

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 627 500**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 31/553 (2006.01)

A61K 31/713 (2006.01)

A61K 31/5517 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.07.2013 PCT/FI2013/050745**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.01.2014 WO14009609**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.07.2013 E 13745446 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.05.2017 EP 2872631**

54 Título: **Terapia de combinación**

30 Prioridad:

13.07.2012 FI 20125795

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

28.07.2017

73 Titular/es:

**TURUN YLIOPISTO (100.0%)
Yliopistonmäki
20014 Turun Yliopisto, FI**

72 Inventor/es:

**WESTERMARCK, JUKKA y
KAUR, AMANPREET**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 627 500 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

Terapia de combinación

Campo de la invención

Esta invención se refiere al campo de agentes terapéuticos de combinación contra el cáncer.

5 Antecedentes de la invención

10 HDAC4 pertenece a la familia de histonas desacetilasas de clase IIa que se han nombrado tradicionalmente por su capacidad para desacetilar residuos de lisina en proteínas de histonas nucleares y para reprimir la expresión génica de forma epigenética. Sin embargo, en las últimas décadas se ha encontrado que estas HDACs regulan muchas proteínas no histonas, tanto en el núcleo como en el citoplasma (revisado por Yao y Yang en *J Biomed Biotechnol.* (2011) 2011:146493). Los rasgos característicos de las HDACs de clase IIa incluyen (i) presencia de un dominio regulador N-terminal conservado, que contiene NLS (señal de localización nuclear) para la translocación núcleo-citoplásmica y motivos de unión para factores de transcripción y correpresores; (ii) expresión específica de tejido y; (iii) capacidad de respuesta a la fosforilación mediada por estímulos externos/internos (Parra y Verdin, *Curr Opin Pharmacol.* (2010) 10(4):454-60).

15 La expresión elevada de HDAC4 se observa en los músculos cardíacos y lisos, corazón y cerebro. La HDAC4 puede inhibir la expresión de muchos genes mediante la unión a factores de transcripción específicos de tejido (por ejemplo, MEF2, Runx2, p53 y SRF) en asociación con correpresores (por ejemplo, N-CoR y SMRT) y otras HDACs (HDAC3 y 5) (Parra y Verdin de 2010, *ibíd.*). Una serie de estudios se refiere a la expresión anormal de HDAC4 y la localización subcelular de defectos en el desarrollo y enfermedades neurodegenerativas (Majdzadeh et al., *Front Biosci.* (2008) 13:1072-82). Como respuesta a un estímulo celular específico, una variedad de cinasas (principalmente CAMKs) pueden fosforilar HDAC4 en residuos de serina conservados (Ser-246, Ser-467 y Ser-632 en los seres humanos), creando un sitio de acoplamiento para la proteína 14-3-3, que atrapa las HDACs en el citoplasma, liberando de esto modo los promotores diana de la represión mediada por HDAC. La desfosforilación mediada por las fosfatasas PP2A y PP1, por el contrario, se ha mostrado que expone la NLS de HDAC4 y favorece su importación al núcleo (Parra y Verdin, 2010, *ibíd.*).

20 Wilson et al. describen en *Mol Biol Cell.* (2008) 19(10):4062-75, una expresión fuerte de HDAC4 en las criptas del colon de ratón en proliferación. El silenciamiento de HDAC4 o de algunas otras HDACs, así como el tratamiento con inhibidores de pan-HDAC, ha mostrado que inhibe la proliferación de células cancerígenas a través de una regulación positiva de p21, ya sea de forma directa o indirecta a través de p53, en condiciones perjudiciales para el ADN (Basile et al., *J Biol Chem.* (2006) 281(4):2347-57; Wilson et al., 2008, *ibíd.*). En un estudio de alto rendimiento, muestras de tumores de mama humanos mostraron una hiperexpresión significativa de HDAC4, lo que sugiere un papel potencial de HDAC4 en los cánceres humanos (Witt et al., *Cancer Lett.* (2009) 277(1):8-21).

25 Los hallazgos más recientes han identificado una serie de dianas citoplasmáticas, que ponen de relieve el papel de la HDAC4 en la regulación del desarrollo, la angiogénesis, la apoptosis y la quimiorresistencia. Se ha observado que la actividad de HDAC4 y su asociación con HIF1 α en el citoplasma es necesaria para la supervivencia de neuronas de la retina (Chen y Cepko, *Science* (2009) 323(5911):256-9). La desacetilación de las lisinas N-terminales de HIF1 α mediada por HDAC4 estabiliza HIF1 α y favorece la transcripción de sus genes diana, a saber, VEGF y genes glicolíticos (LDHA y Glut1) (Geng et al., *J Biol Chem.* (2011) 286(44):38095-102). Por lo tanto, HDAC4 parece que prepara las células para que se adapten a condiciones de hipoxia/estrés y también contribuye a la angiogénesis tumoral. Es importante destacar que, en este informe, las células del cáncer de próstata con HDAC4 silenciada eran más sensibles al tratamiento con docetaxel en condiciones de hipoxia.

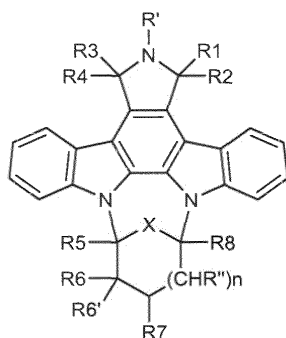
30 También se muestra que la hiperexpresión de HDAC4 mejora la resistencia a cisplatino en el cáncer de ovario mediante la activación y la translocación nuclear de STAT1 (desacetilación seguida de fosforilación). En su lugar, un inhibidor más específico de HDAC4, AHA4a, induce una actividad caspasa y restaura la sensibilidad a cisplatino (Stronach et al., *Cancer Res.* (2011) 71(13):4412-22).

35 Más recientemente, se ha mostrado la importancia de HDAC4 tanto nuclear como citoplasmática en la supervivencia neuronal y la patogénesis ataxia telangiectasia (AT) (Li et al., *Nat Med.* (2012) 18 (5): 783-790). Se ha mostrado que una mejora de la actividad de PP2A, debido a la pérdida de ATM, favorece la acumulación nuclear de HDAC4 y la represión epigenética de diversos promotores. A la inversa, la HDAC4 citoplasmática inhibía la entrada de nuevo en el ciclo celular y la activación de la caspasa-3. Es importante destacar que estos descubrimientos son de gran importancia también en el campo del cáncer, ya que la activación de PP2A puede ser útil para mejorar la eliminación de células cancerosas en el cerebro, transformando la HDAC4 citoplasmática pro-supervivencia a una HDAC4 nuclear anti-supervivencia.

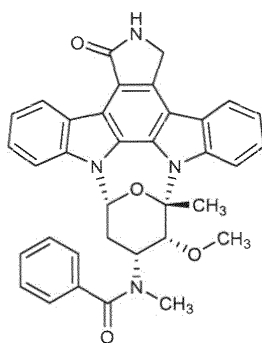
40 Dado que el cáncer es una enfermedad devastadora que afecta a todas las comunidades en todo el mundo y que una resistencia intrínseca o adquirida es el principal problema relacionado con las quimioterapias utilizadas actualmente, existe una necesidad identificada en la técnica de nuevos regímenes de terapias contra el cáncer que induzcan la apoptosis.

Breve descripción de la invención

En un aspecto, la presente invención proporciona una combinación de al menos un tipo de agente de silenciamiento de HDAC4 y, o bien un compuesto de Fórmula (I) o PKC412 (es decir Midostaurina) para uso como un medicamento. Los compuestos de Fórmula (I) tienen la estructura general:

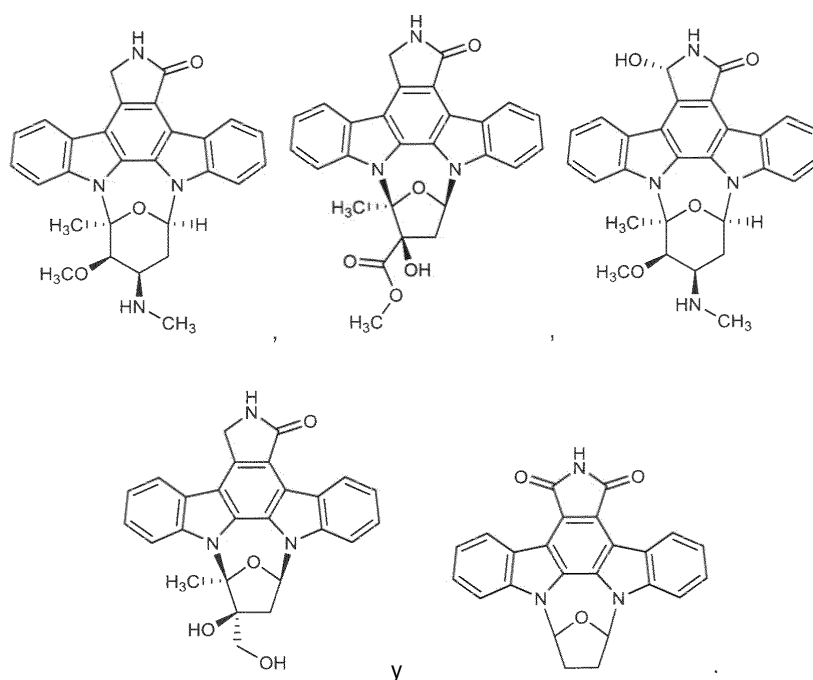


- 5 en donde
- R' es H o alquilo;
- R'' es H o alcoxi;
- R1 y R2 son H o juntos forman oxo;
- 10 R3 y R4 son independientemente H, OH o juntos forman oxo:
- R5, R6, R6', R7 y R8 se seleccionan independientemente a partir del grupo que consiste en H, alquilo, alcoxi, hidroxialquilo, alcóxicarbonilo, o monoalquilamino y dialquilamino;
- X es CH₂ u O; y
- n es 0 o 1.
- 15 PKC412 (es decir Midostaurina) tiene la fórmula



- 20 En algunas realizaciones, el agente de silenciamiento de HDAC4 se selecciona a partir del grupo que consiste en moléculas de ARNsi, moléculas de DARNsi, precursores de miARN artificiales, moléculas de shARN, oligonucleótidos antisentido y ribozimas. En algunas realizaciones adicionales, el agente de silenciamiento de HDAC4 comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 1 a 170.

En algunas otras realizaciones, el compuesto de Fórmula (I) se selecciona a partir del grupo que consiste en



De acuerdo con algunas realizaciones, la combinación se puede utilizar en el tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa seleccionada a partir de un grupo que consiste en cáncer de cerebro, glioma, astrocitoma y glioblastoma.

- 5 De acuerdo con algunas realizaciones adicionales, el agente de silenciamiento de HDAC4 y, o bien el compuesto de Fórmula (I) o PCK412, se van a administrar de forma simultánea, secuencial o por separado.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una combinación de acuerdo con cualquier realización que se expone en el presente documento y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 10 También se describe en esta memoria un método para la sensibilización de células hiperproliferativas frente a un agente quimioterapéutico, mediante el silenciamiento del gen de HDAC4 en un sujeto humano o animal que requiere tal sensibilización.

- 15 También se describe en esta memoria un método para tratar una enfermedad hiperproliferativa en un sujeto humano o animal que requiere tal tratamiento, mediante la administración a dicho sujeto de al menos un tipo de agente de silenciamiento de HDAC4 y, o bien un compuesto de Fórmula (I) descrito en el presente documento o PCK412, de forma concomitante, simultánea o posterior.

Todas las realizaciones descritas para el uso médico de la presente combinación se aplican a los métodos mencionados anteriormente, así como viceversa.

- 20 Otros aspectos, realizaciones específicas, objetos, detalles y ventajas de la invención se exponen en los siguientes dibujos, descripción detallada y ejemplos.

Breve descripción de los dibujos

A continuación, la invención se describirá con mayor detalle por medio de realizaciones preferidas haciendo referencia a los dibujos adjuntos, en los cuales

- 25 La Figura 1A es una transferencia Western que muestra la actividad silenciadora de HDAC4 de un ARNbc desorganizado (Scr.) y ARNbc específico de HDAC4 (HDAC4) en células T98G de glioblastoma humano.

La Figura 1B muestra la cantidad de fragmentaciones nucleares apoptóticas en células T98G de glioblastoma después de la transfección con un ARNbc desorganizado o específico de HDAC4 durante 48 horas, después de un tratamiento con la concentración indicada de fármacos mencionados durante otras 24 horas.

- 30 La Figura 2A representa el potencial colonogénico de células T98G de glioblastoma transfectadas con un ARNbc desorganizado o específico de HDAC4, después de dos días de tratamiento con la concentración indicada de compuestos químicos.

La Figura 2B muestra el análisis cuantitativo de los resultados mostrados en la Figura 2A como una medida del área cubierta por las colonias de células T98G por pocillo en las condiciones indicadas.

5 La Figura 2C muestra el análisis cuantitativo de los resultados mostrados en la Figura 2A como una medida del factor de cambio en el área cubierta por colonias de células T98G tratadas con los fármacos indicados, con respecto a las células de control no tratadas.

La Figura 3A representa el potencial colonogénico de células de glioblastoma U87MG-luciferasa transfectadas con un ARNbc desorganizado o específico de HDAC4, después de dos días de tratamiento con la concentración indicada de compuestos químicos.

10 La Figura 3B muestra el análisis cuantitativo de los resultados mostrados en la Figura 3A como una medida del área cubierta por las colonias de células U87MG-luciferasa por pocillo en las condiciones indicadas.

La Figura 3C muestra el análisis cuantitativo de los resultados mostrados en la Figura 3A como una medida del factor de cambio en el área cubierta por las colonias de células U87MG-luciferasa tratadas con los fármacos indicados con respecto a las células de control no tratadas.

15 La Figura 4A es una transferencia Western que muestra la actividad silenciadora de HDAC4 de un ARNbc desorganizado (Scr.) y un ARNbc específico de HDAC4 (HDAC4.2) en células T98G de glioblastoma humano.

La Figura 4B muestra la cantidad de fragmentaciones nucleares apoptóticas en células T98G de glioblastoma después de la transfección con un ARNbc desorganizado o HDAC4.2 durante 48 horas, seguida por un tratamiento con la concentración indicada de los fármacos mencionados durante otras 24 horas.

20 La Figura 4C representa el potencial colonogénico de células T98G de glioblastoma transfectadas con un ARNbc desorganizado o HDAC4.2, después de dos días de tratamiento con la concentración indicada de compuestos químicos.

Descripción detallada de la invención

25 La presente invención se basa en un descubrimiento sorprendente en el que el silenciamiento del gen de HDAC4 aumenta la actividad inductora de apoptosis de agentes de molécula pequeña que comparten características estructurales comunes

Un silenciamiento concomitante del gen de HDAC4 y la administración de dicho agente da como resultado un aumento sinérgico del nivel de apoptosis. Por lo tanto, en un aspecto, la invención proporciona una terapia de combinación de agotamiento de HDAC4 y dichos agentes.

30 El silenciamiento del gen de HDAC4 se puede producir a través de cualquier método adecuado conocido en la técnica, incluyendo, pero no limitado a, ARN de interferencia (ARNi). El enfoque más común para el silenciamiento de genes basado en ARNi, es el uso de ARN de interferencia pequeño (ARNsi).

35 El principio de ARNsi se presenta ampliamente en las publicaciones. A modo de ejemplos se pueden mencionar los documentos de publicaciones de patente de EE.UU. 2003/0143732, 2003/0148507, 2003/0175950, 2003/0190635, 2004/0019001, 2005/0008617 y 2005/0043266. Una molécula de ARNsi dúplex comprende una región antisentido (no codificante) y una cadena homosenrido (codificante), en donde dicha cadena antisentido comprende una secuencia complementaria a una región diana en una secuencia de ARNm que codifica cierta proteína y la cadena homosenrido comprende una secuencia complementaria a dicha cadena antisentido. Por lo tanto, la molécula de ARNsi dúplex se ensambla a partir de dos fragmentos de ácido nucleico, en donde un fragmento comprende la cadena antisentido y el segundo fragmento comprende la cadena homosenrido de dicha molécula de ARNsi. En 40 otras palabras, los ARNsi son pequeños ARNs bicatenarios (ARNbc). La cadena homosenrido y la cadena antisentido se pueden conectar covalentemente a través de una molécula enlazadora, que puede ser un enlazador polinucleótido o un enlazador no nucleótido. La longitud de las cadenas homosenrido y antisentido puede variar y es normalmente de aproximadamente 19 a 21 nucleótidos cada una. En algunos casos, el ARNsi puede comprender 22, 23 o 24 nucleótidos.

45 Otro enfoque para el silenciamiento de HDAC4 basado en ARNi es usar ARNsi de sustrato Dicer (DARNsi) más largos, normalmente de 25-35 nt, que en algunos casos se ha descrito que son más potentes que los ARNsi correspondientes de 21 meros (Kim et al., Nat Biotechnol de 2005, 23: 222-226). Los DARNsi se procesan *in vivo* en ARNsi activos mediante Dicer.

50 En una célula, se forma una cadena de ARNsi antisentido activa y reconoce una región diana del ARNm diana. Esto a su vez conduce a una escisión del ARN diana a través del complejo de endonucleasa RISC (RISC = complejo de silenciamiento inducido con ARN) y también a la síntesis de ARN adicional mediante una ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRP), que puede activar Dicer y produce moléculas de ARNsi dúplex adicionales, amplificando de este modo la respuesta.

Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "ARNbc" se refiere tanto a los ARNsi como a los DARNsi.

Normalmente, pero no necesariamente, la cadena antisentido y la cadena homosen­tido de ARNbc comprenden ambas un saliente 3' terminal de unos pocos nucleótidos, normalmente de 1 a 3. El saliente 3' puede incluir uno o varios nucleótidos modificados, tales como un 2'-O-metil ribonucleótido. El extremo 5'-terminal de la cadena antisentido es normalmente un grupo fosfato (P). Los dúplex de ARNbc que tienen grupos fosfato terminales (P) son más fáciles de administrar en la célula que una sola cadena antisentido. En algunos casos, el extremo 5'-terminal de la cadena homosen­tido o de ambas cadenas homosen­tido y antisentido, puede comprender un grupo P.

Generalmente, un ARN no modificado tiene una estabilidad baja en condiciones fisiológicas debido a su degradación por enzimas ribonucleasas presentes en la célula viva. Si el oligonucleótido se va a administrar exógenamente, es altamente deseable modificar la molécula de acuerdo con métodos conocidos, con el fin de mejorar su estabilidad frente a una degradación química y enzimática.

Las modificaciones de nucleótidos que se van a administrar de forma exógena *in vivo* se describen extensamente en la técnica (por ejemplo, en el documento US 2005/0255487, incorporado en esta memoria como referencia). Principalmente, cualquier parte del nucleótido, es decir, el azúcar ribosa, la base y/o las cadenas fosfodiéster internucleotídicas se pueden modificar. Por ejemplo, la eliminación del grupo 2'-OH de la unidad de ribosa para proporcionar 2'-desoxirribonucleótidos, da como resultado una estabilidad mejorada. Antes se han descrito también otras modificaciones en este grupo: la sustitución del grupo 2'-OH de la ribosa por grupos alquilo, alqueno, alilo, alcóxialquilo, halo, amino, azido o sulfhidrilo. También se pueden realizar otras modificaciones en la unidad de ribosa: ácidos nucleicos bloqueados (LNA) que contienen enlaces metileno entre las posiciones 2' y 4' de la ribosa, se pueden emplear para crear una mayor estabilidad intrínseca.

Además, el enlace fosfodiéster internucleotídico se puede modificar, por ejemplo, de modo que uno o varios oxígenos se sustituyen por grupos azufre, amino, alquilo o alcoxi. También se puede modificar la base en los nucleótidos.

Preferiblemente, el oligonucleótido comprende modificaciones de uno o varios grupos 2'-hidroxilo en los azúcares de la ribosa, y/o modificaciones en uno o varios enlaces fosfodiéster internucleotídicos, y/o una o varias modificaciones de ácidos nucleicos bloqueados (LNA) entre la posición 2' y 4' de los azúcares de la ribosa.

Modificaciones particularmente preferibles son, por ejemplo, la sustitución de uno o varios de los grupos 2'-OH por 2'-desoxi, 2'-O-metilo, 2'-halo, por ejemplo, fluoro o 2'-metoxietilo. Especialmente preferidos son los oligonucleótidos en los que algunos de los enlaces fosfodiéster internucleotídicos también están modificados, por ejemplo, reemplazados por enlaces fosforotioato.

En algunas realizaciones, los ARNbc pueden contener uno o varios análogos de nucleótidos sintéticos o naturales, incluyendo, pero no limitados a, fosforotioatos, fosforamidatos, fosfonatos de metilo, fosfonatos de quiral-metilo y ácidos peptidonucleicos (PNAs), siempre que los ARNbc conserven su capacidad de silenciamiento de HDAC4.

Se debe subrayar que las modificaciones mencionadas anteriormente son solo ejemplos no limitantes.

Uno de los desafíos relacionados con el ARNi es la identificación de un ARNbc potente para el ARNm correspondiente. Cabe señalar que los genes con una complementariedad incompleta están regulados a la baja de forma inadvertida por el ARNbc, lo que conduce a problemas en la interpretación de datos y una toxicidad potencial. Sin embargo, esto se puede abordar en parte mediante un cuidadoso diseño de ARNbc apropiados con algoritmos de diseño. Estos programas informáticos criban una secuencia diana dada con un conjunto de normas para encontrar tramos de secuencia con bajo contenido en GC, falta de repeticiones internas, un extremo 5' rico en A/U y energía de unión libre local elevada, que son características que mejoran el efecto del silenciamiento del ARNbc.

Los ARNbc específicos de HDAC4 están disponibles en la técnica y otras moléculas de ARNbc se pueden diseñar utilizando algoritmos comerciales y no comerciales. Para este fin, la secuencia de ADNc completa de la HDAC4 se puede cargar en los programas de algoritmos de ARNsi, como la herramienta de diseño Eurofins MWG Operon's Online Design Tool, la herramienta de diseño de ARNsi de Dharmacon y el programa independiente desarrollado por Cui et al. (Comput Methods Programs Biomed (2004) 75(1):67-73). De forma ideal, las secuencias de ARNsi generadas por el algoritmo se criban entonces mediante una alineación de la secuencia de ADN de todo el genoma (BLAST) para eliminar los ARNsi que no están exentos de efectos inespecíficos. En otras palabras, todos esos ARNsi que tienen incluso regiones de secuencias cortas que se emparejan con otros genes distintos del gen diana (HDAC4), se deben considerar invalores para un uso posterior. Un ejemplo no limitativo de ARNsi específicos de HDAC4, adecuados para uso en diversas realizaciones de la presente invención, se enumeran en la Tabla 1.

Los ARNsi específicos de HDAC4 se pueden transfectar con diferentes líneas celulares para comprobar su capacidad para degradar el ARNm. Además, el agotamiento de la traducción de HDAC4 se puede estudiar a nivel de proteínas mediante la medición de la cantidad de proteína HDAC4 después del tratamiento con ARNsi, con anticuerpos específicos de HDAC4.

Tabla 1. ARNsi específicos de HDAC4

SEQ ID NO:	secuencia homosenrido de ARNsi (5' a 3')	Región	Posición de partida
1	CAGUGACCACUGGCCCGUCTT ¹	ORF	1627
2	UCAUACACGAGGCCUGUCGUU ¹	ORF	2768
3	UCUUUGGCGUCGUACAUUCUU ¹	ORF	1502
4	CGACAGGCCUCGUGUAUGAUU ²	ORF	2750
5	AAAUUACGGUCCAGGCUAAUU ²	ORF	1543
6	TCATGAGCCAGGTAACCCAC ³	ORF	613
7	CATACAAGTACCGGGACGGT ³	ORF	681
8	TCATTGCTAGCAATGTCCAC ³	ORF	777
9	CAGAAAGTCCATCTGGATGG ³	ORF	807
10	CTGGTCTCGGCCAGAAAGTC ³	ORF	818
11	TGGGCATGTGGTTCACGCGG ³	ORF	861
12	CACCGTGCTGGGCATGTGGT ³	ORF	869
13	GTCCAGGCGCAGGTCCATGG ³	ORF	935
14	AGTGAGAACTGGTGGTCCAG ³	ORF	949
15	CGGCTCTGCCACAGGCAGTG ³	ORF	965
16	TCCCGCAGGGCCGGCTCTGC ³	ORF	976
17	TGCTGGTGCTTCATGGCCAG ³	ORF	1147
18	TCCTTGTTCTTGAGCTGCTG ³	ORF	1249
19	CCTTCTCCTTGTCTTGAGC ³	ORF	1254
20	ACTTCATCTTCACTTCTGTG ³	ORF	1296
21	CTTCTTTTTATTGAGGACAA ³	ORF	1325
22	GCTGGAAATGCAGTGGTTCA ³	ORF	1364
23	GAGGGTCGCTGGAAATGCAG ³	ORF	1371
24	AACTCTGGTCAAGGGAAGTCT ³	ORF	1416
25	CCTAAGAGGGAAGTCATCTT ³	ORF	1499
26	GCTTTAGCCTGGACCGTAAT ³	ORF	1545
27	TTTCTGCTTTAGCCTGGACC ³	ORF	1550
28	CTGCTCCGTCTTTCGGCCAC ³	ORF	1570
29	GTGACCACTGGCCCGTCTTT ³	ORF	1606
30	AGCAGTGACCACTGGCCCGT ³	ORF	1610
31	CGCGGAGTCTGTGACATCCA ³	ORF	1646
32	AAGTGGAGCGGCCGAGCCTT ³	ORF	1802
33	GGCCAGCGTGATGTTGGGC ³	ORF	1845
34	CAGGCCAGCGTGATGTTGG ³	ORF	1847
35	GTCCCGCTCCAAGGGCGAGG ³	ORF	1988
36	TCCAGTAAGACCATGTGCTG ³	ORF	2035
37	GCTCCCAGGCCTGTGACGAG ³	ORF	2077
38	AACCAAGGACTGTGCGTGGA ³	ORF	2105
39	TCTGCACCAACCAAGGACTG ³	ORF	2113

ES 2 627 500 T3

SEQ ID NO:	secuencia homosenidido de ARNsi (5' a 3')	Región	Posición de partida
40	GTAGGGCTCGTCCAGCAGAG ³	ORF	2393
41	CCTCATCGCTCTCAATGGGC ³	ORF	2475
42	TCTGAAGAGCAGCTCCTGCT ³	ORF	2546
43	GGATGCCGGCGGCCTCCATG ³	ORF	2625
44	ATACACGAGGCCTGTCGTGA ³	ORF	2747
45	ACTCCCGCAGGTGCACTGGT ³	ORF	2786
46	TGCTGCTACTCCCGCAGGTG ³	ORF	2793
47	GCTGCTGCTACTCCCGCAGG ³	ORF	2795
48	TGCACTCGCATTGCCCCGG ³	ORF	2874
49	TGTGGGCTTCCGAGTGCACC ³	ORF	2931
50	GGTTCGTGCCATACAGGAGG ³	ORF	2952
51	GCCACAGCCAGGCGGGCTG ³	ORF	3101
52	GACCAGCTCTACCACGCAGC ³	ORF	3119
53	AGGGTCGCTGTAGAAAGCCT ³	ORF	3338
54	TGGAGGGACATGTACAGGAC ³	ORF	3361
55	TAGCGGTGGAGGGACATGTA ³	ORF	3367
56	GCTGCCTGGGAAGAAGTTCC ³	ORF	3395
57	AAGCCTGATGACACCAGCAC ³	ORF	3571
58	TGGCGGAGAGGTTGTAGCCC ³	ORF	3624
59	TACCCGAAGCATCTGGCGGA ³	ORF	3637
60	GCGTTTGCATTGGGTCTTTG ³	ORF	3811
61	CTCCATGGAACGGACAGCGT ³	ORF	3827
62	TCTGAGCCTCGATCAGAGAA ³	ORF	3912
63	TCTTCCATGGGCTCCTCATC ³	ORF	4012
64	CTTCGAGGGAGTGCTACAGG ³	codón de parada	4041
65	TTTCATAAGAATCAAGTAAG ³	3'UTR	5225
66	GCAATCTGCATTCATTTTAT ³	3'UTR	5295
67	ACAGGCTCCAAAATCCAGG ³	3'UTR	6203
68	GCTGTCCTGGTCAGGCAATC ³	3'UTR	6276
69	AAGAGTAAAGACTGGCTGTC ³	3'UTR	6290
70	ACTGGTGGCTTCATGTGCTG ³	3'UTR	6360
71	GTCTGAACTTCTGCCCCAA ³	3'UTR	6410
72	GAGCACGGTGTGTCTGAACT ³	3'UTR	6421
73	CACTCATTTGGTCAAAAGTT ³	3'UTR	6508
74	CAAACCACTGTCTCAGAGCT ³	3'UTR	6569
75	ATGAGGCCAAGGAGGCCAGA ³	3'UTR	6734
76	AGCAGTCCATGTTATCCCAT ³	3'UTR	6854
77	GCGTCTCCATTTGAATGAGA ³	3'UTR	6911
78	CCTGCCAGGCCTTTGCAGAG ³	3'UTR	6932
79	GGAGAAGAGCCGAGTGTGTC ³	3'UTR	7031

ES 2 627 500 T3

SEQ ID NO:	secuencia homosenrido de ARNsi (5' a 3')	Región	Posición de partida
80	AAGTCCATTGCTAGTGCTGC ³	3'UTR	7519
81	GAATGTTCTGATCAAAAAGA ³	3'UTR	7548
82	GCCATAAAACACGTGGGCC ³	3'UTR	7623
83	AAAGTGAGGCCGAGCTAAGA ³	3'UTR	8399
84	GCACAGAAGTGAAGATGAA ⁴	ORF	1295
85	CAGCAGAGGTTGAGCGTGA ⁴	ORF	3268
86	GGAGAAGGGCAAAGAGAGT ⁴	ORF	1266
87	GGTCCAGGCTAAAGCAGAA ⁴	ORF	1550
88	GCGATGAGGAAGAGGCAGA ⁴	ORF	2486
89	CGACAGGCCTCGTGTATGA ⁴	ORF	2750
90	CAGCAGATCCAGAGGCAGA ⁴	ORF	1036
91	TGGAGAAAGTCATGGAGAT ⁴	ORF	3842
92	GCAGAAAGTGGCCGAAAGA ⁴	ORF	1563
93	GGGACGTGCACCATGGAAA ⁴	ORF	3308
94	CATTGAGAGCGATGAGGAA ⁴	ORF	2478
95	TGGTAGAGCTGGTCTTCAA ⁴	ORF	3125
96	GCAAAGACCCAATGCAAAC ⁴	ORF	3810
97	GAACAAGGAGAAGGGCAA ⁴	ORF	1260
98	GAAGATGAAGTTACAAGAA ⁴	ORF	1305
99	GGGAATGTACGACGCCAAA ⁴	ORF	1482
100	CAGAAAGTGAAGATGAAGTT ⁴	ORF	1298
101	AAGTGAAGATGAAGTTACA ⁴	ORF	1301
102	CCGGGAGGATCCAGAGCAT ⁴	ORF	2828
103	CCATATGGAACGAGGTGCA ⁴	ORF	3071
104	CCACAGGGGAGCTGAAGAA ⁴	ORF	3149
105	AGGTTGAGCGTGAGCAAGA ⁴	ORF	3274
106	AGCAAAGACCCAATGCAA ⁴	ORF	3809
107	ATGAGGAGCCCATGGAAGA ⁴	ORF	4013
108	CCATGAAGCACCAGCAGGA ⁴	ORF	1151
109	AGCAGGAGCTGGAGAAGCA ⁴	ORF	1211
110	TGCAGCAGCTCAAGAACAA ⁴	ORF	1247
111	CAGCCAAGCTTCTGCAGCA ⁴	ORF	3254
112	TCGCTGAGTTCCAGAGGCA ⁴	ORF	1061
113	AGGTGAAGCAGGAGCCCAT ⁴	ORF	2462
114	GGATCCACCAGCTGAGGAA ⁴	ORF	2594
115	GGGAGGATCCAGAGCATCT ⁴	ORF	2830
116	AGAGGTTGAGCGTGAGCAA ⁴	ORF	3272
117	GGAGAAAGTCATGGAGATC ⁴	ORF	3843
118	ACGAAGAAGCCGAGACGGT ⁴	ORF	3941
119	GAAGAAGCCGAGACGGTCA ⁴	ORF	3943

ES 2 627 500 T3

SEQ ID NO:	secuencia homosenrido de ARNsi (5' a 3')	Región	Posición de partida
120	AGGAGATGCTGGCCATGAA ⁴	ORF	1139
121	AGCGGAAGCTGGAGAGGCA ⁴	ORF	1184
122	AGGAGCAGGAGCTGGAGAA ⁴	ORF	1208
123	AGCTCAAGAACAAGGAGAA ⁴	ORF	1253
124	AAGGAGAAGGGCAAAGAGA ⁴	ORF	1264
125	AATCTGAACCACTGCATTT ⁴	ORF	1360
126	GAAATTACGGTCCAGGCTA ⁴	ORF	1542
127	CAGCAACTGCAGATGAACA ⁴	ORF	2290
128	CTGCAGATGAACAAGATCA ⁴	ORF	2296
129	TTGAGAGCGATGAGGAAGA ⁴	ORF	2480
130	TGGGAGACGCTGAGTACTT ⁴	ORF	3497
131	GCGAGAACGAAGAAGCCGA ⁴	ORF	3935
132	TGGAGAAACACAAGCAGCA ⁴	ORF	2261
133	AAACAAAACCTGGACAGAAA ⁴	3'UTR	4636
134	GGGCAGAAGTTCAGACACA ⁴	3'UTR	6413
135	GGAACAATGCCTTAAGAAA ⁴	3'UTR	4774
136	GGGCATTGATACATATATA ⁴	3'UTR	7638
137	GTAATAAAGACTGCGTTA ⁴	3'UTR	8946
138	GCACTGTGGTTTACAATTA ⁴	3'UTR	8327
139	GAACAATGCCTTAAGAAAA ⁴	3'UTR	4775
140	GGAAAGGGATCCTGATTGA ⁴	3'UTR	5364
141	GAGTTGATTTGGAGGAATT ⁴	3'UTR	8096
142	CTGTTCAACTTGTGGGTTA ⁴	5'UTR	602
143	CGTAATGGTCTGACACAAA ⁴	3'UTR	7483
144	AGAGGGACCTTTAAAGAAA ⁴	3'UTR	4619
145	GCAAGTAGCATGAAGTATT ⁴	3'UTR	5135
146	GGGAAGGACCATTTGTA ⁴	3'UTR	7469
147	CAGGGTAGCTTCTGAAATT ⁴	3'UTR	6482
148	CCTAGGAGCTGTATAAAGA ⁴	3'UTR	5884
149	ATGGATGGCTTGTGAATTT ⁴	3'UTR	5328
150	CCAAATGAGTGCAGATTCT ⁴	3'UTR	6516
151	TTAAGCAGATGATGGGATA ⁴	3'UTR	6842
152	GCACATATGTACCTAATGA ⁴	3'UTR	5524
153	CCAATGTATTCCAAGCTAA ⁴	3'UTR	5201
154	GCAGAACGGTCTTGGGACT ⁴	3'UTR	6595
155	CGTGTATCTTGTGGTGTA ⁴	3'UTR	8930
156	CGACTCATCTTGTAGCTTA ⁴	3'UTR	4508
157	GCAAAATGGATGGCTTGTGA ⁴	3'UTR	5324
158	GGACTTAATTCTAATCTCA ⁴	3'UTR	6896
159	GATGAGAATGACAAACATA ⁴	3'UTR	8527

SEQ ID NO:	secuencia homosenntido de ARNsi (5' a 3')	Región	Posición de partida
160	CAAGGGACGCCGTGGAAGA ⁴	3'UTR	4333
161	GGACAGAGGGACCTTTAAA ⁴	3'UTR	4615
162	GGATCCTGATTGATTGAAA ⁴	3'UTR	5370
163	CAGAATTGTTGCTGTCAGA ⁴	3'UTR	5787
164	GGGCAGGGAGGGTTGCTTA ⁴	3'UTR	5977
165	AAACCAAGTTGTAACGACA ⁴	3'UTR	8636

¹ Descrita por Mottet et al. en *Oncogene* (2009) 28, 243-256
² Descrita por Wilson et al. en *Mol. Biol. Cell* (2008) 19, 4062-4075
³ Descrita en el documento US 2004/0077083 y US 2004/0077084
⁴ ARNsi previstos dirigidos a HDAC4 diseñados en relación con la presente invención mediante la herramienta de diseño de ARNsi (siDESIGN Center) proporcionada por Dharmacon/Thermo Scientific.

5 Los ARNbc adecuados incluyen los que tienen una identidad de secuencia mayor que el 80%, por ejemplo, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o incluso una identidad de secuencia del 100% con SEQ ID NOs: 1 a 165, siempre y cuando tengan propiedades de unión similares y actividad de silenciamiento de HDAC4 como los ARNbc de referencia.

Todavía otros ARNbc específicos de HDAC4, adecuados para uso en diversas realizaciones de la presente invención, se pueden diseñar y sintetizar de acuerdo con métodos conocidos en la técnica. Cualquiera de tales ARNbc aislados debe ser suficientemente complementario a la secuencia de ADNc de HDAC4, con el fin de silenciar el gen de HDAC4.

10 Los precursores de microARN artificial (miARN) son otra clase de ARNs pequeños adecuados para mediar con el ARNi. Normalmente, los precursores de miARN artificiales tienen una longitud de aproximadamente 21-25 nucleótidos y pueden tener 1 a 3 nucleótidos, normalmente 2, sobresalientes en 3'. Los precursores de miARN artificiales que silencian HDAC4 se pueden diseñar y sintetizar por métodos conocidos en la técnica.

15 Los ARNs cortos en forma de horquilla (shARNs) son todavía otra forma de silenciar la HDAC4. Los shARNs consisten en i) una secuencia de nucleótidos corta que varía normalmente de 19 a 29 nucleótidos, obtenida a partir del gen diana; ii) un bucle, que varía normalmente entre 4 a 23 nucleótidos; y iii) una secuencia de nucleótidos corta complementaria de forma inversa a la secuencia diana inicial, que varía normalmente desde 19 a 29 nucleótidos. Los shARNs de silenciamiento de HDAC4 se pueden diseñar y sintetizar por medios y métodos conocidos por una persona experta. Ejemplos no limitantes de shARNs específicos de HDAC4 incluyen los enumerados en la Tabla 2.

20 **Tabla 2. shARNs específicos de HDAC4**

SEQ ID NO:	Secuencia diana de shARN (5' a 3')	Región	Posición de partida
166	GGAGATGCTGGCCATGAAGCA ¹	ORF	1140
167	ACGGCATGACTTTATATTGTAT ²	3'UTR	7732
168	AGACCGGCATGACTTTATATTG ²	3'UTR	7729
169	CGACTCATCTTGTAGCTTATT ³	3'UTR	4508
170	GCCAAAGATGACTTCCCTCTT ³	ORF	2550

¹ Descrita por Chen et al. en *Science* (2009) 323(5911):256-9.
² Descrita por Liu et al. en *Cancer Res.* (2009) 69(6):2252-9.
³ Descrita por Lin et al. en *Nature* (2012) 482(7384):251-5.

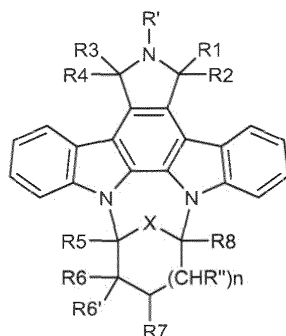
25 El silenciamiento de HDAC4 se puede obtener también mediante una terapia antisentido, en donde oligonucleótidos de ADN o ARN monocatenarios sintéticos, relativamente cortos (normalmente 13-25 nucleótidos) inactivan el gen de HDAC4 mediante la unión a un ARNm correspondiente. Los oligonucleótidos antisentido pueden estar sin modificar o modificados químicamente. En algunas realizaciones, el hidrógeno en la posición 2' de la ribosa se sustituye por un grupo O-alquilo, tal como metilo. En realizaciones adicionales, los oligonucleótidos antisentido pueden contener uno o varios análogos de nucleótidos sintéticos o naturales que incluyen, pero no se limitan a los PNAs.

Además, el silenciamiento de HDAC4 se puede obtener mediante ribozimas que escinden el ARNm de HDAC4. La tecnología de ribozimas está descrita, por ejemplo, por Li et al. en *Adv. Cancer Res* 2007, 96:103-43.

Tal y como se emplea en este documento, la expresión "silenciamiento de HDAC4" se refiere a una reducción completa o parcial de la expresión génica de HDAC4. En algunas realizaciones, la expresión génica de HDAC4 se reduce en al menos el 50%, o al menos el 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% cuando se introduce ARNbc específico de HDAC4, precursor de miARN artificial, shARN, oligonucleótido antisentido, ribozima o cualquier combinación de los mismos en un sujeto humano o animal.

5

Los compuestos químicos adecuados para uso en diversas realizaciones de la presente invención incluyen los enumerados en la Tabla 3 y cualquier estereoisómero, sal, solvato o profármaco de los mismos. En una realización, los compuestos adecuados tienen una fórmula general (I):



10 en donde

R' es H o alquilo;

R'' es H o alcoxi;

R1 y R2 son H o juntos forman oxo;

15 R3 y R4 son independientemente H u OH, o juntos forman oxo:

R5, R6, R6', R7 y R8 se seleccionan independientemente a partir del grupo que consiste en H, alquilo, alcoxi, hidroxilo, hidroxialquilo, alcoxycarbonilo, monoalquilamino y dialquilamino;

X es CH₂ u O; y

n es 0 o 1.

20 Tal y como se emplea en el presente documento, la expresión "que tiene la fórmula" no se pretende que sea limitante y se emplea del mismo modo que como se utiliza normalmente la expresión "que comprende".

El término "alquilo" hace referencia a grupos alquilo C1-6 lineales o ramificados incluidos anteriormente, tales como metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo y similares. En algunas realizaciones, el grupo alquilo es un grupo alquilo C1-3 que contiene de 1 a 3 átomos de carbono.

25 Tal y como se emplea en el presente documento, el término "alcoxi" se refiere a grupos alcoxi C1-6 tanto lineales como ramificados, tales como metoxi, etoxi, propoxi y similares. En algunas realizaciones, el grupo alcoxi es un grupo alcoxi C1-3 que contiene de 1 a 3 átomos de carbono.

Tal y como se emplea en el presente documento, el término "hidroxialquilo" se refiere a cualquiera de los grupos alquilo C1-6 mencionados anteriormente, sustituidos con -OH.

30 Tal y como se usa en el presente documento, el término "alcoxycarbonilo" se refiere a cualquiera de los grupos alcoxi C1-6 emplea anteriormente sustituidos con -COOH.

El término "amino" se refiere a -NH₂.

El término "monoalquilamino" incluye cualquiera de los grupos alquilo mencionados anteriormente sustituidos con un grupo amino.

35 El término "dialquilamino" se refiere a cualquiera de los grupos alquilo mencionados anteriormente sustituidos con dos grupos amino.

Tal y como se emplea en el presente documento, el término "estereoisómero" es un término general para todos los isómeros de moléculas individuales que difieren solo en la orientación de sus átomos en el espacio. Incluye enantiómeros e isómeros de compuestos con más de un centro quiral que no son imágenes especulares uno de otro

(diastereómeros).

Tal y como se emplea en el presente documento, la expresión "centro quiral" o "centro asimétrico" se refiere a un átomo de carbono al que están fijados cuatro grupos diferentes.

5 El término "enantiómero" se refiere a una molécula que no se puede superponer a su imagen especular y por lo tanto es ópticamente activa, en donde el enantiómero hace girar el plano de luz polarizada en una dirección y su imagen especular hace girar el plano de luz polarizada en la dirección opuesta.

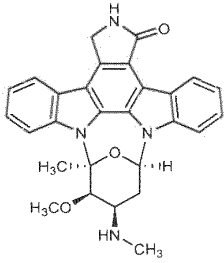
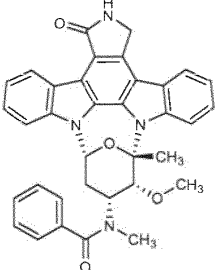
El término "racémico" se refiere a una mezcla de partes iguales de enantiómeros y que es ópticamente inactiva.

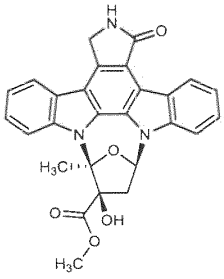
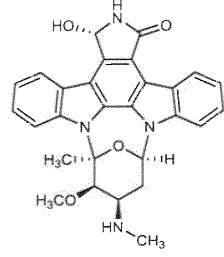
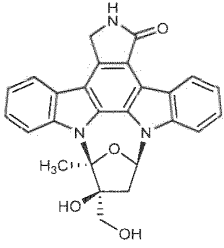
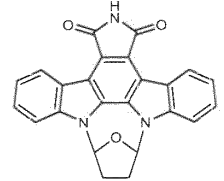
10 Cualquiera de los compuestos descritos se puede convertir en una sal farmacéuticamente aceptable. La sal farmacéuticamente aceptable no está particularmente limitada siempre que no sea tóxica. Ejemplos no limitativos de sales con una base inorgánica u orgánica incluyen sales de metales alcalinos (p. ej., sal de sodio, sal de potasio y similares), sales de metales alcalinotérreos (por ejemplo, sal de calcio, sal de magnesio y similares), sales de amonio, sales de aminas (por ejemplo, sal de trietilamina) y similares. Ejemplos no limitantes de sales de adición de ácido obtenidas a partir de un ácido mineral (por ejemplo ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido yodhídrico, ácido fosfórico, ácido nítrico, ácido sulfúrico y similares) y sales obtenidas a partir de ácidos orgánicos (por ejemplo ácido tartárico, ácido acético, ácido cítrico, ácido málico, ácido láctico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido benzoico, ácido glicólico, ácido glucónico, ácido succínico y similares).

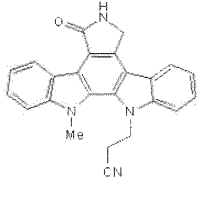
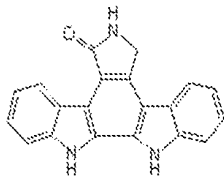
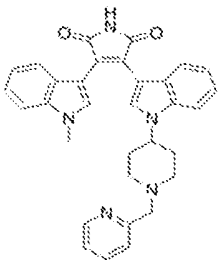
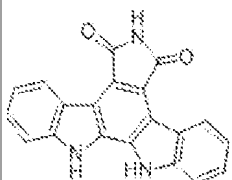
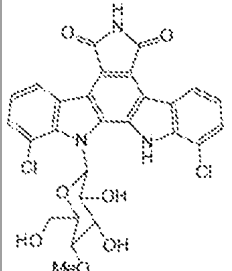
20 Cualquiera de los compuestos descritos se puede emplear como un profármaco para la composición farmacéutica mencionada a continuación. Tal y como se emplea en el presente documento, el término "profármaco" se refiere a cualquier compuesto que se puede convertir en un fármaco activo *in vivo* después de la administración, por ejemplo, al ser metabolizado.

Ejemplos no limitantes de compuestos que tienen la Fórmula (I) incluyen estaurosporina (STS), K252a, UCN-01, CEP-701 y SB-218078 enumerados en la Tabla 3.

25 **Tabla 3. Ejemplos de análogos/derivados de estaurosporina sometidos a ensayo.** Se muestra la cantidad de fragmentación nuclear apoptótica (% de Potenciación) en células T98G de glioblastoma después de la transfección con ARNbc específico de PME-1 y el tratamiento con una concentración indicada de diferentes análogos/derivados de estaurosporina.

Fármacos (sinónimos)	Nombre químico	Número de CAS	Concentración	% de Potenciación (escala)	Estructura
Estaurosporina	[9S-(9 α , 10 β , 11 β , 13 α)]-2,3,10,11,12,13-hexahidro-10-metoxi-9-metil-11-(metilamino)-9,13-epoxi-1H,9H-diindolo [1,2,3-gh:3',2',1'-lm] pirrolo [3,4-j][1,7] benzodiazonin-1-ona	62996-74-1	50 nM	30-40% (+)	
PKC412/Midostaurina / 4'-N-benzoil estaurosporina/CGP 41251	[9S-(9 α , 10 β , 11 β , 13 α)]-N-(2,3,10,11,12,13-hexahidro-10-metoxi-9-metil-1-oxo-9,13-epoxi-1H,9H-diindolo [1,2,3-gh:3',2',1'-lm] pirrolo [3,4-j][1,7] benzo diazonin-11-il)-N-metil benzamida	120685-11-2	5 μ M	50-60% (++)	

Fármacos (sinónimos)	Nombre químico	Número de CAS	Concentración	% de Potenciación (escala)	Estructura
K252a/SF 2370	Éster metílico de ácido (9S, 10R, 12R)-2,3,9,10,11,12-hexahidro-10-hidroxi-9-metil-1-oxo-9,12-epoxi-1H-diindolo [1,2,3-fg:3',2',1'-kl] pirrolo[3,4-i][1,6] benzodiazocina-10-carboxílico	99533-80-9	3,5 µM 5 µM	50-60% (++) 80-90% (++++)	
UCN-01/7-hidroxi-estaurosporina	(9S)-2,3,10,11,12,13-hexahidro-3α-hidroxi-10α-metoxi-9-metil-11α-metil amino-9β,13β-epoxi-1H,9H-diindolo [1,2,3-gh:3',2',1'-lm] pirrolo [3,4-j][1,7] benzo diazonin-1-ona	112953-11-4	1,5 µM 2,5 µM	20-30% (+) 70-80% (+++)	
CEP-701/Lestaurtinib	(9S, 10S, 12R)-2,3,9,10,11,12-hexahidro-10-hidroxi-10-(hidroximetil)-9-metil-9,12-epoxi-1H-diindolo [1,2,3-fg:3',2',1'-kl] pirrolo [3,4-i][1,6] benzo diazocin-1-ona	111358-88-4	3,5 µM 5 µM	40-50% (++) 70-80% (+++)	
SB-218078	9,10,11,12-tetrahydro-9,12-epoxi-1H-diindolo [1,2,3-fg:3',2',1'-kl] pirrolo [3,4-i][1,6] benzodiazocin-1,3(2H)-diona	135897-06-2	5 µM	20-30% (+)	
GÖ-6976	12-(2-cianoetil)-6,7,12,13-tetrahydro-13-metil-5-oxo-5H-indolo[2,3-a]pirrolo[3,4-c]carbazol	136194-77-9	5 µM	10-20% (-)	

Fármacos (sinónimos)	Nombre químico	Número de CAS	Concentración	% de Potenciación (escala)	Estructura
					
K252c/estaurosporina aglicona/ estaurosporinona	6,7,12,13-tetrahidro-5H-indolo[2,3-a]pirrolo[3,4-c]carbazol-5-ona	85753-43-1	5 µM	10-20% (-)	
Enzastaurina/LY-317615	3-(1-metil-1H-indol-3-il)-4-(1-(1-(2-piridinil metil)-4-piperidinil)-1H-indol-3-il)-1H-pirrol-2,5-diona	170364-57-5	5 µM	10-20% (-)	
Arciriaflavina A	12,13-dihidro-5H-indolo [2,3-a] pirrolo[3,4-c] carbazol-5,7(6H)-diona	118458-54-1	5 µM	5-10% (-)	
Rebecamicina	5H-indolo(2,3-a)pirrolo(3,4-c)carbazol-5,7(6h)-diona, 1,11-dicloro-12,13-dihidro-12-(4-o-metil-beta-d-glucopiranosil)	93908-02-2	5 µM	5-10% (-)	

Escala:

(-)	0-20%
(+)	20-40%
(++)	40-60%
(+++)	60-80%

(++++)

80-100%

La administración de los ARNbc de HDAC4 y los compuestos de fórmula (I) puede ser concomitante, simultánea o posterior.

5 La entrega de ARNbc específicos de HDAC4 se puede lograr de dos formas principalmente diferentes: 1) transcripción endógena de una secuencia de ácido nucleico que codifica el oligonucleótido, en donde la secuencia de ácido nucleico se encuentra en una estructura artificial de expresión, o 2) entrega exógena del oligonucleótido.

10 Para la transcripción endógena, los ARNbc específicos de HDAC4 se pueden insertar en sistemas de expresión adecuados usando métodos conocidos en la técnica. Ejemplos no limitantes de tales sistemas de expresión incluyen vectores retrovíricos, vectores adenovíricos, vectores lentivíricos, otros vectores víricos, casetes de expresión y plásmidos, tales como los encapsulados en inmunoliposomas pegilados (PILs), con o sin uno o varios promotores inducibles, conocidos en la técnica. Ambas cadenas de ARNbc se pueden expresar en una sola estructura artificial de expresión a partir de los mismos o de distintos promotores, o las cadenas se pueden expresar en estructuras artificiales de expresión distintas.

15 Los sistemas de expresión mencionados anteriormente también se pueden usar para la entrega de precursores de miARN artificiales y shARNs que silencian HDAC4.

20 Normalmente, las estructuras artificiales de expresión se formulan en composiciones farmacéuticas antes de la administración a un sujeto humano o animal (por ejemplo, un sujeto canino). La administración se puede realizar por cualquier método adecuado, conocido en la técnica, incluyendo la administración sistémica y local. La formulación depende de la vía de administración prevista como es sabido por una persona experta en la técnica. A modo de ejemplo, la estructura artificial de expresión se puede administrar en un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, o puede estar embebida en una composición de liberación lenta adecuada. En algunos casos, la composición farmacéutica puede contener una o varias células que producen la estructura artificial de expresión. También las bacterias se pueden utilizar para la administración de ARNi. Por ejemplo, *Escherichia coli* modificada genéticamente puede entrar en las células de mamífero después de la administración *in vivo* y transferir los shARNs.

25 Un enfoque relacionado es el uso de minicélulas obtenidas, por ejemplo, a partir de *Salmonella enterica*.

30 Para la administración exógena, las moléculas de ARNbc normalmente forman complejos con liposomas o vehículos basados en lípidos, conjugados de colesterol o polietilén-imina (PEI). Un nuevo enfoque prometedor es formar complejos de ARNbc con partículas lipídicas de ácidos nucleicos estables (SNALPs). Las vías de administración adecuadas para la administración exógena, con o sin dicha formación de complejo, incluyen, pero no se limitan a, administración parenteral (por ejemplo, inyección intravenosa), administración entérica (por ejemplo, oral), administración local, administración tópica (por ejemplo, por vía dérmica o transdérmica) como es conocido por una persona experta en la técnica. Ya que la extirpación quirúrgica de un tumor es generalmente la intervención clínica primaria, los ARNbc se pueden administrar directamente en la cavidad del tumor resecado.

35 Los agentes quimioterapéuticos de fórmula (I) se pueden administrar a un sujeto humano o animal a través de cualquier vía adecuada, conocida en la técnica incluyendo, pero no limitadas a, las mencionadas para la administración de ARNbc específicos de HDAC4.

40 En la presente terapia de combinación, las moléculas de ARNbc y los compuestos de fórmula (I) se pueden formular en la misma composición farmacéutica o en una distinta. Cuando se utilizan composiciones farmacéuticas distintas, la administración puede ser concomitante, simultánea o posterior. La formulación y/o la vía de administración para las moléculas de ARNbc y los compuestos de fórmula (I) se puede seleccionar independientemente una de otra. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica puede comprender uno o varios ARNbc silenciadores de HDAC4 diferentes y/o uno o varios agentes quimioterapéuticos de fórmula (I).

45 Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar en cualquier vehículo farmacológico apropiado, adecuado para la administración. Se pueden administrar en cualquier forma que tenga un efecto profiláctico, paliativo, preventivo o curativo de enfermedades hiperproliferativas, tales como cáncer, en pacientes humanos o animales.

50 Para los fines de una administración parenteral o tópica, los ARNbc y/o los compuestos de fórmula (I) se pueden formular, por ejemplo, como soluciones, suspensiones o emulsiones. Las formulaciones pueden comprender disolventes acuosos o no acuosos, codisolventes, agentes solubilizantes, dispersantes o humectantes, agentes de suspensión y/o agentes de viscosidad, según sea necesario. Ejemplos no limitantes de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceite vegetal, aceite de pescado y ésteres orgánicos inyectables. Los vehículos acuosos incluyen, por ejemplo, agua, soluciones de agua-alcohol, incluyendo solución salina y vehículos parenterales mediales tamponados que incluyen solución de cloruro sódico, solución de dextrosa de Ringer, solución de dextrosa más cloruro de sodio, solución de Ringer que contiene lactosa o aceites fijos. Ejemplos no limitantes de vehículos intravenosos incluyen reponedores de fluidos y nutrientes, reponedores de electrolitos, tales como los basados en dextrosa de Ringer y similares. Las composiciones acuosas pueden comprender agentes tamponadores adecuados, tales como tampones fosfatos de sodio y potasio, citrato, acetato, carbonato o glicina, en función del

55

intervalo de pH deseado. El uso de cloruro de sodio como un ajustador de la tonicidad es también útil. Las composiciones también pueden incluir otros excipientes, tales como agentes estabilizantes o conservantes. Los excipientes estabilizadores útiles incluyen tensioactivos (polisorbato 20 y 80, poloxámero 407), polímeros (polietilenglicoles, povidonas), hidratos de carbono (sacarosa, manitol, glucosa, lactosa), alcoholes (sorbitol, glicerol propilenglicol, etilenglicol), proteínas adecuadas (albúmina), aminoácidos adecuados (glicina, ácido glutámico), ácidos grasos (etanolamina), antioxidantes (ácido ascórbico, cisteína, etc.), agentes quelantes (sales de EDTA, histidina, ácido aspártico) o iones metálicos (Ca, Ni, Mg, Mn). Entre los agentes conservantes útiles se encuentra alcohol bencílico, clorobutanol, cloruro de benzalconio y, posiblemente, los parabenos.

Las formas de dosificación sólidas para administración oral incluyen, pero no se limitan a, cápsulas, comprimidos, píldoras, trociscos, pastillas, polvos y gránulos. En tales formas de dosificación sólidas, los ARNbc y/o los compuestos de fórmula (I) se pueden mezclar por adición con al menos un diluyente inerte tal como sacarosa, lactosa o almidón. Tales formas de dosificación también pueden comprender, como es práctica normal, sustancias adyuvantes farmacéuticas, por ejemplo, agentes lubricantes de estearato o agentes aromatizantes. Las preparaciones orales sólidas también se pueden preparar con recubrimientos entéricos o de otro tipo que modulan la liberación de los ingredientes activos.

Ejemplos no limitantes de formas de dosificación líquidas para administración oral incluyen emulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables que contienen diluyentes inertes no tóxicos, utilizados comúnmente en la técnica, tales como agua y alcohol. Tales composiciones también pueden comprender adyuvantes, tales como agentes humectantes, tampones, agentes emulsionantes, de suspensión, edulcorantes y aromatizantes.

La composición farmacéutica se puede proporcionar en una forma concentrada o en forma de un polvo para ser reconstituido según sea la demanda. En caso de liofilización, se prefieren ciertos crioprotectores, incluyendo polímeros (povidonas, polietilenglicol, dextrano), azúcares (sacarosa, glucosa, lactosa), aminoácidos (glicina, arginina, ácido glutámico) y albúmina. Si en el envase se añade una solución para reconstitución, puede consistir por ejemplo, en agua estéril para inyección o solución de cloruro sódico o soluciones de dextrosa o glucosa.

Los medios y los métodos para formular las presentes preparaciones farmacéuticas son conocidos por los expertos en la técnica y se pueden preparar de una manera que es en sí conocida, por ejemplo, por medio de procesos convencionales de mezcla, granulación, disolución, liofilización o similares.

La presente terapia de combinación se puede utilizar para tratar cánceres de cerebro humano o animal, incluyendo, pero no limitados a, gliomas, astrocitomas y glioblastomas.

Tal como se utiliza en este documento, el término "tratamiento" o "tratar" se refiere no solo a completar la curación de una enfermedad, sino también a la prevención, el alivio y la mejora de una enfermedad o los síntomas relacionados con la misma.

Por una "cantidad eficaz" de una combinación de ARNbc y compuestos de fórmula (I) se entiende una cantidad en la que los efectos perjudiciales de un tumor, como mínimo, se mejoran. Las cantidades y los regímenes para la administración de la presente terapia de combinación pueden ser determinados fácilmente por aquellos con una habilidad ordinaria en la técnica clínica del tratamiento de trastornos relacionados con el cáncer. Generalmente, la dosificación de la presente terapia de combinación depende de consideraciones tales como: la edad, el sexo y la salud general del paciente que se va a tratar; el tipo de tratamiento concurrente, si lo hay; la frecuencia del tratamiento y la naturaleza del efecto deseado; la magnitud del daño tisular; la duración de los síntomas; y otras variables que ajustará cada médico. Una dosis deseada se puede administrar en una o varias aplicaciones para obtener los resultados deseados. Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con las presentes realizaciones se pueden proporcionar en formas de dosificación unitarias.

En una realización, los ARNbc se pueden administrar en una cantidad eficaz dentro del intervalo de dosificación de aproximadamente 0,01 µg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, o aproximadamente 1,0 µg/kg a aproximadamente 10 µg/kg. Los ARNbc se pueden administrar en una sola dosis diaria, o la dosificación diaria total se puede administrar en dosis divididas, por ejemplo, de dos, tres o cuatro veces al día.

En una realización, los compuestos de fórmula (I) se pueden administrar en una cantidad eficaz dentro del intervalo de dosificación de aproximadamente 0,1 µg/kg a aproximadamente 300 mg/kg, o aproximadamente 1,0 µg/kg a aproximadamente 10 mg/kg. Los compuestos de fórmula (I) se pueden administrar en una sola dosis diaria, o la dosificación diaria total se puede administrar en dosis divididas, por ejemplo, de dos, tres o cuatro veces al día. La pauta de dosificación se puede seleccionar independientemente de la pauta de dosificación de los ARNbc.

Ejemplos

Materiales y métodos

Cultivo de células eucariotas y transfecciones de ARN de interferencia pequeño (ARNsi): Para este estudio, hemos utilizado la línea celular de glioblastoma humano T98G. Las células se cultivaron en medio MEM de Eagle

(Sigma-Aldrich), complementado con 10% de FCS termoinactivado y penicilina (100 unidades/ml)-estreptomina (100 Ag/ml) en una atmósfera humidificada de 5% de CO₂ a 37°C. Las transfecciones de ARN de interferencia pequeño (ARNsi o ARNbc) se realizaron con el reactivo Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. Las transfecciones se realizaron usando el protocolo de transfección directa. Se utilizaron las siguientes secuencias de ARNsi: desordenada (5'-GUA ACA AUG AGA GCA CGG C-3'; SEQ ID NO: 171), HDAC4 (5'-UCA UAC ACG AGG CCU GUC GUU-3'; SEQ ID NO: 2), HDAC4.2 (5'-AAA UUA CGG UCC AGG CUA AUU-3'; SEQ ID NO: 5).

Inhibidores químicos y fármacos: PKC412 se adquirió en Cayman Chemicals; GÖ 6976 en Calbiochem. Estaurosporina (STS), K252a, CEP-701, UCN-01 se obtuvieron de Sigma-Aldrich; Arciriaflavina-A, K252c y SB218078 de Tocris Bioscience; Rebecamicina de Enzo Life Sciences y Enzastaurina de LC laboratories. Todos los productos químicos se reconstituyeron como soluciones madre 5 o 10 mM en DMSO y se mantuvieron congelados a -20°C.

Transferencia Western y anticuerpos: Células cultivadas y tratadas se lisaron en tampón de muestra 2X SDS/tampón Laemmli, se hirvieron y se determinaron por SDS-PAGE, usando geles de acrilamida al 10%. Las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF. Las membranas se bloquearon y se incubaron con una dilución requerida de dilución de anticuerpo primario y una dilución 1:5000 de anticuerpo secundario en 5% de leche-PBS-Tween 20 durante el tiempo requerido y se revelaron mediante quimioluminiscencia incrementada (ECL). Anticuerpos anti-HDAC4 (clon H-92) (dilución 1:1000) y anti-actina (clon AC-40) (dilución 1:10.000) se adquirieron en Santa Cruz Biotechnology y Sigma-Aldrich, respectivamente. El análisis cuantitativo de las películas se realizó utilizando un analizador de imágenes MCID 5+.

Ensayo de la apoptosis mediante estimación de la fracción sub-G0/G1: El porcentaje de la fracción sub-G0/G1 que contenía núcleos fragmentados teñidos con yoduro de propidio (PI), se tomó como una medida de las células apoptóticas. Se extendieron $3,5-4 \times 10^4$ células en placas de 24 pocillos, se transfectaron con ARNsi durante 48 h y después se trataron con la concentración indicada de compuestos del ensayo en medio de nuevo aporte. Después de 24 h de tratamiento, tanto las células flotantes como las adherentes se recogieron por centrifugación. Los sedimentos celulares se resuspendieron en 400 µl de tampón PI hipotónico, que contenía tricitrato sódico 40 mM (Merck), 0,3% de Triton X-100 (Sigma-Aldrich) y 50 µg/ml de yoduro de propidio (Sigma-Aldrich) en PBS y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos en la oscuridad. Se realizó el análisis por citometría de flujo de los núcleos teñidos con PI y se analizaron los datos recogidos, utilizando un citómetro de flujo de FACScan y el programa informático (Becton Dickinson), respectivamente.

Ensayo de formación de colonias: Las células se extendieron en placas con una densidad muy baja ($4-6 \times 10^3$) en placas de 6 pocillos y se dejaron crecer durante aproximadamente 7 días hasta que formaron pequeñas colonias. Estas células se transfectaron a continuación con ARNsi desordenado o de HDAC4 usando el reactivo Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. Después de 48 h, se administraron los tratamientos con la concentración indicada de fármacos químicos durante otras 48 h. Las colonias celulares se lavaron con PBS, se fijaron con formaldehído al 3,7% y se tiñeron con solución de cristal violeta al 0,2% (preparada en 10% de etanol) durante 15 minutos a temperatura ambiente cada una. El exceso de tinción se eliminó mediante lavados repetidos con PBS. Las placas se secaron y se tomaron imágenes con el escáner Epson perfection V700 y se analizaron con ImageJ.

Análisis estadístico: El nivel de significación de las diferencias entre los valores medios de dos grupos de datos se evaluó utilizando la prueba t de Student no apareada, suponiendo varianzas iguales entre las medias de la muestra. Todos los valores de p eran de dos colas. Los parámetros con un valor de probabilidad $p < 0,05$ se representaron como estadísticamente significativos y $p < 0,001$ como diferencia altamente significativa.

Resultados

Con el fin de estudiar el efecto de la inhibición de HDAC4 sobre la supervivencia de las células de cáncer y la sensibilidad frente a diferentes fármacos químicos, en primer lugar, las células T98G de glioblastoma humano se transfectaron transitoriamente con ARNsi desordenado (ARNsi no dirigido representado en SEQ ID NO: 171) o ARNsi específico de HDAC4 (representado en SEQ ID NO: 2) durante 72 h. La regulación a la baja eficaz mediante el ARNsi específico de HDAC4 se mostró mediante inmunotransferencia (Figura 1A).

Las células T98G que contenían niveles normales o reducidos de HDAC4, es decir, células transfectadas con ARNsi desordenado o ARNsi de HDAC4, respectivamente, se trataron con estaurosporina (STS) y sus derivados relacionados estructuralmente que incluían PKC413, K252a, UCN-01, CEP-701, SB-218078, GÖ-6976, Enzastaurina, K252c, Arciriaflavina A y Rebecamicina. Los tratamientos se proporcionaron 48 h después de la transfección. Después de 24 h de tratamiento con el fármaco, las células se lisaron en tampón hipotónico y sus núcleos se tiñeron con yoduro de propidio. Se analizaron los lisados de células teñidas para estimar la fracción sub-G0/G1 de núcleos fragmentados mediante citometría de flujo (FACS) (Figura 1B). La condensación y la fragmentación del núcleo es una característica bioquímica clave de la apoptosis y el análisis de sub-G0/G1 se ha utilizado ampliamente para la detección de la apoptosis (Afanas'ev et al., FEBS Lett, 1986, 194(2):347-50; Prospero et al., Cytometry, 1991, 12(4):323-329). Este escrutinio identificó cinco fármacos potentes que favorecían la muerte

celular fomentaban una apoptosis significativamente mayor de las células T98G de glioblastoma cuando se utilizaban en combinación con ARNsi de HDAC4.

5 La eficacia de los fármacos potentes seleccionados se analizó después mediante el ensayo de formación de colonias en líneas celulares de glioblastoma T98G no tumorígenas y U87MG-luciferasa altamente tumorígenas (células U87MG que expresaban luciferasa). Para este experimento, las células se cultivaron en placas de 6 pocillos con baja densidad hasta la formación de pequeñas colonias que después se transfectaron con ARNsi desordenado o específico de HDAC4 durante 48 h, seguido de tratamiento con STS, PKC412, K252a, UCN-01 y CEP-701 a las concentraciones indicadas, durante otras 48 h. Las colonias se fijaron con formaldehído, se tiñeron con cristal violeta y las imágenes se analizaron con Image J. En ambas líneas celulares, tanto el tratamiento por agotamiento de HDAC4 como con fármacos químicos por sí solo, reducía moderadamente la capacidad de formación de colonias, mientras que la combinación de estos dos tratamientos daba como resultado una reducción muy elevada del crecimiento de colonias (Figuras 2A-2C y 3A-3C). Se encontró que el tratamiento con el derivado CEP-701 de STS era menos eficaz en las células U87MG (Figura 3C), lo que sugiere la posibilidad de un mayor grado de resistencia a los fármacos en estas células, en comparación con las células T98G (Figura 2C). Más importante aún, el derivado K252a era muy potente en la reducción del crecimiento de colonias, en ambas líneas celulares agotadas específicamente para HDAC4.

20 Con el fin de excluir los posibles efectos inespecíficos de ARNsi, también sometimos a ensayo otro ARNsi específico de HDAC4 (HDAC4.2; SEQ ID: 5) en las células T98G. También este ARNsi inhibía los niveles de expresión de la proteína HDAC4 como se muestra por la transferencia Western (Figura 4A) y aumentaba el nivel de apoptosis después del tratamiento con STS (Figura 4B). Estos resultados fueron corroborados por una reducción en el crecimiento de colonias de células transfectadas con ARNsi de HDAC4.2 tratadas con STS y sus derivados eficaces PKC412 y K252a (Figura 4C).

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> University of Turku	
5	<120> Terapia de combinación III	
	<130> 2120220PC	
	<160> 171	
10	<170> PatentIn versión 3.5	
	<210> 1	
15	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
20	<223> ARNsi	
	<400> 1	
	cagugaccac uggcccguct t	21
	<210> 2	
25	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
30	<223> ARNsi	
	<400> 2	
	ucauacacga ggccugucgu u	21
35	<210> 3	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
40	<220>	
	<223> ARNsi	
	<400> 3	
45	ucuuuggcgu cguacauucu u	21
	<210> 4	
	<211> 21	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> ARNsi	
	<400> 4	
55	cgacaggccu cguguaugau u	21
	<210> 5	
	<211> 21	
	<212> ADN	
60	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> ARNsi	
65	<400> 5	

aaauuacggu ccaggcuaau u 21
 <210> 6
 <211> 20
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> ARNsi
 10 <400> 6
 tcatgagcca ggtaaccac 20
 <210> 7
 <211> 20
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> ARNsi
 20 <400> 7
 catacaagta ccgggacggt 20
 <210> 8
 <211> 20
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> ARNsi
 30 <400> 8
 tcattgctag caatgtccac 20
 35 <210> 9
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40 <220>
 <223> ARNsi
 <400> 9
 45 cagaaagtcc atctggatgg 20
 <210> 10
 <211> 20
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> ARNsi
 55 <400> 10
 ctggctcgg ccagaaagtc 20
 <210> 11
 <211> 20
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> ARNsi
 65 <400> 11

ES 2 627 500 T3

tgggcatgtg gttcacgcgg 20
 <210> 12
 <211> 20
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> ARNsi
 10
 <400> 12
 caccgtgctg ggcattggt 20
 <210> 13
 <211> 20
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> ARNsi
 20
 <400> 13
 gtccaggcgc aggtccatgg 20
 25 <210> 14
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> ARNsi
 <400> 14
 35 agtgagaact ggtgtccag 20
 <210> 15
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40 <220>
 <223> ARNsi
 <400> 15
 45 cggctctgcc acaggcagtg 20
 <210> 16
 <211> 20
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> ARNsi
 55 <400> 16
 tcccgcaggg cggctctgc 20
 <210> 17
 <211> 20
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> ARNsi
 65 <400> 17

tgctggtgct tcatggccag 20
 <210> 18
 <211> 20
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> ARNsi
 10
 <400> 18
 tccttgttct tgagctgctg 20
 <210> 19
 <211> 20
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> ARNsi
 20
 <400> 19
 ccttctcctt gttctgagc 20
 25 <210> 20
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> ARNsi
 <400> 20
 acttcatctt cacttctgtg 20
 35 <210> 21
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40 <220>
 <223> ARNsi
 <400> 21
 45 ctctctttta ttgaggacaa 20
 <210> 22
 <211> 20
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> ARNsi
 55 <400> 22
 gctggaatg cagtggttca 20
 <210> 23
 <211> 20
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> ARNsi
 65 <400> 23

gagggtcgct ggaaatgcag 20

5 <210> 24
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> ARNsi

aactctggtc aaggaactg 20

15 <210> 25
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> ARNsi

cctaagaggg aagtcattt 20

25 <210> 26
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<223> ARNsi

gctttagcct ggaccgtaat 20

35 <210> 27
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

40 <220>
<223> ARNsi

45 tttctgcttt agcctggacc 20

50 <210> 28
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

55 <220>
<223> ARNsi

ctgctccgtc tttcgccac 20

60 <210> 29
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

65 <220>
<223> ARNsi

<400> 29

ES 2 627 500 T3

5 gtgaccactg gcccgctttt 20
 <210> 30
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 10 <220>
 <223> ARNsi
 <400> 30
 agcagtgacc actggcccgt 20

 15 <210> 31
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 20 <220>
 <223> ARNsi
 <400> 31
 cgcgagtgct gtgacatcca 20

 25 <210> 32
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 30 <220>
 <223> ARNsi
 <400> 32
 aagtgagcgc gccgagcctt 20

 35 <210> 33
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 40 <220>
 <223> ARNsi
 <400> 33
 ggcccagcgt gatgtgggc 20

 45 <210> 34
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 50 <220>
 <223> ARNsi
 <400> 34
 caggcccagc gtgatgttg 20

 55 <210> 35
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 60 <220>
 <223> ARNsi
 <400> 35

 65 <220>
 <223> ARNsi
 <400> 35

ES 2 627 500 T3

gtcccgtcc aaggcgagg 20

5 <210> 36
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> ARNsi

tccagtaaga ccatgtgctg 20

15 <210> 37
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> ARNsi

gctcccaggc ctgtgacgag 20

25 <210> 38
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<223> ARNsi

aaccaaggac tgtgctgga 20

35 <210> 39
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

40 <220>
<223> ARNsi

tctgcaccaa ccaaggactg 20

45 <210> 40
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

50 <220>
<223> ARNsi

gtagggctcg tccagcagag 20

55 <210> 41
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

60 <220>
<223> ARNsi

65 <400> 41

cctcatcgct ctcaatgggc 20
 <210> 42
 <211> 21
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> ARNsi
 10 <400> 42
 tctgaagagc agctcctgct s 21
 <210> 43
 <211> 20
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> ARNsi
 20 <400> 43
 ggatgccggc ggcctccatg 20
 25 <210> 44
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> ARNsi
 <400> 44
 35 atacacgagg cctgtcgtga 20
 <210> 45
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40 <220>
 <223> ARNsi
 <400> 45
 45 actcccgcag gtgcactggt 20
 <210> 46
 <211> 20
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> ARNsi
 55 <400> 46
 tgctgtact cccgcaggtg 20
 <210> 47
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> ARNsi
 65 <400> 47

ES 2 627 500 T3

gctgctgcta ctcccgagg 20
 <210> 48
 <211> 20
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> ARNsi
 10
 <400> 48
 tgcactcgca ttgccccgg 20
 <210> 49
 <211> 20
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> ARNsi
 20
 <400> 49
 tgtgggcttc cgagtgacc 20
 25 <210> 50
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> ARNsi
 <400> 50
 35 ggttcgtgcc atacaggagg 20
 <210> 51
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40 <220>
 <223> ARNsi
 <400> 51
 45 gccacagcc aggcgggctg 20
 <210> 52
 <211> 20
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> ARNsi
 55 <400> 52
 gaccagctct accacgcagc 20
 <210> 53
 <211> 20
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> ARNsi
 65 <400> 53

ES 2 627 500 T3

5 aggtcgcgtg tagaaagcct 20
 <210> 54
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> ARNsi
 10 <400> 54
 tggagggaca tgtacaggac 20
 <210> 55
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> ARNsi
 20 <400> 55
 tagcgggtgga gggacatgta 20
 <210> 56
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> ARNsi
 30 <400> 56
 gctgcctggg aagaagtcc 20
 <210> 57
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> ARNsi
 40 <400> 57
 aagcctgatg acaccagcac 20
 <210> 58
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 45 <220>
 <223> ARNsi
 50 <400> 58
 tggcggagag gttgtagccc 20
 <210> 59
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55 <220>
 <223> ARNsi
 60 <400> 59

ES 2 627 500 T3

tacccgaagc atctggcgga 20

5 <210> 60
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> ARNsi

gcgtttgcat tgggtcttg 20

15 <400> 60
 <210> 61
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> ARNsi

ctccatggaa cggacagcgt 20

25 <400> 61
 <210> 62
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> ARNsi

tctgagcctc gatcagagaa 20

35 <400> 62
 <210> 63
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> ARNsi

tcttccatgg gctcctcatc 20

45 <400> 63
 <210> 64
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <223> ARNsi

cttcgagga gtgctacagg 20

55 <400> 64
 <210> 65
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> ARNsi

65 <400> 65

ttcataaga atcaagtaag 20

5 <210> 66
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> ARNsi

<400> 66
 gcaatctgca ttcatttat 20

15 <210> 67
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> ARNsi

<400> 67
 acaggctcca aaatccagg 19

25 <210> 68
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> ARNsi

<400> 68
 gctgtcctgg tcaggcaatc 20

35 <210> 69
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> ARNsi

<400> 69
 aagagtaaag actggctgtc 20

45 <210> 70
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <223> ARNsi

<400> 70
 actggtggct tcatgtgctg 20

55 <210> 71
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> ARNsi

65 <400> 71

gtctgaactt ctgcccccaa 20
 <210> 72
 <211> 20
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> ARNsi
 10
 <400> 72
 gagcacggtg tgtctgaact 20
 <210> 73
 <211> 20
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 20 <223> ARNsi
 <400> 73
 cactcatttg gtcaaaagtt 20
 25 <210> 74
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> ARNsi
 <400> 74
 35 caaaccactg tctcagagct 20
 <210> 75
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40 <220>
 <223> ARNsi
 <400> 75
 45 atgaggccaa ggaggccaga 20
 <210> 76
 <211> 20
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> ARNsi
 55 <400> 76
 agcagtccat gttatccat 20
 <210> 77
 <211> 20
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> ARNsi
 65 <400> 77

gcgtctccat ttgaatgaga 20

5 <210> 78
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> ARNsi

cctgccaggc cttgcagag 20

15 <400> 78
 <210> 79
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> ARNsi

25 <400> 79
 ggagaagagc cgagtgtgtc 20

30 <210> 80
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> ARNsi

40 <400> 80
 aagtccattg ctagtgctgc 20

45 <210> 81
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <223> ARNsi

55 <400> 81
 gaatgttctg atcaaaaaga 20

60 <210> 82
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

65 <220>
 <223> ARNsi

<400> 82
 gcccataaaa cacgtgggcc 20

<210> 83
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> ARNsi

<400> 83

aaagtgaggc cgagctaaga 20
 <210> 84
 <211> 19
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> ARNsi
 10 <400> 84
 gcacagaagt gaagatgaa 19
 <210> 85
 <211> 19
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> ARNsi
 20 <400> 85
 cagcagaggt tgagcgtga 19
 <210> 86
 <211> 19
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> ARNsi
 30 <400> 86
 ggagaagggc aaagagagt 19
 <210> 87
 <211> 19
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> ARNsi
 40 <400> 87
 ggtccaggct aaagcagaa 19
 <210> 88
 <211> 19
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> ARNsi
 55 <400> 88
 gcgatgagga agaggcaga 19
 <210> 89
 <211> 19
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> ARNsi
 65 <400> 89

ES 2 627 500 T3

cgacaggcct cgtgtatga 19
 <210> 90
 <211> 19
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> ARNsi
 10
 <400> 90
 cagcagatcc agaggcaga 19
 <210> 91
 <211> 19
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> ARNsi
 20
 <400> 91
 tggagaaagt catggagat 19
 25 <210> 92
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> ARNsi
 <400> 92
 gcagaaagtg gccgaaaga 19
 35 <210> 93
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40 <220>
 <223> ARNsi
 <400> 93
 45 gggacgtgca ccatggaaa 19
 <210> 94
 <211> 19
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> ARNsi
 55 <400> 94
 cattgagagc gatgaggaa 19
 <210> 95
 <211> 19
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> ARNsi
 65 <400> 95

5 tggtagagct ggtcttcaa 19
 <210> 96
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 10 <220>
 <223> ARNsi
 <400> 96
 gcaaagaccc aatgcaaac 19

 15 <210> 97
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 20 <220>
 <223> ARNsi
 <400> 97
 gaacaaggag aagggcaaa 19

 25 <210> 98
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 30 <220>
 <223> ARNsi
 <400> 98
 gaagatgaag ttacaagaa 19

 35 <210> 99
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 40 <220>
 <223> ARNsi
 <400> 99
 gggaatgtac gacgcaaaa 19

 45 <210> 100
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 50 <220>
 <223> ARNsi
 <400> 100
 cagaagtgaa gatgaagtt 19

 55 <210> 101
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 60 <220>
 <223> ARNsi
 <400> 101

 65 <210> 101

aagtgaagat gaagttaca 19
 <210> 102
 <211> 19
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> ARNsi
 10 <400> 102
 ccgggaggat ccagagcat 19
 <210> 103
 <211> 19
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> ARNsi
 20 <400> 103
 ccatatggaa cgaggtgca 19
 25 <210> 104
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> ARNsi
 <400> 104
 ccacagggga gctgaagaa 19
 35 <210> 105
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40 <220>
 <223> ARNsi
 <400> 105
 45 aggttgagcg tgagcaaga 19
 <210> 106
 <211> 19
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> ARNsi
 55 <400> 106
 agcaaagacc caatgcaaa 19
 <210> 107
 <211> 19
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> ARNsi
 65 <400> 107

atgaggagcc catggaaga 19
 <210> 108
 <211> 19
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> ARNsi
 10 <400> 108
 ccatgaagca ccagcagga 19
 <210> 109
 15 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 20 <223> ARNsi
 <400> 109
 agcaggagct ggagaagca 19
 25 <210> 110
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> ARNsi
 <400> 110
 35 tgcagcagct caagaaca 19
 <210> 111
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40 <220>
 <223> ARNsi
 <400> 111
 45 cagccaagct tctgcagca 19
 <210> 112
 <211> 19
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> ARNsi
 55 <400> 112
 tcgctgagtt ccagaggca 19
 <210> 113
 <211> 19
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> ARNsi
 65 <400> 113

aggtgaagca ggagcccat 19
 <210> 114
 <211> 19
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> ARNsi
 10 <400> 114
 ggatccacca gctgaggaa 19
 <210> 115
 <211> 19
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> ARNsi
 20 <400> 115
 gggaggatcc agagcatct 19
 25 <210> 116
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> ARNsi
 <400> 116
 35 agaggttgag cgtgagcaa 19
 <210> 117
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40 <220>
 <223> ARNsi
 <400> 117
 45 ggagaaagtc atggagatc 19
 <210> 118
 <211> 19
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> ARNsi
 55 <400> 118
 acgaagaagc cgagacggt 19
 <210> 119
 <211> 19
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> ARNsi
 65 <400> 119

gaagaagccg agacggtca 19

5 <210> 120
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> ARNsi

aggagatgct ggccatgaa 19

15 <400> 120
<210> 121
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> ARNsi

agcgggaagct ggagaggca 19

25 <400> 121
<210> 122
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<223> ARNsi

aggagcagga gctggagaa 19

35 <400> 122
<210> 123
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

40 <220>
<223> ARNsi

agctcaagaa caaggagaa 19

45 <400> 123
<210> 124
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

50 <220>
<223> ARNsi

aaggagaagg gcaaagaga 19

55 <400> 124
<210> 125
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

60 <220>
<223> ARNsi

65 <400> 125

ES 2 627 500 T3

aatctgaacc actgcattt 19
 <210> 126
 <211> 19
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> ARNsi
 10 <400> 126
 gaaattacgg tccaggcta 19
 <210> 127
 <211> 19
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> ARNsi
 20 <400> 127
 cagcaactgc agatgaaca 19
 <210> 128
 <211> 19
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> ARNsi
 30 <400> 128
 ctgcagatga acaagatca 19
 <210> 129
 <211> 19
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> ARNsi
 40 <400> 129
 ttgagagcga tgaggaaga 19
 <210> 130
 <211> 19
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> ARNsi
 55 <400> 130
 tgggagacgc tgagtactt 19
 <210> 131
 <211> 19
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> ARNsi
 65 <400> 131

ES 2 627 500 T3

gcgagaacga agaagccga 19

5 <210> 132
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> ARNsi

15 <400> 132
tggagaaaca caagcagca 19

20 <210> 133
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

25 <220>
<223> ARNsi

30 <400> 133
aaacaaaact ggacagaaa 19

35 <210> 134
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

40 <220>
<223> ARNsi

45 <400> 134
gggcagaagt tcagacaca 19

50 <210> 135
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

55 <220>
<223> ARNsi

60 <400> 135
ggaacaatgc ctaaagaaa 19

65 <210> 136
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

70 <220>
<223> ARNsi

75 <400> 136
gggcattgat acatatata 19

80 <210> 137
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

85 <220>
<223> ARNsi

90 <400> 137

gtaaataaag actgcgta 19
 <210> 138
 <211> 19
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> ARNsi
 10
 <400> 138
 gcactgtggt ttacaatta 19
 <210> 139
 <211> 19
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> ARNsi
 20
 <400> 139
 gaacaatgcc ttaagaaaa 19
 25 <210> 140
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> ARNsi
 <400> 140
 35 ggaaagggat cctgattga 19
 <210> 141
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40 <220>
 <223> ARNsi
 <400> 141
 45 gagttgattt ggaggaatt 19
 <210> 142
 <211> 19
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> ARNsi
 55 <400> 142
 ctgttcaact tgtgggta 19
 <210> 143
 <211> 19
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> ARNsi
 65 <400> 143

cgtaatggtc tgacacaaa 19
 <210> 144
 <211> 19
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> ARNsi
 10 <400> 144
 agagggacct taaagaaa 19
 <210> 145
 15 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 20 <223> ARNsi
 <400> 145
 gcaagtagca tgaagtatt 19
 25 <210> 146
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> ARNsi
 <400> 146
 35 gggaaggacc atttcgtaa 19
 <210> 147
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40 <220>
 <223> ARNsi
 <400> 147
 45 cagggtagct tctgaaatt 19
 <210> 148
 <211> 19
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> ARNsi
 55 <400> 148
 cctaggagct gtataaaga 19
 <210> 149
 <211> 19
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> ARNsi
 65 <400> 149

atggatggct tgtgaattt 19
 <210> 150
 <211> 19
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> ARNsi
 10
 <400> 150
 ccaaatgagt gcagattct 19
 <210> 151
 <211> 19
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> ARNsi
 20
 <400> 151
 ttaagcagat gatgggata 19
 25 <210> 152
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> ARNsi
 <400> 152
 35 gcacatatgt acctaatga 19
 <210> 153
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40 <220>
 <223> ARNsi
 <400> 153
 45 ccaatgtatt ccaagctaa 19
 <210> 154
 <211> 19
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> ARNsi
 55 <400> 154
 gcagaacggt ctgggact 19
 <210> 155
 <211> 19
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> ARNsi
 65 <400> 155

5 cgtgttatct tgtggtgta 19
 <210> 156
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> ARNsi
 10
 <400> 156
 cgactcatct tgtagctta 19

 <210> 157
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15

 <220>
 <223> ARNsi
 20

 <400> 157
 gcaaatggat ggcttgta 19
 25
 <210> 158
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30
 <220>
 <223> ARNsi

 <400> 158
 ggacttaatt ctaatctca 19
 35
 <210> 159
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40
 <220>
 <223> ARNsi

 <400> 159
 gatgagaatg acaaacata 19
 45
 <210> 160
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50

 <220>
 <223> ARNsi

 <400> 160
 caagggacgc cgtggaaga 19
 55
 <210> 161
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60

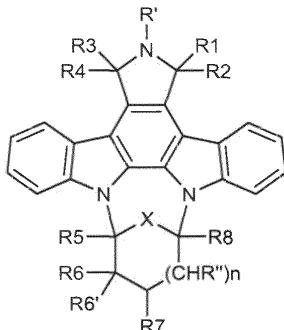
 <220>
 <223> ARNsi
 65
 <400> 161

ggacagaggg acctttaa 19
 <210> 162
 <211> 19
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> ARNsi
 10 <400> 162
 ggatcctgat tgattgaaa 19
 <210> 163
 <211> 19
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> ARNsi
 20 <400> 163
 cagaattgtt gctgcaga 19
 25 <210> 164
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> ARNsi
 <400> 164
 35 gggcagggag ggttgctta 19
 <210> 165
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40 <220>
 <223> ARNsi
 <400> 165
 45 aaaccaagtt gtaacgaca 19
 <210> 166
 <211> 21
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> shRNA
 55 <400> 166
 ggagatgctg gccatgaagc a 21
 <210> 167
 <211> 22
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> shRNA
 65 <400> 167

	acggcatgac ttatattgt at	22
	<210> 168	
	<211> 22	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> shRNA	
10	<400> 168	
	agaccgcat gactttat tg	22
	<210> 169	
15	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
20	<223> shRNA	
	<400> 169	
	cgactcatct tgtagctt t	21
25	<210> 170	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
30	<220>	
	<223> shRNA	
	<400> 170	
35	gccaaagatg acttccct t	21
	<210> 171	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
40	<220>	
	<223> shRNA	
	<400> 171	
45	guaacauga gagcacggc	19

REIVINDICACIONES

1. Una combinación de al menos un tipo de agente de silenciamiento de HDAC4 y, o bien un compuesto de Fórmula (I):



5 en donde

R' es H o alquilo;

R'' es H o alcoxi;

R1 y R2 son H o juntos forman oxo;

R3 y R4 son independientemente H, OH o juntos forman oxo;

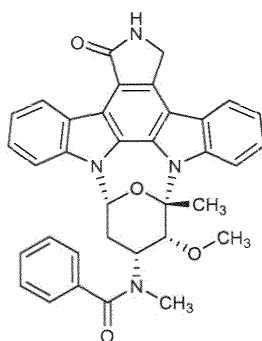
10 R5, R6, R6', R7 y R8 se seleccionan independientemente a partir del grupo que consiste en H, alquilo, alcoxi, hidroxilo, hidroxialquilo, alcoxycarbonilo, o monoalquilamino y dialquilamino;

X es CH₂ u O; y

n es 0 o 1;

o un compuesto

15

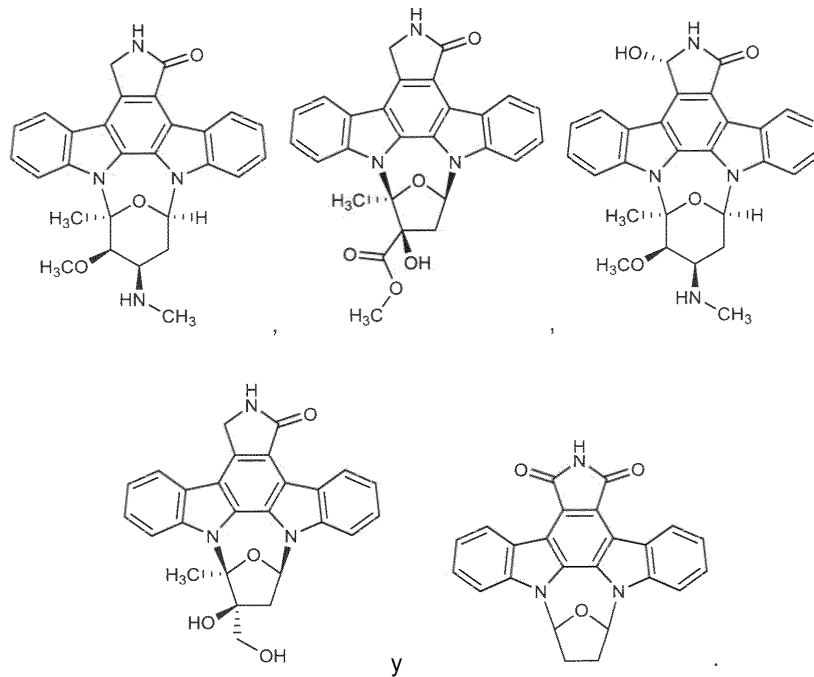


para uso como un medicamento.

2. La combinación para uso según la reivindicación 1, en la que el agente de silenciamiento de HDAC4 se selecciona a partir del grupo que consiste en una molécula de ARNsi, una molécula de DARNsi, un precursor de miARN artificial, una molécula de shARN, un oligonucleótido antisentido y una ribozima.

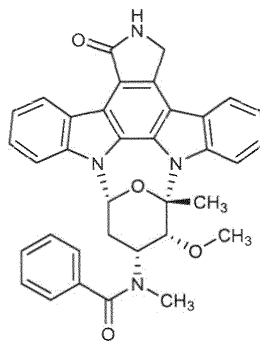
20 3. La combinación para uso según la reivindicación 1, en la que el agente de silenciamiento de HDAC4 comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 1 a 170.

4. La combinación para uso según la reivindicación 1, en la que el compuesto de Fórmula (I) se selecciona a partir del grupo que consiste en



5. la combinación según la reivindicación 1, para uso en el tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa seleccionada a partir de un grupo que consiste en cáncer de cerebro, glioma, astrocitoma y glioblastoma.

5 6. La combinación para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el agente de silenciamiento de HDAC4 y el compuesto de Fórmula (I) o el compuesto



se van a administrar simultáneamente, secuencialmente o por separado.

10 7. Una composición farmacéutica que comprende una combinación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

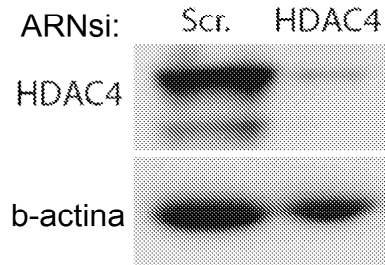


Figura 1A

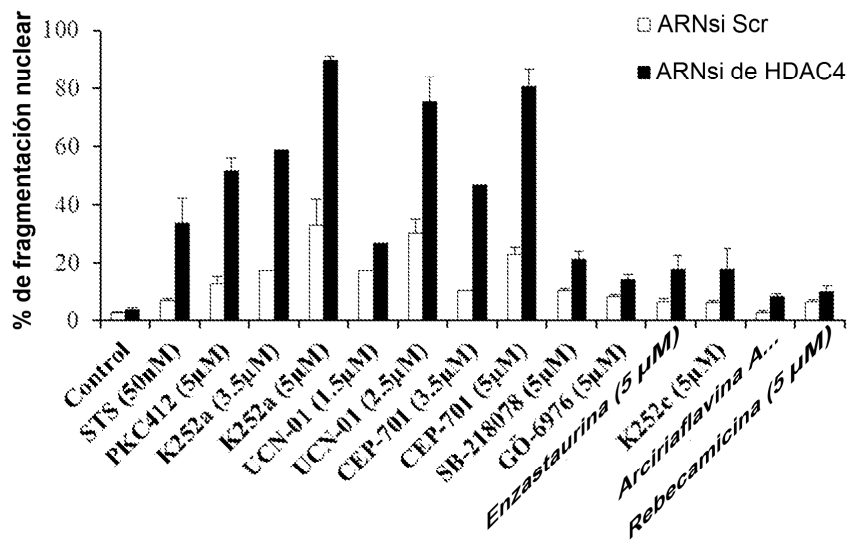


Figura 1B

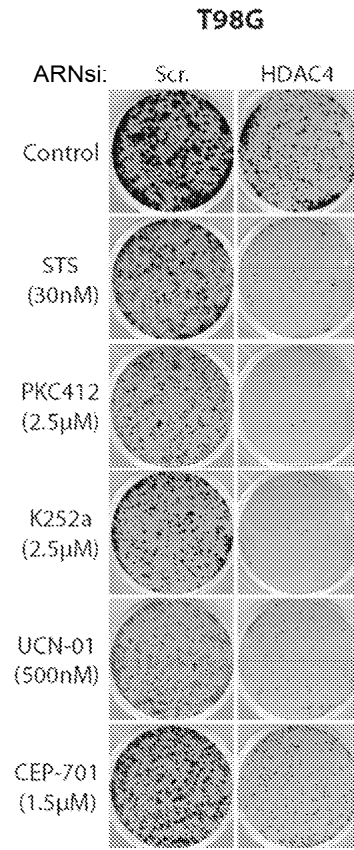


Figura 2A

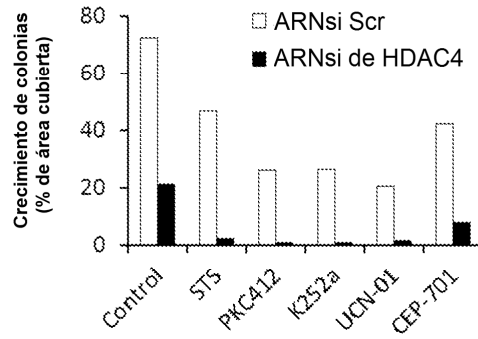


Figura 2B

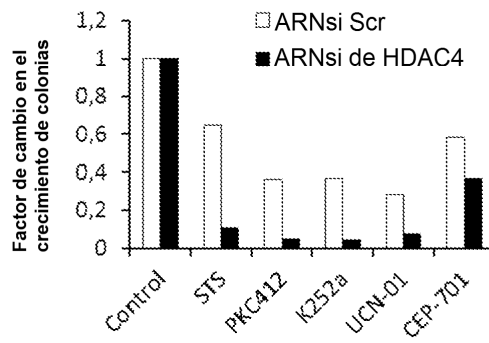


Figura 2C

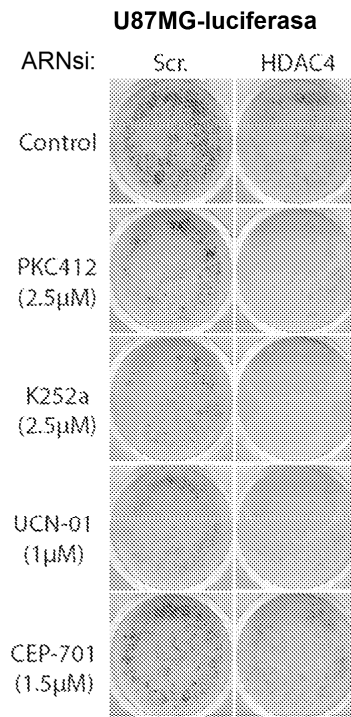


Figura 3A

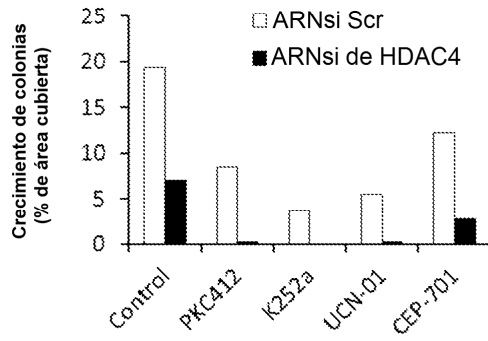


Figura 3B

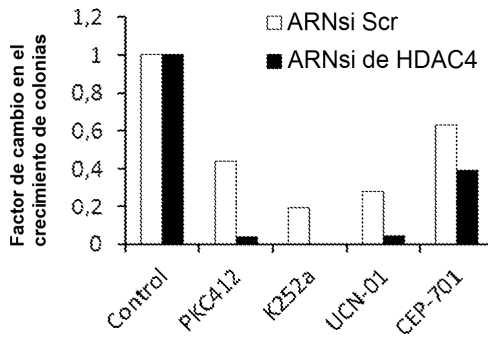


Figura 3C

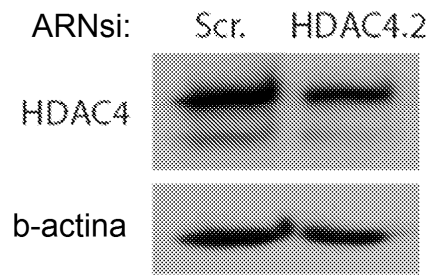


Figura 4A

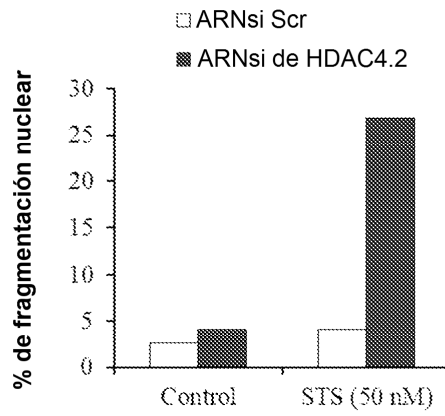


Figura 4B

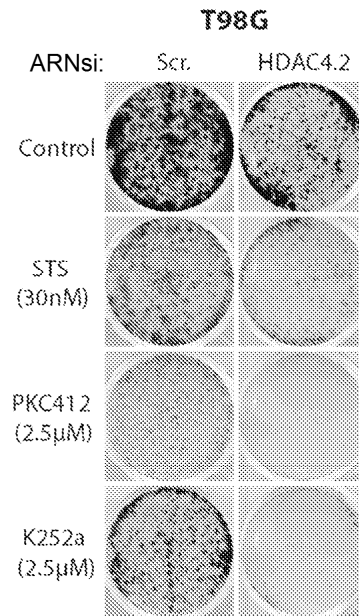


Figura 4C