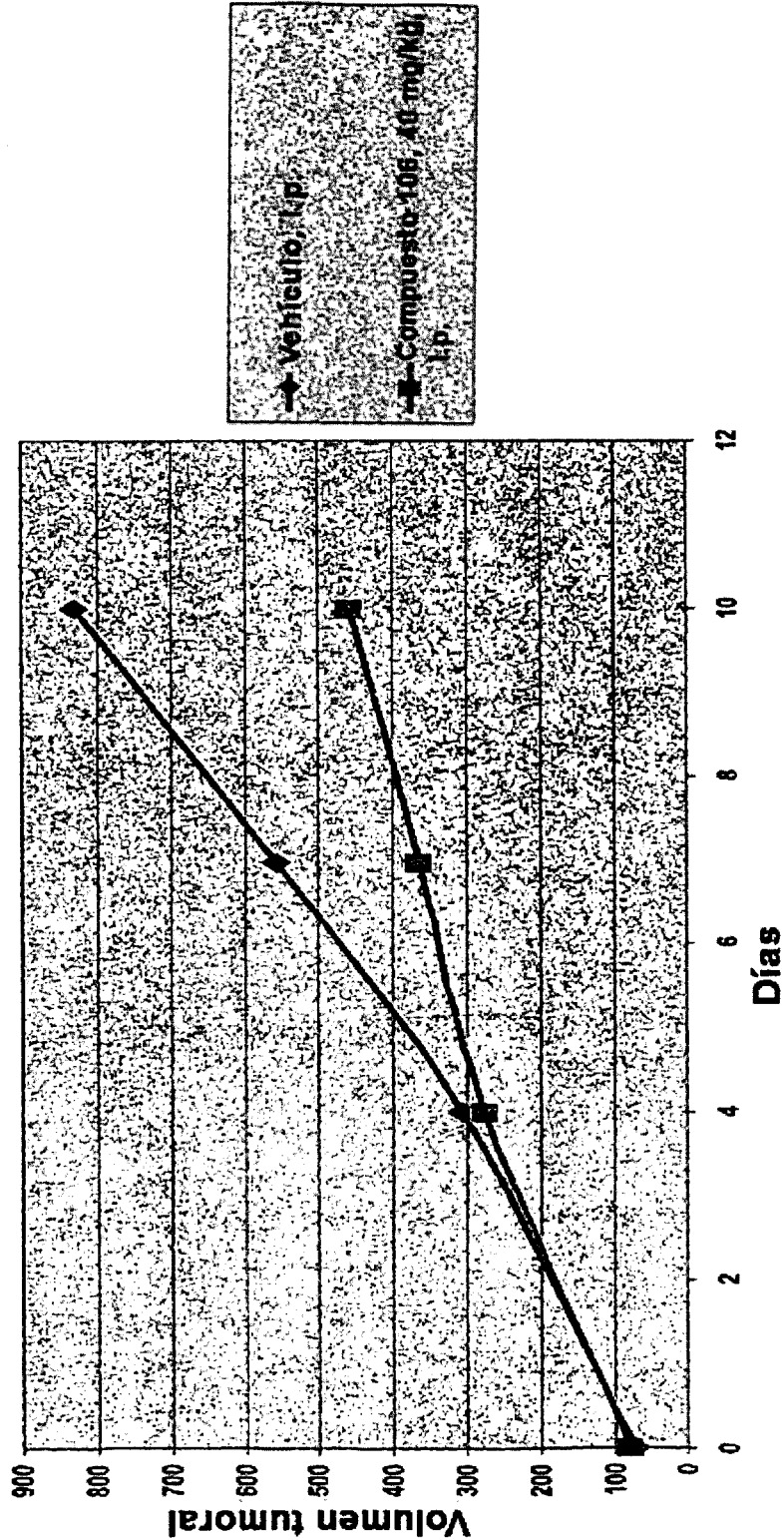


Fig. 2

Inhibición del crecimiento del tumor colorrectal humano HCT116 mediante el compuesto 164 tras administración intraperitoneal

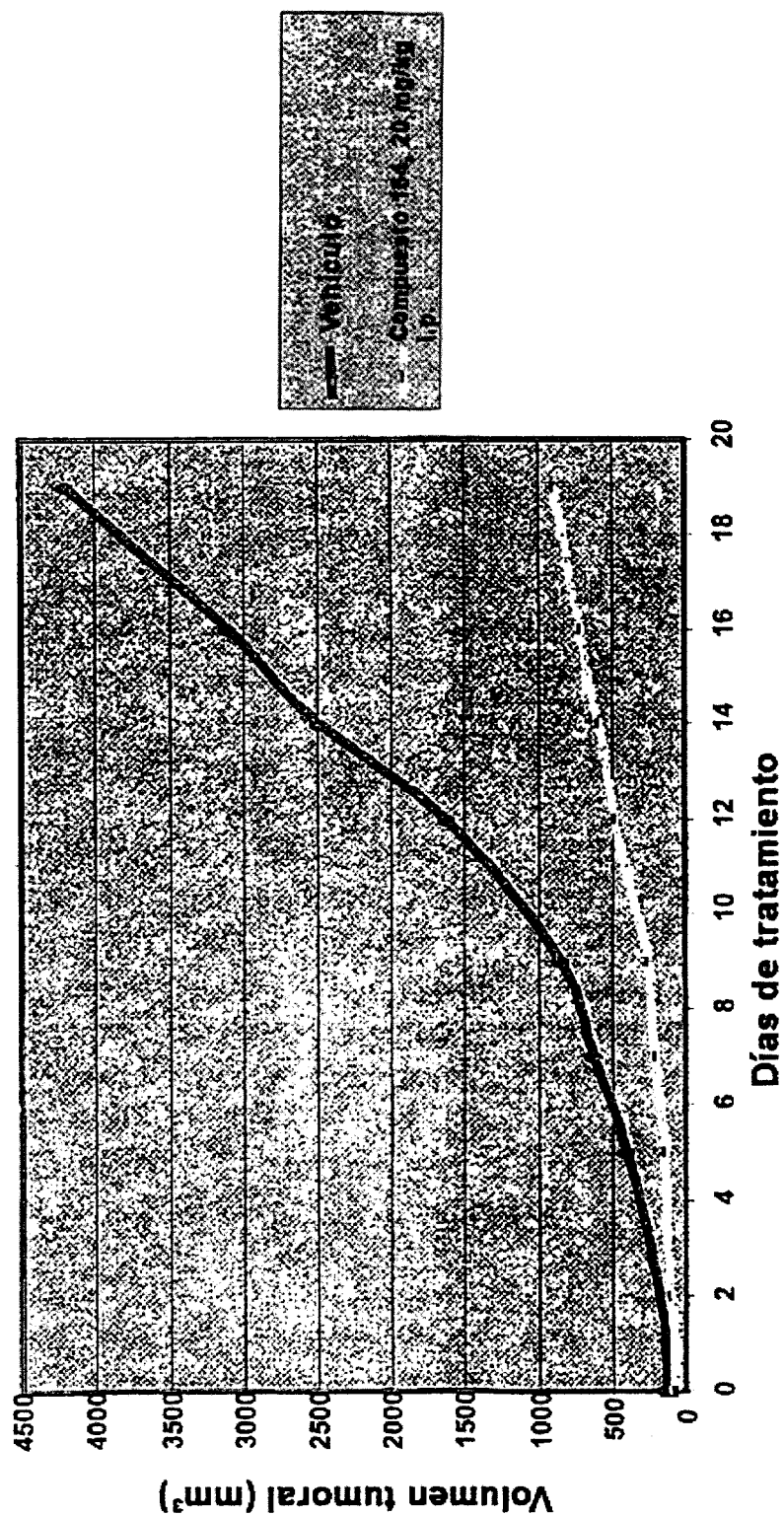


Fig. 3

Inhibición del crecimiento del tumor de cáncer pancreático humano Panc-1 mediante el compuesto 228 tras administración oral

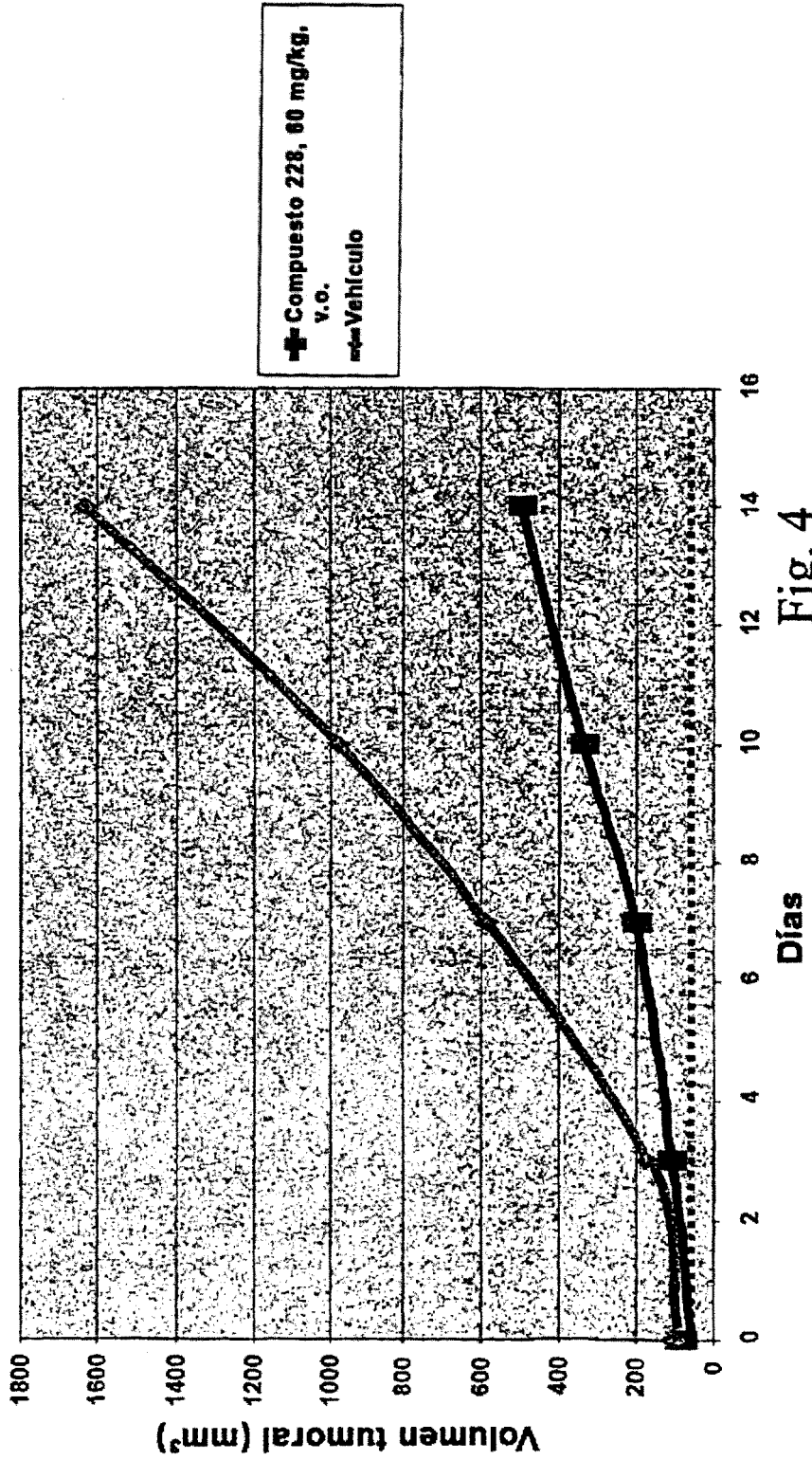


Fig. 4

**Inhibición del crecimiento del tumor colorrectal humano HCT116
mediante el compuesto 311 tras administración intraperitoneal**

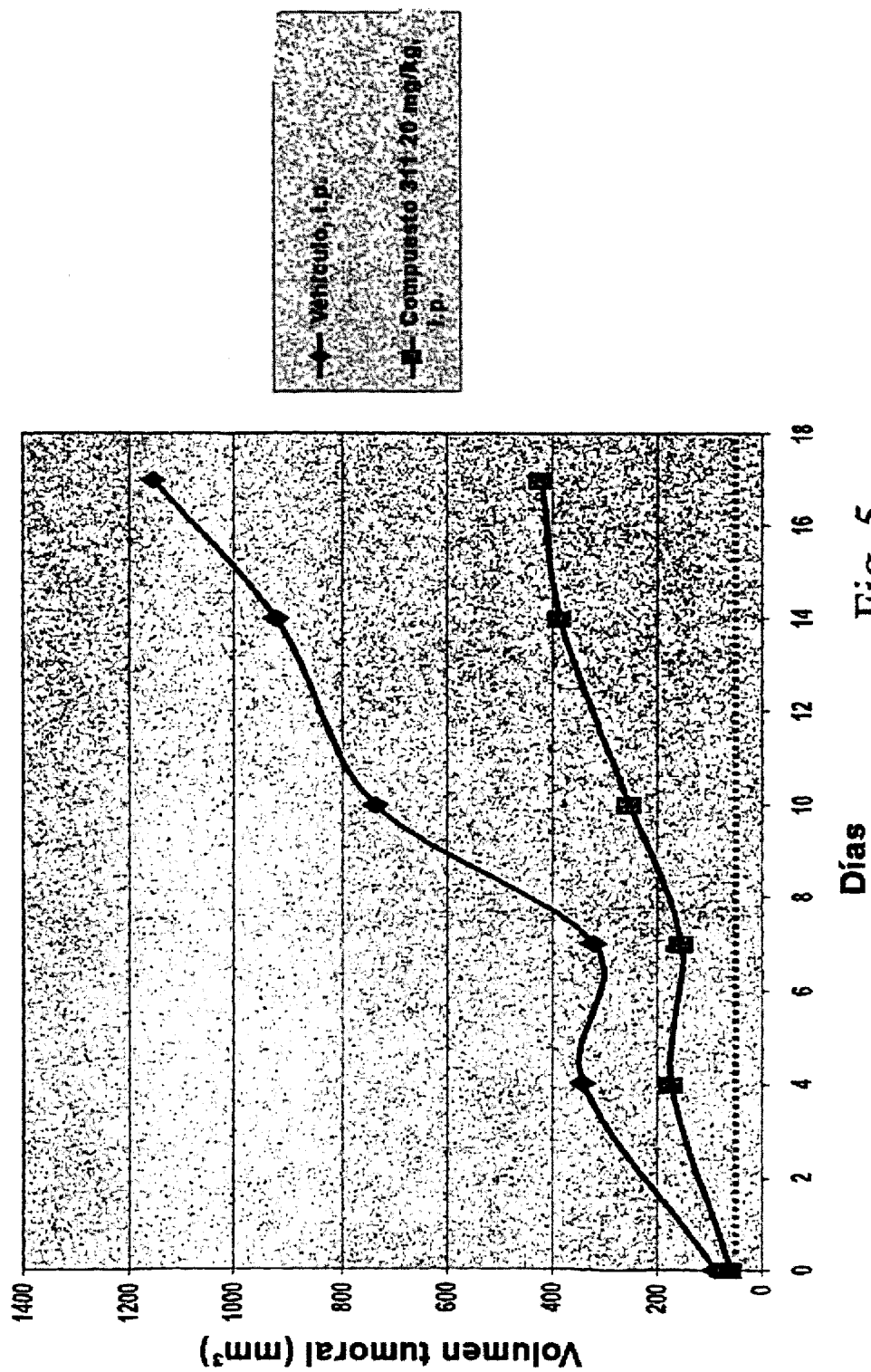


Fig. 5

Inhibición del crecimiento del tumor de cáncer pancreático humano Panc-1
mediante el compuesto 376 tras administración oral

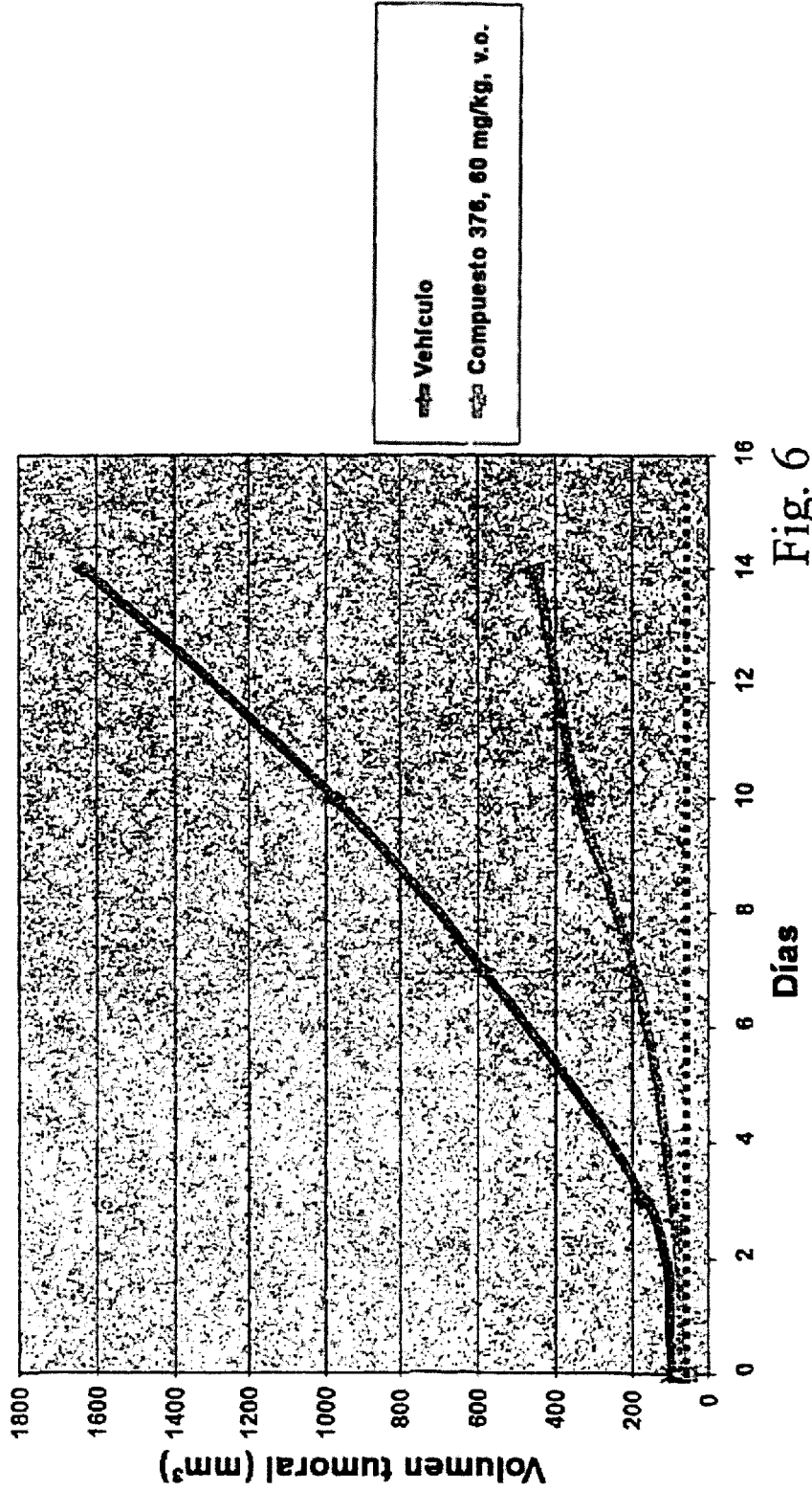


Fig. 6

Inhibición del crecimiento del tumor de cáncer de pulmón humano A549 mediante el compuesto 402 tras administración intraperitoneal

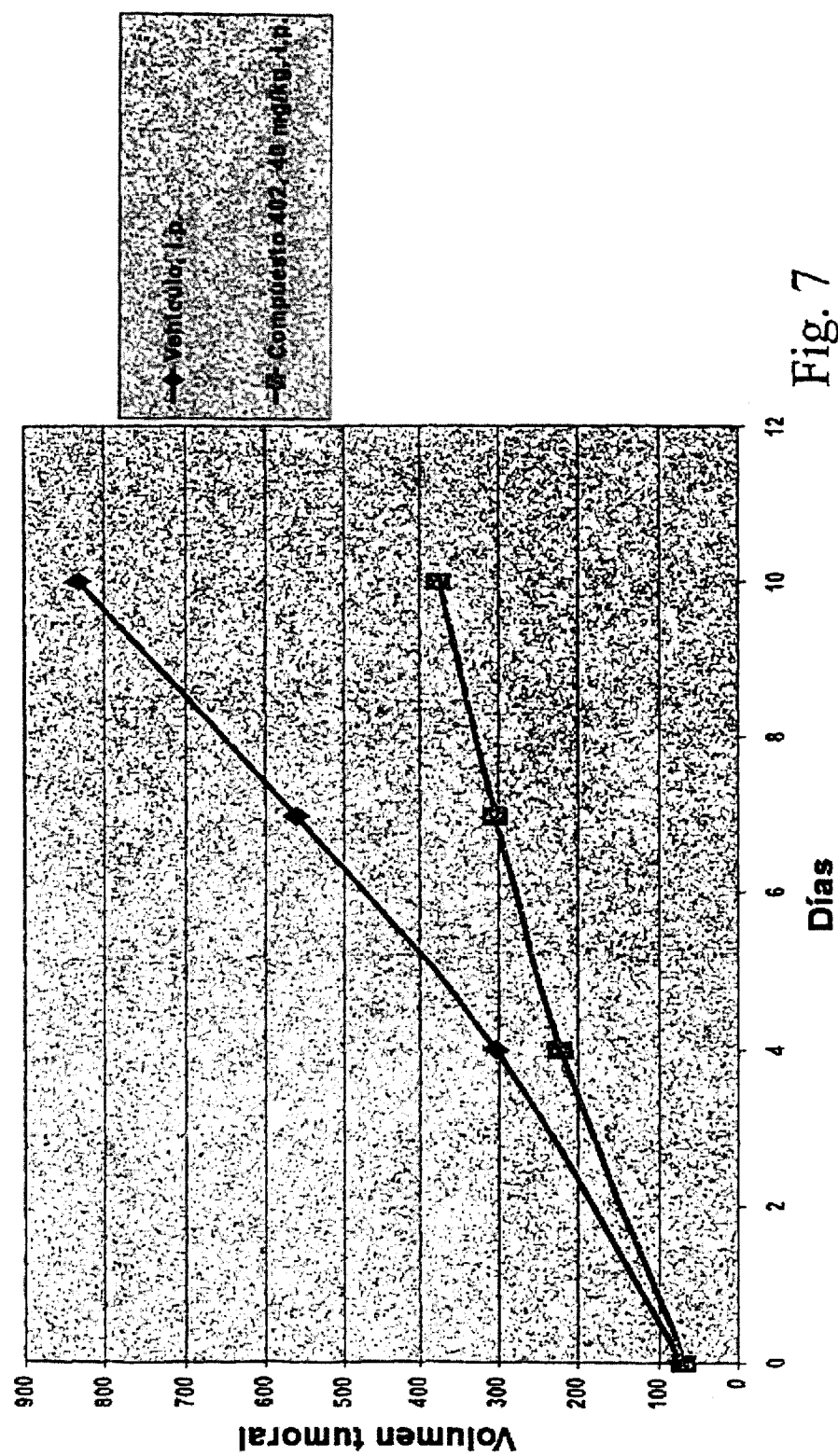


Fig. 7

Inhibición del crecimiento del tumor de cáncer pancreático humano Panc-1 mediante el compuesto 421 tras administración oral

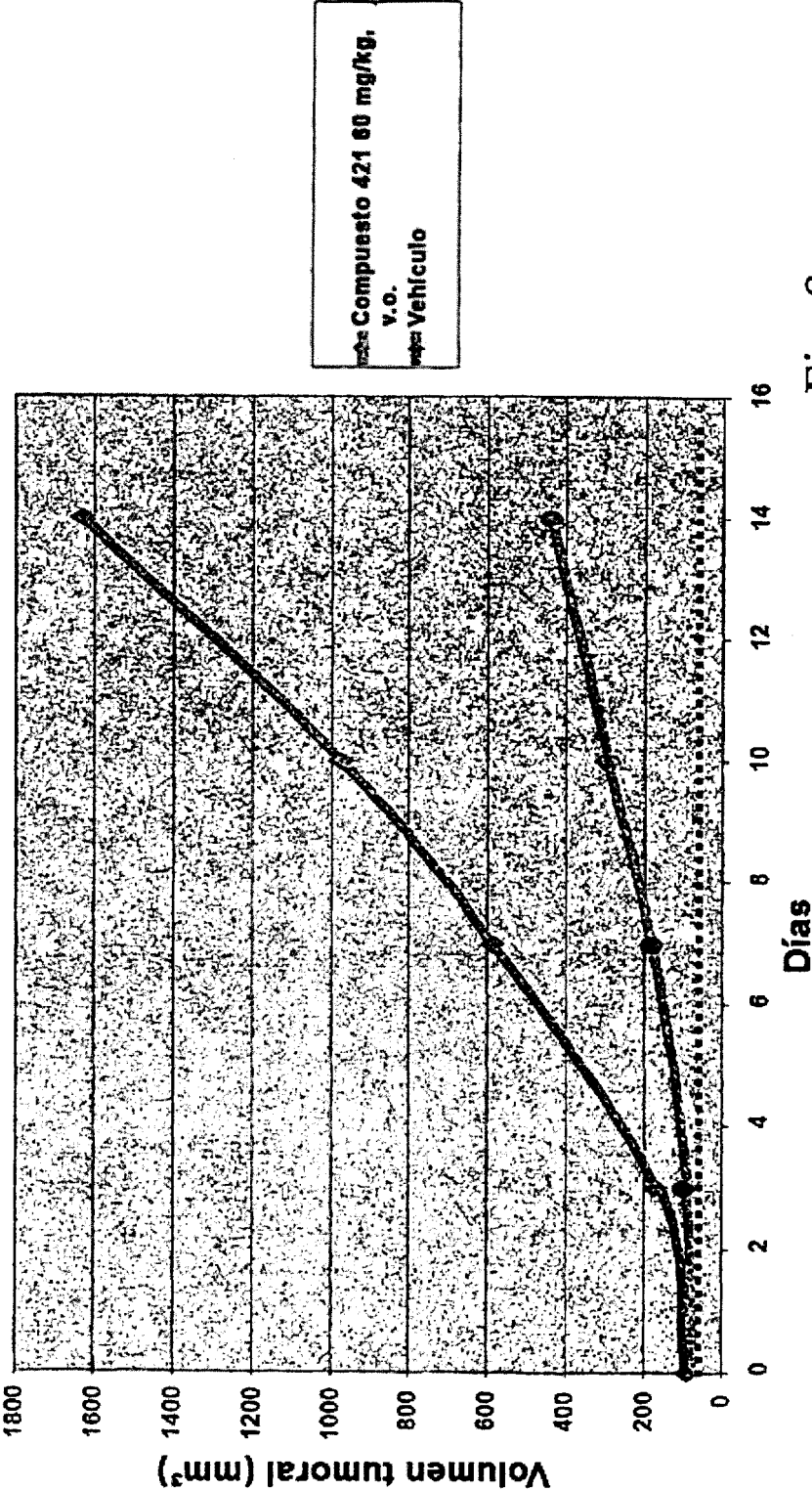


Fig. 8

**Inhibición del crecimiento del tumor de cáncer de pulmón humano A549
mediante el compuesto 424b tras administración intraperitoneal**

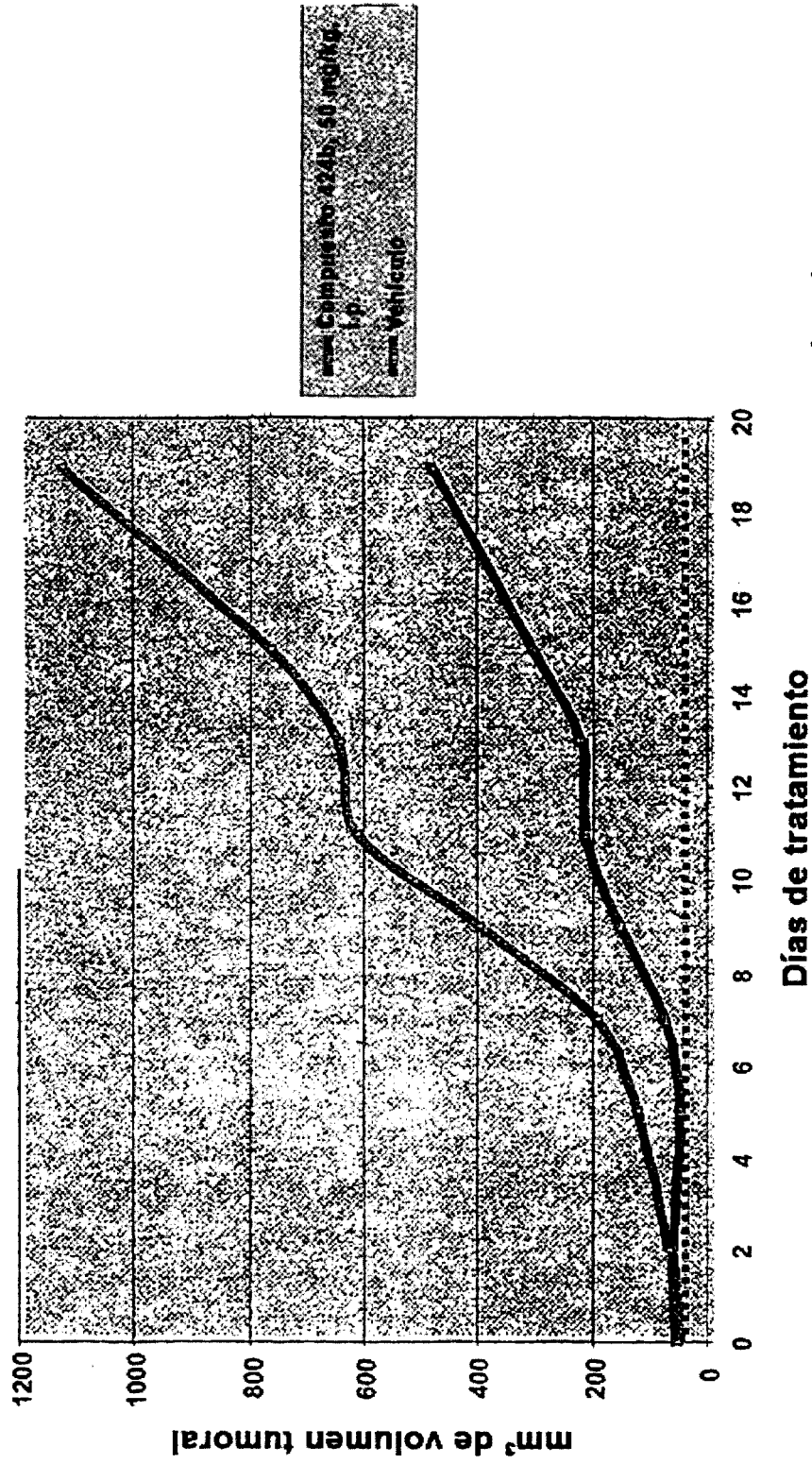


Fig. 9

**Inhibición del crecimiento del tumor de cáncer de pulmón humano A549
mediante el compuesto 424b tras administración oral**

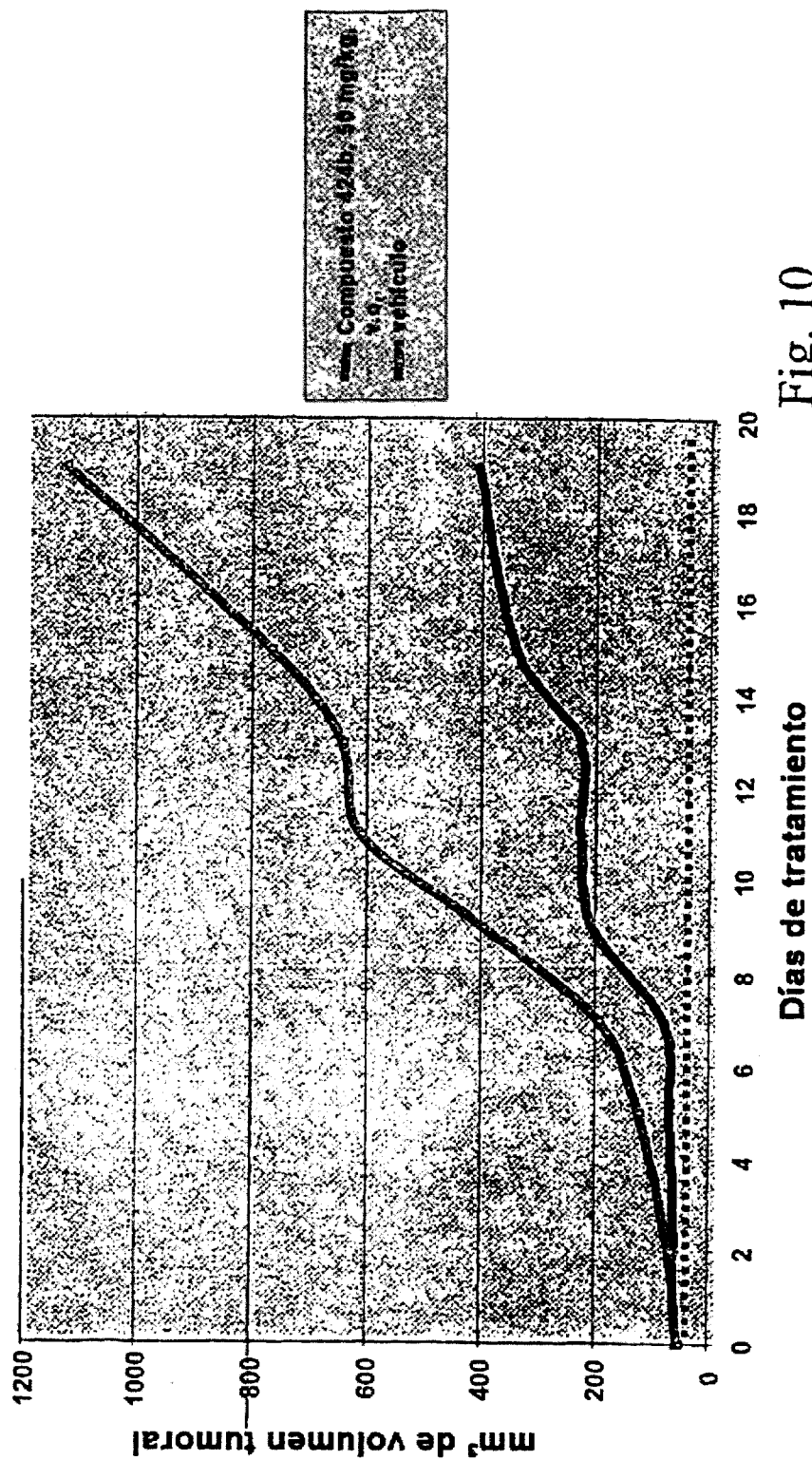


Fig. 10

**Inhibición del crecimiento del tumor de cáncer de pulmón humano A549
mediante el compuesto 570 tras administración intraperitoneal**

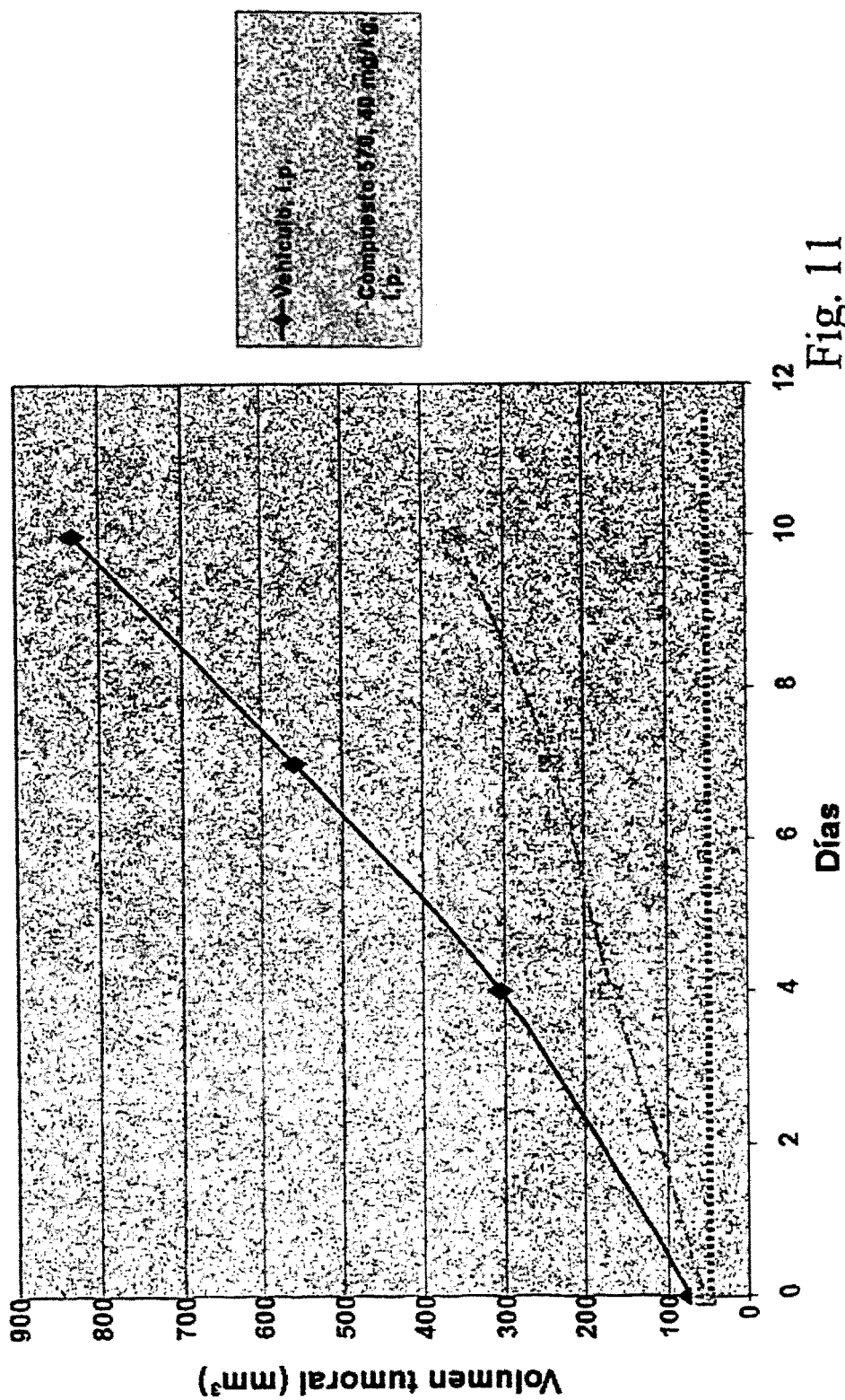


Fig. 11