

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 600 789**

51 Int. Cl.:

| | | | |
|---------------------|-----------|-------------------|-----------|
| A61K 31/167 | (2006.01) | A61P 31/12 | (2006.01) |
| A61K 31/198 | (2006.01) | A61P 31/18 | (2006.01) |
| A61K 31/295 | (2006.01) | A61K 31/28 | (2006.01) |
| A61K 31/4406 | (2006.01) | A61K 33/36 | (2006.01) |
| A61K 31/513 | (2006.01) | | |
| A61K 31/555 | (2006.01) | | |
| A61K 31/7024 | (2006.01) | | |
| A61K 33/04 | (2006.01) | | |
| A61K 33/26 | (2006.01) | | |
| A61K 45/06 | (2006.01) | | |

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.10.2009 PCT/EP2009/007958**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **06.05.2010 WO10049182**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.10.2009 E 09759664 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.08.2016 EP 2349245**

54 Título: **Tratamiento de infecciones por VIH-1 latentes usando auranofina o trióxido de arsénico**

30 Prioridad:

29.10.2008 GB 0819857
22.05.2009 GB 0908952

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.02.2017

73 Titular/es:

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ (100.0%)
Viale Regina Elena, 299
00161 Roma, IT

72 Inventor/es:

SAVARINO, ANDREA;
LUSIC, MARINA;
MAI, ANTONELLO;
PALAMARA, ANNA, TERESA y
GARACI, ENRICO

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 600 789 T3

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

DESCRIPCIÓN

Tratamiento de infecciones por VIH-1 latentes usando auranofina o trióxido de arsénico

5 La presente solicitud se refiere al uso de ciertos compuestos o combinaciones de compuestos en el tratamiento de reservorios virales latentes, especialmente el VIH-1. El tratamiento de los reservorios virales es mediante el aprovechamiento del estrés oxidativo: un enfoque de reposicionamiento de fármacos. Los compuestos incluyen compuestos que contienen oro, tales como auranofina, compuestos que contienen arsénico, tales como trióxido de arsénico, e inhibidores de HDAC en combinación con BSO.

10

Introducción a la invención

15 La erradicación de la infección por VIH-1 en el cuerpo ha encontrado dificultades excepcionales en presencia del reservorio viral latente, representado principalmente por los linfocitos T CD4⁺ de memoria, a los que no pueden dirigirse las terapias antirretrovirales actuales (TAR) ni pueden ser reconocidos por el sistema inmunitario. Para este fin, se han propuesto estrategias denominadas "golpear y destruir" [Hamer, 2004], basadas en a) la estimulación de la expresión de antígeno viral en las células infectadas de forma latente (es decir, la fase de "golpear"), en presencia de TAR intensificado para suprimir la propagación viral debido a la expresión del virus y b) la destrucción de las células infectadas de forma latente por el sistema inmunitario u otros medios (es decir, la fase de "destruir"). Para cada una de estas fases, se están buscando exhaustivamente medicamentos eficaces.

20

25 El descubrimiento de fármacos clásico implica el descubrimiento y la validación de dianas, la identificación de cabezas de serie mediante el cribado de alto rendimiento y la optimización de cabezas de serie mediante la química médica. Una estrategia de desarrollo de fármacos alternativa es el aprovechamiento de fármacos establecidos que ya que ya se han aprobado para el tratamiento de enfermedades no infecciosas y cuyas dianas son particularmente interesantes para la enfermedad cuya cura se está buscando [Dueñas-González *et al.*, 2008]. Esta estrategia también se denomina *reposicionamiento de fármacos o cambio de indicación* [Dueñas-González *et al.*, 2008]. Un ejemplo exitoso de *reposicionamiento de fármacos* es proporcionado por la cloroquina. Además de su uso en el arsenal contra la malaria, la cloroquina se ha utilizado para el tratamiento de enfermedades autoinmunes tales como la artritis reumatoide y ahora está en ensayos clínicos como un posible agente para el tratamiento de ciertos tipos de cáncer e infecciones virales [Savarino *et al.*, 2006; Savarino *et al.*, 2007]. Para la fase de "golpear" de las estrategias de erradicación del VIH-1, se ha propuesto a los inhibidores de la histona desacetilasa (HDACI, del inglés *histone deacetylase inhibitors*), actualmente en ensayos clínicos como agentes antineoplásicos [Demonte *et al.*, 2004; Mai *et al.*, 2009]. Desafortunadamente, los efectos de los compuestos disponibles en la actualidad sobre la activación del VIH-1 desde la quiescencia se asocian a toxicidad [Duverger *et al.*, 2009]. Recientemente se han descubierto nuevos HDACI, que son fármacos epigenéticos que inducen al VIH-1 de escapar de la latencia y que son específicos de clase y de isoforma [Mai *et al.*, 2009]. Estos compuestos inhiben específicamente las histona desacetilasas (HDAC) que pertenecen a la agrupación de clase I, que están involucradas específicamente en el mantenimiento de la latencia del VIH-1. Sin embargo, la toxicidad sigue siendo una preocupación de gran importancia. Además, de manera similar a los HDACI no específicos de clase de la generación anterior, estos fármacos no son capaces de inducir la activación del VIH-1 en todas las células dentro de una población de células infectadas de forma latente. Esto indica que existen diferentes entornos de cromatina que mantienen la latencia del VIH-1 en diferentes células. Por tanto, se necesitarán diversos estímulos para purgar eficazmente el VIH-1 de los reservorios.

30

35

40

45

50

55

60

65

45 En este sentido, se cree que el estrés oxidativo es un área importante para la interacción virus/hospedador. Los iones metálicos y otras especies químicas reactivas al tiol, pueden desempeñar un papel importante en la génesis de estrés oxidativo. Se descubrió que el hierro, un ion metálico que se demostró que genera radicales hidroxilo a través de la reacción de Fenton, está aumentado en las células infectadas por VIH-1 productivamente y promueve la replicación del VIH-1 *in vitro* [Savarino *et al.*, 1999]. Sin embargo, en la actualidad es poco probable que este metal encuentre un lugar entre las estrategias de reactivación del VIH-1, debido a los efectos secundarios y la complejidad de su administración *in vivo*. Dada la mala adsorción y biodistribución de los transportadores de hierro, es poco probable que este metal alcance los niveles plasmáticos suficientes para la activación eficiente del VIH-1 de los reservorios latentes.

55 Metales distintos del hierro pueden provocar estrés oxidativo. Uno de dichos metales es el oro [Sannella *et al.*, 2009]. Los compuestos que contiene oro han demostrado ser útiles en el tratamiento de la artritis reumatoide [Patai, 1999] y se han tenido en cuenta en las estrategias contra el cáncer. Su utilidad propuesta en tratamientos contra el cáncer se debe a sus propiedades antiproliferativas. La cabeza de serie principal para complejos de oro con actividad antitumoral activo es la auranofina (Fig. 1), que se caracteriza por su átomo central de oro (I), así como una trietilfosfina y un ligando hidrato de carbono.

Sumario de la invención

En las reivindicaciones adjuntas se exponen aspectos de la presente invención.

65

Es bien sabido que la activación de la replicación del VIH-1 provoca estrés oxidativo, que a su vez potencia la replicación del VIH-1. La base común para los compuestos de la presente invención es: A) la capacidad de reactivar el VIH-1 desde la latencia y B) la capacidad para contrarrestar la maquinaria celular que se activa con el fin de limitar los efectos del estrés oxidativo. De esta manera, puede potenciarse el estrés oxidativo y se despierta una especie de "reacción en cadena". Esta "reacción en cadena" induce una reactivación más eficiente del VIH-1 desde la latencia y, en algunos casos, induce la destrucción selectiva de las células infectadas. Las acciones A) y B) puede realizarse ya sea mediante un fármaco que ejerce ambos efectos u obtenerse mediante el uso combinado de fármacos distintos. Existen dos maquinarias celulares principales que contrarrestan el estrés oxidativo, es decir, el sistema tiorredoxina (Trx) tiorredoxina reductasa (TrxR) y el glutatión. En el presente documento, los inventores presentan estrategias farmacológicas capaces de ejercer la acción B) mediante el bloqueo de cualquiera de las dos maquinarias.

Los inventores han realizado experimentos para ensayar si la auranofina podría activar el VIH-1 en los modelos de estirpe celular para la quiescencia del VIH-1 y cómo. Sorprendentemente, se ha demostrado que el compuesto que contiene oro (I), auranofina, es un potente inductor de la activación del VIH-1 desde la quiescencia y es por tanto útil en la erradicación del VIH-1. La auranofina muestra una actividad notable en la activación de reservorios de retrovirus latentes. En combinación con la terapia o el tratamiento antirretrovirales conocidos (TAR), éste puede usarse entonces en la terapia para reducir o eliminar la infección por retrovirus. Los efectos de la auranofina sobre la reactivación del VIH-1 son particularmente sorprendentes porque se creía que este fármaco actuaba de forma opuesta (silenciando el VIH), como se analiza en otro lugar.

Específicamente, se ha descubierto que la auranofina estimula la reproducción de retrovirus desde reservorios latentes (de dichos retrovirus) y esto puede usarse para reducir o eliminar estos reservorios en combinación con la terapia antirretroviral convencional. Además, se ha descubierto que cada uno de los inhibidores de la histona desacetilasa (HDACi), el nitrilotriacetato de hierro y la butionina sulfoximina potencia sustancialmente la capacidad de auranofina para combatir la latencia del VIH-1.

Los inventores también han descubierto sorprendentemente que los compuestos que contienen arsénico y las combinaciones de un inhibidor de la histona desacetilasa con un inhibidor de la síntesis de glutatión tales como butionina sulfoximina (BSO) también son eficaces en el tratamiento de células infectadas de forma latente. En particular, los agentes activos son capaces de dirigirse a las células infectadas y selectivamente destruirlas, pero no a las células sin infectar.

Por tanto, ciertos inductores del estrés oxidativo son útiles en el tratamiento de la infección retroviral latente.

Por tanto, en un primer aspecto, se proporciona un inductor del estrés oxidativo para su uso en el tratamiento de la infección por virus de inmunodeficiencia humana de tipo 1 (VIH-1) latente, en el que dicho inductor del estrés oxidativo es auranofina u óxido de arsénico (As_2O_3 o As_4O_6), en el que la auranofina o el óxido de arsénico inducen la activación del VIH-1 desde la quiescencia y son un modulador epigenético y en el que el tratamiento incluye, además, la terapia antirretroviral.

Se desvela un inductor que es un metalofármaco modulador epigenético que no tiene hierro, por ejemplo los compuestos que contienen oro o las combinaciones de un inhibidor de histona desacetilasa con un inhibidor de la síntesis de glutatión tales como butionina sulfoximina. El cisplatino, por ejemplo, es un metalofármaco pero no tiene propiedades epigenéticas. El inductor del estrés oxidativo puede ser una molécula pro-oxidante.

El metalofármaco es un compuesto que comprende un ión metálico y que tienen actividad biológica. Estos metalofármacos incluyen metales capaces de inducir una redistribución de perfiles de expresión génica en una célula. Esto puede aprovecharse para inducir la activación del VIH-1 desde la latencia. Los metalofármacos también pueden tener propiedades químicas particulares. En general, se prefiere que sean capaces de liberar un ion que lleve una carga positiva. Opcionalmente, también pueden cumplir con requisitos estéricos particulares.

Por ejemplo, los compuestos que contienen oro (I) cumplen plenamente con estos criterios. Estos compuestos pueden consistir en un transportador orgánico y un ión de oro (I), que se libera. Aunque la presente invención no está ligada a ningún mecanismo particular, el tamaño atómico del oro (aproximadamente 174 pm) permite la inserción en el sitio activo de TrxR para formar un complejo con cisteínas/selenocisteínas fundamentales para la actividad biológica de esta proteína. Puede verse una estructura de tres dimensiones en el Banco de Datos de Proteínas (número de registro: 3H4K). De esta manera, se inhibe la actividad de la TrxR.

El ion activo de los metalofármacos también puede ser un ion no metálico capaz de imitar el ión de oro (I). En este contexto, algunos fármacos que contienen metaloides, tales como el trióxido de arsénico (As_2O_3) se consideran como metalofármacos epigenéticos. El trióxido de arsénico libera un ion de monóxido de arsénico que lleva una carga positiva y cumple con los requisitos estructurales para formar aductos covalentes con las cisteínas o selenocisteínas presentes en las reductasas (tamaño atómico del arsénico: 115 pm; tamaño atómico del oxígeno: 60 pm). Puede verse una estructura de óxido de arsénico en complejo con un miembro de la superfamilia de Trx en el Banco de Datos de Proteínas (número de registro: 1J9B). Esta estructura indica fuertemente que se forma un aducto similar con tiorredoxina reductasa.

El ion liberado por el metalofármaco puede, por tanto, no ser derivado del platino, cuya oxidación solo puede dar como resultado iones Pt(II) o Pt(IV), o hierro, del que derivan los iones Fe(II) o Fe(III) y tiene un tamaño atómico menor en comparación con el oro. Por tanto, se excluyen los metalofármacos que comprenden iones de hierro o iones de platino y se tienen en cuenta solamente si están combinados con uno de los metalofármacos anteriormente mencionados. Son ejemplos de los mismos los compuestos que comprenden oro, preferentemente los iones de oro (I) o arsénico. Los compuestos que contienen oro incluyen las sales de oro o los derivados de oro. Los compuestos que contienen arsénico incluyen los arsenicales tales como óxidos de arsénico, que incluyen arsénico blanco (As_2O_3 , pero también puede encontrarse como As_4O_6). Otra actividad común compartida por los compuestos que contienen oro (I) y el trióxido de arsénico es la capacidad de actuar como miméticos de la superóxido dismutasa, facilitando de este modo la producción intracelular de especies radicales de oxígeno (ERO). Es ampliamente sabido que las ERO activan el VIH-1 desde la latencia.

Se sabe en la técnica que los moduladores epigenéticos desempeñan un papel en la metilación del ADN y la remodelación de la cromatina, es decir, en el enrollamiento y/o desenrollamiento del ADN, modulando de este modo la expresión génica.

El metalofármaco modulador epigenético sin hierro es capaz de inducir el estrés oxidativo. También es preferentemente capaz de inhibir la tioredoxina reductasa (TrxR) y/o actuar como un mimético de la superóxido dismutasa (SOD). El metalofármaco inhibe la tioredoxina reductasa mediante el bloqueo de su sitio activo. Esto puede conseguirse mediante la complejación directa con el resto de selenocisteína que se sabe que es importante para la actividad reductora de estas proteínas. El metalofármaco también puede suprimir la síntesis de TrxR.

También se prevén moléculas pro-oxidantes, en particular inhibidores de la gamma-glutamyl cisteína sintetasa, una enzima limitante en la vía de síntesis del glutatión [Anderson, 1998]. Los inhibidores preferidos de esta enzima incluyen la butionina sulfoximina (BSO), un inhibidor irreversible. La BSO es, por tanto, un inhibidor de la síntesis del glutatión y también se prefieren dichos inhibidores. El inhibidor se proporciona más preferentemente en combinación con un inhibidor de la histona desacetilasa (HDACi).

Los compuestos de la presente invención (que pueden incluir combinaciones tales como un inhibidor de la síntesis de glutatión) tienen capacidad de destrucción selectiva. Esta es la capacidad para dirigirse y destruir las células infectadas de forma latente, pero no las células no infectadas. En otras palabras, las células que comprenden reservorios virales son dianas, pero las células no infectadas no se destruyen, conduciendo a una reducción ventajosa en los efectos secundarios. Se prefiere que las células diana sean linfocitos T-CD4⁺ de memoria transitoria (T_{TM}) o linfocitos T CD4⁺ de memoria central (T_{CM}). Estos son el principal reservorio para la latencia del VIH-1 en individuos con terapia antirretroviral (TAR) y que presentan un recuento bajo de CD4 [Chomont *et al.*, 2009]. Los linfocitos T CD4⁺ de memoria central (T_{CM}) son precursores de los T_{TM} y representan un reservorio de VIH-1 más estable. Por tanto, la presente invención es particularmente útil en el tratamiento de pacientes con reservorios virales, especialmente de los pacientes que presentan un recuento bajo de CD4. Dichos pacientes deberían estar sometidos, o haber sido sometidos, a terapia antirretroviral (TAR) ya que esto puede ayudar a impedir que el virus recién formado infecte otras células.

También se desvela un método de tratamiento de un paciente con sospecha de infección retroviral latente, que comprende administrar a dicho paciente un inductor del estrés oxidativo tal como se define en el presente documento, que puede incluir un metalofármaco modulador epigenético sin hierro o un HDACi junto con un inhibidor de la síntesis de glutatión, tal como butionina sulfoximina. El método puede comprender adicionalmente la administración de al menos uno de entre un inhibidor de la histona desacetilasa (HDACi) (adicional), BSO y un compuesto que contiene oro, tal como la auranofina, un compuesto que contiene arsénico, tal como trióxido de arsénico (As_2O_3) y/o nitrilotriacetato de hierro o sulfato ferroso.

Los inventores desvelan en el presente documento un método de dirección selectiva a las células infectadas de forma latente por un retrovirus, comprendiendo dicho método poner en contacto las células con dicho inductor del estrés oxidativo.

Por tanto, los inventores proporcionan estrategias capaces no solo de activar el VIH-1 desde la latencia, sino también de contrarrestar la maquinaria antioxidante celular manteniendo el VIH-1 en un estado quiescente. En el caso de los metalofármacos epigenéticos, ambas actividades son realizadas por el mismo fármaco (inducción de la replicación del VIH-1 activada por ERO e inhibición de la proteína antioxidante celular TrxR). En el caso de la combinación de HDACi más BSO, estos efectos son ejercidos por fármacos separados (un HDACi que induce la reactivación epigenética del VIH-1 y BSO que inhibe la síntesis del péptido reductor celular, glutatión).

Breve descripción de la invención

Figura 1. La estructura de la auranofina [oro(1+); 3,4,5-triacetiloxi-6-(acetiloximetil)oxano-2-tiolato; trietilfosfano].

Figura 2. Estimulación dependiente de la dosis de la replicación del VIH-1 por auranofina en células ACH-2. El gráfico muestra la estimulación dependiente de la concentración de la producción de p24 de VIH-1 en

células ACH-2 en el Día 3 de la incubación con los fármacos. Eje X: Concentración del fármaco; eje y: aumento de p24 de VIH-1 (transformación logarítmica del porcentaje de los niveles basales en los cultivos sin tratar). Se muestra la línea o curva que mejor se ajusta a los puntos de datos.

5 **Figura 3. Efectos combinados de auranofina (0,25 µM) y MC2113 (1 µM) sobre la replicación del VIH-1 en células U1.** Se incubaron células U1 con cualquiera de los fármacos solos o en combinación y se evaluó la producción de p24 a las 24 h de tratamiento. En este caso, el efecto sinérgico era tan evidente que no necesitó análisis usando superficies de porcentaje-de-sinergia.

10 **Figura 4. Inducción dependiente de la dosis de la expresión controlada por LTR de proteína verde fluorescente (GFP) por auranofina.** Se usó un clon de célula Jurkat linfocito T infectado en reposo, establecido por Jordan *et al.* (2003). Este clon, es decir, 8.4, contiene todo el genoma del VIH-1 bajo el control del LTR y presenta el gen GFP en reemplazo de *nef*. Las células 8.4 muestran niveles basales no significativos de expresión de GFP. Las células se incubaron con los diferentes tratamientos y se controló la expresión de GFP en las células vivas seleccionadas a las 72 h por medio de técnicas de citometría de flujo convencionales. Los resultados se presentan como histogramas de fluorescencia. Cada histograma presenta el porcentaje de células fluorescentes más allá de un valor umbral establecido usando células Jurkat no infectadas.

20 **Figura 5. Inducción de la expresión controlada por LTR de proteína verde fluorescente (GFP) por auranofina y un inhibidor de histona desacetilasa de clase I (MC2113).** Se trataron células Jurkat 8.4 infectadas con una concentración clínicamente pertinente de auranofina (0,25 µM) o 1 µM de MC2113 o ambos. Los datos se presentan como en la Fig. 4.

25 **Figura 6. Inducción de transporte nuclear de NF-kappaB (p65/p50) por auranofina en diferentes tiempos de incubación.** Se incubaron células Jurkat 8.4 infectadas en reposo con una concentración clínicamente pertinente de auranofina (0,25 µM) y se cuantificó la presencia de p65 en extractos nucleares mediante un ensayo colorimétrico de factor nuclear. Los resultados se presentan como un porcentaje de la señal obtenida en los extractos nucleares de células incubadas con TNF-alfa durante 1,5 h.

30 **Figura 7. Efectos combinados de auranofina y nitrilotriacetato de hierro (FeNTA) que dan como resultado la estimulación sinérgica de la replicación de VIH-1 en células ACH-2.** Superficie 3D que muestra la sinergia entre fármacos. Ejes x, y: concentración del fármaco; eje z: porcentaje de sinergia entre los dos fármacos. Los valores de porcentaje de sinergia representan la diferencia porcentual entre los efectos de la combinación de fármacos y la suma de los efectos de la auranofina y FeNTA administrados por separado a concentraciones emparejadas, calculados como se indica a continuación:

$$PS = 100 \cdot [E_{\text{fármaco A} + \text{fármaco B}} - (E_{\text{fármaco A}} + E_{\text{fármaco B}})] / (E_{\text{fármaco A}} + E_{\text{fármaco B}})$$

40 donde *PS* es el porcentaje de sinergia y *E* es el efecto de la concentración del fármaco, expresado como el aumento de la producción de p24.

45 **Figura 8. Efectos combinados de auranofina y butionina sulfoximina (BSO) que dan como resultado la estimulación sinérgica de la replicación del VIH-1 en células ACH-2.** Para la interpretación de la figura se remite al lector al título de la figura 7.

50 **Figura 9. Destrucción celular por inhibidores de histona desacetilasa (HDACi).** Paneles A-B: Correlación entre la producción de p 24 de VIH-1 en células ACH-2 (panel A) y U1 (panel B) infectadas de forma latente tratadas con HDACi y la inhibición de la viabilidad de células infectadas. Las células se incubaron con los compuestos de ensayo (1 µM) y la producción de p24 se midió mediante ELISA en sobrenadantes de cultivo celular. Después de la recolección de los sobrenadantes, la viabilidad celular se midió mediante el método altamente normalizado del metil tetrazolio (MTT). Eje X: aumento de p24 de VIH-1; los datos se presentan como una transformación logarítmica del porcentaje de los niveles basales en los cultivos sin tratar. Eje y: reducción porcentual de la viabilidad celular en comparación con los controles no tratados incubados en condiciones similares. Paneles C-D: destrucción selectiva de cultivos celulares linfocíticos (panel C) y monocíticos (panel D) infectados por VIH-1 mediante MC 1855. Se incubaron células no infectadas H9 y U937 y células infectadas por VIH-1 H9_{IIIB}, ACH-2 y U1, con los compuestos de ensayo durante siete días y la viabilidad celular se midió como se ha descrito anteriormente. Eje X: concentración de fármaco. Eje y: reducción porcentual de la viabilidad celular en comparación con los controles sin tratar.

60 **Figura 10. Estimulación dependiente de la dosis de la replicación de VIH-1 por MS 275 en células ACH-2.** El gráfico muestra la estimulación dependiente de la concentración de la producción de p24 de VIH-1 en células ACH-2 en el Día 3 de la incubación con el fármaco. Eje X: Concentración del fármaco; eje y: aumento de p24 de VIH-1 (transformación logarítmica del porcentaje de los niveles basales en los cultivos sin tratar). Se adoptaron transformaciones apropiadas para normalizar los datos en caso necesario. Se muestra la línea o curva que mejor se ajusta a los puntos de datos.

Figuras 11 y 12. Sinergia de los inhibidores de histona desacetilasa (HDACi) con butionina sulfoximina (BSO). El gráfico tridimensional (3D) muestra la superficie 3D de la sinergia entre cada HDACi y BSO. Ejes x, y: concentración del fármaco; eje z: porcentaje de sinergia entre los dos fármacos. Los valores de porcentaje de sinergia representan la diferencia porcentual entre los efectos de la combinación de fármacos y la suma de los efectos de MS 275 y BSO administrados por separado a concentraciones emparejadas, calculados como se indica a continuación:

$$PS = 100 \cdot [E_{\text{fármaco A + fármaco B}} - (E_{\text{fármaco A}} + E_{\text{fármaco B}})] / (E_{\text{fármaco A}} + E_{\text{fármaco B}})$$

donde *PS* es el porcentaje de sinergia y *E* es el efecto de la concentración del fármaco, expresado como el aumento de la producción de p24.

Figura 13. Estimulación de la expresión controlada por LTR de VIH-1 de la proteína fluorescente verde (GFP) por MS-275 y butionina sulfoximina (BSO), solos o en combinación en un clon de célula Jurkat (A1). El clon de célula A1, derivado de células Jurkat linfoides T, establecido por Jordan *et al.* como un modelo para la infección por VIH-1 latente. Este clon tiene una construcción integrada GFP/Tat bajo el control del LTR de VIH-1 y muestra una proporción basal de células que expresan GFP, que aumentan siguiendo los estímulos que activan el promotor del VIH-1. Las células A1 se incubaron durante 72 h con los diferentes tratamientos y la expresión de GFP se controló mediante técnicas de citometría de flujo convencionales y se evaluó como el porcentaje de células fluorescentes (indicado para cada histograma) más allá del valor umbral establecido usando células Jurkat no transfectadas de control. Un experimento de tres con resultados similares. Se descubrió que los histogramas derivados de tratamientos con doble fármaco eran significativamente diferentes ($P < 0,01$) de los derivados de los tratamientos con los fármacos individuales a concentraciones emparejadas (estadística de Kolmogorov-Smirnoff).

Figura 14. Efectos del inhibidor de HDAC, MS-275 y butionina sulfoximina (BSO), solos o en combinación. Se proporcionan valores de viabilidad de células a 72 h de incubación, según se determina mediante el método del metil tetrazolio (MTT): células ACH-2 (A), células 6.3 Jurkat (B), células Jurkat no infectadas (C). Los resultados se presentan como porcentajes de la absorbancia ($A = 550$) en controles sin tratar restando el nivel de fondo (medias \pm ETM, 3 experimentos). Los asteriscos indican las diferencias significativas encontradas entre los tratamientos con BSO y los tratamientos equivalentes en ausencia de BSO (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$). La significación estadística se calculó usando medidas repetidas, ANOVA de dos vías y post-ensayo de Bonferroni, después de una transformación apropiada para restablecer la normalidad, en caso necesario.

Figura 15. Inducción dependiente de la dosis de la expresión controlada por LTR de proteína verde fluorescente (GFP) por trióxido de arsénico. En este experimento, los inventores usaron el clon A1 de célula Jurkat linfóide T, que tiene una construcción integrada GFP/Tat bajo el control del LTR de VIH-1. Las células se incubaron con los diferentes tratamientos y la expresión de GFP se monitorizó en células vivas seleccionadas a las 72 h mediante técnicas de citometría de flujo convencionales. Los resultados se presentan como histogramas de fluorescencia. Cada histograma presenta el porcentaje de células fluorescentes más allá de un valor umbral establecido usando células Jurkat no infectadas.

Descripción detallada de la invención

Se desvela un compuesto que contiene oro para su uso en el tratamiento de una infección retroviral latente. El compuesto que contiene oro puede ser capaz de inducir la replicación retroviral en un modelo reconocido de una infección latente de dicho retrovirus. En el caso del VIH-1, este modelo puede seleccionarse entre el U1 y ACH-2, por ejemplo. Se prefiere que los compuestos de la presente invención tengan una actividad mínima en el ensayo U1 que se describe a continuación en el presente documento en la sección Experimental de aproximadamente un aumento del 500 % (%).

El retrovirus puede ser un lentivirus de simio o humano, tal como el VIH. El VIH-1 es la diana de la presente invención. El compuesto que contiene oro de la presente invención es auranofina (Fig. 1), que se caracteriza por su átomo de oro (I) central, así como una trietilfosfina y un ligando de hidrato de carbono. Otros complejos de oro relacionados incluyen, por ejemplo, el análogo de cloro: Et_3PAuCl y tiomalato de oro. Estos pueden tener múltiples modos de acción que aún están siendo explorados. Se ha demostrado recientemente que la auranofina induce un cambio hacia el lado pro-oxidante del potencial redox intracelular [Sannella *et al.*, 2008]. La especie activa es probablemente el oro en sí mismo y los ligandos son más relevantes para las propiedades de biodistribución y cinéticas de los agentes. Los candidatos ideales para las estrategias de erradicación del VIH-1 no deben inducir la activación inmunitaria (perjudicial para los individuos infectados por VIH-1 [Savarino *et al.*, 2000]). Es, por tanto, ventajoso que las sales de oro orgánicas estén dotados de propiedades antiinflamatorias.

El ion de oro (I) o (II) es, por tanto, biodisponible. Se apreciará que el compuesto que contiene oro también puede denominarse un complejo. El compuesto que contiene oro puede comprender oro en su estado de oxidación (I) o (II), prefiriéndose en particular el (I). Los compuestos que contienen oro pueden ser compuestos químicos iónicos de oro o compuestos de organooro.

Preferentemente, el compuesto que contiene oro puede usarse ya sea solo o en combinación con al menos uno de entre un HDACi, BSO y/o nitriloacetato de hierro. Se prefieren combinaciones con BSO y se prefieren en particular combinaciones con al menos un HDACi.

5 Se desvela un inductor de estrés oxidativo, que es un metalofármaco modulador epigenético sin hierro, en combinación con al menos un HDACi para su uso en el tratamiento de la infección retroviral latente. El inductor el estrés oxidativo es un compuesto que contiene oro o arsénico, tal como auranofina o trióxido de arsénico, o un inhibidor de la síntesis de glutatión, tal como BSO. También se prevé el nitriloacetato de hierro en combinación con un HDACi.

10 En la medida en que los HDACi pueden considerarse inductores de estrés oxidativo, el inductor de estrés oxidativo mencionado anteriormente es un inductor de estrés oxidativo no HDACi. En otras palabras, se desvela al menos un HDACi en combinación con al menos otro inductor de estrés oxidativo (no-HDACi) para su uso en el tratamiento de la infección retroviral latente. Dicho otro inductor de estrés oxidativo (no-HDACi) puede ser auranofina o BSO, nitrilotriacetato de hierro o sulfato ferroso, por ejemplo. También se desvelan métodos de tratamiento, que corresponden a los presentes usos.

Se demostró que el estrés oxidativo está vinculado a la replicación del VIH-1 por interacciones binarias, provocando la replicación del VIH-1 estrés oxidativo y activando el estrés oxidativo la activación del VIH-1 desde la quiescencia [Israel y Gougerot-Pocidaló, 1997]. Los mecanismos detrás de la activación del VIH-1 desde la quiescencia inducida por estrés oxidativo son numerosos y todavía están poco explorados. Se demostró que el estrés oxidativo conduce el equilibrio entre las actividades de las histona desacetilasas (HDAC) y las histona acetil transferasas (HAT) hacia un aumento de la actividad HAT [Rahman *et al.*, 2004]. Esto favorece el desenrollamiento del ADN y la transcripción de varios genes, incluyendo los provirus de VIH-1. Sin embargo, el uso de inductores de estrés oxidativo en combinación con HDACi no se ha tenido en cuenta.

25 La auranofina puede no necesariamente inducir la reactivación del VIH-1 a través del estrés oxidativo, puede actuar a través de un mecanismo alternativo. Los inventores han demostrado que la auranofina induce la activación del VIH-1 desde la quiescencia, probablemente mediante un mecanismo novedoso. Los indicios de que este fármaco activa el VIH-1 desde la quiescencia derivan de sus efectos reproducibles en cuatro estirpes celulares diferentes en las que la expresión génica impulsada por LTR es inducible. La opinión de que la auranofina activa la expresión génica del VIH-1 mediante un mecanismo novedoso se sugiere por sus efectos en combinación con fármacos que se sabe que activan la transcripción génica del VIH-1 por mecanismos diferentes y bien caracterizados y es apoyada por la bibliografía existente sobre sus dianas intracelulares [Rigobello *et al.*, 2002; Rigobello *et al.*, 2005; Omata *et al.*, 2006; Talbot *et al.*, 2008].

35 Se ha demostrado que la auranofina es un inhibidor de los TrxR, que son selenoproteínas involucradas en el mantenimiento de la homeostasis redox intracelular [Rigobello *et al.*, 2002; Rigobello *et al.*, 2005; Omata *et al.*, 2006]. También se ha demostrado que la auranofina inhibe la síntesis de TrxR [Talbot *et al.*, 2008]. Los TrxR se encuentran en dos isoformas principales, una citosólica (TrxR1) y una mitocondrial (TrxR2) [Lu y Holmgren, 2009]. Los TrxR tienen varios sustratos, de los cuales el principal es la tiorredoxina (Trx1 es la isoforma celular; Trx2 es la isoforma mitocondrial). Los TrxR mantienen la Trx en un estado reducido, que a su vez reduce varias proteínas intracelulares. Aparte de la Trx, los TrxR también reducen otras dianas incluyendo el Tat del VIH-1, que se inactiva por acción del TrxR (Kalantari *et al.*, 2008).

45 A la luz de esta evidencia, se podría suponer que los efectos de la auranofina sobre la reactivación de la VIH-1 podrían estar mediados por Tat. La auranofina, sin embargo, realizó efectos que inducen el VIH-1 en estirpes celulares tales como ACH-2 y U1, que tienen un eje Tat/TAR defectuoso, lo que indica que otros objetivos están involucrados en los efectos de la auranofina que inducen el VIH-1. Se demostró, de hecho, que la auranofina actúa sobre múltiples dianas intracelulares. Aparte de sus efectos sobre las selenoproteínas, se descubrió que este fármaco inhibe algunas cinasas tales como la proteína cinasa C [Daniel *et al.*, 1995] y las catepsinas [Chircorian y Barrios, 2004].

55 En el estudio, la auranofina potenció potentemente los efectos de activación del VIH-1 del FeNTA, que genera especies reactivas de oxígeno (ERO) a través de la reacción de Fenton. Además, los efectos de la auranofina se potenciaron por BSO, un compuesto que induce el agotamiento de glutatión y, por tanto, disminuyen la capacidad de las células para contrarrestar el estrés oxidativo. Si, como informan otros autores (Sannella *et al.*, 2009), la auranofina induce efectos pro-oxidantes, su mecanismo puede ser distinto del de otras moléculas pro-oxidantes tales como FeNTA y BSO. El efecto de activación del VIH-1 de la auranofina sola es apoyado, en el presente documento, por sus efectos activadores de NF-kappaB. Se ha demostrado que el estrés oxidativo induce la translocación nuclear de NF-kappaB (p65/p50) [Rahman *et al.*, 2004]. Este factor nuclear se une a sitios específicos en el LTR del VIH-1 y promueve la transcripción del genoma proviral [Williams *et al.*, 2007].

65 En este sentido, los inventores han descubierto en el presente estudio que la auranofina induce la translocación nuclear NF-kappaB y la unión al ADN en condiciones similares a aquellas en las que se induce la replicación del VIH-1. Este fue un hallazgo realmente sorprendente, a la luz de los informes anteriores [Jeon *et al.*, 2000; Traber *et al.*, 1999]. Pueden conciliarse las discrepancias aparentes entre nuestros resultados y los de estudios anteriores que

muestran un efecto inhibitor de la auranofina y otros compuestos que contienen oro sobre la activación de NF-kappaB [Jeon *et al.*, 2000; Traber *et al.*, 1999], al tener en cuenta las diferentes concentraciones adoptadas de los fármacos. Las concentraciones de auranofina adoptadas en los estudios previos para demostrar la inhibición de NF-kappaB eran aproximadamente dos órdenes de magnitud superiores a las adoptadas en el presente estudio. Dichas concentraciones de fármacos, que son superiores a las que pueden conseguirse clínicamente en el tratamiento de la artritis reumatoide, fueron tóxicas para nuestras estirpes celulares (datos no mostrados). En lugar de ello, los inventores han demostrado que la auranofina puede tener el efecto contrario al silenciamiento del VIH, es decir, la activación. Este es en particular el caso a concentraciones adecuadas, como se determinará fácilmente por el experto en la materia. A modo de guía, sin embargo, se prefiere el uso de un intervalo de concentraciones de 0,125-0,5 microM, aproximándose a los niveles plasmáticos medios observados durante el tratamiento de la artritis reumatoide [Benn *et al.*, 1991]. Otros intervalos preferidos incluyen 0,1-0,6, 0,125-0,3, 0,2-0,6, 0,2-0,7, 0,125-0,2 y 0,125-0,175 microM.

El experto apreciará que estos pueden aumentarse a escala a dosis humanas, pero se prefiere uno cualquiera de los siguientes intervalos: 0,025-0,2 mg/kg/día, 0,02-0,3 mg/kg/día, 0,01-0,3 mg/kg/día, 0,005-0,3 mg/kg/día, 0,03-0,2 mg/kg/día, 0,03-0,4 mg/kg/día, 0,025-0,4 mg/kg/día y 0,02-0,5 mg/kg/día. Se prefiere en particular un intervalo de dosificación de 0,025-0,2 mg/kg/día.

La translocación nuclear de NF-kappaB inducida por auranofina, aunque apoya adicionalmente la opinión de que la auranofina activa el VIH-1 desde la quiescencia mediante la inducción de un estrés oxidativo, no puede considerarse como un indicio que apunta a NF-kappaB como el efector principal de los efectos de la auranofina sobre la replicación del VIH-1. Varios otros factores de transcripción potencialmente activos sobre el LTR del VIH-1 se activan por estrés oxidativo [Wu *et al.*, 2004]. Además, el estrés oxidativo cambia el equilibrio entre las actividades de HDAC y HAT hacia un aumento de la actividad de HAT. En este sentido, se descubrió un efecto sinérgico de la auranofina y los HDACI.

Aunque los iones de oro (I y II) solos son malos catalizadores de Fenton, los complejos orgánicos de oro pueden potenciar la reacción de Fenton catalizada por Fe^{2+} actuando como miméticos de superóxido dismutasa (SOD) [Huang *et al.*, 2005]. Los miméticos de SOD, al catalizar la conversión de superóxido/peróxido, pueden reponer las reservas de peróxido de hidrógeno intracelular consumidas por el catalizador de Fenton, proporcionando por tanto nuevo sustrato para la reacción de Fenton. El mimetismo de SOD y la inhibición de TrxR no son necesariamente excluyentes entre sí y pueden tener un entorno común. Por tanto, es posible plantear la hipótesis de que ambos mecanismos cooperan para activar el VIH-1 desde la quiescencia. Por último, no se puede excluir que otros mecanismos aún sin explorar puedan reforzar el efecto activador del VIH-1 de la auranofina.

Los resultados del presente estudio señalan una nueva aplicación para los fármacos existentes en la inducción de la activación del VIH-1 desde la quiescencia. También señala estrategias novedosas basadas en combinaciones de dos fármacos que activan el VIH-1 a concentraciones de fármaco no tóxicas. Se descubrió en el presente estudio que la auranofina, un fármaco utilizado satisfactoriamente para el tratamiento de la artritis reumatoide y la leucemia, induce la activación del VIH-1 desde la quiescencia a concentraciones que pueden alcanzarse clínicamente, que tienen un perfil de toxicidad que está bien caracterizado y que se ha demostrado que no pone en peligro la salud humana. Además, los inventores demuestran que las concentraciones de auranofina eficaces pueden reducirse adicionalmente por el uso concomitante de otros agentes de activación del VIH-1 tales como los HDACI, actuando mediante diferentes mecanismos.

Los resultados mostraron que la auranofina indujo una reactivación del VIH-1 dependiente del tiempo y de la dosis ($P = 0,0295$, ensayo t para la regresión; Fig. 5) en el intervalo de concentraciones de 0,125-0,5 microM, aproximándose a los niveles medios en plasma observados durante el tratamiento de la artritis reumatoide [Benn y otros, 1991]. En línea con su capacidad de inducir la activación del VIH-1, la translocación nuclear de NF-kappaB, un importante factor de transcripción del VIH-1, inducida por auranofina. Los efectos de la auranofina sobre la activación del VIH-1 desde la quiescencia eran aditivos o sinérgicos con los de otros compuestos potenciadores de la replicación del VIH-1. Estos incluían los inhibidores de histona desacetilasa (HDACI), que favorecen la transcripción del VIH-1 por la regulación epigenética del enrollamiento del ADN, el nitrilotriacetato de hierro, que promueve la transcripción del VIH-1 por la generación intracelular de especies reactivas de oxígeno (ERO) y la sulfoximina butionina, un inhibidor de la síntesis de glutatión que deteriora la capacidad de la célula para contrarrestar el estrés oxidativo. Estos efectos combinados permiten tanto el uso de la auranofina como el de cada uno de los fármacos mencionados anteriormente a concentraciones que no son tóxicas para las células no infectadas.

Encontrar posibles curas para el VIH-1/SIDA, capaces de erradicar el virus del cuerpo, es un importante reto científico para el siglo 21. Una vía de investigación adicional está dirigida a la investigación de posibles fármacos y combinaciones de fármacos útiles para la eliminación de reservorios de VIH-1 latente que persisten a pesar de la terapia antirretroviral (TAR). Esto implica superar la barrera latente mediante la inducción de la replicación del VIH en los linfocitos T infectados de forma latente, previniendo al mismo tiempo la propagación de los viriones recién producidas a células no infectadas proporcionando TAR simultáneamente. Se ha postulado que los inhibidores de la histona desacetilasa (HDACi) son herramientas potencialmente útiles en las estrategias de erradicación del VIH-1

[Demonte *et al.*, 2004], y se demostró que el ácido valproico (AV), un HDACi relativamente débil, promueve el escape del VIH-1 de la latencia *in vitro* y reduce el número de linfocitos CD4⁺ de memoria infectados de forma latente *in vivo* en combinación con la terapia antirretroviral [Lehrman *et al.*, 2005; Smith, 2005]. Dichas estrategias se han denominado "golpear y destruir" [Hamer, 2004]. Es probable que la baja potencia del VA (CE₅₀ en el intervalo milimolar) haya contribuido a su incapacidad para inducir la erradicación del VIH-1.

Se han desarrollado HDACi nuevos y más potentes para inducir la diferenciación en tumores [Mottet y Castronovo, 2008]. Muchos de los nuevos agentes, sin embargo, son inhibidores no específicos para todos los tipos de HDAC, que desempeñan diversas funciones importantes en el ciclo celular [Dokmanovic *et al.*, 2007]. Las HDAC de clase I comprenden HDAC1-3 y 8, son predominantemente enzimas nucleares y se expresan de forma ubicua [Annemieke *et al.*, 2003]. Las HDAC de clase II comprenden HDAC4-7, 9 y 10 y se transportan entre el núcleo y el citoplasma [Annemieke *et al.*, 2003]. La HDAC1 probablemente mantiene la latencia del VIH-1 actuando en un complejo multimolecular con c-Myc y los LTR [Williams *et al.*, 2006; Jiang *et al.*, 2007].

Se han explorado otras estrategias para la inducción de escape del VIH-1 de la latencia, incluyendo el uso de la sustancia natural prostratina (cuyos mecanismos están, hasta ahora, en gran parte sin explorar) y diacil glicerol lactonas que interfieren con la activación de linfocitos T [Hezareth, 2005; Hamer, 2004].

El estrés oxidativo es otro medio potente que promueve la replicación del VIH-1 [Hulgan *et al.*, 2003; Savarino *et al.*; 1999; Garaci *et al.*, 1997; Palamara *et al.*, 1996]. Los intermediarios reactivos de oxígeno promueven la activación y translocación nuclear del factor nuclear kappaB (NF-kappaB) [Bowie y O'Neill, 2000], un factor de transcripción que potencia la transcripción y replicación del VIH-1, que puede ser inhibida por altas concentraciones de glutatión y otros antioxidantes [Palamara *et al.*, 1996]. Los moduladores del estado redox de molécula pequeña, hasta ahora, se han explorado poco para determinar su potencial de erradicación del VIH-1.

Los inventores han descubierto ahora, sorprendentemente, que dos tipos de inhibidor HDACi, las benzamidas y los hidroxamatos, muestran una notable actividad en la activación de los reservorios de retrovirus latente preferentemente en combinación con el inhibidor de la síntesis de glutatión, butionina sulfoximina (BSO). En combinación con la terapia o el tratamiento antirretrovirales conocidos (ART), esto, puede usarse entonces en la terapia para reducir o eliminar la infección por retrovirus.

Específicamente, se ha descubierto que los inhibidores de histona desacetilasas benzamida y hidroxamato estimulan la reproducción del retrovirus desde reservorios latentes del mismo y esto puede usarse para reducir o eliminar estos depósitos en combinación con la terapia antirretroviral convencional. Además, se ha descubierto que la sulfoximina butionina (BSO) sustancialmente potencia la actividad antirretroviral de los HDACi de benzamida. También se prefieren análogos de BSO.

Se desvela un inhibidor de histona desacetilasa (HDACi) ya sea de la variedad benzamida o hidroxamato para su uso en el tratamiento de la infección retroviral latente. El HDACi puede usarse en combinación con BSO.

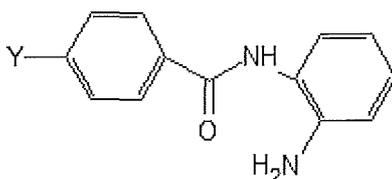
El inhibidor es capaz de inducir la replicación retroviral en un modelo reconocido de una infección latente de dicho retrovirus. En el caso del VIH-1, este modelo puede seleccionarse entre U1 y ACH-2, por ejemplo. Se prefiere adicionalmente que los compuestos de la presente invención tengan una actividad mínima en el ensayo de U1 descrito en el presente documento a continuación en la sección Experimental adjunta, de un aumento de 800 veces (%).

Al igual que con los compuestos que contienen oro, el retrovirus es el VIH-1.

De este modo, los HDACi pueden usarse, por ejemplo, con inductores del estrés oxidativo. El inductor del estrés oxidativo es la auranofina y el trióxido de arsénico y puede incluir inhibidores de la síntesis de glutatión, tales como BSO. A continuación se describen HDACi.

Los HDI denominados "clásicos" actúan sobre las histonas desacetilasas de Clase I y Clase II. El HDACi clásico se unen al dominio catalítico que contiene cinc de la HDAC. Estos HDI clásicos pertenecen a varios grupos. Estos incluyen ácidos hidroxámicos, tales como tricostatina A; tetrapéptidos cíclicos (tales como trapoxina B) y los depsipéptidos; benzamidas; cetonas electrófilas; y compuestos de ácido alifático tales como fenilbutirato y ácido valproico. Los HDI denominados "de segunda generación" incluyen SAHA/Vorinostat, Belinostat/PXD101, MS275, LAQ824/LBH589, CI994 y MGCD0103. Las HDAC de clase III de sirtuina son dependientes de NAD⁺ y, por tanto, son inhibidas por la nicotinamida, así como por derivados de NAD, dihidroumarina, naftopiranona y 2-hidroxinafaldehídos. Se prefiere en particular el ácido suberoilánilida hidroxámico (SAHA), especialmente en combinación con compuestos que contienen oro tales como la auranofina.

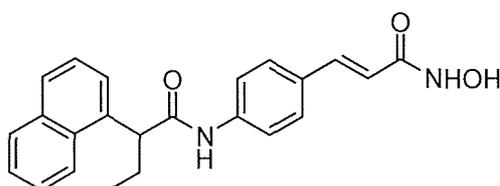
Se desvelan HDACi de benzamida. Estos pueden tener la fórmula:



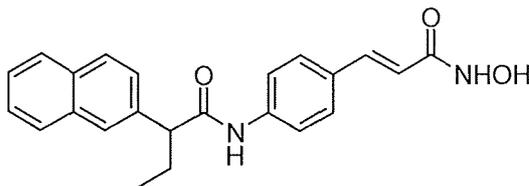
5 en la que Y comprende uno o dos anillos de seis miembros, estando cada uno insaturado o parcialmente insaturado y siendo heterocíclico u homocíclico, con dos a ocho átomos de unión y en la que cualquiera de los átomos de unión o un anillo comprende un grupo amino y un grupo carbonilo.

Algunas benzamidas son análogos de los compuestos identificados como MC 2211, MC2113 y MS 275 a continuación.

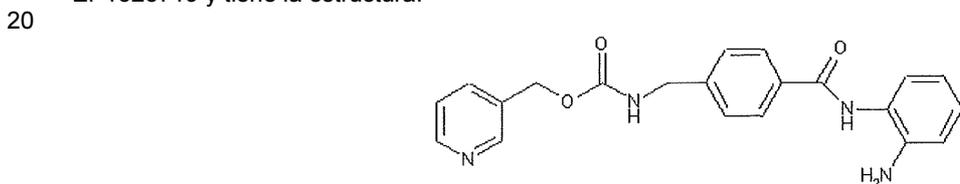
10 MC 2211 es:



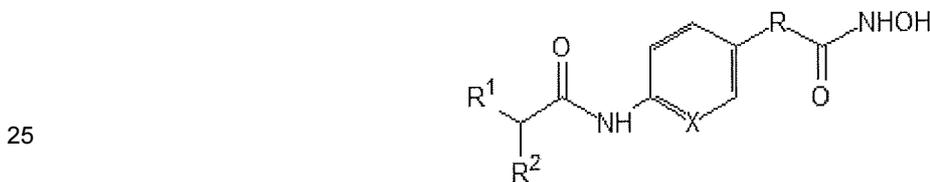
15 MC2113 es:



20 Se desvela MS 275 o N-(2-aminofenil)-4-[N-(piridin-3-ilmetoxicarbonil)aminometil]benzamida, en el documento EP1626719 y tiene la estructura:



Los HDACi de hidroxamato tienen la fórmula:



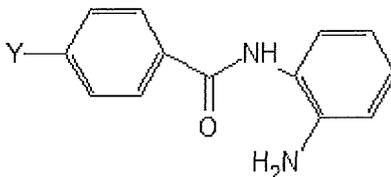
25 en la que R es un enlace directo o un grupo etileno o etenileno, X es =CH- o =N-, R¹ es arilo o heteroarilo y es mono- o bi-cíclico y R² es alquilo de cadena lineal o ramificada, opcionalmente sustituido con un arilo o heteroarilo mono- o bi-cíclico. R² puede ser alquilo sin sustituir, preferentemente metilo, etilo o isopropilo. R¹ puede ser fenilo o naftilo. R puede ser etenileno. X puede ser =CH-. Los HDACi pueden ser HDACi de Clase 1.

30 También se desvelan HDACi de hidroxamato tales como ácido suberoilánilida hidroxámico (SAHA). Esta es una molécula polar híbrida que contiene ácido hidroxámico y se une a e inhibe específicamente la actividad de la histona desacetilasa. Se sabe en la técnica que SAHA presenta un efecto antitumoral mediante el aumento de la expresión de genes que regulan la supervivencia del tumor y que SAHA reduce la producción de citocinas proinflamatorias *in vivo* e *in vitro* (Mascagni *et al.*, "The antitumor histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid exhibits antiinflammatory properties via suppression of cytokines", *PNAS*, 5 de marzo de 2002, vol. 99 n.º 5 2995-3000).

También se prevé un inhibidor de histona desacetilasa (HDACi) en el tratamiento de la infección retroviral latente. El inhibidor puede seleccionarse entre los HDACi analizados en el presente documento y los siguientes:

a) un inhibidor de HDAC de benzamida que tiene la fórmula:

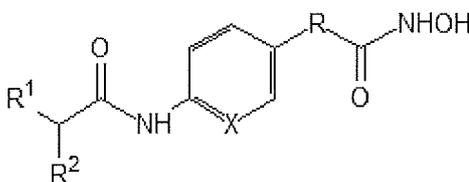
5



en la que Y comprende uno o dos anillos de seis miembros, estando cada uno insaturado o parcialmente insaturado y siendo heterocíclico o homocíclico, con dos a ocho átomos de unión, y en la que ya sea los átomos de unión o un anillo comprende un grupo amino y un grupo carbonilo; o

10

b) un inhibidor de HDAC de hidroxamato que tiene la fórmula:



15

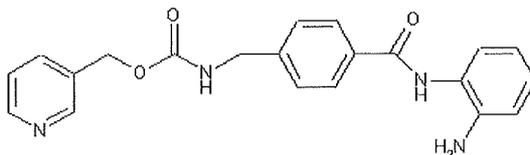
en la que R es un enlace directo o un grupo etileno o etenileno, X es =CH- o =N-, R¹ es arilo o heteroarilo y es mono- o bi-cíclico y R² es alquilo de cadena lineal o ramificada, sustituido opcionalmente con un arilo o heteroarilo mono- o bi-cíclico. El HDACi puede ser un HDACi de clase I.

20

El inhibidor puede ser capaz de inducir la replicación retroviral en un modelo reconocido de una infección latente de dicho retrovirus. El retrovirus puede ser un virus VIH, preferentemente el VIH-1 y el modelo puede seleccionarse entre los modelos celulares U1 y ACH2.

La benzamida puede ser un análogo de uno de los compuestos identificados como MC 2211 y MS 275 en el presente documento. El inhibidor puede ser un compuesto que tiene la fórmula:

25



R² puede ser un grupo alquilo sin sustituir, preferentemente metilo, etilo o isopropilo. R¹ puede ser fenilo o naftilo. R puede ser etenileno. X puede ser =CH-.

30

El inhibidor puede ser un inhibidor de Clase 1 y no inespecífico. El tratamiento puede incluir, además, la terapia antirretroviral.

35

También se desvela un inhibidor de la histona desacetilasa (HDACi), en particular de la variedad benzamida, en combinación con un inhibidor de la síntesis de glutatión, tal como BSO (butionina sulfoximina), para su uso en el tratamiento de la infección retroviral latente. El inhibidor puede ser N-(2-aminofenil)-4-[N-(piridin-3-ilmetoxicarbonil)aminometil]benzamida). La BSO y el HDACi de benzamida pueden administrarse juntos.

40

El Ejemplo 2 adjunto proporciona técnicas adecuadas para establecer qué clase de HDAC inhiben los compuestos. Los HDACi no son HDACi inespecíficos.

Los HDACi de pueden usarse en el tratamiento de pacientes con sospecha de tener reservorios latentes de retrovirus. Dichos retrovirus se denominarán en el presente documento como VIH-1.

45

El tratamiento puede eliminar cualquier reservorio latente de retrovirus. Sin embargo, se apreciará que dichos tratamientos también pueden usarse, menos preferentemente, para controlar retrovirus latentes. Esto puede ser ventajoso cuando un individuo es particularmente susceptible de repetir las infecciones a partir de los reservorios, por ejemplo.

50

Un reservorio latente es una célula o células que contienen el retrovirus ya sea en quiescencia o replicándose a tasas bajas, tales como a menos del 5 % de la tasa normal, de manera que la célula puede actuar para proteger el virus durante un periodo de tiempo, y con frecuencia solo libera viriones viables semanas o meses después de que el tratamiento antirretroviral normal se haya detenido, requiriendo de este modo la continuación del tratamiento del individuo, en caso de que la infección reaparezca a través de un reservorio de este tipo.

El tratamiento antirretroviral "normal" mencionado anteriormente y que se administra a individuos infectados con VIH-1, generalmente consiste en una combinación de al menos tres fármacos diferentes que pertenecen a diferentes clases y normalmente se seleccionan entre inhibidores de la transcriptasa inversa nucleosídicos/nucleotídicos (NRTI, del inglés *nucleosidic/nucleotidic reverse transcriptase inhibitors*), los inhibidores de la transcriptasa inversa no nucleosídicos (NNRTI, del inglés *non-nucleosidic reverse transcriptase inhibitors*) y los inhibidores de la proteasa (Pi). Un inhibidor de la fusión también puede formar parte del tratamiento. Recientemente, se ha añadido una clase adicional de fármaco, los inhibidores de la integrasa, al arsenal de fármacos antirretrovirales. Las combinaciones de fármacos antirretrovirales, en general, muestran la capacidad de bloquear la replicación viral en curso, pero no tienen posibilidades de erradicar el virus del cuerpo.

Para la eliminación de los reservorios retrovirales, las estrategias actuales postulan el uso de HDACi, especialmente los HDACi de clase 1, junto con la terapia antirretroviral convencional, como se sabe bien en la técnica y como se ha descrito anteriormente, por ejemplo [Savarino *et al.* 2009].

El documento WO2007/121429 (Gladstone Institute) y el documento WO 03/053468 (Univ Libre Bruxelles) se refieren a los usos de HDACi. Se desvela HDACi de diversas estructuras en el documento WO 2004/069823 (MetilGene, Inc) y en el documento WO 2004/103369 (Schering AG). Munier S *et al.* (*Retrovirology*, 23, noviembre de 2005, 2:73) describe la caracterización de dos genes candidatos, NCoA3 y IRF8, que pueden estar implicados en el control de la latencia del VIH-1. Garaci *et al.* (*Journal of Leukocyte Biology*, julio de 1997, Vol 62, n.º 1, págs. 54-59) describe ciertos usos de BSO.

El HDACi puede administrarse directamente al paciente en cualquier vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado, y por cualquier vía adecuada, como puede determinarse por un experto o un médico. El HDACi puede administrarse como una inyección o por parche transdérmico, por ejemplo, y puede estar en solución libre o unido a un vehículo. Otras formulaciones, tales como comprimidos, supositorios, cremas y pulverizaciones serán en general menos útiles, aunque pueden usarse si se considera apropiado.

Los vehículos adecuados pueden incluir liposomas dirigidos, que llevan anticuerpos adecuados, pero las células infectadas latentes se asocian en gran medida a la circulación, por lo que la administración por inyección intravenosa es una vía particularmente preferida.

También se desvelan los compuestos novedosos de la Tabla 1 e, independientemente, métodos para preparar los mismos, como se ilustra en la sección Experimental adjunta.

Los inventores desvelan en el presente documento formulaciones farmacéuticamente aceptables de los nuevos compuestos de la invención.

Los inventores desvelan en el presente documento un método para la eliminación selectiva de células infectadas de forma latente, en el que las células son infectadas de forma latente por un lentivirus, especialmente el VIH-1, comprendiendo dicho tratamiento poner en contacto dichas células con un HDACi de la invención en combinación con la terapia antirretroviral.

Lo que es particularmente sorprendente es que se ha descubierto que los HDACi de benzamida son potenciados por la butionina sulfoximina (BSO) a niveles de hasta el 800 %. Esto es especialmente sorprendente ya que la BSO no tiene ninguna actividad anti-VIH-1 apreciable, pero es susceptible de una acción sinérgica con MS 275, por ejemplo, para aumentar muy sustancialmente su capacidad de destruir células que tienen una infección por VIH-1 latente.

Esta potenciación tiene la ventaja añadida de reducir la cantidad de HDACi y BSO necesaria para el tratamiento del paciente. Por ejemplo, tanto MS 275 como BSO ya se han ensayado para determinar la seguridad en seres humanos y las cantidades de MS 275 tal como se usan para el tratamiento del cáncer son generalmente mayores que las necesarias para el tratamiento proporcionado por la presente invención. El intervalo de dosificación para MS 275 está en un intervalo de aproximadamente 0,05-0,1 mg/kg una vez por semana o según lo prescrito por el médico. La BSO puede administrarse simultáneamente con MS 275, a una dosificación de 0,1-0,3 mg/kg y las dosis posteriores, de tres a cinco en número, pueden administrarse una vez o dos veces al día, por ejemplo, cada 12 h.

Se desvela un inhibidor de histona desacetilasa, tal como la variedad de benzamida, en combinación con butionina sulfoximina, para su uso en el tratamiento de la infección retroviral latente.

El método descrito anteriormente para la eliminación selectiva de las células infectadas de forma latente pueden comprender adicionalmente poner en contacto dichas células con BSO en combinación con dicho HDACi, en los

tiempos que se describen en el presente documento.

Aunque BSO y HDACi trabajan sinérgicamente, ninguno es tóxico y los dos pueden administrarse juntos o por separado, a condición de que ambos estén presentes *in vivo*, preferentemente en particular en cantidades sinérgicas. La BSO puede formularse con la benzamida o puede administrarse por separado si existe algún problema en la formulación de los dos principios activos o si las condiciones de estabilidad para uno no son compatibles con el otro, por ejemplo.

Como se ha señalado anteriormente, en general, se ha descubierto que el HDACi selectivo de clase I muestra menor toxicidad que los compuestos no selectivos, e induce la destrucción selectiva de las células U1, ACH-2 y H9 IIB infectadas por VIH-1, en comparación con sus homólogas no infectadas ($P < 0,01$, ensayo *t* para determinar la pendiente).

Los inventores compararon la toxicidad de la combinación BSO + HDACi en estirpes celulares no infectadas y en estirpes celulares infectadas de forma latente. Los resultados mostraron que, usando BSO en combinación con HDACi, hubo una marcada citotoxicidad a las 72 h de incubación en los cultivos de células infectadas de forma latente, pero no en los cultivos de células no infectadas (Figura 14). Además de amplificar el efecto de los inhibidores de histona desacetilasa, los resultados del presente estudio permiten a los inventores plantear la hipótesis de que la estrategia de uso de agentes pro-oxidantes tales como BSO en combinación con HDACi es capaz de inducir la destrucción selectiva de las células infectadas de forma latente.

Esta estrategia puede considerarse como uno de las largamente codiciadas estrategias "golpear y destruir" estrategias. Estas estrategias consisten en inducir, a través de fármacos, la activación del VIH-1 desde la quiescencia (es decir, la fase de "golpear"), en presencia de TAR (para bloquear la propagación viral), seguido de la eliminación de las células infectadas (es decir, la fase de "destruir"), a través ya sea de medios naturales (por ejemplo, respuesta inmunitaria, citopatogenicidad viral) o medios artificiales (por ejemplo, fármacos, anticuerpos monoclonales, etc.) [Hamer DH, 2004]. De hecho, la estrategia se basa en un HDACi, que activa la replicación del VIH-1 en las células infectadas de forma latente (es decir, la fase de "golpear"), en combinación con un agente pro-oxidante tal como BSO, que amplifica la respuesta del HDCAi y provoca daño celular debido a la disminución inducida por VIH-1 de los niveles intracelulares de glutatión reducido (es decir, la fase de "destruir"). La búsqueda de una combinación de fármacos capaces de ejercer dichos efectos, hasta el momento, ha sido un "Santo Grial" en la investigación del SIDA.

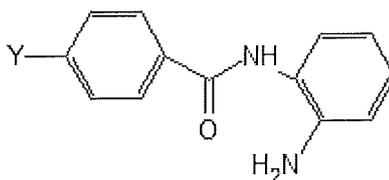
Los inventores han demostrado en el presente documento que los compuestos que contienen oro son útiles en los tratamientos de la presente invención. Sorprendentemente, también han descubierto que los compuestos que contienen arsénico son útiles de forma similar.

Por tanto, la invención también proporciona un compuesto que contiene arsénico para su uso, en el tratamiento de la infección retroviral latente. Preferentemente, el compuesto es capaz de inducir la replicación retroviral en un modelo reconocido de una infección latente de dicho retrovirus. El retrovirus es el VIH-1 y el modelo puede seleccionarse entre los modelos celulares U1 y ACH-2. El compuesto que contiene arsénico es un óxido de arsénico, tal como As_4O_6 , aunque se prefiere en particular el trióxido de arsénico (As_2O_3).

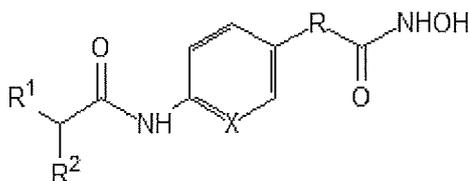
Preferentemente, la invención puede comprender adicionalmente al menos otro inductor del estrés oxidativo, tal como un metalofármaco modulador epigenético sin hierro, por ejemplo compuestos que contienen oro, tales como la auranofina; una molécula pro-oxidante, por ejemplo, un inhibidor de la síntesis de glutatión tal como BSO; y/o nitrilotriacetato de hierro o sulfato de 5945301-1 JTOCHER ferroso. El HDACi puede ser cualquiera de los definidos anteriormente y en particular de los HDACi de clase I.

Los HDACi pueden ser:

un HDACi de benzamida que tiene la fórmula:



en la que Y comprende uno o dos anillos de seis miembros, estando cada uno insaturado o parcialmente insaturado y siendo heterocíclico o homocíclico, con dos a ocho átomos de unión y en la que cualquiera de los átomos de unión o un anillo comprende un grupo amino y un grupo carbonilo; o un HDACi de hidroxamato que tiene la fórmula:



5 en la que R es un enlace directo o un grupo etileno o etenileno, X es =CH- o =N-, R¹ es arilo o heteroarilo y es mono- o bi-cíclico y R² es alquilo de cadena lineal o ramificada, opcionalmente sustituido con un grupo arilo o heteroarilo mono- o bi-cíclico.

10 También se desvela un método de tratamiento de un paciente con sospecha de tener un reservorio retroviral, que comprende administrar a dicho paciente el compuesto que contiene arsénico, que también puede incluir la administración de al menos otro inductor del estrés oxidativo, tal como un metalofármaco modulador epigenético sin hierro, por ejemplo compuestos que contienen oro, tales como la auranofina; un inhibidor de histona desacetilasa (HDACi); una molécula pro-oxidante, por ejemplo, un inhibidor de la síntesis de glutatión tal como BSO; y/o nitrilotriacetato de hierro o sulfato ferroso. Se prefieren pacientes que presenten un recuento bajo de CD4. Dichos pacientes pueden estar sometidos o haber sido sometidos a terapia antirretroviral (TAR).

15 Todos los aspectos de la presente invención pueden usarse en el tratamiento de los reservorios latentes de los retrovirus, que están presentes en cada infección retroviral. La presente invención puede usarse en el tratamiento de pacientes con sospecha de reservorios latentes de retrovirus. Dichos retrovirus se denominarán en el presente documento VIH-1.

20 El tratamiento tiene por objeto eliminar cualquier depósito latente del VIH-1. Sin embargo, se apreciará que dichos tratamientos también pueden usarse, menos preferentemente, para controlar retrovirus latentes. Esto puede ser ventajoso cuando un individuo es particularmente susceptible de reiniciar las infecciones a partir de los reservorios, por ejemplo. La destrucción selectiva de las células infectadas de forma latente descrita anteriormente es particularmente ventajosa.

25 Un reservorio latente es una célula o células que contienen el retrovirus ya sea en quiescencia o replicándose a tasas bajas, tales como a menos del 5 % de la tasa normal, de manera que la célula puede actuar para proteger el virus durante un periodo de tiempo, y con frecuencia solo libera viriones viables semanas o meses después de que el tratamiento antirretroviral normal se haya detenido, requiriendo de este modo la continuación del tratamiento del individuo, cuando la infección reaparece a través de un reservorio de este tipo.

35 El tratamiento antirretroviral "normal" mencionado anteriormente y que se administra a individuos infectados con VIH-1, generalmente consiste en una combinación de al menos tres fármacos diferentes que pertenecen a diferentes clases y normalmente se seleccionan entre inhibidores de la transcriptasa inversa nucleosídicos/nucleotídicos (NRTI, del inglés *nucleosidic/nucleotidic reverse transcriptase inhibitors*), los inhibidores de la transcriptasa inversa no nucleosídicos (NNRTI, del inglés *non-nucleosidic reverse transcriptase inhibitors*) y los inhibidores de la proteasa (Pi). Un inhibidor de la fusión, o un bloqueante del receptor de quimiocinas también pueden formar parte del tratamiento. Recientemente, se ha añadido una clase adicional de fármaco, los inhibidores de la integrasa, al arsenal de fármacos antirretrovirales. Las combinaciones de fármacos antirretrovirales, en general, muestran la capacidad de bloquear la replicación viral en curso, pero no tienen posibilidades de erradicar el virus del cuerpo.

40 En el presente documento se hace referencia a activos. Se apreciará que esto se refiere a los inductores de estrés oxidativo, que se analizan en el presente documento.

45 Para la eliminación de reservorios retrovirales, el tratamiento desvelado en el presente documento usa los presentes activos, junto con una terapia antirretroviral convencional, como es bien sabido en la técnica y como se ha descrito anteriormente, por ejemplo.

50 Los activos pueden administrarse directamente al paciente en cualquier vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado, y por cualquier vía adecuada, como puede determinarse por un experto o un médico. Los activos pueden administrarse por vía oral o como una inyección o por parche transdérmico, por ejemplo y pueden estar en solución libre o unidos a un vehículo. Otras formulaciones, tales como comprimidos, supositorios, cremas y pulverizaciones serán generalmente menos útiles, aunque pueden usarse si se considera apropiado.

55 La administración adecuada puede ser simultánea o mediante entrega por separado. Los vehículos adecuados pueden incluir liposomas dirigidos, que llevan anticuerpos adecuados, pero las células infectadas latentes se asocian en gran medida a la circulación, por lo que la administración por inyección intravenosa también se considera, aunque la vía de administración preferida para todos los compuestos de la presente invención es la oral.

60

Los inventores desvelan en el presente documento un método para la eliminación selectiva de células infectadas de forma latente, en el que las células son infectadas de forma latente por un lentivirus, especialmente el VIH-1, dicho tratamiento comprende poner en contacto dichas células con un HDACi en combinación con la terapia antirretroviral.

- 5 Se ha demostrado potenciación (sinergia) entre muchos de los compuestos de la presente invención con los HDACi. Esto tiene la ventaja añadida de reducir la cantidad de activos necesarios para el tratamiento del paciente.

Además, muchos de estos activos ya han sido aprobados para la administración a seres humanos o han pasado la fase I de ensayos clínicos para determinar la seguridad.

- 10 Por tanto, la presente invención proporciona adicionalmente el uso de los presentes activos en el tratamiento de la infección por VIH-1 latente y para la eliminación selectiva de las células infectadas de forma latente.

- 15 También se prevé que los inhibidores de la síntesis de glutatión tales como butionina sulfoximina (BSO) pueden usarse solos en el tratamiento de los reservorios retrovirales, es decir, en el tratamiento de células infectadas de forma latente, preferentemente dirigiéndose y destruyendo selectivamente las células infectadas, pero no las no infectadas.

- 20 Pueden usarse combinaciones de cualquiera de los inductores de estrés oxidativo (metalofármacos moduladores epigenéticos sin hierro) e inhibidores de la síntesis de glutatión descritos en el presente documento.

Los HDACi pueden ser HDACi de clase I. Los ejemplos de los mismos incluyen los descritos en Mai *et al.* 2009.

- 25 La siguiente sección experimental es solo para ilustración y no es limitante de la presente invención.

Ejemplo 1 - Auranofina

MÉTODOS

- 30 **Inducción de VIH-1 en células U1 y ACH-2.** Se incubaron células ACH-2 forma infectadas por VIH 1 de forma latente con los compuestos en placas de 96 pocillos en condiciones de cultivo convencionales (medio RPMI, suero bovino fetal al 10 %/FBS y antibióticos apropiados, que se cambiaron de tanto en tanto con el fin de evitar la selección de bacterias contaminantes resistentes a fármacos) y se midió el contenido de antígeno de núcleo de p24 de VIH-1 en el sobrenadante a las 24 y 72 h de incubación mediante kits ELISA de p24 de VIH-1 (Perkin elmers, Boston, MA), siguiendo las instrucciones del fabricante. La viabilidad celular se ensayó para cada tratamiento después de la recolección de los sobrenadantes, como se indica a continuación.

- 35 **Ensayo de viabilidad celular.** La viabilidad celular se cuantificó usando el procedimiento de metil tetrazolio (MTT). Los valores de absorbancia se generaron a una longitud de onda de 550 nm usando lectores de ELISA de 96 pocillos y se restan los valores de blanco usando medios de cultivo celular en ausencia de células. La viabilidad celular en presencia de los compuestos de ensayo se expresó como un porcentaje de la viabilidad celular de cultivos celulares control sin tratar.

- 45 **Ensayo para la detección de los efectos combinados de dos fármacos.** Para la detección de sinergia/antagonismo/aditividad, las células se incubaron con diferentes concentraciones ya sea de cualquiera de los fármacos solos o ambos fármacos en combinación, y, de nuevo, la replicación viral se cuantificó a los tres días de incubación mediante ensayos ELISA.

- 50 **Citometría de flujo.** Para determinar la expresión controlada por el LTR del VIH-1 de la proteína fluorescente verde (GFP) en los clones de células Jurkat, las células se agruparon y se lavaron tres veces en PBS enfriado con hielo con NaN₃ (0,02 %) y albúmina de suero bovino (2 %; PBS A/A). Después, las células se fijaron en paraformaldehído al 1 % durante 20 min, se lavaron y se resuspendieron en PBS A/A. Después, la fluorescencia se obtuvo mediante un citómetro de flujo (FACScalibur, Becton-Dickinson, Mountain View, CA). Los datos de fluorescencia se recogieron en una escala logarítmica 4-década y la intensidad de fluorescencia relativa se expresó como el porcentaje de células fluorescentes más allá del valor umbral establecido usando células Jurkat no transfectadas.

- 60 **Detección de translocación nuclear de NF-kappaB.** Se obtuvieron extractos nucleares de células 8.4 Jurkat de control y células tratadas con auranofina en diferentes momentos de incubación usando un kit de extracción nuclear (Chemicon International), siguiendo las instrucciones del fabricante. La translocación nuclear de NF-kappaB se detectó usando un ensayo de factor de transcripción colorimétrico (Millipore) para la subunidad p65. Los resultados se expresaron como un porcentaje de la señal obtenida en las células incubadas con la citocina estimulante potente de NF-kappaB, TNF-alfa (5 ng/ml) durante 1,5 h, momento en el que se alcanza el pico de la translocación nuclear de NF-kappaB.

- 65 **Análisis de los datos.** Los experimentos se realizaron en, al menos, dos ocasiones diferentes con resultados similares y los resultados se muestran como medias. Los análisis se realizaron usando el software GraphPad. Para

las curvas de dependencia de la concentración, los valores de porcentaje de control se representaron frente a las diferentes concentraciones de fármaco. Se aplicó una transformación apropiada para restablecer la normalidad en caso necesario. Las líneas, o curvas, que mejor ajustan los puntos de datos se generaron mediante el método de mínimos cuadrados. Se considera que el umbral para la significación era $P = 0,05$, en caso de regresión lineal, o $R^2 = 0,7$, en caso de regresión no lineal. Se prefirió la regresión no lineal sobre la regresión lineal (también en el caso de que ésta última fuera significativa), donde el R^2 era superior. Las diferencias entre las respuestas a la concentración de fármaco se analizaron mediante el ensayo t para determinar la pendiente.

La sinergia se analizó por medio de los valores de porcentaje de-sinergia, que representan la diferencia porcentual entre los efectos de la combinación de fármacos y la suma de los efectos de cualquiera de los fármacos administrados por separado a concentraciones emparejadas, calculada como se indica a continuación:

$$PS = 100 \cdot [E_{\text{fármaco A} + \text{fármaco B}} - (E_{\text{fármaco A}} + E_{\text{fármaco B}})] / (E_{\text{fármaco A}} + E_{\text{fármaco B}})$$

donde PS es el porcentaje de sinergia y E es el efecto del fármaco, expresado como el aumento de la producción de p24. Se generaron gráficos x, y, z tridimensionales (3D) mediante el trazado de los valores de porcentaje de sinergia (eje z) frente a las concentraciones los fármacos emparejados empleados (en los ejes x e y). Las superficies 3D se generaron usando Microsoft Excel. Las superficies altamente convexas indican sinergia. Las superficies planas indican un efecto aditivo, mientras que las superficies cóncavas muestran antagonismo.

20 RESULTADOS

Activación del VIH-1 por auranofina en células U1 y ACH-2

Para evaluar preliminarmente los efectos activadores del VIH-1 de la auranofina en estirpes celulares en las que las etapas posteriores a la integración de la replicación del VIH-1 son inducibles, se incubaron células ACH-2 linfoides T y U1 monocíticas infectadas por VIH-1 con concentraciones crecientes del compuesto y la replicación del VIH-1 se midió a las 24 h (datos no mostrados) y a las 72 h de incubación (La Fig. 2 muestra los datos de células ACH-2). Se usaron 5 ng/ml de TNF-alfa, una citocina que promueve potentemente la replicación del VIH-1 mediante la inducción de la activación de NF-kappaB (p65/p50) como control positivo. Los resultados mostraron que la auranofina aumentó la replicación del VIH-1 en una forma dependiente del tiempo y de la dosis ($P = 0,0295$, ensayo t para la regresión; Fig. 5B) en el intervalo de concentraciones de 0,125-0,5 μM , aproximándose a los niveles medios en plasma observados durante tratamiento de la artritis reumatoide [Benn *et al.*, 1991].

Ha de observarse que el efecto activador del VIH-1 de la auranofina fue sinérgico con el de MC2113, un HDACI de clase I de la biblioteca institucional de los inventores dotado con poca toxicidad [Rotili *et al.*, 2009]. Esto se demostró en experimentos en los que la auranofina se administró conjuntamente con MC 2113 a las células U1 (Fig. 3). El efecto fue visible tan pronto como a las 24 h de incubación.

La base celular para la respuesta a auranofina

Para evaluar la respuesta a la auranofina dentro de una población celular, se usó el clon 8.4 de células Jurkat linfoides T infectadas de forma latente, establecido por Jordan *et al.* [Jordan *et al.*, 2003]. Este clon de célula contiene la totalidad del genoma del VIH-1 bajo el control del LTR y presenta el gen GFP que reemplaza a *nef*. A diferencia de las células U1, estas células muestran niveles basales no significativas de expresión de VIH-1 y tienen un eje funcional Tat/TAR. En las células 8.4, la auranofina induce un cambio dependiente de la dosis en la fluorescencia (Fig. 4), que fue evidente sobre todo en las concentraciones más altas adoptadas. También se exploró la base celular para los efectos aditivos de la combinación HDACI/auranofina. Los inventores descubrieron que la adición de auranofina reclutó las células que no respondían a HDACI a la población de células que responden (Fig. 5).

Se obtuvieron resultados similares en otras estirpes celulares que expresan GFP bajo el control del LTR del VIH-1 y usando otras HDACi tales como el ácido suberoilánilida hidroxámico (SAHA). Las células Jurkat A1 tienen un gen de proteína fluorescente verde (GFP) bajo el control del LTR del VIH-1, que está quiescente en una porción de la población celular. Estas células se trataron con una concentración clínicamente relevante de auranofina (0,25 μM) o 1 μM de MC2113 o ambos. Los datos se presentan como el porcentaje de células fluorescentes más allá de un umbral establecido usando células Jurkat que no expresan GFP. Estos datos demostraron la inducción de la expresión controlada por LTR de proteína verde fluorescente (GFP) por auranofina y un inhibidor de la histona desacetilasa no específico de clase (SAHA).

Translocación nuclear de NF-kappaB inducida por auranofina

Es bien sabido que el estrés oxidativo provoca la activación y la localización nuclear del heterodímero de NF-kappaB Rel A (p65)/p50 [Rahman *et al.*, 2004], que es importante para la transcripción y la replicación del VIH-1 [Williams *et al.*, 2007]. Si la auranofina activa el VIH-1 desde la quiescencia mediante la inducción de un estrés oxidativo en las células diana, entonces, la translocación nuclear de NF-kappa B (p65/p50) debe ser visible. Para ensayar esta hipótesis, alícuotas de extractos nucleares de células 8.4 Jurkat tratadas con auranofina (250 μM) se sometieron a

un ensayo colorimétrico para la subunidad p65 (EREA) de NF-kappaB. Los resultados mostraron una acumulación de NF-kappaB dependiente del tiempo dentro de los núcleos (Fig. 6). Se concluye que la auranofina induce la activación de NF-kappaB (p65/p50) en condiciones similares a aquellas en las que se activa el VIH-1 a partir de la quiescencia.

5

Efectos sinérgicos de la auranofina con otras estrategias pro-oxidantes

Para conseguir algo de conocimiento sobre la activación del VIH-1 inducida por auranofina desde la quiescencia, los efectos del fármaco se ensayaron en presencia de algunas moléculas pro-oxidantes bien caracterizadas, es decir, nitrilotriacetato de hierro (FeNTA) [Savarino *et al.*, 1999], que promueve el estrés oxidativo a través de la reacción de Fenton, y butionina sulfoximina (BSO), un inhibidor irreversible de la gamma-glutamil cisteína sintetasa, una enzima limitante en la vía de síntesis de glutatión [Anderson, 1998]. Los resultados mostraron que, de manera similar a la auranofina, FeNTA indujo de forma dependiente de la dosis la replicación del VIH-1 en células ACH-2 (datos no mostrados), mientras que la BSO sola no tuvo ningún efecto sobre los efectos de la inducción del VIH-1 a concentraciones de hasta 500 µM (datos no mostrados). Cuando se coadministra con cualquiera de los dos agentes, la auranofina ejerce efectos sinérgicos en la activación del VIH-1, como se muestra por las superficies altamente convexas en los gráficos de porcentaje de sinergia (Fig. 7 y 8). Se concluye que la auranofina potencia la activación del VIH-1 inducida por hierro y que los efectos de este fármaco se ven reforzados por el agotamiento del glutatión.

20 Referencias

- Anderson ME: *Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. Chem Biol Interact* 1998, 111-112:1-14.
- Benn HP, Schnier C, Bauer E, Seiler KU, Elhöft H, Löffler H. *Biliary, renal and fecal elimination and distribution of gold after a single oral administration of auranofin, quantified by the instrumental neutron activation analysis method. Z Rheumatol.* enero-febrero de 1991; 50(1):32-8.
- Chouchane S, Snow ET. *In vitro effect of arsenical compounds on glutathione-related enzymes. Chem Res Toxicol.* mayo de 2001; 14(5):517-22.
- Daniel LW, Civoli F, Rogers MA, Smitherman PK, Raju PA, Roederer M. *ET-18-OCH3 inhibits nuclear factor-kappa B activation by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate but not by tumor necrosis factor-alpha or interleukin 1 alpha. Cancer Res.* 1 de noviembre de 1995; 55(21):4844-9.22.
- Chircorian A, Barrios AM, *Inhibition of lysosomal cysteine proteases by chrysotherapeutic compounds: a possible mechanism for the antiarthritic activity of Au(I), Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14 (2004), págs. 5113-5116.
- Demonté D, Quivy V, Colette Y, Van Lint C: *Administration of HDAC inhibitors to reactivate HIV-1 expression in latent cellular reservoirs: implications for the development of therapeutic strategies. Biochem Pharmacol* 2004, 68:1231-1238.
- Dueñas-González A, García-López P, Herrera LA, Medina-Franco JL, González-Fierro A, Candelaria M. *The prince and the pauper. A tale of anticancer targeted agents. Mol Cancer.* 23 de octubre de 2008; 7:82.
- Duverger A, Jones J, May J, Bibollet-Ruche F, Wagner FA, Cron RQ, Kutsch O: *Determinants of the establishment of human immunodeficiency virus type 1 latency. J Virol* 2009, 83:3078-93.
- Hamer DH: *Can HIV be Cured? Mechanisms of HIV persistence and strategies to combat it. Curr HIV Res.* 2004, 2:99-111.
- Huang R, Wallqvist A, Covell DG. *Anticancer metal compounds in NCI's tumor-screening database: putative mode of action. Biochem Pharmacol.* 1 de abril de 2005; 69(7):1009-39.
- Israël N, Gougerot-Pocidal MA: *Oxidative stress in human immunodeficiency virus infection. Cell Mol Life Sci* 1997, 53:864-70.
- Jeon KI, Jeong JY, Jue DM. *Thiol-reactive metal compounds inhibit NF-kappa B activation by blocking I kappa B kinase. J Immunol.* 1 de junio de 2000; 164(11):5981-9.
- Jordan A, Bisgrove D, Verdin E: *HIV reproducibly establishes a latent infection after acute infection of T cells in vitro. EMBO J* 2003, 22:1868-77.
- Kalantari P, Narayan V, Natarajan SK, Muralidhar K, Gandhi UH, Vunta H, Henderson AJ, Prabhu KS. *Thioredoxin reductase-1 negatively regulates HIV-1 transactivating protein Tat-dependent transcription in human macrophages. J Biol Chem.* 28 de noviembre 2008; 283(48):33183-90.
- Lu J, Chew EH, Holmgren A. *Targeting thioredoxin reductase is a basis for cancer therapy by arsenic trioxide. Proc Natl Acad Sci USA.* 2007
- Lu J, Holmgren A. *Selenoproteins. J Biol Chem.* 9 de enero de 2009; 284(2):723-7.
- Omata Y, Folan M, Shaw M, Messer RL, Lockwood PE, Hobbs D, Bouillaguet S, Sano H, Lewis JB, Wataha JC. *Sublethal concentrations of diverse gold compounds inhibit mammalian cytosolic thioredoxin reductase (TrxR1). Toxicol In Vitro.* septiembre de 2006; 20(6):882-90.
- Patai S. *The Chemistry of Organic Derivatives of Gold and Silver.* Editado por Saul Patai y Zvi Rappoport 1999 John Wiley & Sons, Ltd., passim.
- Rahman I, Marwick J, Kirkham P: *Redox modulation of chromatin remodeling: impact on histone acetylation and deacetylation, NF-kappaB and pro-inflammatory gene expression. Biochem Pharmacol* 2004, 68:1255-67.
- Rigobello MP, Scutari G, Boscolo R, Bindoli A. *Induction of mitochondrial permeability transition by auranofin, a gold(I)-phosphine derivative. Br J Pharmacol.* Agosto de 2002; 136(8):1162-8.
- Rigobello MP, Scutari G, Folda A, Bindoli A. *Mitochondrial thioredoxin reductase inhibition by gold(I) compounds and concurrent stimulation of permeability transition and release of cytochrome c. Biochem Pharmacol.* 15 de

febrero de 2004; 67(4):689-96.

Rotili D, Simonetti G, Savarino A, Palamara AT, Migliaccio AR, Mai A: *Non-cancer uses of histone deacetylase inhibitors: effects on infectious diseases and β -hemoglobinopathies*. *Curr Topics Med Chem* 2009, 9(3):272-91.

Sannella AR, Casini A, Gabbiani C, Messori L, Bilia AR, Vincieri FF, Majori G, Severini C. *New uses for old drugs. Auranofin, a clinically established antiarthritic metalloid, exhibits potent antimalarial effects in vitro: Mechanistic and pharmacological implications*. *FEBS Lett*. Marzo de 2008 19; 582(6):844-7.

Savarino A, Bottarel F, Malavasi F, Dianzani U. *Role of CD38 in HIV-1 infection: an epiphenomenon of T-cell activation or an active player in virus/host interactions?* *AIDS*. 16 de junio de 2000; 14(9):1079-89.

Savarino A, Cauda R, Cassone A. *On the use of chloroquine for chikungunya*. *Lancet Infect Dis*. Octubre de 2007; 7(10):633.

Savarino A, Lucia MB, Giordano F, Cauda R. *Risks and benefits of chloroquine use in anticancer strategies*. *Lancet Oncol*. Octubre de 2006; 7(10):792-3. Ningún resumen disponible.

Savarino A, Pescarmona GP, Boelaert JR: *Iron metabolism and HIV infection: reciprocal interactions with potentially harmful consequences?* *Cell Biochem Funct* 1999, 17:279-87.

Traber KE, Okamoto H, Kurono C, Baba M, Saliou C, Soji T, Packer L, Okamoto T. *Anti-rheumatic compound aurothioglucose inhibits tumor necrosis factor-alpha-induced HIV-1 replication in latently infected OM10.1 and Ach2 cells*. *Int Immunol*. Febrero de 1999; 11(2):143-50.

Williams SA, Greene WC: *Regulation of HIV-1 latency by T-cell activation*. *Cytokine* 2007, 39:63-74.

Wu Y. *HIV-1 gene expression: lessons from provirus and non-integrated DNA*. *Retrovirology* 2004, 1:13 (25 de junio de 2004).

EJEMPLO DE REFERENCIA 1 - HDACi

Las células ACH-2 linfocíticas y las células U1 monocíticas infectadas por VIH (mostrando ambas bajos niveles basales de replicación de VIH-1) son modelos de estirpe celular bien establecidos para determinar la latencia del VIH-1 [Munier *et al.*, 2005]. Se incubaron con los compuestos de ensayo en placas de 96 pocillos en condiciones de cultivo convencionales y la replicación del VIH-1 se midió a las 72 h de incubación mediante ensayo ELISA. La potencia de los compuestos sobre la inducción del VIH-1 se evaluó como el aumento en la replicación del VIH-1 en presencia de una concentración convencional de 1 μ M del compuesto de ensayo (esta concentración se utiliza generalmente como un umbral para la selección de compuestos cabezas de serie), en comparación con los niveles de referencia observados en los controles sin tratar. Los inventores descubrieron varios compuestos capaces de inducir la replicación del VIH-1 en las células infectadas de forma latente y, en general, existe una buena concordancia entre los resultados en las células ACH-2 y U1.

Varios compuestos (HDACi selectivo o no selectivo de Clase I) mostraron una notable actividad estimulante del VIH-1 (Tabla 1), que se relacionó con la destrucción de células infectadas (células U1: $P = 0,0378$; ACH-2 células: $P = 0,0017$; ensayo no paramétrica de Spearman (Figura 9 A,B)). Los compuestos selectivos de clase I, en general, mostraron menor toxicidad que los compuestos no selectivos (datos no mostrados). Además, algunos HDACi selectivos de Clase I que promueven la reactivación del VIH-1 indujeron la destrucción selectiva de las células infectadas por VIH-1. Esto se ejemplifica por los datos usando MC1855 ($P < 0,01$; ensayo t para la pendiente; Figura 9C, D).

A partir de las relaciones estructura/actividad, surgen requerimientos particulares para la inducción eficiente del escape del VIH-1 de la latencia. En general, los HDACi muestran un modelo farmacofórico general, que comprende un grupo caperuza (CAP) capaz de interactuar con el borde del túnel catalítico, con frecuencia con una unidad de conexión polar (UC), que une el CAP a un espaciador hidrófobo (EH), que permite que la molécula se extienda en el túnel [Mai *et al.*, 2005b]. Por último, el EH lleva en el extremo un grupo de unión Zn^{2+} (GUC) que es capaz de complejar el Zn^{2+} de la parte inferior de la cavidad [Mai *et al.*, 2005b]. En general, el GUC consiste en un hidroxamato, carboxilato o una benzamida.

MS 275 es un HDACi selectivo de Clase I en ensayos clínicos para el tratamiento del cáncer [Nishioka *et al.* 2008.; Hauschild *et al.*, 2008]. Este compuesto fue el inductor más potente del escape del VIH-1 desde la latencia entre los compuestos ensayados, mostrando actividad en el intervalo nanomolar en las células ACH-2 (Figura 10) y U1 (no se muestra), dentro de las concentraciones plasmáticas que se pueden alcanzar *in vivo* [Zhao *et al.*, 2007]. Los estudios SAR de los inventores no están destinados a limitar los tipos químicos de HDACi administrable con butionina sulfoximina (BSO) y los efectos sinérgicos (véase a continuación) de HDACi con BSO son extensibles a toda la clase de HDACi.

La BSO, que induce el estrés oxidativo, también se ensayó. BSO, un inhibidor de la gamma glutamil cisteína sintetasa [Garaci *et al.*, 1996] (una enzima limitante en la síntesis de glutatión), promueve el estrés oxidativo indirectamente por la disminución de la defensa antioxidante celular [Anderson, 1998]. Este compuesto se ensayó, ya que podría favorecer la activación de NF-kappa B, que se ve reforzada en un ambiente oxidativo. Los resultados mostraron que BSO no indujo significativamente la replicación del VIH-1, en ninguna de las células ACH-2 o U1 (datos no mostrados). A pesar de esto, la BSO se ensayó para determinar si se podrían potenciar los efectos de HDACi. Los resultados mostraron que la BSO sorprendentemente aumentó efectos de promover el VIH-1 de dos HDACi de benzamida, a saber, MS 275 y MC2211, como se muestra en las figuras 11 y 12. Las superficies 3D

altamente convexas de la gráfica de porcentaje de sinergia en las células ACH-2 apuntan a un efecto sinérgico de las combinaciones de fármacos. Las concentraciones de BSO que muestran el efecto sinérgico se pueden alcanzar terapéuticamente [Lacreta *et al.*, 1994]. Se obtuvieron resultados similares en células U1 (datos no mostrados).

- 5 El descubrimiento de que la inhibición de HDAC de clase I, que es por sí misma suficiente para la reactivación del VIH-1, es particularmente ventajosa.

Métodos

- 10 **Química.** Se determinaron los puntos de fusión en un aparato de punto de fusión Buchi 530 y están sin corregir. se registraron espectros Infrarrojos (IR) (KBr) en un instrumento Perkin-Elmer Spectrum One.; los espectros de RMN ¹H se registraron a 400 MHz en un espectrómetro Bruker AC 400; los desplazamientos químicos se presentan en unidades δ(ppm) con relación a la referencia interna, tetrametilsilano (Me₄Si). Todos los compuestos se comprobaron sistemáticamente por TLC y RMN ¹H. La TLC (cromatografía en capa fina) se realizó sobre placas de gel de sílice con dorso de aluminio (Merck DC, Alufolien Kieselgel 60 F₂₅₄) con las manchas visualizadas mediante luz UV. Todos los disolventes fueron de calidad de reactivo y, en caso necesario, se purificaron y se secaron por métodos convencionales. La concentración de las soluciones después de las reacciones y extracciones implicó el uso de un evaporador rotatorio funcionando a una presión reducida de aproximadamente 2,66 kPa (20 Torr). Las soluciones orgánicas se secaron sobre sulfato de sodio anhidro. Los resultados analíticos están dentro de ± 0,40 % de los valores teóricos. Una muestra de SAHA para ensayos biológicos se preparó también de acuerdo con métodos convencionales. Todos los productos químicos se adquirieron de Aldrich Chimica, Milán (Italia) o de Lancaster Synthesis GmbH, Milán (Italia) y eran de la más alta pureza [Mai *et al.* 2006].

- 25 **Procedimiento general para la síntesis de ésteres etílicos de ácidos 4-(3,4-dihidro-4-oxo-6-sustituido-2-pirimidinil)metilcinámicos. Ejemplo: éster etílico del ácido 4-(3,4-dihidro-4-oxo-6-bencil-2-pirimidinil)metilcinámico.** Una mezcla de 6-bencil-4-hidroxi-2-mercaptopirimidina (6,87 mmol, 1,5 g), 4-bromometilcinamato de etilo en bruto (7,56 mmol, 2,2 g) y carbonato de potasio anhidro (7,56 mmol, 1,0 g) en 3 ml de DMF anhidro se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. Después del tratamiento con agua fría (100 ml), la fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (40 ml, 3 veces). La fase orgánica se lavó con salmuera (40 ml, 3 veces), se secó y se evaporó a sequedad para proporcionar el compuesto deseado en bruto, que se purificó mediante cromatografía en una columna de gel de sílice, eluyendo con una mezcla acetato de etilo/hexano (1:1) para proporcionar el producto deseado en forma de un sólido de color blanco (1,2 g). RMN ¹H (CDCl₃) 51,33 (t, 3H, CH₂CH₃), 3,83 (s, 2H, PhCH₂), 4,26 (c, 2H, CH₂CH₃), 4,38 (s, 2H, CH₂S), 5,98 (s, 1H, C₅H), 6,40 (d, 1 H, CH = CHCO), 7,33 (m, 9H, dos anillos de benceno), 7,61 (d, 1H, CH=CHCO), 13,20 (s, 1H, NH). Anal. C, H, N, S [Mai *et al.* 2006].

- 40 **Procedimiento General para la Síntesis de ácidos 6-(3,4-dihidro-4-oxo-6-(no)sustituido-2-pirimidinil)hexanoicos y ácidos 4-(3,4-dihidro-6-sustituido-4-oxopirimidin-2-iltio)metilcinámicos. Ejemplo: ácido 6-(3,4-dihidro-4-oxopirimidin-2-iltio)hexanoico.** Una mezcla del éster de etilo apropiado (1,1 mmol, 0,3 g), KOH 2 N (8,8 mmol, 0,49 g) y EtOH (5 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 18 h. La solución se vertió en agua (50 ml) y se extrajo con acetato de etilo (20 ml, 2 veces). Se añadió HCl (2 N) a la capa acuosa hasta que pH 5 y el precipitado se filtró y se recristalizó para producir el compuesto del título (0,23 g) en forma de un sólido puro. RMN ¹H (DMSO-*d*₆) 81,32 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂S), 1,49 (m, 2H, CH₂CH₂CO), 1,61 (m, 2H, CH₂CH₂S), 1,93 (t, 2H, CH₂CO), 3,06 (t, 2H, CH₂S), 6,07 (s, 1 H, C₅H), 7,83 (s, 1 H, C₆H), 12,2 (s, 1 H, COOH). Anal. C, H, N, S [Mai *et al.* 2006].

- 45 **Procedimiento General para la Síntesis de N-hidroxi-6-(3,4-dihidro-4-oxo-6-(no)sustituido-2-pirimidinil)hexanamidas y N-Hidroxi-4-(3,4-dihidro-6-sustituido-4-oxopirimidin-2-iltio)-metilcinamolamidas. Ejemplo: N-hidroxi-6-(3,4-dihidro-4-oxopirimidin-2-iltio)hexanamida** A una solución enfriada a 0 °C del ácido carboxílico apropiado (0,9 mmol, 0,22 g) en tetrahidrofurano seco (5 ml enfría), se le añadieron clorofornio de etilo (2,2 mmol, 0,21 ml) y trietilamina (2,3 mmol, 0,33 ml) y la mezcla se agitó durante 10 min. El sólido se retiró por filtración y al filtrado se le añadió O-(2-metoxi-2-propil)hidroxilamina (5,4 mmol, 0,4 ml). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 h, después se evaporó a presión reducida y el residuo se diluyó en MeOH (5 ml). Se añadió resina de intercambio iónico Amberlyst 15 (0,18 g) a la solución del O-hidroxamato protegido y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. Después, la reacción se filtró y el filtrado se concentró al vacío para proporcionar el producto final en bruto, que se purificó por cristalización. RMN ¹H (DMSO-*d*₆) 81,30 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂S), 1,46 (m, 2H, CH₂CH₂CO), 1,60 (m, 2H, CH₂CH₂S), 1,90 (t, 2H, CH₂CO), 3,02 (t, 2H, CH₂S), 6,10 (s, 1H, C₅H), 7,85 (s, 1H, C₆H), 8,66 (s, 1H, NHOH), 10,33 (s, 1H, NHOH), 12,5 (s, 1H, uracilo NH). Anal. C, H, N, S [Mai *et al.* 2006].

- 60 **Procedimiento general para la síntesis de 3-(4-acilaminofenil)-N-hidroxi-2-propenamidas. Ejemplo: 3-[4-(2,3-Difenilpropionilamino)fenil]-N-hidroxi-2-propenamida (MC1895).** Se añadieron clorofornio de etilo (1,26 mmol, 0,12 ml) y trietilamina (1,37 mmol, 0,19 ml) a una solución enfriada (0 °C) de ácido 3-[4-(2,3-difenilpropionilamino)fenil]-2-propenoico (1,05 mmol, 0,39 g) en THF seco (10 ml) y la mezcla se agitó durante 10 min. El sólido se separó por filtración, y se añadió O-(2-metoxi-2-propil)hidroxilamina (3,15 mmol, 23 ml) al filtrado. La solución se agitó durante 15 min a 0 °C, después se evaporó a presión reducida y el residuo se diluyó en metanol (10 ml). Se añadió resina de intercambio iónico Amberlyst 15 (105 mg) a la solución del O-hidroxamato protegido y la mezcla se agitó a

temperatura ambiente durante 1 h. Después, la reacción se filtró y el filtrado se concentró al vacío para proporcionar el MC1895 en bruto que se purificó por cristalización. RMN ^1H (DMSO- d_6) δ 3,05 (m, 1H, PhCH $_2$), δ 3,60 (m, 1 H, PhCH $_2$), δ 3,75 (m, 1 H, PhCHCO), δ 6,36 (d, 1 H, PhCH = CHCOOEt), δ 7,15-7,70 (m, 15H, protones de benceno y PhCH = CHCOOEt), δ 9,00 (s, 1H, OH), δ 10,23 (s, 1H, CONHPh), δ 10,85 (s, 1H, NHOH). Anal. C, H, N, O.

5 **Inhibición de enzimas de maíz HD2, HD1-B y HD1-A *in vitro*.** Se usaron histonas del núcleo de pollo marcadas radiactivamente como sustrato de la enzima de acuerdo con los procedimientos establecidos [referencia en: Mai *et al.*, 2006]. La enzima liberó ácido acético tritio del sustrato, que se cuantificó por recuento de centelleo. Los valores de CI_{50} son los resultados de triples determinaciones. Una muestra de 50 μl de enzima de maíz (a 30 °C) se
10 incubó (30 min) con 10 microlitros histonas de reticulocitos de pollo premarcadas con [^3H] (2 mg/ml) totales. La reacción se detuvo mediante la adición de 36 microlitros de HCl 1 M/acetato 0,4 M y 800 microlitros de acetato de etilo. Después de la centrifugación (10000 g, 5 min), una parte alícuota de 600 microlitros de la fase superior se
15 contó para determinar la radiactividad en 3 ml de cóctel de centelleo líquido. Los compuestos se ensayaron a una concentración de partida de 40 μM y sustancias activas se diluyeron adicionalmente. TSA y SAHA se utilizaron como los compuestos de referencia y se usaron disolventes blanco como controles negativos [Mai *et al.*, 2006].

Ensayo de enzima HDAC1 de ratón. Para el ensayo de inhibición, se usó HDAC1 parcialmente purificado de hígado de ratón (cromatografía de intercambio aniónico) como fuente de enzima. La actividad de HDAC se
20 determinó usando histonas de reticulocitos de pollo de premarcadas con [^3H] como sustrato. Se incubó HDAC1 de ratón (50 microlitros) con diferentes concentraciones de compuestos durante 15 min en hielo y se añadieron 10 μl de las histonas de reticulocitos de pollo de premarcadas con [^3H] totales (2 mg/ml), dando como resultado una
25 concentración de 41 μM . La mezcla se incubó a 37 °C durante 1 h. La reacción se detuvo mediante la adición de 50 microlitros de HCl 1 M/acetato de acetilo 0,4 M y 1 ml de acetato de etilo. Después de la centrifugación a 10000 g durante 5 min, una parte alícuota de 600 microlitros de la fase superior se contó para determinar la radiactividad en un cóctel de centelleo líquido de 3 ml [Mai *et al.* 2006].

Ensayos celulares. Estirpes celulares y cultivos. La estirpe celular U937 se cultivó en RPMI con suero fetal de ternero al 10 %, 100 U/ml de penicilina, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de estreptomycin y 250 ng/ml de anfotericina-B, HEPES 10
30 mM y glutamina 2 mM. Las células U937 se mantuvieron a la concentración constante de 200000 células por mililitro de medio de cultivo. Se propagaron células de cáncer de mama humano ZR-75.1 en medio DMEM complementado con suero fetal de ternero al 10 % y antibióticos (100 U/ml de penicilina, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de estreptomycin y 250 ng/ml de anfotericina-B).

Ligandos y Materiales. Se disolvió SAHA en DMSO y se usó a 1 o 5 μM . Se disolvió MS-275 (regalo de Schering AG) en etanol y se usó a 5 μM . Se disolvieron compuestos de UBHA 1d y 1j en DMSO y se usaron a 1
35 o 5 μM .

Ensayos basados en células de HDAC1 y HDAC4 humanas. Se lisaron células (células U937 para el ensayo de HDAC1 y células ZR75.1 para el ensayo de HDAC4) en tampón IP (Tris-HCl 50 mM a pH 7,0, NaCl 180 mM, NP-40
40 al 0,15 %, glicerol al 10 %, MgCl_2 1,5 mM, NaMo_4 1 mM y NaF 0,5 mM) con un cóctel inhibidor de proteasa (Sigma), DTT 1 mM y PMSF 0,2 mM durante 10 min en hielo y se centrifugaron a 13000 rpm durante 30 min. Después, se diluyeron 1000 μg de extractos en tampón IP hasta 1 ml y se pre-aclararon mediante incubación con 20 microlitros de A/G más agarosa (Santa Cruz) durante 30 min a 1 h en una mesa oscilante a 4 °C. Los sobrenadantes se transfirieron a un nuevo tubo y se añadieron los anticuerpos (aproximadamente 3 a 4 μg) y se dejó proceder al IP
45 durante la noche a 4 °C en una mesa oscilante. Los anticuerpos utilizados fueron HDAC1 (Abcam) y HDAC4 (Sigma). Como control negativo, la misma cantidad de los extractos de proteínas se inmunoprecipitó con la correspondiente IgG purificada (Santa Cruz). El día siguiente, se añadieron 20 microlitros de A/G y agarosa (Santa Cruz) a cada IP y la incubación continuó durante 2 h. Las perlas se recuperaron por centrifugación breve y se lavaron con tampón IP frío varias veces. Las muestras se lavaron dos veces en PBS y se resuspendieron en 20
50 microlitros de PBS estéril. El ensayo de HDAC se realizó de acuerdo con las instrucciones del proveedor (Upstate). Brevemente, las muestras inmunoprecipitadas con HDAC4 y HDAC1 o con IgG purificada se agruparon por separado para homogeneizar todas las muestras. Después, se incubaron 10 microlitros de IP con un péptido H4 marcado previamente con ^3H -histona unido a perlas de estreptavidina agarosa (Upstate). En detalle, se usaron 120000 CPM de ^3H -acetil-péptido H4 para cada tubo y se incubaron en tampón de HDAC 1x con 10 microlitros de la
55 muestra en presencia o ausencia de inhibidores de HDAC con un volumen final de 200 μl . Las muestras se incubaron durante la noche a 37 °C en rotación lenta. Al día siguiente, se añadieron 50 μl de una solución de inactivación y 100 microlitros de las muestras se contaron por duplicado después de una breve centrifugación en un contador de centelleo. Los experimentos se han realizado por cuadruplicado [Mai *et al.*, 2006].

60 **Conservación del compuesto.** Los compuestos se conservaron en forma de polvos secos y se resuspendieron en dimetilsulfóxido (DMSO) en el momento de su uso. Las concentraciones iniciales en soluciones de DMSO se ajustaron con el fin de obtener concentraciones adecuadas de fármaco con menos de DMSO 2/1000 (v/v) en los medios de cultivo celular finales.

65 **Ensayo de detección de reactivación de VIH-1.** Se incubaron células ACH-2 infectadas por VIH-1 de forma latente con los compuestos en placas de 96 pocillos en condiciones de cultivo convencionales (medio RPMI, suero fetal

bovino al 10 %/FBS y los antibióticos apropiados, cambiados de tanto en tanto con el fin de evitar la selección de bacterias contaminantes resistentes a fármacos) y se midió el contenido de antígeno de núcleo de p24 de VIH-1 en el sobrenadante a las 72 h de incubación mediante kits ELISA de p24 de VIH-1 (Perkin elmers, Boston, MA), siguiendo las instrucciones del fabricante. La potencia de los compuestos sobre la inducción de escape del VIH-1 desde la latencia se evaluó como el aumento (%) en la replicación del VIH-1 en presencia de una concentración patrón de 1 microM, en comparación con los niveles de referencia observados en los controles sin tratar. Se eligió la concentración 1 μM porque en general se considera que es un umbral para la selección de compuestos cabezas de serie. La viabilidad celular se ensayó para cada tratamiento después de la recolección de los sobrenadantes, como se indica a continuación.

Ensayo de viabilidad celular: La viabilidad celular se cuantificó usando el procedimiento del metil tetrazolio (MTT) altamente normalizado (descrito en detalle en: Savarino A, Calosso L, Piragino A, Martini C, Gennero L, Pescarmona GP, Pugliese A. *Modulation of surface transferrin receptors in lymphoid cells de novo infected with human immunodeficiency virus type-1. Cell Biochem Funct.* Marzo de 1999; 17(1):47-55). Los valores de absorbancia se generaron a una longitud de onda de 450 nm usando lectores de ELISA de 96 pocillos y se restan los valores de blanco usando medios de cultivo celular en ausencia de células. La viabilidad celular en presencia de los compuestos de ensayo se expresó como un porcentaje de la viabilidad celular de cultivos celulares control sin tratar. Para los ensayos de destrucción selectiva, se incubaron células H9 y U937 no infectadas y células H9_{III}B, ACH-2 y U1 infectadas por VIH-1 con los compuestos de ensayo durante siete días y la viabilidad celular se midió como se ha descrito anteriormente.

Curvas de concentración-respuesta. Se generaron curvas de concentración-respuesta para los compuestos con las mejores actividades, mediante la incubación de las células con concentraciones decrecientes de los compuestos (0,001-1 μM).

Ensayo para la detección de efectos de fármacos combinados. Para la detección de sinergia/antagonismo, las células se incubaron con diferentes combinaciones de BSO sola, el inhibidor de la histona desacetilasa solo, o ambos, y, de nuevo, la replicación viral se cuantificó a los tres días de incubación mediante ensayos ELISA.

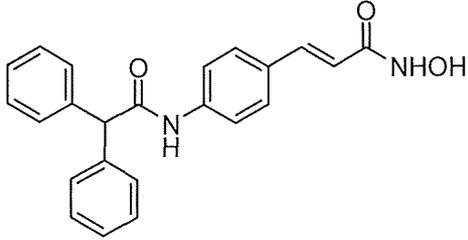
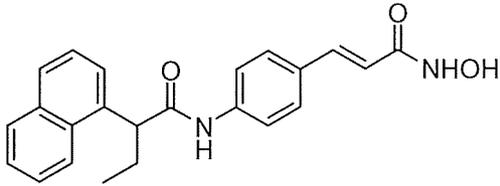
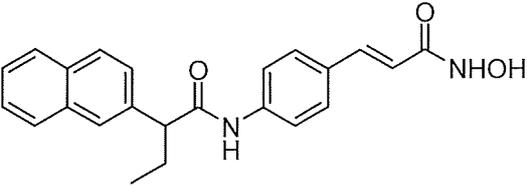
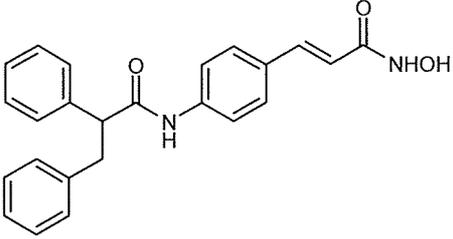
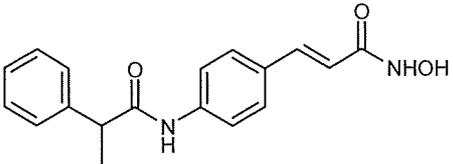
Análisis de los datos. Los experimentos se realizaron en al menos dos ocasiones diferentes con resultados similares y los resultados se muestran como medias. Los análisis se realizaron usando el software GraphPad. La correlación entre la destrucción celular/reactivación del VIH-1 se evaluó trazando, para cada compuesto, el porcentaje de inhibición de la viabilidad de las células frente al aumento en la replicación del VIH-1. La significación de la correlación se evaluó mediante los coeficientes de correlación de Spearman usando un umbral de significación de $P = 0,05$. Para las curvas de concentración-dependencia, los valores de aumento se representaron frente a las diferentes concentraciones. Se aplicó una transformación apropiada para restablecer la normalidad en caso necesario. Se generaron las líneas, o curvas, que se ajustan mejor a los puntos de datos mediante el método de mínimos cuadrados. Se consideró que el umbral para la significación era de $P = 0,05$, en el caso de la regresión lineal, o $R^2 = 0,7$, en el caso de la regresión no lineal. La sinergia se analizó por medio de los valores de porcentaje de sinergia, que representan la diferencia porcentual entre los efectos de la combinación de fármacos y la suma de los efectos del inhibidor de histona desacetilasa y el fármaco pro-oxidante administrados por separado a concentraciones emparejadas, calculada como se indica a continuación:

$$PS = 100 \cdot [E_{\text{fármaco A} + \text{fármaco B}} - (E_{\text{fármaco A}} + E_{\text{fármaco B}})] / (E_{\text{fármaco A}} + E_{\text{fármaco B}})$$

donde PS es el porcentaje de sinergia y E es el efecto de la concentración de fármaco, expresado como el aumento de la producción de p24.

Se generaron gráficos x, y,z tridimensionales (3D) mediante el trazado de los valores de porcentaje de sinergia (eje z) frente a las concentraciones los fármacos emparejados empleados (en los ejes x e y). Las superficies 3D se generaron usando Microsoft Excel. Las superficies altamente convexas indican sinergia. Las superficies planas indican un efecto aditivo, mientras que las superficies cóncavas muestran antagonismo.

Tabla 1: Estructuras y potencias de diferentes compuestos en la inducción de la replicación del VIH-1 en células linfocíticas ACH-2 y células monocíticas U1.

| Compuesto | Estructura | HDAC inhibidas | Clase química | Aumento (%) de p24 de VIH-1 a 1 μ M (a menos que se especifique lo contrario) | |
|-----------|---|----------------|---------------|---|------------|
| | | | | Células ACH-2 | Células U1 |
| MC1855 |  | Clase I | Hidroxamatos | 699 | 817 |
| MC2111 |  | Clase I | Hidroxamatos | 2.460 | 2.960 |
| MC2113 |  | Clase I | Hidroxamatos | 3.304 | 2.846 |
| MC2195 |  | Clase I | Hidroxamatos | 3.427 | 4.076 |
| MC1895 |  | Clase I | Hidroxamatos | 2.981 | 3.747 |
| MC1857 |  | NE | Hidroxamatos | 1.655. | 880 |

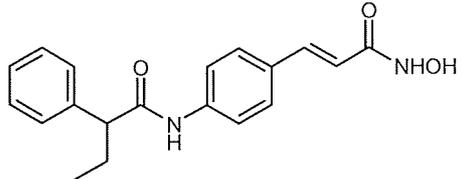
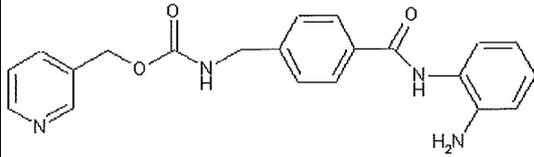
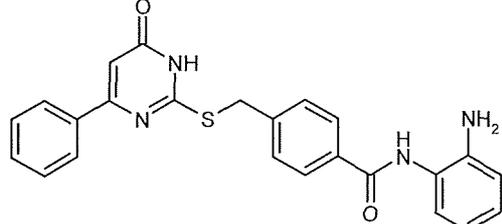
| | | | | | |
|--------|---|---------|--------------|--------|-------|
| MC1864 |  | NE | Hidroxamatos | 1.145 | 995 |
| MS275 |  | Clase I | Benzamidas | 23.162 | 1.835 |
| MC2211 |  | Clase I | Benzamidas | 2.025 | 4.811 |

Tabla 2: Actividad de inhibición HDAC de los compuestos MC citados

| Compuesto | Ref. | Valores de CI ₅₀ , nM | | | % inhibición a 5 µM | |
|-----------|--------------------------|----------------------------------|---------------|----------------|---------------------|----------|
| | | HD1-B de maíz | HD1-A de maíz | HDAC1 de ratón | IP HDAC1 | IP HDAC4 |
| MC1855 | | 162 | 55 | 128 | 78,7 | 0 |
| MC2111 | | 58 | 42 | 620 | 73,6 | 0 |
| MC2113 | | 62 | 69 | 560 | 64,9 | 22,4 |
| MC2195 | | 11 | 8 | 69 | 46,7 | 93,1 |
| MC2211* | Mai <i>et al.</i> , 2008 | | | | | |
| MC1857 | | 72 | 80 | 291 | 79,3 | N.D. |
| MC1864 | | 89 | 64 | 305 | 55,0 | 60,4 |
| MC1895 | | 133 | 74 | 83 | 72,5 | 16,1 |
| MS 275** | | | | | 65,4 | 0 |

N.D., No determinado

* ensayado en HDAC1 y 4 recombinantes humanas.

** confirmado por los datos de la literatura que usando ensayos en HDAC recombinantes humanas.

Referencias para HDACi:

- 5 Anderson ME. *Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. Chem Biol Interact.* 24 de abril de 1998; 111-112:1-14.
- Annemieke J.M. de Ruijter, Albert H. Van Gennip, Huib N. Caron *et al. Histone deacetylases (HDACs): Characterization of the classical HDAC family. Biochem. J.* 2003. 370, 737-749.
- 10 Benn HP, Schnier C, Bauer E, Seiler KU, Elhöft H, Löffler H. [Biliary, renal and fecal elimination and distribution of gold after a single oral administration of auranofin, quantified by the instrumental neutron activation analysis method] *Z Rheumatol.* Enero-febrero de 1991; 50(1):32-8.
- Biochem J. 15 de junio de 2008; 409(2):581-9.
- 15 Bowie A, O'Neill LA. *Oxidative stress and nuclear factor-kappaB activation: a reassessment of the evidence in the light of recent discoveries. Biochem Pharmacol.* 1 de enero de 2000; 59(1):13-23.
- Demonté D, Quivy V, Colette Y, Van Lint C. *Administration of HDAC inhibitors to reactivate HIV-1 expression in latent cellular reservoirs: implications for the development of therapeutic strategies. Biochem Pharmacol.* 15 de septiembre de 2004; 68(6):1231-8.
- Dokmanovic M, Clarke C, Marks PA. *Histone deacetylase inhibitors: overview and perspectives. Mol Cancer Res.*

- Octubre de 2007; 5(10):981-9.
- Duong, V.; Bret, C.; Altucci, L.; Mai, A.; Duraffourd, C.; Loubersac, J.; Harmand, P.; Bonnet, S.; Valente, S.; Maudelonde, T.; Cavaillès, V.; Boulle, N. *Specific regulation and activity of class II histone deacetylases in human breast cancer cells. Mol. Cancer Res.* 2008, en prensa.
- 5 Garaci E, Palamara AT, Ciriolo MR, D'Agostini C, Abdel-Latif MS, Aquaro S, Lafavia E, Rotilio G. *Intracellular GSH content and HIV replication in human macrophages. J Leukoc Biol.* Julio de 1997; 62(1):54-9.
- Hamer DH. *Can HIV be Cured? Mechanisms of HIV persistence and strategies to combat it. Curr HIV Res.* Abril de 2004; 2(2):99-111.
- 10 Hauschild A, Trefzer U, Garbe C, Kaehler KC, Ugurel S, Kiecker F, Eigentler T, Krissel H, Schott A, Schadendorf D. *Multicenter phase II trial of the histone deacetylase inhibitor pyridylmethyl-N-{4-[(2-aminophenyl)-carbamoyl]-benzyl}-carbamate in pretreated metastatic melanoma. Melanoma Res.* Agosto de 2008; 18(4):274-8.
- Hezareh M. *Prostratin as a new therapeutic agent targeting HIV viral reservoirs. Drug News Perspect.* Octubre de 2005; 18(8):496-500.
- 15 Hulgán T, Morrow J, D'Aquila RT, Raffanti S, Morgan M, Rebeiro P, Haas DW. *Oxidant stress is increased during treatment of human immunodeficiency virus infection. Clin Infect Dis.* 15 de diciembre de 2003; 37(12):1711-7.
- Illì, B.; Dello Russo, C.; Colussi, C.; Rosati, J.; Pallaoro, M.; Spallotta, F.; Rotili, D.; Valente, S.; Ragone, G.; Martelli, F.; Biglioli, P.; Steinkuhler, C.; Gallinari, P.; Mai, A.; Capogrossi, M. C.; Gaetano, C. *Nitric oxide modulates chromatin folding in human endothelial cells via protein phosphatase 2A activation and class II histone deacetylases nuclear shuttling. Circ Res.* 2008, 102, 51-58.
- 20 Inoue, S.; Mai, A.; Dyer, M. J. S.; Cohen, G. M. *Inhibition of histone deacetylase class I but not class II is critical for the sensitization of leukemic cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis. Cancer Res.* 2006, 66, 6785-6792.
- Jiang G, Espeseth A, Hazuda DJ, Margolis DM. *c-Myc and Sp1 contribute to proviral latency by recruiting histone deacetylase 1 to the human immunodeficiency virus type 1 promoter. J Virol.* Octubre de 2007; 81(20):10914-23.
- 25 Khan N, Jeffers M, Kumar S, Hackett C, Boldog F, Khramtsov N, Qian X, Mills E, Berghs SC, Carey N, Finn PW, Collins LS, Tumber A, Ritchie JW, Jensen PB, Lichenstein HS, Sehested M, Lacreata FP, Brennan JM, Hamilton TC, Ozols RF, O'Dwyer PJ. *Stereoselective pharmacokinetics of L-buthionine SR-sulfoximine in patients with cancer. Drug Metab Dispos.* Noviembre-diciembre de 1994; 22(6):835-42.
- 30 Lehrman G, Hogue IB, Palmer S, Jennings C, Spina CA, Wiegand A, Landay AL, Coombs RW, Richman DD, Mellors JW, Coffin JM, Bosch RJ, Margolis DM. *Depletion of latent HIV-1 infection in vivo: a proof-of-concept study. Lancet.* 13-19 de agosto de 2005; 366(9485):523-4.
- a Mai A, Massa S, Ragno R, Cerbara I, Jesacher F, Loidl P, Brosch G. *3-(4-Aroyl-1-methyl-1H-2-pyrrolyl)-N-hydroxy-2-alkylamides as a new class of synthetic histone deacetylase inhibitors. 1. Design, synthesis, biological evaluation, and binding mode studies performed through three different docking procedures. J Med Chem.* 13 de febrero de 2003; 46(4):512-24.
- 35 b Mai, A.; Massa, S.; Pezzi, R.; Rotili, D.; Loidl, P.; Brosch, G. *Discovery of (aryloxopropenyl)pyrrolyl hydroxyamides as selective inhibitors of class IIa histone deacetylase homologue HD1-A. J. Med. Chem.* 2003, 46, 4826-4829.
- a Mai, A.; Massa, S.; Pezzi, R.; Simeoni, S.; Rotili, D.; Nebbioso, A.; Scognamiglio, A.; Altucci, L.; Loidl, P.; Brosch, G. *Class II (IIa)-selective histone deacetylase inhibitors. 1. Synthesis and biological evaluation of novel (aryloxopropenyl)pyrrolyl hydroxyamides. J. Med. Chem.* 2005, 48, 3344-3353.
- 40 b Mai, A.; Massa, S.; Rotili, D.; Pezzi, R.; Bottoni, P.; Scatena, R.; Meraner, J.; Brosch, G. *Exploring the connection unit in the HDAC inhibitor pharmacophore model: novel uracil-based hydroxamates. Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2005, 15, 4656-4661.
- 45 Mai A, Massa S, Rotili D, Simeoni S, Ragno R, Botta G, Nebbioso A, Miceli M, Altucci L, Brosch G. *Synthesis and biological properties of novel, uracil-containing histone deacetylase inhibitors. J Med Chem.* 5 de octubre de 2006; 49(20):6046-56.
- Mai A, Perrone A, Nebbioso A, Rotili D, Valente S, Tardugno M, Massa S, De Bellis F, Altucci L. *Novel uracil-based 2-aminoanilide and 2-aminoanilide-like derivatives: histone deacetylase inhibition and in-cell activities. Bioorg Med Chem Lett.* 15 de abril de 2008; 18(8):2530-5.
- 50 Mottet D, Castronovo V. *Histone deacetylases: a new class of efficient anti-tumor drugs. Med Sci (Paris).* Agosto-septiembre de 2008; 24(8-9):742-6.
- Munier S, Delcroix-Genête D, Carthagéna L, Gumez A, Hazan U. *Characterization of two candidate genes, NCoA3 and IRF8, potentially involved in the control of HIV-1 latency. Retrovirology.* 23 de noviembre de 2005; 2:73.
- 55 Nishioka C, Ikezoe T, Yang J, Takeuchi S, Koeffler HP, Yokoyama A. *MS-275, a novel histone deacetylase inhibitor with selectivity against HDAC1, induces degradation of FLT3 via inhibition of chaperone function of heat shock protein 90 in AML cells. Leuk Res.* Septiembre de 2008; 32(9): 1382-92.
- 60 Palamara AT, Garaci E, Rotilio G, Ciriolo MR, Casabianca A, Fraternali A, Rossi L, Schiavano GF, Chiarantini L, Magnani M. *Inhibition of murine AIDS by reduced glutathione. AIDS Res Hum Retroviruses.* 20 de septiembre de 1996; 12(14):1373-81.
- Ragno R, Simeoni S, Rotili D, Caroli A, Botta G, Brosch G, Massa S, Mai A. *Class II-selective histone deacetylase inhibitors. Part 2: alignment-independent GRIND 3-D QSAR, homology and docking studies. Eur J Med Chem.* Marzo de 2008; 43(3):621-32.
- 65 Saari H, Suomalainen K, Lindy O, Konttinen YT, Sorsa T. *Activation of latent human neutrophil collagenase by reactive oxygen species and serine proteases. Biochem Biophys Res Commun.* 28 de septiembre de 1990;

171(3):979-87.

Sannella AR, Casini A, Gabbiani C, Messori L, Bilia AR, Vincieri FF, Majori G, Severini C. *New uses for old drugs. Auranofin, a clinically established antiarthritic metalloid, exhibits potent antimalarial effects in vitro: Mechanistic and pharmacological implications. FEBS Lett.* 19 de marzo de 2008; 582(6):844-7.

5 Savarino A, Pescarmona GP, Boelaert JR. *Iron metabolism and HIV infection: reciprocal interactions with potentially harmful consequences? Cell Biochem Funct.* Diciembre de 1999; 17(4):279-87.

Savarino A, Pistello M, D'Ostilio D, Zabogli E, Taglia F, Mancini F, Ferro S, Matteucci D, De Luca L, Barreca ML, Ciervo A, Chimirri A, Ciccozzi M, Bendinelli M. *Human immunodeficiency virus integrase inhibitors efficiently suppress feline immunodeficiency virus replication in vitro and provide a rationale to redesign antiretroviral treatment for feline AIDS. Retrovirology.* 30 de octubre de 2007; 4:79.

10 Scognamiglio, A., Nebbioso, A., Manzo, F., Valente, S., Mai, A., Altucci, L. *HDAC-class II specific inhibition involves HDAC proteasome-dependent degradation mediated by RANBP2. Biochim Biophys Acta* 2008 publicado en la web el 22 de julio de 2008.

15 Smith SM. *Valproic acid and HIV-1 latency: beyond the sound bite. Retrovirology.* 19 de septiembre de 2005; 2:56.

Williams SA, Chen LF, Kwon H, Ruiz-Jarabo CM, Verdin E, Greene WC. *NF-kappaB p50 promotes HIV latency through HDAC recruitment and repression of transcriptional initiation. EMBO J.* 11 de enero de 2006; 25(1):139-49.

20 Zhao M, Rudek MA, Mnasakanyan A, Hartke C, Pili R, Baker SD. *A liquid chromatography/tandem mass spectrometry assay to quantitate MS-275 in human plasma. J Pharm Biomed Anal.* 17 de enero de 2007; 43(2):784-7.

EJEMPLO DE REFERENCIA 2 – Trabajo adicional sobre HDACi + BSO

25 Para investigar las bases celulares de la sinergia entre HDACi y BSO, se utilizó el modelo de Jurkat para la quiescencia de VIH-1. Estos resultados se han obtenido a partir del clon de células Jurkat A1, que tiene una construcción integrada GFP/Tat bajo el control del LTR del VIH-1, que es inactivo en la mayoría de las células y por tanto permite examinar, por citometría de flujo, la activación del promotor LTR en un nivel de una sola célula [Jordan a, *et al.* 2003]. Los resultados mostraron que la BSO reclutaron células insensibles a HDACi a la población de células que responden (Figura 13). A diferencia de los resultados obtenidos para las mediciones de p24 en las células ACH-2 y U1, BSO sola indujo la activación de LTR en una pequeña proporción de las células.

35 Los cultivos celulares que replican VIH-1 muestran una disminución de los niveles de glutatión reducido [Simon G, *et al* 1994]. Se comparó la toxicidad de la combinación BSO + HDACi en estirpes celulares no infectadas e infectadas de forma latente. Los resultados mostraron que, usando la BSO en combinación con HDACi, hubo una citotoxicidad marcado a las 72 h de incubación en las células infectadas de forma latente, pero no en los cultivos celulares no infectados (Figura 14).

40 Esto está apoyado por experimentos en células Jurkat no infectadas y clones de células Jurkat (6.3 y 8.4), que contienen un genoma de VIH-1 quiescente (con el gen *GFP*) bajo el control del LTR [Jordan a, 2003, *infra*]. Se descubrió que el clon de células 6.3 sucumbió más fácilmente a la combinación MS-275/BSO que su homólogo no infectado (Figura 14). Se obtuvieron resultados similares con el clon 8.4 (datos no mostrados).

45 En conclusión, los efectos de la BSO permiten amplificar la proporción de células que responden a un tratamiento de reactivación del VIH-1 basado en HDACi. En general, el estrés oxidativo inclina la balanza de la actividad HAT/HDAC hacia el aumento de la actividad HAT y el enrollamiento del ADN, facilitando de este modo la unión de varios factores de transcripción [Rahman I, *et al* 2004]. Esto sugiere usos clínicos importantes, porque un fenotipo abigarrado después de la activación, con solo una fracción de la población de células activándose en respuesta a una señal global, también se demostró por Jordan *et al.* 2004 [se cita a continuación], quien atribuye este fenómeno a los diferentes entornos de cromatina locales.

Además de amplificar el efecto de los inhibidores de la histona desacetilasa, los resultados del presente estudio permiten la hipótesis de que la estrategia de utilización de agentes pro-oxidantes tales como la BSO en combinación con HDACi es capaz de inducir la destrucción selectiva de las células infectadas de forma latente. Esta estrategia puede ser considerada como una de las estrategias largamente codiciadas "golpear y destruir". Estas estrategias consisten en la inducción, a través de fármacos, de la activación del VIH-1 desde la quiescencia (es decir, la fase de "golpear"), en presencia de TAR (para bloquear la propagación viral), seguido de la eliminación de las células infectadas (es decir, la fase de "destruir"), ya sea a través de medios naturales (por ejemplo, la respuesta inmunitaria, la citopatogenicidad viral) o medios artificiales (por ejemplo, fármacos, anticuerpos monoclonales, etc.) [Hamer DH, 2004]. De hecho, la estrategia de los inventores se basa en un HDACi, que activa la replicación del VIH-1 en las células infectadas de forma latente (es decir, la fase de "golpear"), en combinación con un agente pro-oxidante tal como la BSO, que amplifica el daño celular debido al descenso inducido por VIH-1 en los niveles intracelulares de glutatión reducido (es decir, la fase de "destruir"). La búsqueda de una combinación de fármacos capaces de ejercer dichos efectos, hasta el momento, ha sido un "Santo Grial" en la investigación del SIDA.

65

Referencias para el ejemplo de referencia 2

Jordan A, Bisgrove D, Verdin E: *HIV reproducibly establishes a latent infection after acute infection of T cells in vitro*. *EMBO J* 2003, 22:1868-1877.

Simon G, Moog C, Obert G: *Valproic acid reduces the intracellular level of glutathione and stimulates human immunodeficiency virus*. *Chem Biol Interact* 1994, 91:111-121.

Rahman I, Marwick J, Kirkham P: *Redox modulation of chromatin remodeling: impact on histone acetylation and deacetylation, NF-kappaB and pro-inflammatory gene expression*. *Biochem Pharmacol* 2004, 68:1255-1267.

Hamer DH: *Can HIV be Cured? Mechanisms of HIV persistence and strategies to combat it*. *Curr HIV Res* 2004, 2:99-111.

EJEMPLO 2 – Trióxido de arsénico

Las sales de oro y los arsenicales comparten una serie de efectos biológicos y ahora se están mostrando prometedores como metalofármacos potencialmente epigenéticos con varias aplicaciones en medicina. Su uso terapéutico en otras patologías tiene una tradición antigua, por supuesto. Aunque el arsénico se considera que es un elemento que muestra tanto propiedades metálicas como no metálicas, se comporta como un metal en muchos aspectos. En su forma elemental más común (arsénico gris), que tiene una naturaleza de tipo metálica y conduce la electricidad. Al igual que las sales de oro, los arsenicales se han empleado terapéuticamente desde el siglo 5º antes de Cristo. Hipócrates usaba rejalgar (As_2S_2) y oropimente (As_2S_3) como remedio para las úlceras. La medicina tradicional china usaba arsenicales, en combinación con oro para el tratamiento de diversas afecciones. Olimpiodoro de Tebas (siglo 5º dC) usaba sulfuro de arsénico y obtenía arsénico blanco (As_2O_3), pero también puede encontrarse como As_4O_6). Tanto las sales de oro como los compuestos de arsénico descubiertos más tarde, entre otros usos, tienen aplicaciones como antirreumáticos, antisifilíticos y antitumorales [véase Eisler, 2003, Giordano, 1844, Christison y Griffith, 1848, Cutler y Bradford, 1878, Waxman *et al.*, 2001, Park *et al.*, 2008]. El arsénico también es conocido como un veneno, cuando se usa en dosis más altas.

El uso de sales de trióxido de arsénico y oro fue abandonado poco a poco en el siglo pasado, limitando el uso del trióxido de arsénico a la leucemia promielocítica crónica y las sales oro a la artritis reumatoide. En la última década, sin embargo, el interés de estos tipos de medicamentos se ha reavivado a la luz del descubrimiento de sus efectos epigenéticos, es decir, la capacidad de inducir modificaciones en la estructura del ADN sin alterar la secuencia de bases. Las modificaciones estructurales del ADN tales como el enrollamiento/desenrollamiento regulan la expresión génica. La investigación adicional demostró que las sales de trióxido de arsénico y oro comparten similitudes importantes en sus efectos a nivel celular, lo que podría explicar las aplicaciones terapéuticas similares que ambos tipos de fármacos han encontrado durante su historia. Tanto las sales de trióxido de arsénico como las de oro inducen especies reactivas del oxígeno (ERO).

Se sabe que el estrés oxidativo inclina el equilibrio de la actividad HAT/HDAC hacia el aumento de la actividad HAT y el desenrollamiento del ADN, lo que facilita la unión de varios factores de transcripción [Rahman *et al.*, 2004]. Curiosamente, tanto los compuestos que contienen trióxido de arsénico como los que contienen oro inhiben la tiorredoxina reductasa y actúan como miméticos de la superóxido dismutasa (SOD). Por tanto, a la luz de estos efectos y los efectos epigenéticos habituales, tales como la inducción de la actividad HAT, los compuestos de oro y los arsenicales están empezando a ser considerados como un único tipo de fármaco [Talbot *et al.*, 2008].

Esta clase de fármacos, que comprenden arsenicales y compuestos de oro, se denominarán en adelante "metalofármacos epigenéticos", es decir metalofármacos que tienen efectos epigenéticos. Otros metalofármacos que se sabe que activan el VIH-1 desde la latencia, tales como los compuestos que contienen hierro y cisplatino [Savarino *et al.*, 1998; Spandidos *et al.*, 1990], no muestran los efectos pro-diferenciadores de los compuestos de oro y los arsenicales.

Además, los iones de oro y arsénico comparten la capacidad de bloquear el sitio activo de la tiorredoxina reductasa (TrxR) formando complejos directamente con el residuo selenocisteína importante para la actividad reductora de estas proteínas. Esta actividad de la auranofina es compartida con el trióxido de arsénico [Liu *et al.* 2007]. Los derivados de oro (I) y el trióxido de arsénico aparecen como muy buenos inhibidores de la tiorredoxina reductasa, presentando unos valores de CI_{50} en el intervalo nanomolar ($CI_{50} < 300$ nM), mientras que los iones metálicos y los complejos metálicos son activos en el intervalo micromolar (de 19 a 80 μ M) [Bragadin *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2007]. Otra actividad compartida por el trióxido de arsénico y un derivado de oro (I) tal como la auranofina es la capacidad única de suprimir la síntesis de TrxR [Talbot *et al.*, 2008].

Los inventores han demostrado en el Ejemplo 1 que el compuesto que contiene oro, auranofina, es capaz para inducir el escape del VIH-1 desde la latencia in vitro a concentraciones que imitan las que se encuentran en el plasma de los seres humanos con artritis reumatoide. Si la teoría de los inventores es correcta, los efectos del compuesto que contiene oro, auranofina, en el escape del VIH-1 desde la latencia también deberían ser ejercidos por los arsenicales.

El trióxido de arsénico tiene un potencial epigenética bien documentado, un perfil de toxicidad bien descrito y su uso clínico es relativamente seguro en ciertas dosis.

5 Los inventores ensayaron primero la respuesta al trióxido de arsénico en clones de células Jurkat con un gen integrado que codifica la proteína de fluorescencia verde (GFP) bajo el control del LTR del VIH-1 [Jordan *et al.*, 2003].

10 Los experimentos se realizaron de acuerdo con las técnicas descritas exhaustivamente en el Ejemplo 1. En estos clones de células Jurkat, la inducción de GFP por HDACI fue evidente solo en una fracción de las células y aumentó en respuesta al trióxido de arsénico de una manera dependiente de la concentración (Figura 15).

15 Para evaluar la respuesta al trióxido de arsénico dentro de una población celular que contiene el genoma entero del VIH-1, se han utilizado clones de células Jurkat linfoides T 6.3 y 8.4 infectados de forma latente, establecidos por Jordan *et al.* [Jordan *et al.*, 2003]. Estos clones de células contienen el genoma del VIH-1 bajo el control del LTR y presentan el gen GFP que reemplaza a *nef*. A diferencia de las células U1, estas células muestran niveles basales no significativos de expresión de VIH-1 y tienen un eje Tat/TAR funcional. En las células 8.4, el trióxido de arsénico induce un cambio dependiente de la dosis en la fluorescencia (datos no presentados), que fue evidente sobre todo en las concentraciones más altas adoptadas.

20 Los inventores llegan a la conclusión de que el efecto del trióxido de arsénico reproduce exactamente los de la auranofina en modelos de estirpe celular para la latencia del VIH 1. De forma similar a la auranofina, el cisplatino fue capaz de activar el VIH-1 latente a concentraciones en el intervalo nanomolar. La auranofina y el trióxido de arsénico no comparten sus efectos con otros metalofármacos tales como el cisplatino, que activa el VIH-1 quiescente en el intervalo de concentraciones micromolar en lugar de en el intervalo nanomolar [Spandidos *et al.*, 1990]. Los resultados de los inventores apoyan la idea de que los derivados de oro (I) y el trióxido de arsénico deben considerarse como pertenecientes a una única clase de fármacos moduladores epigenéticos. De forma similar a la auranofina, el trióxido de arsénico puede encontrar una aplicación en estrategias de "ahuyentado" para purgar el VIH-1 de los reservorios.

30 Los inventores han demostrado en los ejemplos 2 y 3 que puede obtenerse un efecto "golpear y destruir" en modelos de estirpes celulares para la latencia del VIH-1 mediante la combinación de los inhibidores de histona desacetilasa de clase I (HDACI) con butionina sulfoximina, un inhibidor de la gamma-glutamil cisteina sintetasa, es decir, una enzima limitante para la síntesis del glutatión [Savarino *et al.*, 2009].

35 El glutatión es sin duda una defensa antioxidante importante, sin embargo, la BSO sola era incapaz de inducir el escape del VIH-1 desde la latencia, solo escasamente. Es probable que esto se explique por el hecho de que la BSO no provoca en sí misma un estrés oxidativo, sino que más bien deteriora la capacidad de una población de células para contrarrestar el estrés oxidativo inducido por los HDACI [Palamara *et al.*, Datos no publicados]. En este contexto, la auranofina y el trióxido de arsénico son capaces por sí mismos de inducir estrés oxidativo probablemente a través de sus efectos miméticos de la superóxido dismutasa y son capaces de contrarrestar la defensa antioxidante mediante la inhibición de los TrxR. Estos efectos podrían representar un paso adelante en el aprovechamiento del estrés oxidativo como un medio para combatir la latencia del VIH-1.

45 Recientemente, Chomont *et al.* identificaron a los linfocitos T CD4⁺ de memoria transitorios (T_{TM}) como el principal reservorio para la latencia del VIH-1 en individuos en tratamiento antirretroviral (TAR) y que presentan un recuento bajo de CD4 [Chomont *et al.*, 2009]. Los T_{TM} son precursores de los linfocitos T CD4⁺ de memoria (T_{CM}), que representan un reservorio de VIH-1 más estable y sobreviven durante años. En comparación con los T_{CM}, los T_{TM} presentan un fenotipo menos diferenciado y proliferan en respuesta a la IL-7, una citocina que induce la proliferación de células madre. Con el fin de obtener la erradicación del VIH-1 de individuos tratados con TAR y con recuentos bajos de CD4, Chomont *et al.* abogan por el tratamiento con una "quimioterapia dirigida inteligente", que, en combinación con el TAR, sea capaz de inhibir la proliferación de linfocitos T y disminuir las células madre con el fin de evitar la generación de un reservorio de T_{CM} de larga duración. Los autores, sin embargo no pudieron identificar fármacos candidatos adecuados. Sin embargo, los efectos inductores del VIH-1 del trióxido de arsénico (que permite la eliminación de las células infectadas mediante la citopatogenicidad viral o el sistema inmunitario), añadidos a sus efectos antiblásticos bien conocida sobre los linfocitos, así como su marcada actividad pro-diferenciadora harían de este fármaco un candidato ideal para los ensayos clínicos de erradicación del VIH-1.

Referencias para el Ejemplo 2

60 Bragadin M, Scutari G, Folda A, Bindoli A, Rigobello MP. *Effect of metal complexes on thioredoxin reductase and the regulation of mitochondrial permeability conditions.* *Ann N Y Acad Sci.* Diciembre de 2004; 1030:348-54.
 Chomont N, El-Far M, Ancuta P, Trautmann L, Procopio FA, Yassine-Diab B, Boucher G, Boulassel MR, Ghattas G, Brenchley JM, Schacker TW, Hill BJ, Douek DC, Routy JP, Haddad EK, Sékaly RP. *HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation.* *Nat Med.* Agosto de 2009; 15(8):893-900.
 65 Cutler EG, Bradford EH. *Action of iron, cod-liver oil and arsenic on the globular richness of the blood.* *Am J Med Sci* 1878; 75:74-84.

- Christison and Griffith's *Dispensatory 1848 (A Dispensatory or Commentary on the Pharmacopeias of Great Britain and the United States)*. Lea y Blanchard editores de Filadelfia.
- Eisler R. *Chrysotherapy: a synoptic review*. *Inflamm Res*. Diciembre de 2003; 52(12):487-501.
- 5 Giordano A. *Farmacologia, ossia trattato di farmacia teorico e pratico*. Torino, 1844 Ed. Zecchi e Bona, Contrada Carlo Alberto.
- Jordan A, Bisgrove D, Verdin E. *HIV reproducibly establishes a latent infection after acute infection of T cells in vitro*. *EMBO J*. 2003; 22:1868-1877.
- Lu J, Chew EH, Holmgren A. *Targeting thioredoxin reductase is a basis for cancer therapy by arsenic trioxide*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 24 de Julio de 2007; 104(30):12288-93.
- 10 Park SJ, Kim M, Kim NH, Oh MK, Cho JK, Jin JY, Kim IS. *Auranofin promotes retinoic acid- or dihydroxyvitamin D3-mediated cell differentiation of promyelocytic leukaemia cells by increasing histone acetylation*. *Br J Pharmacol*. Julio de 2008; 154(6):1196-205.
- Rahman I, Marwick J, Kirkham P: *Redox modulation of chromatin remodelling: impact on histone acetylation and deacetylation, NF-kappaB and pro-inflammatory gene expression*. *Biochem Pharmacol* 2004, 68:1255-1267.
- 15 Savarino A, Mai A, Norelli S, El Daker S, Valente S, Rotili D, Altucci L, Palamara AT, Garaci E. *"Shock and kill" effects of class I-selective histone deacetylase inhibitors in combination with the glutathione synthesis inhibitor buthionine sulfoximine in cell line models for HIV-1 quiescence*. *Retrovirology*. 2 de Junio de 2009;6:52.
- Spandidos DA, Zoumpourlis V, Kotsinas A, Maurer HR, Patsilinos P. *Transcriptional activation of the human immunodeficiency virus long terminal repeat sequences by cis-platin*. *Genet Anal Tech Appl*. Septiembre de 1990; 7(5):138-41.
- 20 Talbot S, Nelson R, Self WT. *Arsenic trioxide and auranofin inhibit selenoprotein synthesis: implications for chemotherapy for acute promyelocytic leukaemia*. *Br J Pharmacol*. Julio de 2008; 154(5):940-8.
- Waxman S, Anderson KC. *History of the development of arsenic derivatives in cancer therapy*. *The Oncologist*, Vol. 6, Supl. 2, 3-10, Abril de 2001.
- 25

REIVINDICACIONES

1. Un inductor de estrés oxidativo para su uso en el tratamiento de una infección por el virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 (VIH-1) latente, en donde dicho inductor de estrés oxidativo es la auranofina o el óxido de arsénico que es As_2O_3 o As_4O_6 ; en donde la auranofina o el óxido de arsénico inducen la activación del VIH-1 desde la quiescencia y son un modulador epigenético; y en donde el tratamiento incluye, además, la terapia antirretroviral.
2. Un inductor de estrés oxidativo para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende adicionalmente el uso de butionina sulfoximina (BSO) y/o nitrilotriacetato de hierro o sulfato ferroso.

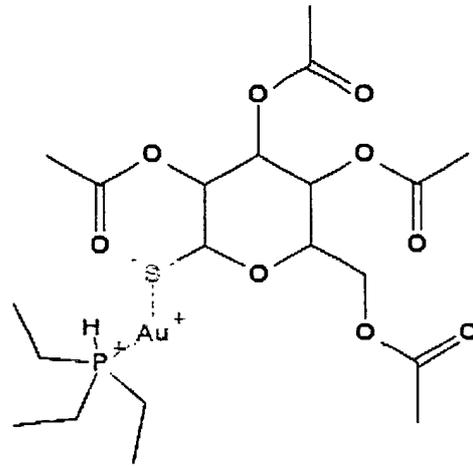


Figura 1

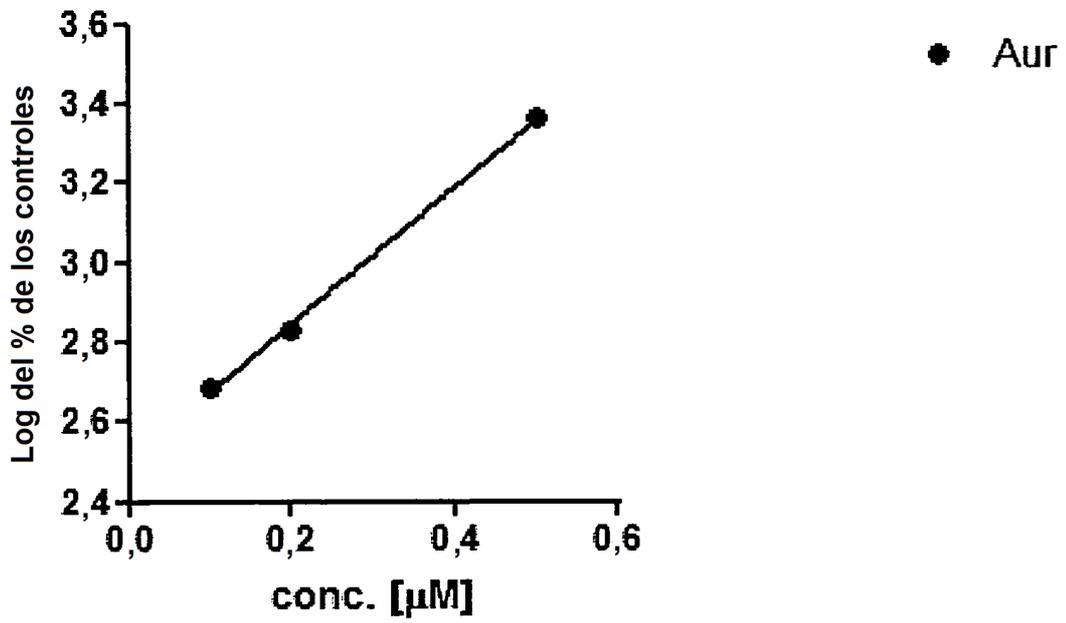


Figura 2

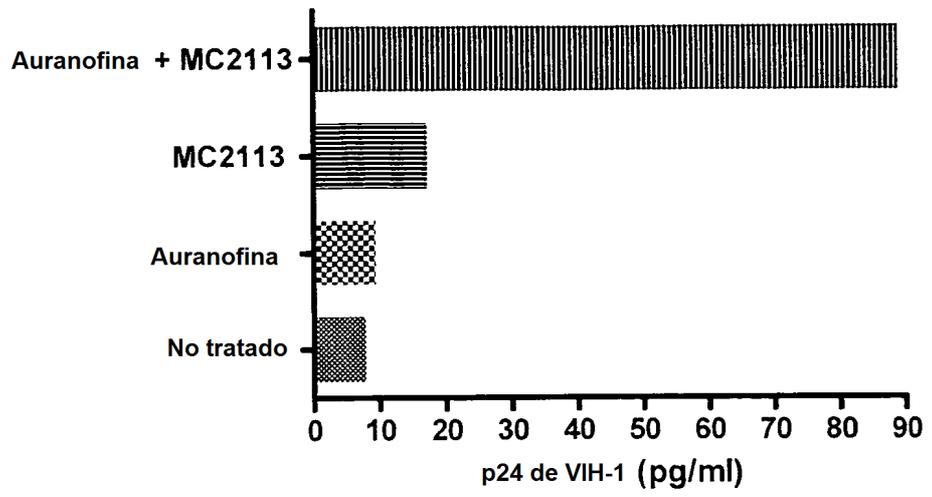


Figura 3

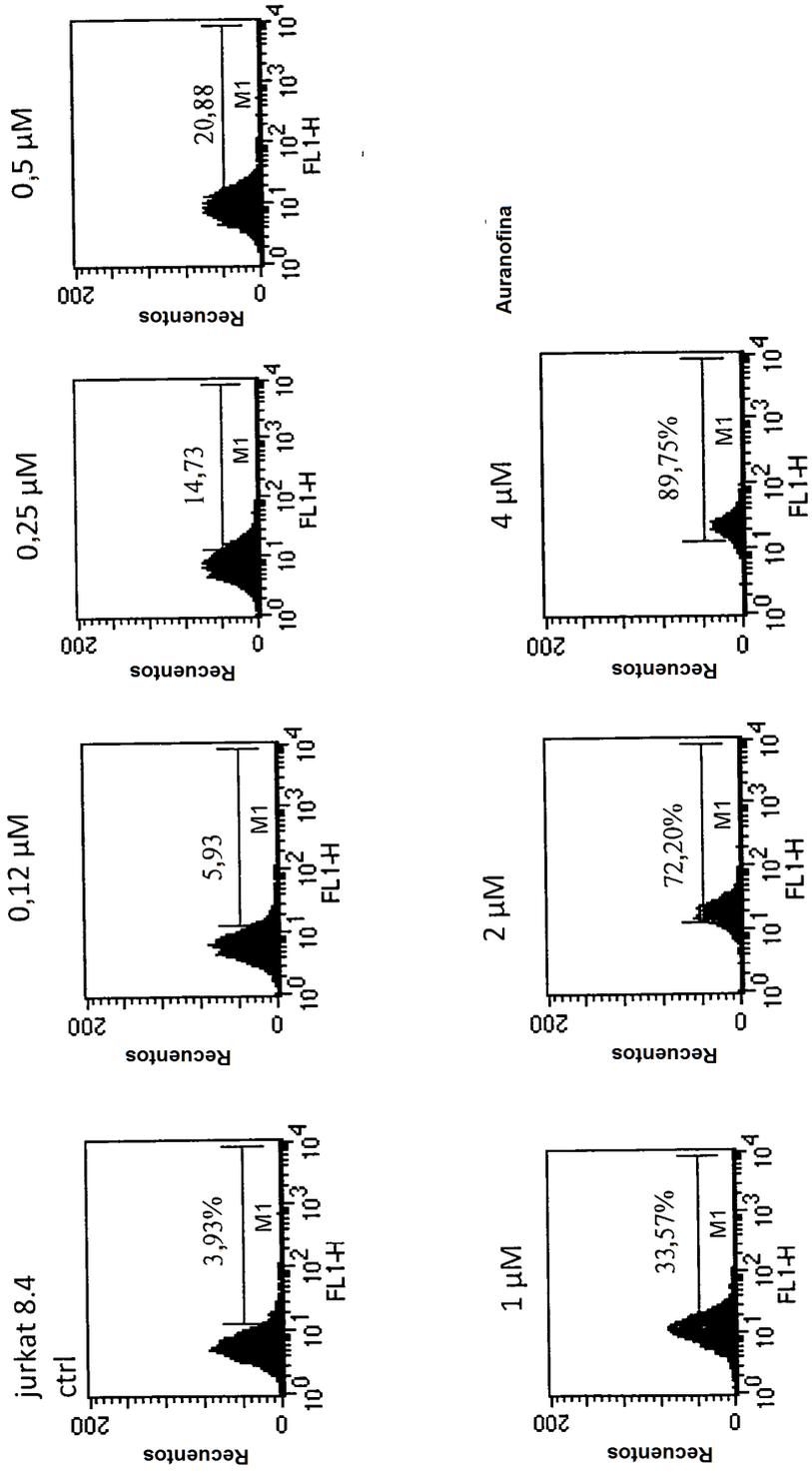


Figura 4

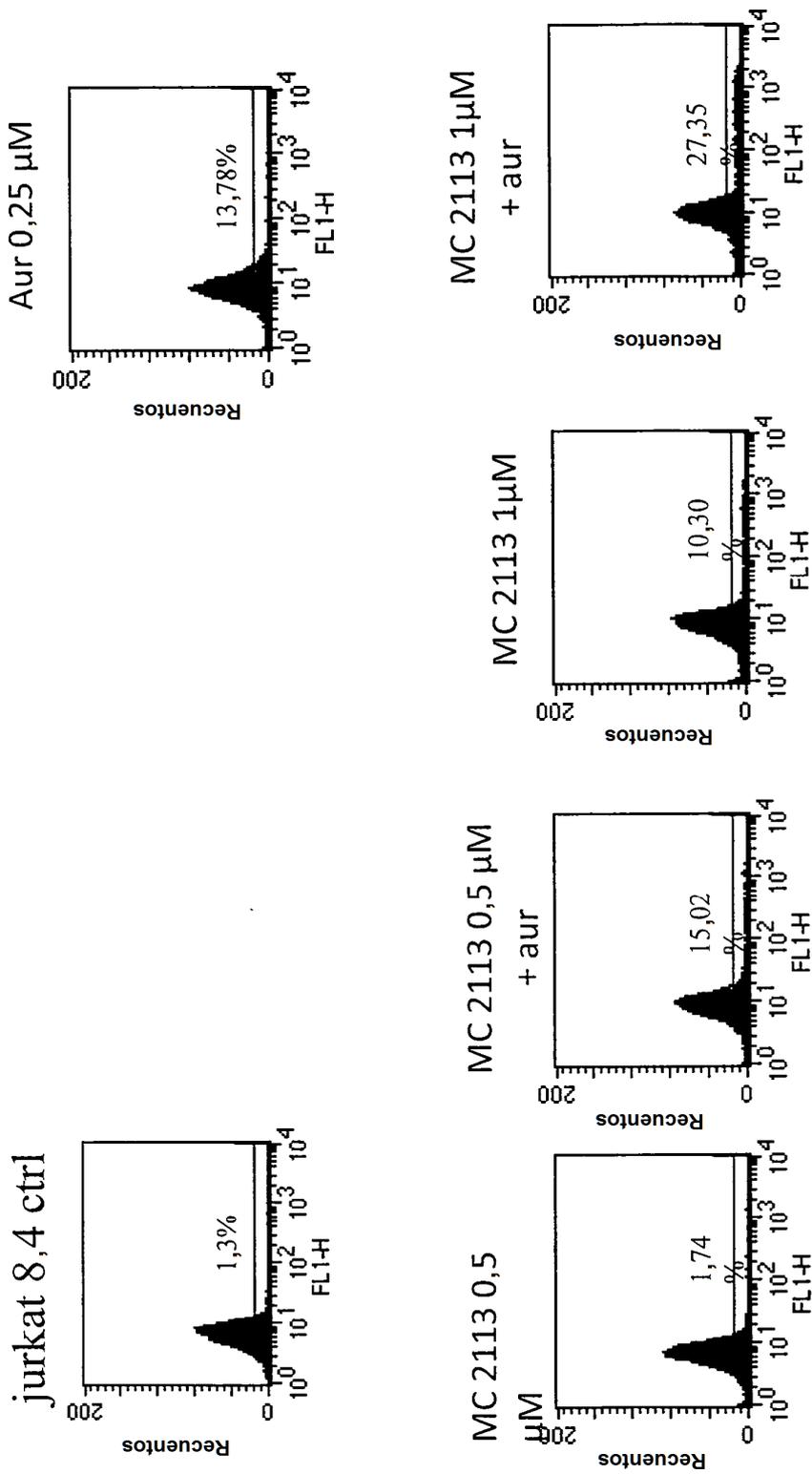


Figura 5

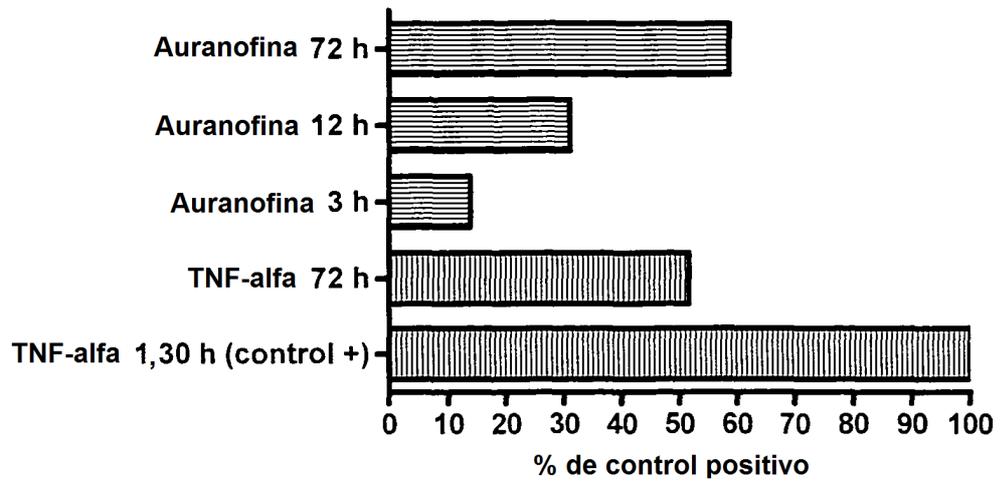


Figura 6

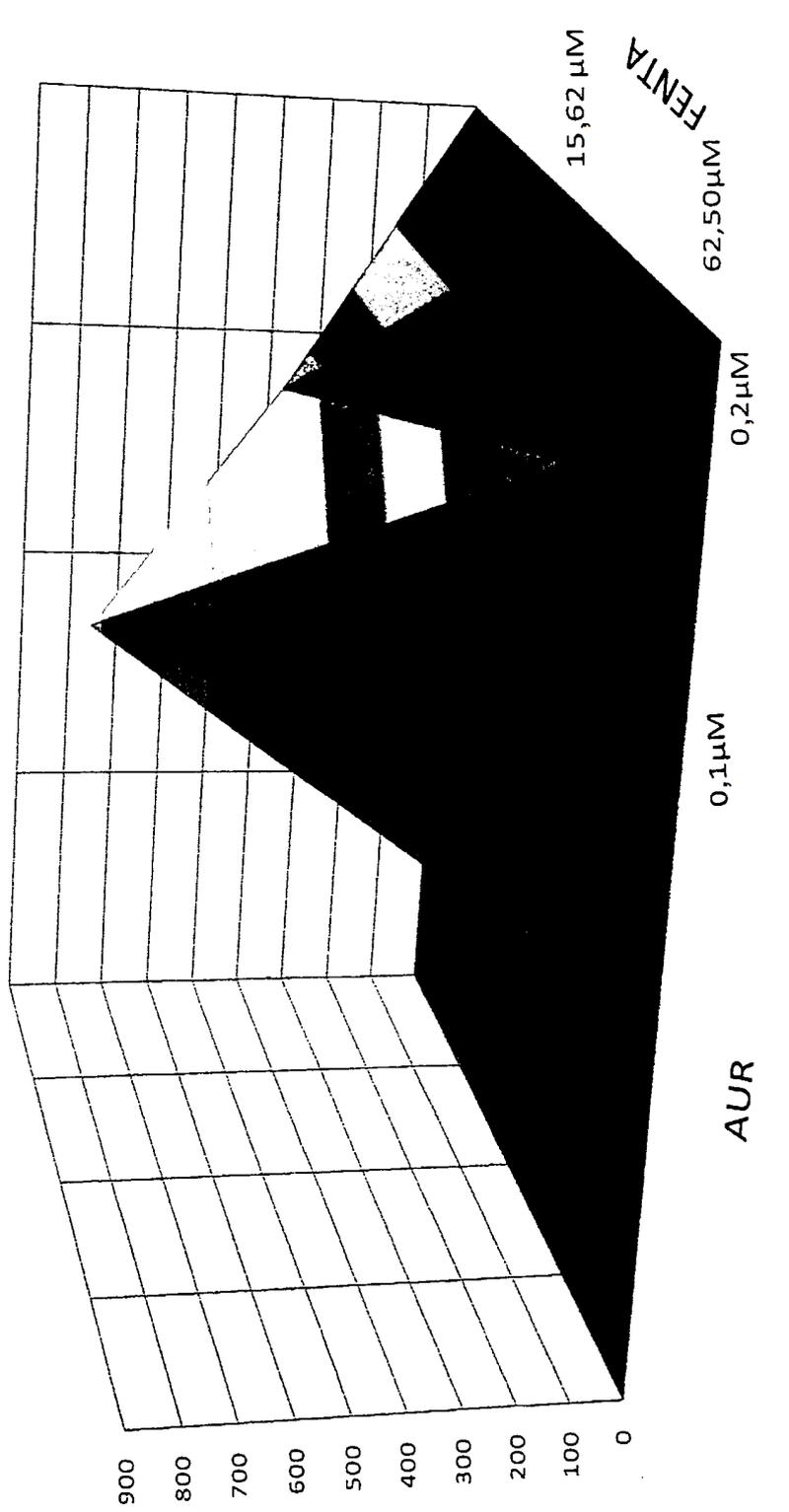


Figura 7

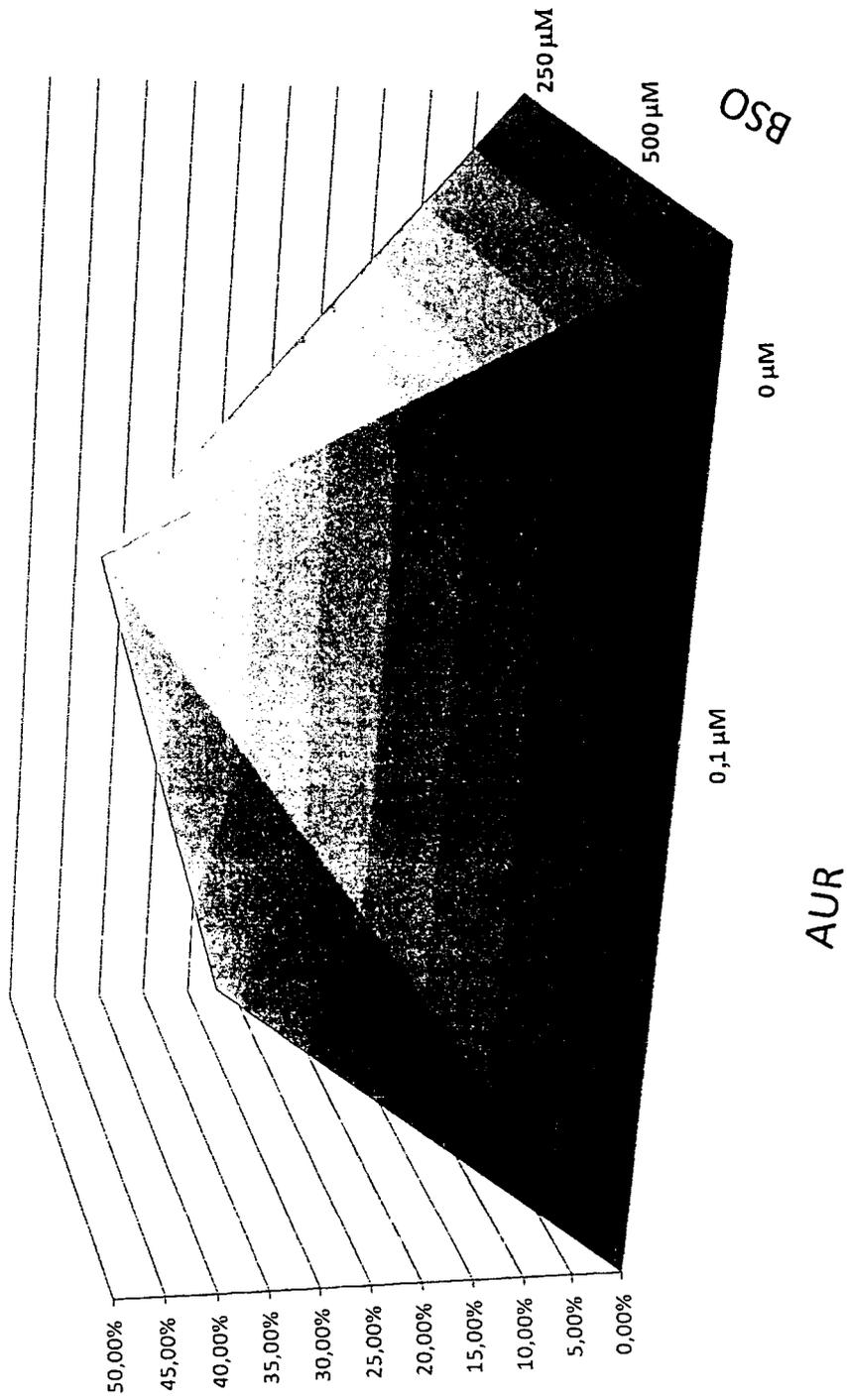


Figura 8

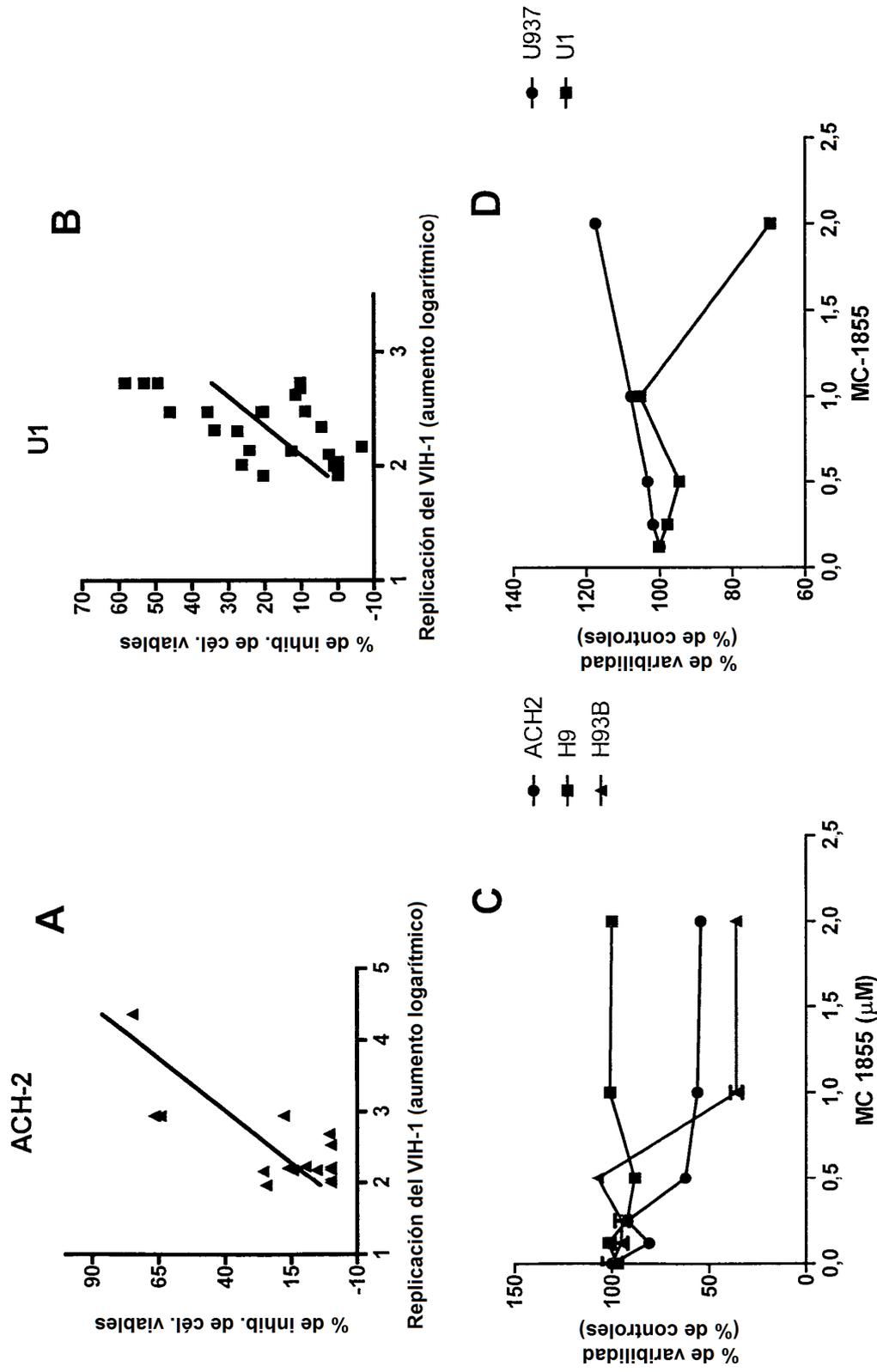


Figura 9

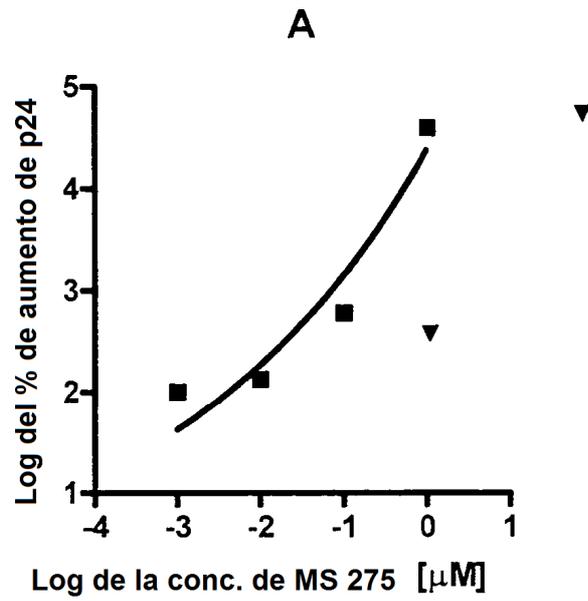


Figura 10

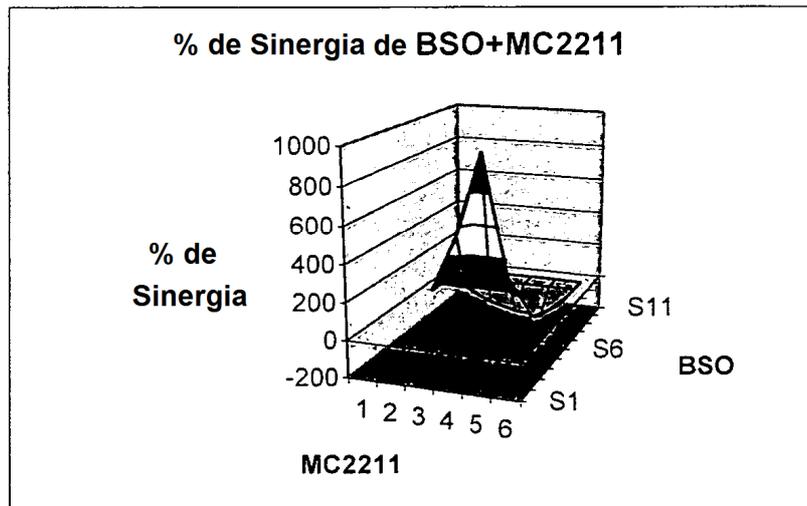


Figura 11

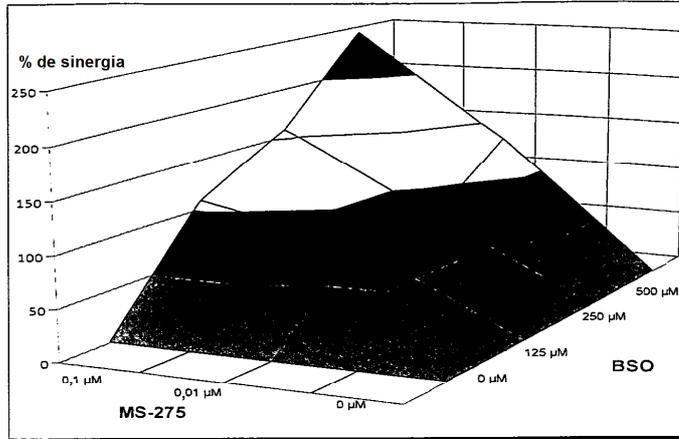


Figura 12

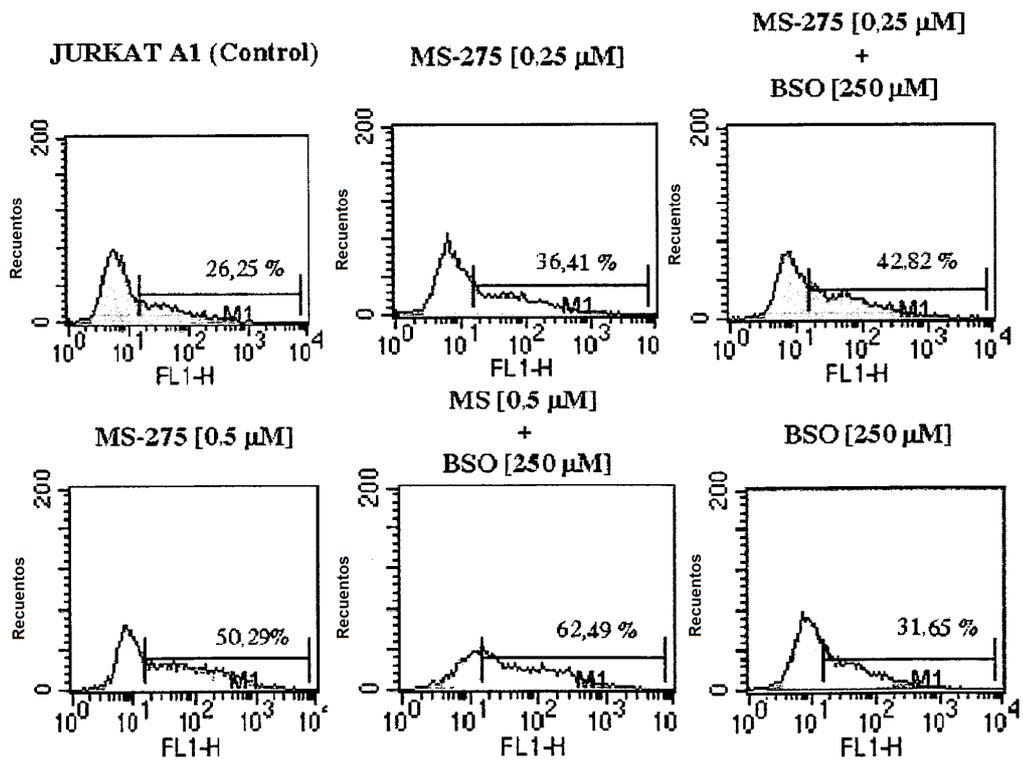


Figura 13

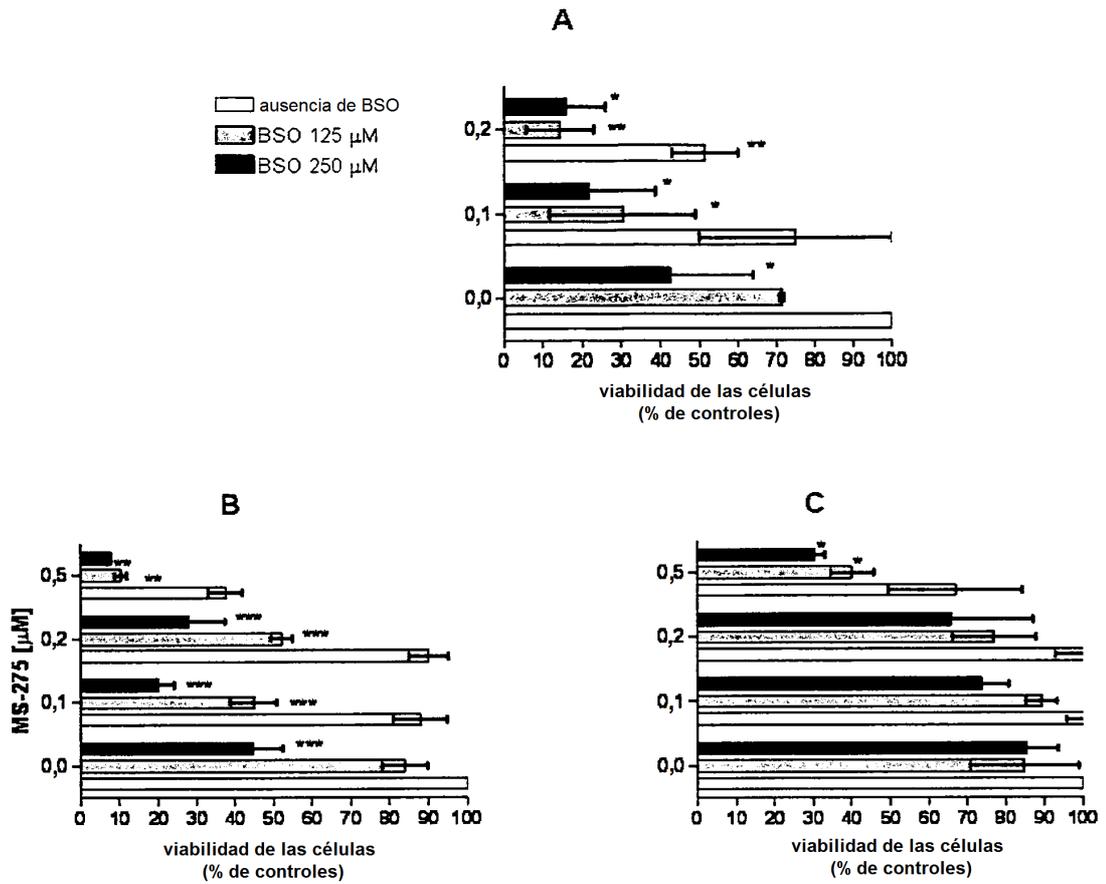
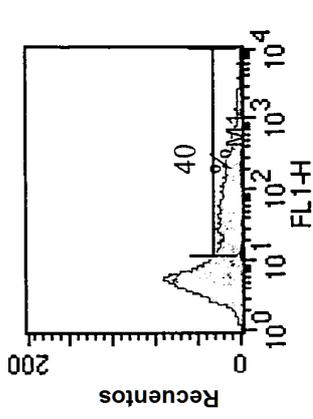
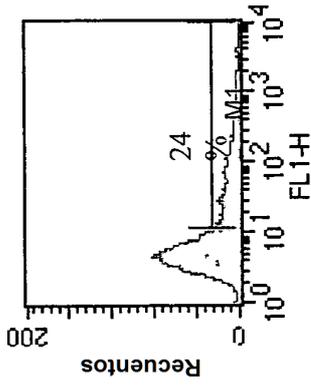


Figura 14

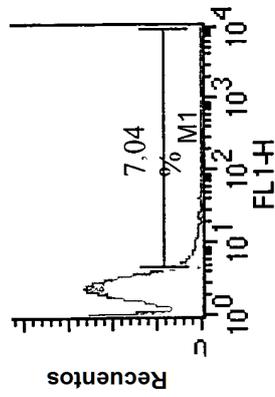
Jurkat A1
As₂O₃ 125 nM



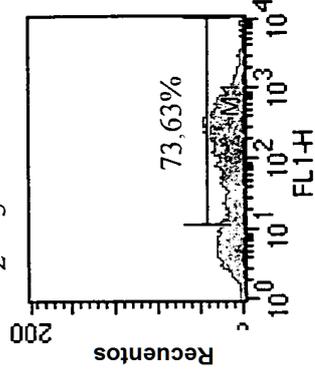
Jurkat A1
(control sin tratar)



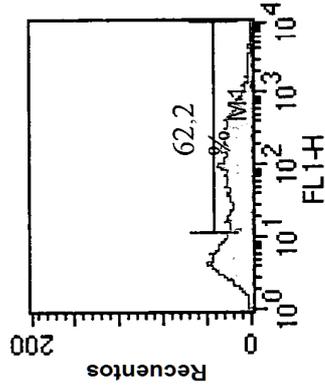
Células Jurkat normales
(control negativo)



Jurkat A1
As₂O₃ 1000 nM



Jurkat A1
As₂O₃ 500 nM



Jurkat A1
As₂O₃ 250 nM

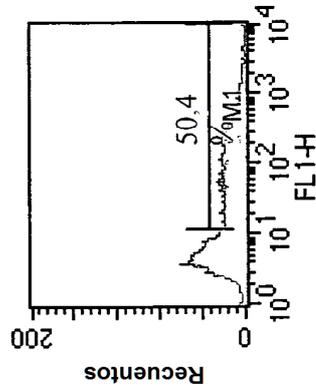


Figura 15