

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 527 759**

51 Int. Cl.:

A01N 43/04	(2006.01)	A61K 31/695	(2006.01)
A61P 19/02	(2006.01)	C07C 215/50	(2006.01)
A61K 31/03	(2006.01)	C07D 295/096	(2006.01)
A61K 31/05	(2006.01)	C07D 213/16	(2006.01)
A61K 31/136	(2006.01)	C07D 213/30	(2006.01)
A61K 31/66	(2006.01)	A61Q 19/08	(2006.01)
A61P 17/02	(2006.01)	A61Q 5/00	(2006.01)
A61P 35/00	(2006.01)	A61K 8/34	(2006.01)
A61P 25/28	(2006.01)		
A61K 31/055	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.06.2008 E 08763514 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.10.2014 EP 2152256**

54 Título: **Compuestos activadores de la telomerasa y métodos de uso de los mismos**

30 Prioridad:

04.06.2007 US 924875 P
02.07.2007 US 929524 P
02.07.2007 US 929525 P
06.02.2008 US 6924 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.01.2015

73 Titular/es:

**BEN GURION UNIVERSITY OF THE NEGEV
RESEARCH AND DEVELOPMENT AUTHORITY
(33.3%)
Po Box 653
84105 Beer Sheva, IL;
SLAVIN, SHIMON (33.3%) y
GAZIT, AVIV (33.3%)**

72 Inventor/es:

**GAZIT, AVIV;
SLAVIN, SHIMON;
PRIEL, ESTHER y
YITZCHAK, SARA**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 527 759 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

Compuestos activadores de la telomerasa y métodos de uso de los mismos

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al uso de una serie de compuestos para potenciar la expresión y/o la activación de la telomerasa y para el tratamiento de enfermedades, trastornos y/o afecciones relacionadas.

10 **Antecedentes de la invención**

La telomerasa es una ribonucleoproteína que cataliza la adición de repeticiones teloméricas a los extremos de los telómeros. Los telómeros son largas extensiones de secuencias repetidas que tapan los extremos de los cromosomas. En los seres humanos, los telómeros tienen generalmente una longitud de 7-10 kb y comprenden múltiples repeticiones. La telomerasa no se expresa en la mayoría de las células adultas y la longitud de los telómeros disminuye con las sucesivas rondas de replicación.

La telomerasa actúa como transcriptasa inversa en el alargamiento de los telómeros, lo que impide la pérdida de los telómeros debido a los problemas de replicación de los extremos. Sin telomerasa los telómeros se acortan en cada división celular, lo que conduce a la senescencia, apoptosis y muerte celular causada por la inestabilidad cromosómica. La telomerasa es inactiva en las células somáticas, pero activa en el 90 % de las células cancerosas, donde se reactiva la telomerasa. Aunque la activación de la telomerasa puede ser peligrosa, ya que puede imitar el proceso de desarrollo del cáncer, se pueden administrar teóricamente agentes potenciadores de la telomerasa como agentes anti-envejecimiento y clínicamente útiles en ciertas afecciones médicas. Por el contrario, los inhibidores de la telomerasa pueden ser útiles para combatir el cáncer. El cáncer y el envejecimiento están estrechamente relacionados entre sí: Las intervenciones que protegen contra el cáncer pueden conducir al envejecimiento prematuro mientras que se requiere la inmortalización de las células en la formación de células cancerosas malignas. A pesar del riesgo teórico de activación de la carcinogénesis, la activación de la telomerasa puede conducir a una tasa reducida de envejecimiento.

La evaluación de la longitud de los telómeros es importante en la comprensión de la importancia biológica y clínica de los telómeros. La longitud de los telómeros sirve como un indicador útil en el estudio de la estabilidad cromosómica, la actividad y/o expresión de la telomerasa, la capacidad proliferativa y proceso de envejecimiento de las células. El valor clínico de los telómeros se puede demostrar en su importancia en el cáncer, el síndrome de envejecimiento prematuro o progeria segmentaria; anomalías genéticas, enfermedades derivadas de la inestabilidad cromosómica, como el síndrome de Bloom (un trastorno hereditario poco frecuente que se caracteriza por una alta frecuencia de roturas y reordenamientos en los cromosomas de la persona afectada) y en enfermedades relacionadas con la edad, como el síndrome de Warner (una enfermedad rara que se manifiesta por el rápido envejecimiento en las personas más jóvenes). La dinámica de la longitud de los telómeros tiene distintos patrones de expresión en la progresión de enfermedades específicas. Por lo tanto, tiene un gran valor en el pronóstico de las enfermedades.

La longitud de los telómeros se puede medir por transferencia Southern, ensayo de protección de hibridación, fluorescencia por hibridación *in situ*, citometría de flujo, cebado *in situ*, reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa y análisis individual de la longitud telomérica.

La falta de actividad y/o expresión de la telomerasa y los telómeros cortos puede causar disqueratosis congénita, anemia aplásica, aumento de la mortalidad por enfermedades cardiovasculares, ictus o infecciones, hipertensión o estrés crónico.

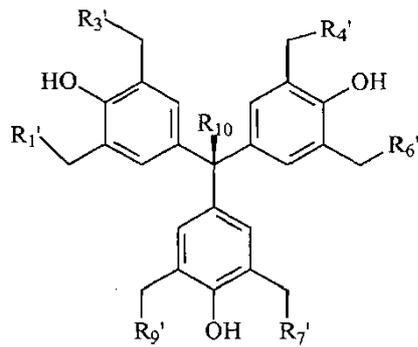
Se ha demostrado que la transducción de la telomerasa en los ratones con telomerasa desactivada prevenía daños en el hígado.

Además de la función de la telomerasa en el mantenimiento de la longitud de los telómeros, un número cada vez mayor de datos sugiere que la proteína de la telomerasa transcriptasa inversa (TERT) tiene funciones fisiológicas adicionales, es decir, la protección de las células y de los ratones de diversos daños en un mecanismo (todavía no dilucidado) que no implica el alargamiento de los telómeros.

Los compuestos que activan la telomerasa tienen su aplicación, por lo tanto, en múltiples escenarios clínicamente relevantes.

Sumario de la invención

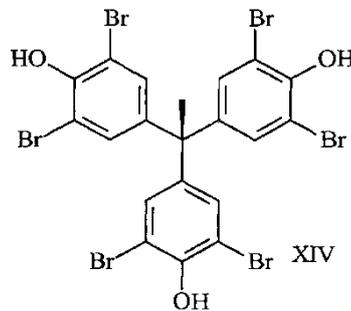
En una realización, esta invención proporciona un compuesto representado por la estructura de fórmula VI:



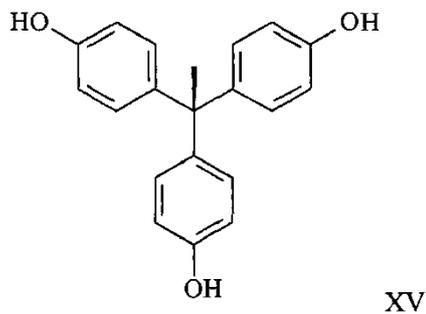
VI

en la que R₁' , R₃' , R₄' , R₆' , R₇' y R₉' son iguales y se seleccionan de heterocicloalquilo, alcoxi y dialquilamino y R₁₀ es metilo o por la estructura de fórmula XIV:

5

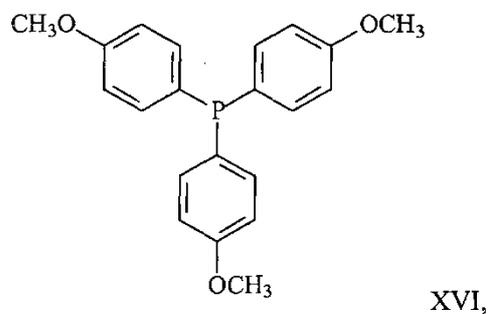


o por la estructura de fórmula XV:



10

o por la estructura de la fórmula XVI:



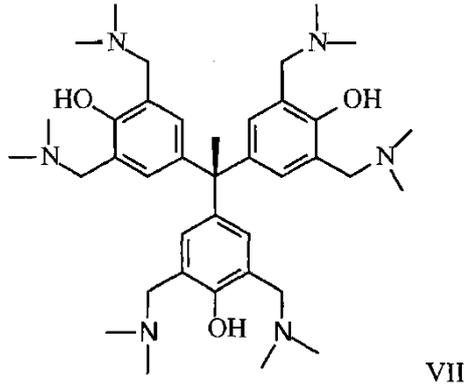
15

para su uso en el tratamiento en un sujeto de enfermedades que se pueden tratar mediante la estimulación o el aumento de la expresión y/o actividad de la telomerasa y seleccionadas de una enfermedad neurodegenerativa, lesión del sistema nervioso, enfermedad vascular, una enfermedad o trastorno asociado con el envejecimiento, una enfermedad degenerativa de las articulaciones, una enfermedad degenerativa del sistema esquelético, una enfermedad degenerativa de la musculatura, degeneración macular, infección, deterioro del sistema inmunitario,

20

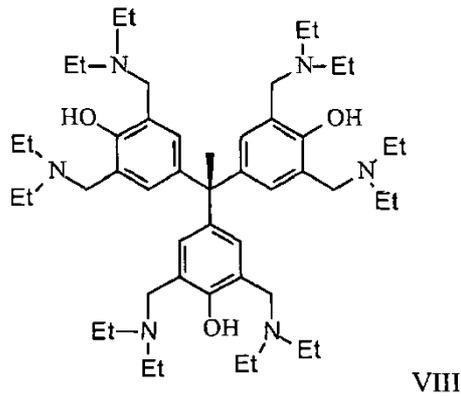
cáncer, enfermedad degenerativa inflamatoria, un trastorno genético que causa renovación celular acelerada, anemia, infertilidad masculina o femenina y una enfermedad aguda o crónica o trastorno de la piel por contacto de la piel afectada con el compuesto.

- 5 En otra realización, dicha afección o trastorno agudo de la piel es una herida, una quemadura, una abrasión, una incisión, un sitio de injerto, una lesión vascular, una lesión causada por un agente infeccioso, una úlcera venosa crónica, una úlcera diabética, una úlcera de compresión, una úlcera por presión, una llaga o úlcera de la mucosa, melanoma o formación de queloides.
- 10 En otra realización, la estructura de la fórmula VI está representada por la estructura de fórmula VII:



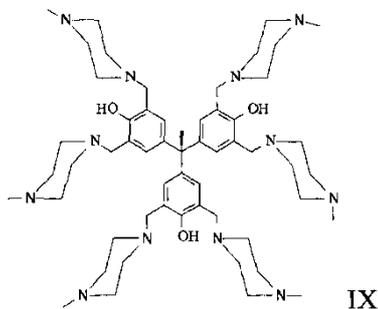
o por la estructura de la fórmula VIII:

15

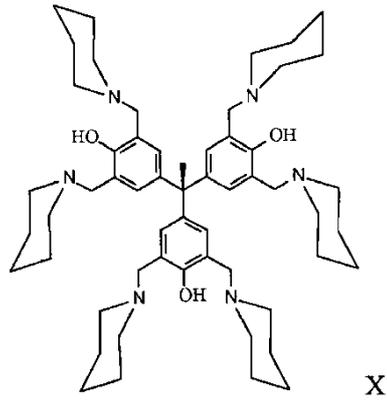


o por la estructura de la fórmula IX:

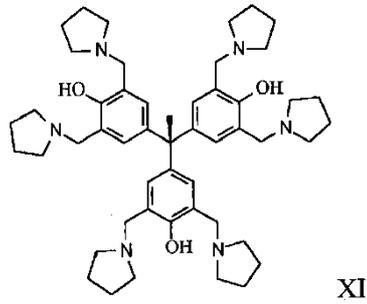
20



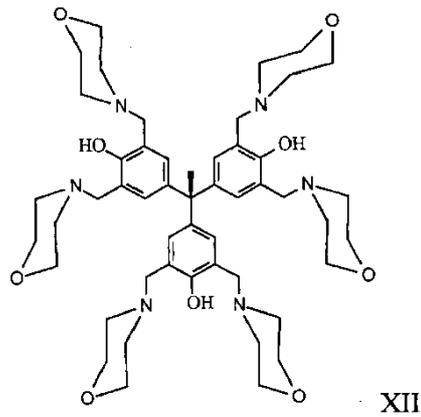
o por la estructura de la fórmula X:



5 o por la estructura de fórmula XI:

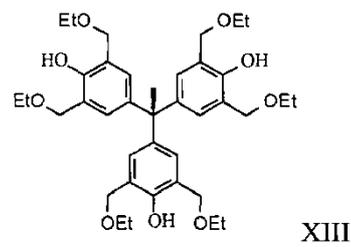


o por la estructura de fórmula XII:



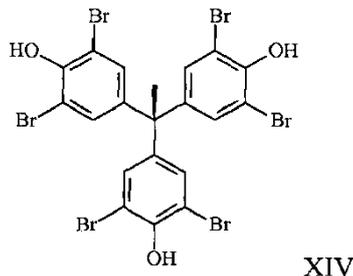
10

o por la estructura de fórmula XIII:

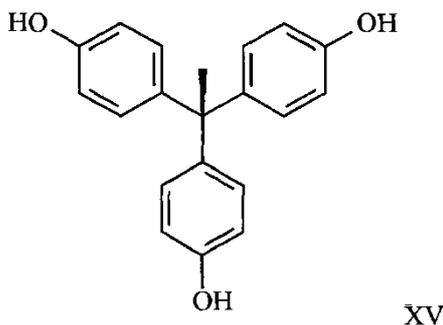


15

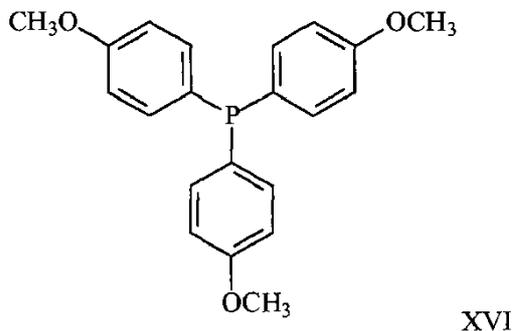
En otra realización, la estructura de la fórmula VI está representada por la estructura de fórmula XIV:



5 o por la estructura de fórmula XV:



10 o por la estructura de la fórmula XVI:



15 En otra realización, la invención hace uso de un compuesto representado por la estructura de la fórmula VI, XIV, XV o XVI como se ha definido anteriormente para el tratamiento de una afección relacionada con la edad que se puede tratar mediante la estimulación o el aumento de la expresión y/o actividad de la telomerasa, en la que la afección relacionada con la edad es arrugamiento de la piel o encanecimiento del cabello.

20 En otra realización, la invención hace uso de un compuesto representado por la estructura de fórmula VII, VIII, IX, X, XI, XII o XIII como se ha definido anteriormente para el tratamiento de una afección relacionada con la edad que se puede tratar mediante la estimulación o aumento de la expresión y/o actividad de la telomerasa, en donde la afección relacionada con la edad es arrugamiento de la piel o encanecimiento del cabello.

Breve descripción de los dibujos

25 La materia considerada como la invención se indica particularmente y se reivindica claramente en la parte final de la memoria. La invención, sin embargo, tanto en cuanto a organización como método de funcionamiento, junto con los objetos, características y ventajas de la misma, puede entenderse mejor por referencia a la siguiente descripción detallada cuando se lee con los dibujos adjuntos en los que:

30 **Fig. 1:** Tratamiento de las células U-251 con los compuestos de la presente invención y medición de la actividad de telomerasa mediante un ensayo TRAP. A. Actividad de la telomerasa en las células tratadas con el Compuesto 68. B. Cuantificación de los resultados y % de activación de la telomerasa.

35 **Fig. 2:** Aumento dependiente del tiempo del nivel de proteína de la telomerasa por los compuestos de la presente invención. A. Análisis de transferencia Western con anticuerpo anti-telomerasa humana. B. Cuantificación del nivel de proteína de la telomerasa.

Fig 3: El compuesto 68 aumenta la expresión de la ARN telomerasa. A. Análisis de transferencia Northern utilizando la sonda de ADNc específica de hTERT. AD es actinomicina D.B. Cuantificación del nivel de ARN.

5 **Fig 4:** El efecto del tratamiento con los compuestos de la presente invención sobre la supervivencia y la proliferación de hMSC.

10 **Fig 5:** Activación de la expresión de la telomerasa en hMSC por los compuestos de la presente invención. A. hMSC tratadas con 250 nM de los compuestos 79, 77 y 68 durante 6 horas. La inmunofluorescencia se realizó con anticuerpo anti-hTERT (rojo) y el núcleo se tiñó con DAPI (azul). B. hMSC tratadas con el compuesto 79 durante 6 y 24 h. La actividad telomerasa se midió por PCR en tiempo real usando un kit de detección de telomerasa cuantitativa (Allied Biotech Inc., EE.UU.).

Fig 6: El efecto de los compuestos de la presente invención sobre queratinocitos humanos senescentes *in vitro*.

15 **Fig 7:** A. El efecto de los compuestos de la presente invención sobre las células epiteliales pigmentadas de la retina humana bajo estrés oxidativo. B. El efecto de los compuestos sobre la actividad de la telomerasa en las células del RPE (medido por un kit de detección cuantitativa de telomerasa-PCR en tiempo real).

20 **Fig. 8:** Prolongación de la vida de *C. elegans* por los compuestos 68 y 77 activadores de la telomerasa.

25 **Fig. 9:** Activación de la expresión de la telomerasa por los compuestos de la presente invención en las células del endometrio de rata. A,B. Análisis histológico. C-F. Análisis inmunohistoquímico con anticuerpo anti-hTERT específico. G. Actividad de la telomerasa en extractos nucleares derivados de endometrio de ratas inyectadas con compuestos de la presente invención. G(B) Actividad de la telomerasa en extractos nucleares derivados de endometrio de ratas inyectadas con compuestos de la presente invención medida por PCR en tiempo real utilizando un kit de detección cuantitativa de la telomerasa (Allied Biotech Inc., EE.UU.).

30 **Fig. 10:** Activación de la telomerasa de las células de la corteza cerebral de rata por los compuestos de la presente invención.

Fig. 11: Activación de la telomerasa de SNC de ratón por los compuestos de la presente invención.

Fig. 12: La proteína de la telomerasa aumenta en ratas tratadas con los compuestos de la presente invención.

35 **Fig. 13:** Prevención de la apoptosis inducida por glutamato en el cerebelo del ratón por el Compuesto 79.

Fig. 14: La expresión de la telomerasa se activa en el corazón del ratón por el Compuesto 79.

40 **Fig. 15:** El compuesto 68 previene el efecto de los fármacos perjudiciales para el desarrollo embrionario en ratas.

Descripción detallada de la presente invención

45 En la siguiente descripción detallada, se exponen numerosos detalles específicos con el fin de proporcionar una comprensión completa de la invención. Sin embargo, se entenderá por los expertos en la técnica que la presente invención puede ponerse en práctica sin estos detalles específicos. En otros casos no se han descrito en detalle métodos, procedimientos y componentes bien conocidos para no oscurecer la presente invención.

50 La presente invención se refiere al uso de los compuestos tri-fenilo para el tratamiento de enfermedades o afecciones susceptibles de ser afectadas por el aumento de la expresión de la telomerasa y/o la activación de la telomerasa, tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

55 La descripción divulga el uso de tales compuestos, los cuales estimulan y/o incrementan la expresión y/o actividad de la telomerasa en las células y tejidos de un sujeto, en donde la actividad está disminuida, falta, está alterada o es anormal. Tales trastornos incluyen, entre otros, a) la enfermedad de Alzheimer; b) la enfermedad de Parkinson; c) la enfermedad de Huntington; d) daño nervioso, enfermedad de la motoneurona, esclerosis múltiple (EM), lesión del sistema nervioso central y periférico incluyendo lesión de la médula y accidentes vasculares cerebrales; e) ictus; f) enfermedades o afecciones asociadas con el envejecimiento, tales como por ejemplo, el envejecimiento de la piel, tales como la atrofia y adelgazamiento dérmico, elastolisis y arrugamiento de la piel, hiperplasia o hipoplasia de la glándula sebácea, lentigo senil, anomalías de pigmentación, envejecimiento de la pérdida de cabello y adelgazamiento del cabello (calvicie, alopecia) o úlceras crónicas de la piel; g) enfermedad degenerativa de las articulaciones; h) osteoporosis, artrosis y otras afecciones del sistema esquelético; i) sarcopenia y otras afecciones degenerativas de la musculatura; j) enfermedades del sistema vascular relacionadas con la edad y el estrés incluyendo aterosclerosis, calcificación, trombosis y aneurisma; k) degeneración macular relacionada con la edad; l) el SIDA; m) deterioro del sistema inmunitario relacionado con la edad y el estrés, incluyendo el deterioro del recambio de tejidos que se produce con el envejecimiento natural, el cáncer, terapia del cáncer, infecciones agudas o crónicas, enfermedades inflamatorias degenerativas o con trastornos genéticos que provocan un recambio celular

acelerado y anemias relacionadas y otras afecciones degenerativas; n) cicatrización de heridas, quemaduras, abrasiones u otras afecciones agudas o crónicas de la epidermis o) defecto de la fase luteínica y/o p) insuficiencia ovárica prematura (insuficiencia ovárica primaria o hipogonadismo hipergonadotrópico).

5 **Los compuestos de la invención:**

La invención comprende el uso de compuestos tri-fenilo representados por la estructura de fórmulas VI a XVI.

10 El término "alquilo" se refiere a grupos alquilo de cadena lineal y cadena ramificada. En una realización, el grupo alquilo tiene 1-12 carbonos. En otra realización, el grupo alquilo tiene 1-7 carbonos. En otra realización, el grupo alquilo tiene 1-6 carbonos. En otra realización, el grupo alquilo tiene 1-7 carbonos. En otra realización, el grupo alquilo tiene 2-6 carbonos. En otra realización, el grupo alquilo tiene 1-7 carbonos. En otra realización, el grupo alquilo tiene 2-8 carbonos. En otra realización, el grupo alquilo tiene 3-6 carbonos. En otra realización, el grupo alquilo tiene 3-7 carbonos. En otra realización, el grupo alquilo tiene 1-4 átomos de carbono. En otra realización, el grupo alquilo ramificado es un alquilo sustituido por cadenas laterales de alquilo de 1 a 5 carbonos.

Un grupo "alcoxi" se refiere a un grupo alquilo como se ha descrito anteriormente, que está unido al oxígeno. Ejemplos de grupos alcoxi son etoxi, propoxi, terc-butoxi.

20 Un grupo "heterocicloalquilo" se refiere, en una realización, a un anillo no aromático, monocíclico o policíclico que comprende carbono y además de carbono, azufre, fósforo, oxígeno o nitrógeno, como parte del anillo. Un grupo heterocicloalquilo puede tener uno o más dobles enlaces en el anillo siempre que el anillo no se vuelva aromático por su presencia. Ejemplos de grupos heterocicloalquilo incluyen, pero no se limitan a, piperidina, piperazina, pirano, morfolina. Preferiblemente, el grupo heterocicloalquilo es un anillo monocíclico o bicíclico de una estructura de anillo que comprende, además de átomos de carbono, azufre, oxígeno, nitrógeno o cualquier combinación de los mismos, como parte del anillo. En otra realización, el heterocicloalquilo es un anillo de 3-12 miembros. En otra realización, el heterocicloalquilo es un anillo de 6 miembros. En otra realización, el heterocicloalquilo es un anillo de 5-7 miembros. En otra realización, el heterocicloalquilo es un anillo de 4-8 miembros. En otra realización, el heterocicloalquilo es una urea cíclica, imidazolinilo, imidazolidinilo, pirrolinilo, pirrolidinilo, oxazolinilo, isoxazolinilo, oxazolidinilo, oxazolidonilo, isoxazolidonilo, pirazolinilo, pirazolidinilo, piperidilo, piperazina, morfolinilo.

35 Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos pueden producirse para formar sales de metales alcalinos y para formar sales de adición de ácidos libres o bases libres. Sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables adecuadas de los compuestos de esta invención se pueden preparar a partir de un ácido inorgánico o de un ácido orgánico. Ejemplos de ácidos inorgánicos son ácido clorhídrico, bromhídrico, yodhídrico, nítrico, carbónico, sulfúrico y fosfórico. En una realización, los ácidos orgánicos pueden ser seleccionados de las clases de ácidos orgánicos alifáticos, cicloalifáticos, aromáticos, aralifáticos, heterocíclicos, carboxílicos y sulfónicos, ejemplos de los cuales son ácido fórmico, acético, propiónico, succínico, glicólico, glucónico, láctico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, glucurónico, maleico, fumárico, pirúvico, aspártico, glutámico, benzoico, antranílico, oxálico, p-toluenosulfónico, mesílico, salicílico, p-hidroxibenzoico, fenilacético, mandélico, embónico (pamoico), metanosulfónico, etilsulfónico, bencenosulfónico, sulfanílico, esteárico, ciclohexilaminosulfónico, algénico, galacturónico. Sales de adición de base farmacéuticamente aceptables adecuadas de los compuestos de esta invención incluyen sales metálicas hechas de aluminio, calcio, litio, magnesio, potasio, sodio y zinc o sales orgánicas hechas de N,N'-dibenciletildiamina, colina, cloroprocaína, dietanolamina, etilendiamina, meglumina (N-metilglucamina) y procaína. Todas estas sales pueden prepararse por medios convencionales a partir de los compuestos correspondientes.

Las sales farmacéuticamente aceptables se pueden preparar, a partir de los compuestos fenólicos, por tratamiento con bases inorgánicas, por ejemplo, hidróxido de sodio.

50 En algunas realizaciones, la invención proporciona el uso del compuesto, para el tratamiento de una afección que se puede tratar aumentando la actividad y/o expresión de la telomerasa en células o tejido de un sujeto, tales como el tratamiento de una afección aguda o crónica de la epidermis y/o el tratamiento de enfermedades del sistema vascular relacionadas con la edad y el estrés, incluyendo aterosclerosis, calcificación, trombosis, hipertensión o aneurisma y/o tratamiento de la degeneración macular relacionada con la edad y/o enfermedades relacionadas con la edad de la piel y/o tratamiento del deterioro del sistema inmunitario relacionado con la edad y el estrés.

60 En algunas realizaciones, la invención proporciona composiciones que comprenden el compuesto de esta invención y/o el tratamiento de afecciones relacionadas con la infertilidad femenina incluyendo el defecto de la fase luteínica o insuficiencia ovárica prematura (insuficiencia ovárica primaria o hipogonadismo hipergonadotrópico) y/o disminución de la actividad telomerasa de las células de la granulosa y/o el tratamiento de afecciones relacionadas con la infertilidad masculina, incluyendo alteraciones en la espermatogénesis o en la liberación de espermatozoides.

65 En una realización, los términos "tratar" o "tratamiento" incluyen el tratamiento preventivo, así como el tratamiento de remisión del trastorno. Los términos "reducir", "suprimir" e "inhibir" tienen su significado entendido comúnmente de atenuar o disminuir, o retrasar, en otra realización, o reducir, en otra realización, la incidencia, la gravedad o

patogénesis de una enfermedad, trastorno o afección. En una realización, el tratamiento a largo plazo se refiere a la demora en la progresión de, remisión prolongada de, reducción de la incidencia de, o la mejora de los síntomas asociados con la enfermedad, trastorno o afección. En una realización, los términos “tratar” “reducir”, “suprimir” o “inhibir” se refieren a una reducción en la morbilidad, la mortalidad o una combinación de las mismas, en asociación con la enfermedad, trastorno o afección indicada. En una realización, el término “progresión” se refiere a un aumento en su alcance o gravedad, avance, crecimiento o empeoramiento. El término “recurrencia” significa en otra realización, el regreso de una enfermedad después de una remisión. En una realización, el uso en el tratamiento de la invención reduce la gravedad de la enfermedad, o en otra realización, los síntomas asociados con la enfermedad, o en otra realización, reduce el número de biomarcadores expresados durante la enfermedad.

En una realización, el término “tratar” y sus aspectos incluidos, se refiere a la administración a un sujeto con la enfermedad, trastorno o afección indicada, o en algunas realizaciones, a un sujeto predispuesto a la enfermedad, trastorno o afección indicada. El término “predispuesto a” debe considerarse que se refiere, entre otras cosas, a un perfil genético o relación familiar que se asocia con una tendencia o aumento estadístico en la incidencia, gravedad, etc., de la enfermedad indicada. En algunas realizaciones, el término “predispuesto a” debe considerarse que se refiere, entre otras cosas, a un estilo de vida que se asocia con un mayor riesgo de la enfermedad indicada. En algunas realizaciones, el término “predispuesto a” debe considerarse que se refiere, entre otras cosas, a la presencia de biomarcadores que están asociados con la enfermedad indicada, por ejemplo, en el cáncer, el término “predispuesto a” puede comprender la presencia de precursores precancerosas del cáncer indicado.

En algunas realizaciones, el término “reducción de la patogénesis” debe entenderse que abarca la reducción de daño tisular o daño del órgano asociado con una enfermedad, trastorno o afección en particular. En otra realización, el término “reducción de la patogénesis” se debe entender que abarca la reducción de la incidencia o gravedad de una enfermedad, trastorno o afección asociada, con aquella en cuestión. En otra realización, el término “reducción de la patogénesis” se debe entender que abarca reducir el número de enfermedades, trastornos o afecciones asociadas con la indicada o síntomas asociados a la misma.

El término “administrar”, en otra realización, se refiere a poner a un sujeto en contacto con un compuesto de la presente invención. La administración se lleva a cabo *in vivo*, es decir, en células o tejidos de organismos vivos, por ejemplo, seres humanos.

En una realización, la invención hace uso del compuesto descrito de esta invención poniendo en contacto o uniendo una enzima telomerasa en una cantidad eficaz para aumentar la actividad y/o expresión de la telomerasa y de ese modo mediando en los efectos descritos.

Composiciones farmacéuticas

En algunas realizaciones, esta invención proporciona el uso en métodos que comprenden administrar una composición que comprende los compuestos descritos. Como se usa en la presente memoria, “composición farmacéutica” significa una “cantidad terapéuticamente eficaz” del principio activo, es decir, los compuestos utilizados en esta invención, junto con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. Una “cantidad terapéuticamente eficaz” como se usa en la presente memoria se refiere a la cantidad que proporciona un efecto terapéutico para una afección y régimen de administración dados.

En algunas realizaciones, las composiciones pueden comprender al menos un compuesto utilizado en esta invención, en cualquier forma o realización descrita en la presente memoria. En algunas realizaciones, el término “un” se debe entender que abarca un único o múltiple del material indicado. En algunas realizaciones, el término “un” o “una” se refiere a al menos uno.

En algunas realizaciones, cualquiera de las composiciones consistirá en un compuesto utilizado en esta invención, en cualquier forma o realización descrita en la presente memoria. En algunas realizaciones, las composiciones consistirán esencialmente en un compuesto usado en cualquier forma o realización descrita en la presente memoria.

En algunas realizaciones, el término “comprende” se refiere a la inclusión del principio activo indicado, tales como los compuestos utilizados en esta invención, así como la inclusión de otros principios activos y vehículos, excipientes, emolientes, estabilizadores, etc. farmacéuticamente aceptables, como se conocen en la industria farmacéutica. En algunas realizaciones, cualquiera de las composiciones comprenderán un compuesto de fórmula VI - XVI en cualquier forma o realización descrita en la presente memoria. En algunas realizaciones, cualquiera de las composiciones consistirán en un compuesto de fórmula VI - XVI, en cualquier forma o realización descrita en la presente memoria. En algunas realizaciones, las composiciones consistirán esencialmente en un compuesto utilizado en esta invención, en cualquier forma o realización descrita en la presente memoria. En algunas realizaciones, el término “comprende” se refiere a la inclusión del principio activo indicado, tal como el compuesto utilizado en esta invención, así como la inclusión de otros principios activos, y vehículos, excipientes, emolientes, estabilizantes farmacéuticamente aceptables, como son conocidos en la industria farmacéutica. En algunas realizaciones, el término “consiste esencialmente en” se refiere a una composición, cuyo único principio activo es el principio activo indicado, sin embargo, se pueden incluir otros compuestos que son para la estabilización y

conservación de la formulación, pero que no están implicados directamente en el efecto terapéutico del principio activo indicado. En algunas realizaciones, el término “consiste esencialmente en” se refiere a una composición, cuyo único principio activo con un modo de acción comparable, o diana molecular comparable es el principio activo indicado, sin embargo, se pueden incorporar otros principios activos con dichos principios activos secundarios que actúan sobre diferentes dianas o con capacidad paliativa. En algunas realizaciones, el término “consiste esencialmente en” puede referirse a los componentes que facilitan la liberación del principio activo. En algunas realizaciones, el término “que consiste en” se refiere a una composición, que contiene un compuesto como se describe en la presente memoria como el único principio activo y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Un componente activo puede formularse en la composición como formas de sales farmacéuticamente aceptables neutralizadas. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido, que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico. Las sales formadas a partir de los grupos carboxilo libres también se pueden derivar de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, sodio, potasio, amonio, calcio, o hidróxidos férricos, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína.

Las composiciones farmacéuticas que contienen el compuesto utilizado en esta invención se pueden administrar a un sujeto por cualquier método conocido para una persona experta en la técnica, tales como por vía oral, parenteral, intravascular, paracanceral, transmucosa, transdérmica, intramuscular, intranasal, intravenosa, intradérmica, subcutánea, sublingual, intraperitoneal, intraventricular, intracraneal, intravaginal, por inhalación, por vía rectal, por vía intratumoral, o por cualquier medio en el que el virus/composición recombinante puede ser suministrada al tejido (por ejemplo, aguja o catéter). Alternativamente, la administración tópica puede ser deseable para la aplicación a células de la mucosa, para la piel o la aplicación ocular. Otro método de administración es a través de la aspiración o la formulación de aerosol.

Las composiciones se formulan en una realización para la administración oral, en las que los compuestos activos se pueden incorporar con excipientes y usarse en forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas. Los comprimidos, trociscos, píldoras, cápsulas también pueden contener lo siguiente: un aglutinante, como goma tragacanto, goma acacia, almidón de maíz, o gelatina; excipientes, tales como fosfato dicálcico; un agente disgregante, tal como almidón de maíz, almidón de patata, ácido algínico; se puede añadir un lubricante, tal como estearato de magnesio y un agente edulcorante, tal como sacarosa, lactosa o sacarina o un agente aromatizante, tal como menta, aceite de gaulteria o aroma de cereza. Cuando la forma farmacéutica unitaria es una cápsula, ésta puede contener, además de los materiales del tipo anterior, un vehículo líquido. Varios otros materiales pueden estar presentes como recubrimientos o para modificar de otro modo la forma física de la unidad de administración. Por ejemplo, los comprimidos, píldoras o cápsulas pueden recubrirse con goma laca, azúcar o ambos. El jarabe de elixir puede contener el compuesto activo, sacarosa como agente edulcorante, metil y propil parabenos como conservantes, un colorante y aromatizante, tal como aroma de cereza o naranja. Además, los compuestos activos se pueden incorporar en preparaciones y formulaciones de liberación sostenida, liberación pulsante, liberación controlada o liberación aplazada.

En otra realización, las composiciones comprenden uno o más, materiales vehículos farmacéuticamente aceptables.

En una realización, los vehículos para uso dentro de tales composiciones son biocompatibles y en otra realización, biodegradables. En otras realizaciones, la formulación puede proporcionar un nivel relativamente constante de liberación de un componente activo. En otras realizaciones, sin embargo, se puede desear una tasa más rápida de liberación inmediatamente después de la administración. En otras realizaciones, la liberación de los compuestos activos puede ser disparada por evento. Los eventos de activación de la liberación de los compuestos activos pueden ser el mismo en una realización o diferentes en otra realización. Eventos de activación de la liberación de los componentes activos pueden ser la exposición a la humedad en una realización, un pH más bajo en otra realización o el umbral de temperatura en otra realización. La formulación de tales composiciones está bien dentro del nivel de experiencia normal en la técnica usando técnicas conocidas. Vehículos ilustrativos útiles a este respecto incluyen micropartículas de poli(lactida-co-glicólido), poliacrilato, látex, almidón, celulosa, dextrano y similares. Otros vehículos de liberación aplazada ilustrativos incluyen biovectores supramoleculares, que comprenden un núcleo hidrófilo no líquido (por ejemplo, un polisacárido u oligosacárido reticulado) y, opcionalmente, una capa externa que comprende un compuesto anfifílico, tal como fosfolípidos. La cantidad de compuesto activo contenido en una realización, dentro de una formulación de liberación sostenida depende del sitio de administración, la velocidad y duración esperada de la liberación y la naturaleza de la afección a tratar suprimida o inhibida.

En una realización será deseable suministrar las composiciones descritas en la presente memoria por vía parenteral, intravenosa, intramuscular, o incluso intraperitoneal. Tales enfoques son bien conocidos por el experto en la materia, algunos de los cuales se describen adicionalmente, por ejemplo, en los documentos US-5.543.158; US- 5.641.515 y US-5.399.363. En ciertas realizaciones, las soluciones de los compuestos activos como base libre o sales farmacológicamente aceptables se pueden preparar en agua adecuadamente mezclada con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. Las dispersiones también pueden prepararse en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de los mismos y en aceites. Deben ser estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento y

deben conservarse contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos.

En otra realización, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. En otras realizaciones, será deseable la absorción prolongada de las composiciones inyectables. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede ser provocada por el uso de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina, en las composiciones.

Los vehículos parenterales incluyen en ciertas realizaciones solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, lactato de Ringer y aceites fijos. Los vehículos intravenosos incluyen reponedores de fluidos y nutrientes, reponedores de electrolitos tales como los basados en dextrosa de Ringer. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos, tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes, gases inertes.

En algunas realizaciones, los compuestos usados en esta invención se pueden administrar en varias dosis a un sujeto, que en una realización, es un sujeto humano. En una realización, los compuestos se administran a una dosis de 0,1 - 200 mg por día. En una realización, el compuesto se administra a una dosis de 0,1 - 10 mg, o en otra realización, de 0,1 a 25 mg, o en otra realización, de 0,1 a 50 mg, o en otra realización, de 0,3 a 15 mg, o en otra realización, de 0,3 a 30 mg, o en otra realización, de 0,5 a 25 mg, o en otra realización, de 0,5 a 50 mg, o en otra realización, de 0,75 a 15 mg, o en otra realización, de 0,75 a 60 mg, o en otra realización, de 1 a 5 mg, o en otra realización, de 1 a 20 mg, o en otra realización, de 3 a 15 mg, o en otra realización, de 1 a 30 mg, o en otra realización, de 30 a 50 mg, o en otra realización, de 30 a 75 mg, o en otra realización, de 100 a 2.000 mg. En algunas realizaciones, los compuestos se pueden administrar en diferentes dosis, como una función del tiempo, o gravedad de la enfermedad/síntoma/afección o edad o de otros factores, como será apreciado por un experto en la técnica.

Los compuestos se pueden administrar en varias dosis. En una realización, los compuestos se administran a una dosis de 1 mg. En otra realización, los compuestos se administran a una dosis de 5 mg, o en otra realización, 3 mg, o en otra realización 10 mg, o en otra realización 15 mg, o en otra realización 20 mg, o en otra realización 25 mg, o en otra realización 30 mg, o en otra realización 35 mg, o en otra realización 40 mg, o en otra realización 45 mg, o en otra realización 50 mg, o en otra realización 55 mg, o en otra realización 60 mg, o en otra realización 65 mg, o en otra realización 70 mg, o en otra realización 75 mg, o en otra realización 80 mg, o en otra realización 85 mg, o en otra realización 90 mg, o en otra realización 95 mg o en otra realización 100 mg.

Aunque los compuestos se pueden administrar como el único agente farmacéutico activo, también pueden usarse en combinación con uno o más otro compuesto y/o en combinación con otros agentes usados en el tratamiento y/o prevención de las enfermedades, trastornos y/o afecciones, como comprenderá un experto en la técnica. En otra realización, los compuestos se pueden administrar secuencialmente con uno o más de tales agentes para proporcionar efectos terapéuticos y profilácticos sostenidos. En otra realización, los compuestos se pueden administrar por diferentes vías, en diferentes momentos, o una combinación de los mismos.

Además, los compuestos se pueden utilizar, ya sea individualmente o en combinación, en combinación con otras modalidades para prevenir o tratar afecciones, enfermedades o trastornos. En algunas realizaciones, tales otras modalidades de tratamiento pueden incluir, sin limitación, la cirugía, la radiación, la suplementación hormonal, la regulación de la dieta, el desbridamiento de heridas, como será apropiado para la afección que se trata. Estos se pueden realizar secuencialmente (por ejemplo, el tratamiento con un compuesto usado en la invención tras la cirugía o radiación) o en combinación (por ejemplo, además de un régimen de dieta).

Los agentes activos adicionales se pueden emplear en general en cantidades terapéuticas como se indica en el Vademécum (PDR) 53ª edición (1999), o dichas cantidades terapéuticamente útiles como serían conocidas por un experto ordinario en la técnica. Los compuestos usados en la invención y los otros agentes terapéuticamente activos pueden administrarse a la dosis clínica máxima recomendada o en dosis más bajas. Los niveles de dosificación de los compuestos activos en las composiciones de la invención pueden variarse para obtener una respuesta terapéutica deseada dependiendo de la vía de administración, la gravedad de la enfermedad y la respuesta del paciente. La combinación puede administrarse como composiciones separadas o como una forma de administración única que contiene ambos agentes. Cuando se administran como una combinación, los agentes terapéuticos pueden formularse como composiciones separadas que se administran al mismo tiempo o en tiempos diferentes o los agentes terapéuticos se pueden dar como una sola composición.

La composición farmacéutica puede comprender los compuestos solos o puede incluir además un vehículo farmacéuticamente aceptable y puede estar en forma sólida o líquida tal como comprimidos, polvos, cápsulas, gránulos, soluciones, suspensiones, elixires, emulsiones, geles, cremas, o supositorios, incluyendo supositorios rectales y uretrales. Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen gomas, almidones, azúcares, materiales de celulosa y mezclas de los mismos. La preparación farmacéutica que contiene los compuestos de esta invención se puede administrar a un sujeto mediante, por ejemplo, implantación subcutánea de un gránulo; en una realización adicional, el gránulo proporciona la liberación controlada de los compuestos durante un periodo de tiempo. La preparación también se puede administrar por inyección intravenosa, intraarterial, o intramuscular de una

preparación líquida, administración oral de una preparación líquida o sólida, o mediante aplicación tópica. La administración también puede llevarse a cabo mediante el uso de un supositorio rectal o un supositorio uretral. La composición farmacéutica también puede ser una formulación parenteral; en una realización, la formulación comprende un liposoma que incluye un complejo de un compuesto utilizado en esta invención.

5 La composición farmacéutica se puede preparar mediante procesos de disolución, mezclado, granulado o de formación de comprimidos conocidos. Para la administración oral, los compuestos o sus derivados fisiológicamente tolerados tales como sales, ésteres, *N*-óxidos se mezclan con aditivos habituales para este propósito, tales como vehículos, estabilizantes o diluyentes inertes y se convierten por métodos habituales en una forma adecuada para la
10 administración, tales como comprimidos, comprimidos recubiertos, cápsulas de gelatina dura o blanda, soluciones acuosas, alcohólicas u oleosas. Ejemplos de vehículos inertes adecuados son bases de comprimidos convencionales tales como lactosa, sacarosa o almidón de maíz en combinación con aglutinantes como acacia, almidón de maíz, gelatina o con agentes disgregantes tales como almidón de maíz, almidón de patata, ácido algínico o con un lubricante de disgregación tal como ácido esteárico o estearato de magnesio. Ejemplos de vehículos o
15 disolventes oleosos adecuados son aceites vegetales o animales tales como aceite de girasol o aceite de hígado de pescado. Las preparaciones pueden efectuarse tanto como gránulos secos como húmedos.

Para la administración parenteral (subcutánea, intravenosa, intraarterial, o intramuscular), los compuestos o sus derivados fisiológicamente tolerados tales como sales, ésteres, *N*-óxido se convierten en una solución, suspensión,
20 o emulsión, si se desea con las sustancias habituales y adecuadas para este propósito, por ejemplo, solubilizantes u otros auxiliares. Algunos ejemplos son: líquidos estériles tales como agua y aceites, con o sin la adición de un tensioactivo y otros adyuvantes farmacéuticamente aceptables. Aceites ilustrativos son los de petróleo, animales, vegetales o sintéticos, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de soja, o aceite mineral. En general, agua, solución salina, dextrosa acuosa y soluciones de azúcar relacionadas y glicoles tales como propilenglicoles o polietilenglicol son vehículos líquidos preferidos, particularmente para soluciones inyectables.
25

La preparación de composiciones farmacéuticas que contienen un componente activo es bien conocida en la técnica. Generalmente, tales composiciones se preparan como un aerosol del polipéptido administrado a la nasofaringe o como inyectables, bien como soluciones o suspensiones líquidas, sin embargo, también se pueden
30 preparar formas sólidas adecuadas para solución en, o suspensión en, líquido antes de la inyección. La preparación también se puede emulsionar. El ingrediente terapéutico activo se mezcla a menudo con excipientes que son farmacéuticamente aceptables y compatibles con el principio activo. Excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol, y combinaciones de los mismos. Además, si se desea, la composición puede contener cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, o
35 agentes tampón de pH que mejoran la eficacia del principio activo.

Para la administración tópica a las superficies corporales usando, por ejemplo, cremas, geles, gotas, y similares, los compuestos o sus derivados fisiológicamente tolerados tales como sales, ésteres, *N*-óxidos, se preparan y aplican como soluciones, suspensiones, o emulsiones en un diluyente fisiológicamente aceptable con o sin un vehículo farmacéutico.
40

En otra realización, el compuesto activo puede administrarse en una vesícula, en particular un liposoma (ver Langer, Science 249:1527-1533 (1990); Treat et al., en Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, López-Berestein y Fidler (eds.), Liss, Nueva York, pp 353-365 (1989); López-Berestein, ibid, pp 317-327.; véase en general
45 ibid).

En una realización, la presente invención proporciona el uso en preparaciones combinadas. En una realización, el término "una preparación combinada" define especialmente un "kit de partes" en el sentido de que los compañeros de combinación como se definió anteriormente se pueden administrar independientemente o mediante el uso de
50 diferentes combinaciones fijas con cantidades distinguidas de los compañeros de combinación, es decir, simultáneamente, concurrentemente, separadamente o secuencialmente. En algunas realizaciones, las partes del kit de partes pueden administrarse, por ejemplo, simultáneamente o de forma cronológicamente escalonada, es decir en diferentes puntos temporales y con intervalos de tiempo iguales o diferentes para cualquier parte del kit de partes. La relación entre las cantidades totales de los compañeros de combinación, en algunas realizaciones, puede administrarse en la preparación combinada. En una realización, la preparación combinada se puede variar, por
55 ejemplo, con el fin de hacer frente a las necesidades de una subpoblación de pacientes a ser tratados o las necesidades del paciente individual cuyas diferentes necesidades pueden deberse a una enfermedad en particular, la gravedad de una enfermedad, la edad, el sexo o el peso corporal como puede ser fácilmente evidente para una persona experta en la técnica.
60

Tratamiento de afecciones o enfermedades susceptibles de verse afectadas por la activación y/o la expresión de la telomerasa

Esta invención proporciona compuestos y composiciones farmacéuticas que comprenden los mismos, para su uso
65 en el tratamiento de afecciones y/o enfermedades susceptibles de ser afectadas por el aumento de la expresión y/o actividad de la telomerasa como se define en las reivindicaciones. Estos compuestos interactúan con la enzima

telomerasa y estimulan y/o aumentan la expresión y/o actividad de la telomerasa en los tejidos y células de un sujeto. Tal actividad puede ser reducida o estar ausente, lo que tiene como resultado el desarrollo de, o aumento de la patogénesis o síntomas asociados con una enfermedad, trastorno o afección en el sujeto. Tal enfermedad, trastorno o afección puede comprender, entre otras, a) la enfermedad de Alzheimer; b) la enfermedad de Parkinson; c) la enfermedad de Huntington; d) ictus; e) daño nervioso, enfermedad de la motoneurona, esclerosis múltiple (EM), lesión del sistema nervioso central y periférico incluyendo lesión de la médula y los incidentes cerebrovasculares; f) enfermedades de la piel relacionadas con la edad tales como la atrofia y adelgazamiento dérmico, elastolisis y arrugamiento de la piel, hiperplasia o hipoplasia de la glándula sebácea, lentigo senil, anomalías de pigmentación, encanecimiento del cabello y la pérdida o adelgazamiento del cabello (calvicie, alopecia) o úlceras de la piel crónicas; g) enfermedad degenerativa de las articulaciones; h) osteoporosis, artrosis y otras afecciones degenerativas del sistema esquelético; i) enfermedades del sistema vascular relacionadas con la edad y el estrés incluyendo aterosclerosis, calcificación, trombosis, hipertensión y aneurisma; j) degeneración macular relacionada con la edad; k) SIDA; l) deterioro del sistema inmunitario relacionado con la edad y el estrés, incluyendo el deterioro del recambio de tejidos, que se producen con el envejecimiento natural, el cáncer, terapia del cáncer, infecciones agudas o crónicas, enfermedades inflamatorias degenerativas o con trastornos genéticos que provocan un recambio celular acelerado y anemias relacionadas y otras afecciones degenerativas; m) cicatrización de heridas, quemaduras, abrasiones u otras afecciones agudas o crónicas de la epidermis; n) sarcopenia y/u otra enfermedad o afección muscular; o) defecto de la fase luteínica y/o p) insuficiencia ovárica prematura (insuficiencia ovárica primaria o hipogonadismo hipergonadotrópico); q) alteraciones en la espermatogénesis y/o en la liberación de espermatozoides.

La telomerasa se detecta normalmente en niveles bajos en las células somáticas normales. En la piel, tejidos linfocíticos, tejido endometrial, folículos pilosos y criptas intestinales, células mitóticas activas y células madre, la expresión y/o actividad de la telomerasa se expresa en niveles bajos. La expresión y/o actividad de la telomerasa está regulada a diferentes niveles moleculares, incluyendo la transcripción, el empalme del ARNm y a través de la maduración y modificación de la telomerasa transcriptasa inversa (TERT) y el componente ARN de los telómeros (TERC).

En una realización, los compuestos usados en esta invención activan la telomerasa y, por lo tanto, son útiles los métodos como los descritos en la presente memoria.

La capacidad de un compuesto para aumentar la expresión y/o actividad de la telomerasa en una célula se puede determinar usando el ensayo TRAP (Protocolo de amplificación de repeticiones teloméricas), que se conoce en la técnica (por ejemplo, Kim et al., US-5.629.154; Harley et al, US-5.891.639). La actividad se mide generalmente en comparación con la actividad medida de manera similar en un ensayo de control de tales células (por ejemplo, una actividad de la telomerasa 50 % mayor que la observada en un control de disolvente). Líneas celulares adecuadas para uso en el ensayo, pueden comprender fibroblastos humanos normales (Now) o queratinocitos humanos normales (NHK).

La longitud de los telómeros puede servir como indicador útil para la expresión y/o actividad de la telomerasa. En una realización, la expresión y/o la activación de la telomerasa es importante en el tratamiento de cáncer, el síndrome de envejecimiento prematuro o progeria segmentaria, anomalías genéticas y enfermedades relacionadas con la edad. La longitud de los telómeros tiene distintos patrones de expresión en la progresión de la enfermedad específica y es una función de su activación, por lo tanto, la medición de dicha longitud como una función de tratamiento tiene un valor, en términos de pronóstico de diferentes enfermedades.

La longitud del telómero se puede medir por Southern blot, ensayo de protección de hibridación, fluorescencia por hibridación *in situ*, citometría de flujo, cebado *in situ*, reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa y análisis individual de la longitud telomérica, las cuales son todas técnicas conocidas en la técnica (Kah-Wai Lin y Ju Yan, J. Cell. Mol. Med., 2005, Vol 9, Nº 4. 977.989).

Esta invención es útil en métodos de tratamiento de una afección susceptible de ser afectada por la expresión de la telomerasa y/o la activación en un sujeto, comprendiendo el método administrar a un sujeto una cantidad eficaz de un compuesto utilizado en esta invención, en el que el compuesto estimula o aumenta la expresión y/o actividad de la telomerasa en las células o tejido del sujeto, como se define adicionalmente en las reivindicaciones.

En una realización, dichas afecciones pueden comprender, por ejemplo, afecciones asociadas con la senescencia celular o con un aumento de la tasa de proliferación de una célula en ausencia de telomerasa, lo que conduce a una pérdida acelerada de repetición de los telómeros. El término "aumento de la tasa de proliferación" se refiere a una mayor tasa de división celular en comparación con células normales de ese tipo celular, o en comparación con células normales dentro de otros individuos de ese tipo celular. La senescencia de esos grupos de células a una edad anormalmente temprana puede conducir eventualmente a la enfermedad.

En algunas realizaciones, la presente invención encuentra aplicación en la mejora de la función inmunitaria en la enfermedad. En algunas realizaciones, la presente invención encuentra aplicación en el aumento de la actividad de los linfocitos T, por ejemplo, la actividad o capacidad de respuesta de los linfocitos T citotóxicos o de rescate de

anergia, lo que se puede aplicar al tratamiento de múltiples enfermedades, por ejemplo, en la infección o neoplasia. En algunas realizaciones, esta invención es particularmente útil en el tratamiento de patógenos altamente resistentes a la terapia convencional, organismos particularmente virulentos u organismos para los que no hay disponibles otras terapias, por ejemplo, organismos resistentes a múltiples fármacos.

5 En otra realización, la afección está relacionada con la fertilidad femenina, incluyendo insuficiencia de la fase luteínica, en la que hay una interrupción en el ciclo menstrual normal de la mujer y el cuerpo no produce suficiente progesterona, lo que tiene como resultado un retraso en el desarrollo del revestimiento de útero (endometrio) o insuficiencia ovárica prematura (insuficiencia ovárica primaria o hipogonadismo hipergonadotrópico), en el que hay
10 una pérdida del funcionamiento normal de los ovarios en una mujer menor de 40 años de edad.

En otra realización, la afección está relacionada con la fertilidad masculina, incluyendo la alteración de la espermatogénesis o de la liberación de espermatozoides.

15 Además, los tipos de células en los que un aumento en la expresión y/o actividad de la telomerasa puede ser terapéuticamente beneficioso incluyen células del hígado, glándulas endocrinas y exocrinas, musculatura lisa o musculatura esquelética.

20 En una realización, se cree que la enfermedad del SIDA está causada por la senescencia temprana de las células CD8+. El envejecimiento de tales células se atribuye no solamente a una cantidad anormal de pérdida de secuencias teloméricas por duplicación celular, sino, además, a la mayor tasa replicativa de las células, de tal manera que el desgaste de los telómeros es mayor de lo normal para ese grupo de células. La invención proporciona así el uso en métodos de tratamiento de un sujeto infectado por el VIH y más particularmente en la reducción de la senescencia temprana de las células CD8+ restringidas por el VIH en un sujeto infectado por el VIH,
25 que comprende administrar a dicho sujeto un compuesto utilizado en esta invención o una composición que comprende el mismo.

30 En una realización un aumento de la expresión y/o actividad de la telomerasa puede beneficiar a las células que no están en división, así como a las células en proliferación, por ejemplo, en afecciones asociadas con una mayor susceptibilidad a la muerte celular debido a estrés, tales como la isquemia en la insuficiencia cardíaca o en el ictus (Schneider, J. Mol. Cell. Cardiol 34(7):717-24; Mattson, Exp Gerontol 35(4):489-502). Esta invención proporciona el uso de métodos de reducción de la muerte celular inducida por estrés o daño del ADN en un sujeto, como un sujeto que experimenta afecciones isquémicas en los tejidos debido a insuficiencia cardíaca o ictus, aumentando la expresión y/o actividad de la telomerasa en las células del sujeto, que comprende administrar a dicho sujeto una
35 composición que comprende un compuesto utilizado en esta invención.

40 En una realización, esta invención proporciona el uso en los métodos de aumento de la expresión y/o actividad de la telomerasa, promoviendo así la curación de heridas, quemaduras, abrasiones u otras afecciones agudas o crónicas de la piel tal como se define en las reivindicaciones, y, en alguna realización, en particular en la epidermis. Se describe un método para tratar una afección aguda o crónica de la piel, mediante la administración a dicho sujeto de un compuesto como se describe en la presente memoria y/o una composición que comprende el mismo. En una realización, la composición se administra por vía tópica a la zona afectada.

45 En otra realización, las afecciones de la piel agudas o crónicas tratadas mediante el uso de esta invención pueden comprender lesiones sufridas por traumatismo, quemaduras, abrasiones, incisiones quirúrgicas, sitios de injerto de donantes y/o lesiones causadas por agentes infecciosos.

50 En otra realización, las afecciones agudas o crónicas de la piel pueden comprender úlcera venosa crónica, úlcera diabética, úlcera de compresión, úlceras por presión y las úlceras o llagas de una superficie mucosa.

55 En otro aspecto, la afección aguda o crónica de la piel puede comprender lesiones superficiales causadas por una afección inflamatoria persistente o infección, o por un defecto genético (como la formación Haloid y anomalías de la coagulación).

60 En un aspecto, los métodos de curación de heridas, quemaduras, abrasiones u otras afecciones agudas o crónicas de la piel comprenden administrar una composición que comprende un compuesto como se describe en la presente memoria para estimular o aumentar la proliferación o migración celular en el sitio de tratamiento, aumentar la densidad de las células epiteliales en el sitio como resultado de la terapia aplicada y por lo tanto el cierre de una herida si está presente, o la restauración de la función fisiológica normal.

65 En algunos aspectos, esta invención es útil en una terapia adyuvante en el tratamiento del cáncer, en combinación con cirugía, radiación, métodos/compuestos quimioterapéuticos e inmunoterapéuticos y en la mejora de la capacidad de respuesta a otras terapias contra el cáncer. En algunos aspectos, los compuestos de esta invención suprimen la latencia del cáncer, es decir, mantener las células neoplásicas en un estado activo por el cual compuestos adicionales que son tóxicos para las células cancerosas son más eficaces. En algunos aspectos, esta invención cuando se usa en la terapia adyuvante para el cáncer aumenta la probabilidad de supervivencia de un sujeto con

cáncer.

Los compuestos y/o composiciones como se describe en la presente memoria pueden actuar como estimulantes de (a) células con capacidad replicativa en el sistema nervioso central, incluyendo astrocitos, células endoteliales y fibroblastos, que desempeñan un papel en estas enfermedades relacionadas con la edad como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington y el ictus o en la reparación de daños en los nervios, enfermedad de la motoneurona, lesión del sistema nervioso central y periférico, incluyendo lesión de la médula y los incidentes cerebrovasculares (ICV), tales como ictus, o en enfermedades tales como la esclerosis múltiple (EM); (b) células con capacidad replicativa finita en el tegumento, incluyendo fibroblastos, células de las glándulas sebáceas, melanocitos, queratinocitos, células de Langerhans y células del folículo piloso que pueden desempeñar un papel en las enfermedades relacionadas con la edad del integumento como la atrofia dérmica, elastosis y arrugamiento de la piel, hiperplasia de la glándula sebácea, lentigo senil, encanecimiento del cabello y pérdida del cabello (calvicie, alopecia), úlceras crónicas de la piel, queratosis y deterioro de la cicatrización de heridas relacionado con la edad; (c) células con capacidad replicativa finita en el cartílago articular, tales como condrocitos y fibroblastos sinoviales lacunales y que desempeñan un papel en la enfermedad degenerativa de las articulaciones; (d) células con capacidad replicativa finita en el hueso, tales como osteoblastos y las células osteoprogenitoras que desempeñan un papel en la osteoporosis; (e) células con capacidad replicativa finita en el sistema inmunitario tales como linfocitos B y T, monocitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, células NK y sus respectivos progenitores, que pueden jugar un papel en el deterioro del sistema inmunitario relacionado con la edad; (f) células con capacidad replicativa finita en el sistema vascular incluyendo células endoteliales, células del músculo liso y fibroblastos adventicios que pueden jugar un papel en las enfermedades del sistema vascular relacionadas con la edad, incluyendo aterosclerosis, calcificación, trombosis, hipertensión y aneurismas; (g) células con capacidad replicativa finita en los órganos del cuerpo, incluyendo, pero sin limitarse a hígado, pulmón y páncreas (células de los islotes), que puede jugar un papel en la enfermedad del hígado (cirrosis), enfermedad pulmonar o diabetes; (h) células con capacidad replicativa finita en el sistema reproductivo, incluyendo las células del folículo del ovario y las células del cuerpo lúteo; (i) células con capacidad replicativa finita en el oído, incluyendo células auditivas ciliadas internas y externas del órgano de Corti y (j) células con una capacidad replicativa finita en el ojo, tales como las células del epitelio pigmentario y las células endoteliales vasculares que pueden desempeñar un papel importante en la degeneración macular relacionada con la edad.

Los siguientes ejemplos se presentan con el fin de ilustrar más completamente las realizaciones preferidas de la invención.

Ejemplos

EJEMPLO 1

Síntesis del compuesto 77

Se añadieron 1,1,1-tris (4-hidroxifenil)etano (4 g, 13 mM), formaldehído (3,6 g, 120 mM) y una solución al 40 % de dimetilamina en agua (15 ml) a una solución de 50 ml de agua y 60 ml de EtOH. La solución se calentó a reflujo durante 2,5 horas. La evaporación parcial del disolvente precipitó un sólido blanco, que se filtró, se lavó con agua y se secó para dar 7,85 g de sólido blanco de compuesto 77, 93 % de rendimiento, $pf = 169^\circ$.

RMN $CDCl_3$ δ 6,64 (6H, s, ArH), 3,40 (12H, s, CH_2), 2,22 (36H, s, N- CH_3), 2,06 (3H, s, C- CH_3).

EJEMPLO 3

Síntesis del compuesto 78

1,1,1-tris (4-hidroxifenil)etano (1,53 gr, 5 mM), formaldehído (1,35 gr, 45 mM) y 1-metil piperazina (2,5 ml, 50 mM) en 20 ml de agua y 25 ml de EtOH se calentaron a reflujo durante 3 horas. La evaporación proporcionó un sólido que por CCF y RMN contenía 2 productos que no eran el material de partida. Se añadieron formaldehído (0,75 gr, 25 mM) y 1-metilpiperazina (1,5 ml, 30 mM) a 5 ml de agua y 10 ml de EtOH y la reacción se calentó a reflujo durante 4 horas. La evaporación y el tratamiento dieron 3,3 g de un sólido de color amarillo claro a blanco, rendimiento 67 %, $pf = 63^\circ$. Soluble en etanol y muy buena solubilidad en agua.

RMN $CDCl_3$ δ 6,67 (6H, s, ArH), 3,53 (12H, s, CH_2), 2,44 (48H, m a, anillo de piperazina), 2,26 (18H, s, N- CH_3), 2,00 (3H, s, C- CH_3).

EJEMPLO 5

Síntesis del compuesto 81

El compuesto 81 se sintetizó por un procedimiento análogo al descrito en el Ejemplo 1. Se obtuvo un sólido blanco. $pf = 135^\circ$.

RMN CDCl₃ δ 6,68 (6H, s, ArH), 3,61 (12H, s, CH₂), 2,51 (24H, t a, anillo N-CH₂), 2,03 (3H, s, C-CH₃), 1,76 (24H, t a, anillo N-CH₂).

EJEMPLO 6

5

Síntesis del compuesto 82

El compuesto 82 se sintetizó por un procedimiento análogo al descrito en el Ejemplo 1. Se obtuvo un sólido blanco. pf = 212°.

10

RMN CDCl₃ δ 6,68 (6H, s, ArH), 3,69 (24H, t, J = 4,5 Hz, anillo N-CH₂), 3,52 (12H, s, CH₂), 2,45 (24H, t a, anillo O-CH₂), 2,03 (3H, s, C-CH₃).

EJEMPLO 7

15

Síntesis del compuesto 79

Etapa 1: El compuesto 77 (2,98 g, 4,6 mM), preparado por un proceso como el descrito en el Ejemplo 1, se añadió a 20 ml de anhídrido acético y se calentó a 100° durante 4 horas. La mezcla se enfrió y se añadió agua. La mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente y después se extrajo con CH₂Cl₂. El disolvente se evaporó para dar un derivado nona-acetato como un aceite amarillo y se purificó adicionalmente por cromatografía (gel de sílice; MeOH 1 %/CH₂Cl₂) para dar 3,2 g de un aceite viscoso de color amarillo, rendimiento 80 %.

20

Etapa 2: Se añadió una solución de KOH (4 g) en agua a una solución del nona-acetato de la etapa 1 (2,5 g) en 20 ml de EtOH. La mezcla se agitó durante 20 horas a temperatura ambiente. La mezcla se acidificó con HCl y se extrajo con CH₂Cl₂. El disolvente se evaporó y dio 2,2 g de un aceite de color amarillo que se purificó adicionalmente mediante cromatografía en columna (gel de sílice; MeOH 2 %/CH₂Cl₂) y recristalizó en tolueno-hexano para dar 1 g del compuesto 79, 53 % de rendimiento, sólido blanco, pf 78°. CCF - Rf = 0,55 en MeOH 5 %/CH₂Cl₂.

25

RMN CDCl₃ δ 7,93 (3H, s, OH), 6,79 (6H, s, Ar-H), 4,54 (12H, s, Ar-CH₂), 3,55 (12H, c, J = 7,0 Hz, CH₂), 2,05 (3H, s, C-CH₃), 1,22 (18H, t, J = 7,0 Hz, CH₃).

30

EJEMPLO 8

35

Síntesis de 1,1,1-tris(4-hidroxi-3,5-dibromo-fenil)-etano (Compuesto 68)

Etapa 1: Se añadió durante una hora una solución de NaOH (1 g, 25 mM) en 10 ml de agua y sulfato de dimetilo (5,1 gr, 40 mM)(relación molar 1:8) y simultáneamente, en porciones a una solución de 1,1,1-tris(4-hidroxifenil)-etano (1,53 g, 5 mM) en 20 ml de etanol y 10 ml de agua. La solución se calentó a reflujo durante 1 hora y se agitó 70 horas a TA. El precipitado blanco se filtró, se lavó con agua y se secó para dar 1,74 g de 1,1,1-tris(4-metoxifenil)-etano. La recristalización dos veces en 50 ml de etanol dio 1,15 gr de cristales blancos, 66 % de rendimiento y pf 160°. TLC Rf = 0,85 en CH₂Cl₂.

40

RMN CDCl₃ δ 6,99, 6,79(12H, ABc, J_{AB}=8,8 Hz), 3,78 (9H, s, OCH₃), 2,11(3H, s, CH₃).

45

Etapa 2: A una solución de 1,1,1-tris(4-metoxifenil)-etano (0,49 g, 1,4 mM), de la etapa 1, en 22 ml en 1, 2-dicloroetano, se añadió por partes una solución de bromo (1,65 g, 10,2) (relación 7,3:1) en 5 ml de 1,2-dicloroetano. La solución se agitó a TA durante una noche y se calentó durante 3 horas a 70° y se trató (tiosulfato de sodio) para dar 1,0 gr del producto bruto. La CCF no mostraba material de partida, pero la RMN mostraba mezclas, lo que indica que la bromación no fue completa (m a 6,90 ppm y 4-metoxi). El sólido se bromó de nuevo con 1 g de bromo y se sometió a reflujo 18 horas. La mezcla se trató como anteriormente y se trituró con etanol caliente para dar 0,27 g de un sólido blanco, rendimiento 23 %, pf = 160°. CCF Rf = 0,95 en CH₂Cl₂.

50

RMN CDCl₃ δ 7,16 (6H, s, ArH), 3,92, 3,91 (relación 6:4) (9H, 2s, OCH₃), 2,04, 2,03 (relación 4:6)(3H, s, CH₃).

55

EJEMPLO 10

Reparación de fragmentos bicatenarios de ADN utilizando la telomerasa

Con el fin de evaluar la activación y/o expresión de la telomerasa, se llevó a cabo un ensayo de reparación del ADN. Los fragmentos de ADN fueron generados por radiación iónica. Todos los compuestos incrementaron la reparación. Estos resultados indican que la actividad y/o expresión de la telomerasa proporcionaba estabilidad en condiciones de estrés.

60

65

EJEMPLO 11

Efectos de los compuestos activadores de la tri-fenil telomerasa sobre la prolongación de la vida con nematodos

5 Se administró a nematodos (*C. elegans*) los compuestos activadores de la tri-fenil telomerasa presentados en las tablas siguientes y la actividad y/o expresión de la telomerasa se midió en términos de prolongación de la vida de los nematodos. Los nematodos crecieron con los activadores a concentración 50 micromolar y se midió la media, la máxima y la semivida del Compuesto 68 y el Compuesto 77, dos moléculas representativas, frente a la del control (Fig. 8). Los valores representan la media de vida.

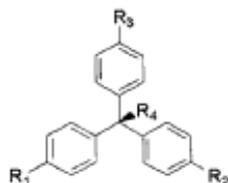
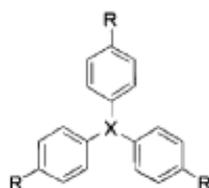
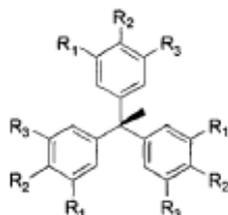


Tabla 1

Nº compuesto	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Prolongación de la vida %
1	OH	OH	OH	CH ₃	30



Nº compuesto	R	X	Vida %
62	OCH ₃	P	29



Nº compuesto	R ₁	R ₂	R ₃	Vida %
68	Br	OH	Br	13
77	CH ₂ -Dimetilamino	OH	CH ₂ -Dimetilamino	43
78	CH ₂ -Metilpiperazina	OH	CH ₂ -Metilpiperazina	36
79	CH ₂ OEt	OH	CH ₂ OEt	16
81	CH ₂ - pirrolidina	OH	CH ₂ - pirrolidina	
82	CH ₂ - morfolina	OH	CH ₂ - morfolina	

EJEMPLO 12

Efectos de los compuestos activadores de la tri-feniltelomerasa sobre las células de glioblastoma humanas

25 Los compuestos 1, 62, 68, 77 y 79 (mencionados en las tablas anteriores) fueron examinados para determinar la activación y/o expresión de la telomerasa en las células de glioblastoma. Los compuestos 79 y 68 se sintetizaron como se ha descrito anteriormente. Los compuestos 1 y 62 están disponibles comercialmente. Se añadió 1 µM de proteínas celulares nucleares (como la fuente de telomerasa) a una mezcla de reacción específica de telomerasa y se llevó a cabo un ensayo de amplificación de la repetición de la telomerasa (TRAP) en ausencia o en presencia de activadores de telomerasa (Compuestos 79, 68, 1 y 62). Los productos de reacción se analizaron en PAGE seguido por autorradiografía. Se calculó el % de actividad y/o expresión de la telomerasa.

Células de glioblastoma U-251 se trataron con diferentes concentraciones de los compuestos de la presente invención durante 1 o 3 horas. El medio de cultivo se retiró y las células se lavaron varias veces con PBS. El extracto nuclear con Chaps se llevó a cabo mediante la metodología estándar y la actividad de la telomerasa se determinó por TRAP utilizando nucleótidos radiactivos. En la Fig. 1A se muestra una imagen representativa de varios experimentos que muestran los productos de la actividad de la telomerasa observados mediante el ensayo TRAP. Las células fueron tratadas con el Compuesto 68 a 1 (carriles 2 y 4) o 0,25 μ M (carriles 3 y 5) durante 1 (carriles 2-3) o 3 (carriles 4-5) horas, respectivamente. El carril 1 muestra sólo el tratamiento con vehículo. La cuantificación de la actividad de la telomerasa a partir de múltiples experimentos se realizó usando un contador de centelleo β midiendo el marcaje radiactivo total de los productos de la telomerasa, y la actividad de la telomerasa en cada muestra se calculó en relación al patrón interno. El porcentaje de activación de la telomerasa (de las células de control tratados con el vehículo sólo) se determinó para los compuestos de la presente invención (Fig. 1B). Los compuestos de la presente invención incrementaron significativamente la actividad de la telomerasa en las células tratadas y el nivel de activación era dependiente de la naturaleza del compuesto, la concentración y el tiempo de exposición de las células a los compuestos de la presente invención.

El efecto de los compuestos de la presente invención sobre el nivel de proteína de la telomerasa y de tratamiento a largo plazo de una sola dosis del Compuesto 68 sobre la telomerasa fue probado exponiendo las células durante diversos intervalos (3-24 h) a 1 μ M del compuesto y detectando el nivel de proteína de la telomerasa por transferencia Western con el anticuerpo anti-telomerasa. El compuesto 68 aumentaba el nivel de proteína de la telomerasa en las células tratadas (Fig. 2A). Se observó un aumento dependiente del tiempo en la telomerasa, alcanzando la activación un máximo al cabo de 1-3 h de tratamiento y luego, decreciendo gradualmente. El nivel de actividad de la telomerasa fue sólo ligeramente superior en comparación con el observado en las células tratadas con vehículo después de 24 h (Fig. 2B). No se observaron cambios en el nivel de la proteína β -actina (panel inferior) u otras enzimas nucleares tales como la topoisomerasa I, lo que sugiere que una dosis única causa una rápida activación específica de la telomerasa, aunque esta activación es transitoria y el nivel de la telomerasa volvió a su valor basal 24 h después del tratamiento, lo que indica una capacidad de los compuestos de la presente invención para controlar la activación de la telomerasa.

También se realizaron experimentos para determinar el efecto de los compuestos de la presente invención sobre el nivel de ARNm de la telomerasa (incluyendo los ARNm de longitud completa y la variante de corte y empalme telomerasa-ARNm). Las células se trataron con una dosis única de 1 mM del compuesto 68 durante diversos intervalos (1-24 h). Se prepararon extractos de ARN total y concentraciones iguales de ARN se analizaron mediante transferencia northern con una sonda específica hTERT. La Fig. 3A muestra los ARNm de longitud y las variantes de corte y empalme de la telomerasa en las células no tratadas de control (carriles 1,2). El nivel del ARNm de longitud completa, así como las variantes de corte y empalme de ARNm aumentaron significativamente con el tiempo en las células tratadas con compuestos de la presente invención (hasta 4,5 veces de control) (Fig. 3B, carriles 3-7). El aumento de la expresión de la telomerasa fue específica ya que no se observó ningún efecto sobre el ARNm de GAPDH (panel inferior). La adición de actinomicina D (un inhibidor de la transcripción del ARN) durante el tratamiento con los compuestos de la presente invención (durante 3 h) suprimió la activación de la expresión de la telomerasa (Fig. 3A y B, comparar carril 8 a 4), lo que sugiere que los compuestos de la presente invención activan la expresión del gen de la telomerasa.

EJEMPLO 13

Efectos de los compuestos de la presente invención sobre las células madre mesenquimales humanas

Las células madre mesenquimales humanas se aislaron por aspiración de la cresta ilíaca y se hicieron crecer en cultivo celular durante 6 meses (paso 19) antes de la observación de una disminución significativa en el crecimiento celular. Los compuestos de la presente invención se añadieron directamente al medio de cultivo diariamente durante 3 días. Se observó una supervivencia y proliferación de las hMSC significativa tras el tratamiento con diversos compuestos de la presente invención (Fig. 4).

La posibilidad de que compuestos de la presente invención potencien la supervivencia y la proliferación de las hMSC por la activación de TERT se examinó mediante el cultivo de hMSC (p 3) en un portaobjetos de cámara de cultivo de tejidos con 17×10^3 células/pocillo durante 60 h. Se añadieron los compuestos de la presente invención durante 6 h con medio fresco. Se llevó a cabo la inmunofluorescencia con un anticuerpo anti-hTERT (primer anticuerpo) y un anticuerpo secundario fluorescente cy3. El núcleo fue teñido con DAPI. Los compuestos de la presente invención activaban la expresión de la telomerasa en las hMSC (Fig. 5). La expresión de la proteína de la telomerasa se observó tanto en el citoplasma como en el núcleo. El grado de activación de la expresión de la telomerasa fue Compuesto 68>79>77. La cuantificación de la actividad de la telomerasa en las hMSC se realizó por PCR en tiempo real (kit de detección de telomerasa cuantitativa) en extractos nucleares derivados de hMSC tratadas con el compuesto 79 (250 nM) durante 6 o 24 h. El compuesto 79 aumentaba la actividad de la telomerasa en las hMSC en 12 o 6 veces de una manera dependiente del tiempo (Fig. 5B).

EJEMPLO 14**Efectos de los compuestos de la presente invención sobre queratinocitos humanos**

5 Se obtuvieron queratinocitos humanos que habían perdido su capacidad para proliferar (en su quinto paso) de un banco de piel local y se trataron con el compuesto 68 durante 24 h. Se examinó la viabilidad celular, el número de células y la morfología. Las células tratadas con compuestos de la presente invención mostraron una proliferación celular significativa (2-4 veces) y se observaron células viables (Fig. 6). El compuesto 79 exhibió un mejor efecto de supervivencia de las células que el compuesto 68. Estos resultados apoyan un papel para los compuestos de la presente invención en el trasplante de piel, cicatrización de heridas, úlceras crónicas de la piel y otras afecciones de la piel.

EJEMPLO 15**Efectos de los compuestos de la presente invención sobre células epiteliales pigmentadas de retina humana**

15 La exposición crónica de las células epiteliales pigmentadas de retina humana (RPE) a estrés oxidativo las predispone al desarrollo de la degeneración macular relacionada con la edad (AMD). Las células RPE humanas se expusieron a estrés oxidativo mediante el tratamiento con H₂O₂ (1 mM) durante 24 horas y H₂O₂ (0,5 mM) durante otras 24 horas. Las células se trataron a continuación diariamente durante dos días con los compuestos indicados en la ausencia de H₂O₂. Se observó un aumento del crecimiento celular como una consecuencia del tratamiento con los compuestos (Fig. 7a). La actividad de la telomerasa estaba aumentada en las células RPE tratadas con los compuestos 68 y 79 en 30 y 50 veces, respectivamente (Fig 7B). Estos resultados sugieren un papel para los compuestos de la presente invención en el tratamiento de la degeneración macular y otras enfermedades de la retina.

EJEMPLO 16**Prolongación de la supervivencia en *C. elegans***

30 La supervivencia de *C. elegans*, un nematodo que normalmente sobrevive durante 12-14 días, representa un modelo aceptable para el estudio de la prolongación de la vida. Se administró a los nematodos compuestos activadores de la tri-fenil telomerasa y se determinó su efecto sobre la prolongación de la vida de los nematodos. Los nematodos se cultivaron con los activadores a una concentración de 50 micromolar y se midió la media, la máxima y la semivida en comparación con los controles no tratados. La vida aumentó en 13-43 % (Tabla 2) y la mediana de la vida aumentó aproximadamente 2 veces (de 12 días a 22 días, como se muestra en la Figura 8).

Tabla 2: Prolongación de la supervivencia de *C. elegans* por compuestos telomerasa

Nº de compuesto	Prolongación de la vida (%)
62	29
68	13
77	43
78	36
79	16

EJEMPLO 17**Activación de la expresión de la telomerasa por los compuestos de la presente invención en células endometriales de rata**

45 Se inyectó a ratas hembras en diestro (la etapa en la que la capa epitelial del endometrio de la rata sufre degradación) por vía subcutánea 6 mg/kg del compuesto 68 o vehículo. Las ratas se sacrificaron 24 h más tarde y se prepararon cortes de endometrio a partir de los cuernos uterinos de ratas tratadas y no tratadas y se analizó por procedimientos histológicos y por tinción inmunohistoquímica. Los cortes endometriales se tiñeron con hematoxilina-eosina. El tratamiento con compuestos de la presente invención impide la degradación de la capa epitelial endometrial. Además, morfológicamente, el tejido endometrial se parecía a la estructura de las etapas proliferantes (proestro y estro) (Fig. 9A, B). La activación de la expresión de la telomerasa en las células endometriales de las ratas tratadas fue examinada por inmunohistoquímica con anticuerpo anti-telomerasa (Fig. 9C-F). Hubo un aumento significativo en la tinción de la telomerasa en el tejido endometrial de la rata inyectada con compuestos de la presente invención, especialmente en las capas epiteliales del lumen endometrial y de la capa epitelial de las glándulas secretoras (compárese Fig. 9C y D, E y F). Además, la actividad de la telomerasa se midió en extractos nucleares derivados del endometrio de los diversos grupos de tratamiento. Se observó un aumento significativo de 4-8 veces en la actividad de la telomerasa en las ratas inyectadas con los compuestos de la presente invención (Fig. 9G), lo que indica que los compuestos de la presente invención inyectados por vía subcutánea en el cuello alcanzaban el tejido endometrial, activaban la telomerasa y provocaban la proliferación de tejido. Estos datos apoyan

un papel para los compuestos de esta invención de activación de la telomerasa en animales y que afectan a la proliferación de un tejido *in vivo*. Los datos apoyan un papel para el tratamiento de la endometriosis con los compuestos de esta invención.

5 **EJEMPLO 18**

Activación de la telomerasa de las células de la corteza cerebral de rata por los compuestos de la presente invención

10 Se examinó el efecto de los compuestos de la presente invención inyectados por vía subcutánea en ratas hembra y ratones macho adulto sobre la expresión de la telomerasa en varias regiones del cerebro. La colocación de la telomerasa y DAPI (DAPI o 4',6-diamidino-2-fenilindol), una tinción fluorescente de unión a ADN demostró la activación y/o expresión en estas células como consecuencia del tratamiento. Se observó una expresión de la telomerasa muy baja en células específicas en diversas áreas del SNC (Figs. 10 y 11). Las inyecciones de los compuestos 79 y 77 en la rata activaron significativamente la expresión de la telomerasa en la corteza cerebral, pero el compuesto 68 no lo hizo, lo que indica que los compuestos 79 y 77, pero no el compuesto 68, puede atravesar la barrera hematoencefálica (BBB) (Fig. 10).

20 El compuesto 79 se inyectó por vía subcutánea en ratones macho de tres meses de edad. Los ratones se sacrificaron 24 h más tarde y se aislaron la corteza, el cerebelo, el hipocampo, el hipotálamo, el tronco cerebral y el bulbo olfativo y se sometieron a inmunofluorescencia. Se observó una expresión de la telomerasa baja en la mayoría de las regiones del cerebro examinadas excepto en las células de Purkinje en el cerebelo (Fig. 11). La inyección de compuestos de la presente invención aumentó significativamente y drásticamente la expresión de la telomerasa en las diversas regiones del cerebro. Esta activación parece ser específica de ciertas células neuronales. El compuesto 79, por ejemplo, aumentó la expresión de la telomerasa en las motoneuronas presentes en el tronco cerebral.

30 La confirmación de los resultados de inmunofluorescencia se obtuvo examinando el nivel de enzima proteína TERT en extractos de proteínas nucleares derivados de cerebros extirpados de ratas tratadas o no tratadas con los compuestos de la presente invención. Se realizó un análisis de transferencia Western utilizando anticuerpo específico anti-hTERT y la activación de la telomerasa (%) se determinó y se calculó respecto a los resultados obtenidos con el vehículo. Se observó un aumento significativo (9-13 veces) en la proteína de la telomerasa en células de la corteza cerebral de rata tratadas con compuestos de la presente invención (Fig. 12), lo que respalda un papel para el uso de compuestos de la presente invención en el tratamiento de enfermedades relacionadas con el cerebro.

35 **EJEMPLO 19**

Prevención de la apoptosis inducida por glutamato en el cerebelo de ratón

40 Se examinó la capacidad de los compuestos de la presente invención para prevenir la apoptosis inducida por glutamato en el cerebelo de ratón. Los ratones fueron inyectados con 6 mg/kg del compuesto 79 o sólo con vehículo. Los ratones se sacrificaron 24 h después del tratamiento y se extrajeron sus cerebros. Se prepararon cortes de cerebelo y se sometieron a tratamiento con glutamato en diversas concentraciones durante 30 min. Los cortes se tiñeron con yoduro de propidio y se contó y calculó el número de células apoptóticas utilizando software específico (ImageJ). La prevención de la apoptosis en los ratones tratados con los compuestos de la presente invención se calculó como un porcentaje con respecto a los ratones de control (Fig. 13). Esto apoya un papel para los compuestos de la presente invención en el tratamiento de convulsiones, ictus, enfermedad de Alzheimer, epilepsia, esquizofrenia y adicción al alcohol y opiáceos.

50 **EJEMPLO 20**

Activación de la telomerasa de células de corazón de ratón por los compuestos de la presente invención

55 Se midió la activación de la telomerasa por los compuestos de la presente invención en extractos de proteínas del corazón obtenidas de ratón (Fig. 14). Hubo un aumento significativo en la expresión de la telomerasa de corazón después de la inyección del compuesto 79. Esto apoya un papel para los compuestos de la presente invención en el tratamiento del infarto, la isquemia y la miocarditis.

60 **EJEMPLO 21**

Prevención del daño por medicamentos a embriones por los compuestos de la presente invención

65 La capacidad de los compuestos de la presente invención para prevenir los efectos perjudiciales de los medicamentos sobre el desarrollo embrionario se examinó en ratas. Las ratas hembra fueron tratadas con camptotecina (CPT) (5 mg/kg), un fármaco anti-cáncer y después se inyectaron con el compuesto 68 (6 mg/kg) o vehículo (0,1 %). Los embriones fueron extraídos los días 14-15 de la gestación y se examinó el daño. Los

embriones tratados tanto con CPT como con el compuesto 68 se desarrollaron normalmente, mientras que los embriones tratados con CPT sólo mostraron evidencia de desarrollo anormal (Fig. 15).

EJEMPLO 22

5

Efecto de los compuestos de la presente invención sobre la tumorigenicidad de BCL1

10

Ratones (BALB/c x C57BL/6)F1 fueron inoculados con 10^5 células de linfoma/leucemia de células B (BCL1) murina. Se desarrolló esplenomegalia y linfocitosis (leucemia) en todos los controles y en los ratones tratados con los compuestos activadores de la telomerasa (40 o 80 mg/kg).

Tabla 3

Grupo experimental	Mediana de la supervivencia (intervalo)
BCL 1 sólo	29 (21-35)
BCL 1 + Compuesto 77 10 mM	26 (22-41)

15

Los compuestos activadores de la telomerasa no fomentaron el desarrollo de la leucemia y no acortaron la supervivencia de ratones a los que se inoculó con leucemia. Los compuestos activadores de la telomerasa de la presente invención no facilitaron la progresión del cáncer existente, ni la administración a largo plazo de los compuestos tuvo como resultado el desarrollo de cáncer.

EJEMPLO 23

20

Efecto de los compuestos de la presente invención sobre la enfermedad de injerto contra huésped (EICH) como una función representativa de los linfocitos T

25

Se inocularon ratones (BALB/c x C57BL/6)F1 con 30×10^6 células de bazo C57BL/6 para la inducción de la EICH. Los ratones tratados con el compuesto 77 mostraron signos más graves de EICH aguda, como se demuestra por la pérdida de peso en comparación con los controles no tratados. Estos resultados sugieren que los compuestos de la presente invención se pueden usar como un potente adyuvante.

EJEMPLO 24

30

Efecto de los compuestos de la presente invención sobre la enfermedad injerto contra leucemia (ICL) como un ejemplo representativo de la inmunoterapia por linfocitos T

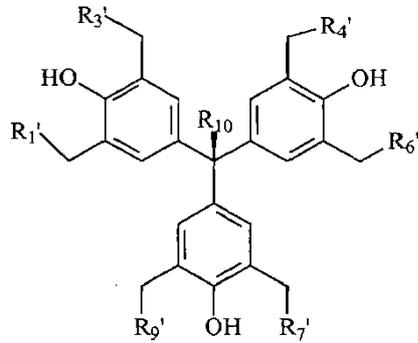
35

Se inocularon ratones (BALB/c x C57BL/6)F1 con 10^5 de BCL1 después de la irradiación corporal total con 400 cGy para permitir el injerto de linfocitos alogénicos para la inducción de efectos de injerto contra leucemia (ICL) mediada por 30×10^6 de células de bazo C57BL/6. La supervivencia de los controles no tratados varió desde 21 hasta 35 días (mediana 29). La supervivencia de los ratones tratados con células madre alogénicas varió desde 13 hasta 22 días, ya que la leucemia activaba una EICH grave. En comparación, la supervivencia de los ratones tratados con células madre alogénicas y compuestos de la presente invención varió desde 37 hasta 74 días, sobreviviendo un ratón 125 días. Esto apoya un papel para los compuestos de la presente invención en el tratamiento de la leucemia.

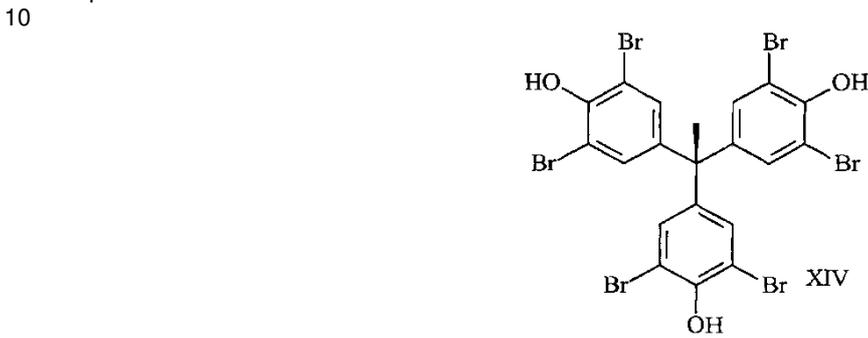
40

REIVINDICACIONES

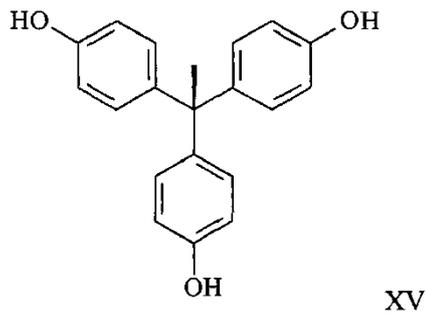
1. Un compuesto representado por la estructura de fórmula VI:



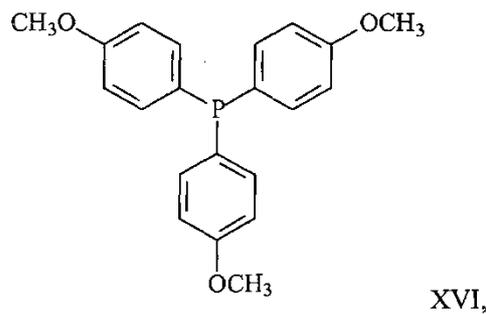
5
 VI
 en la que R₁' , R₃' , R₄' , R₆' , R₇' y R₉' son iguales y se seleccionan de heterocicloalquilo, alcoxi y dialquilamino y R₁₀ es metilo;
 o por la estructura de fórmula XIV:



o por la estructura de fórmula XV:



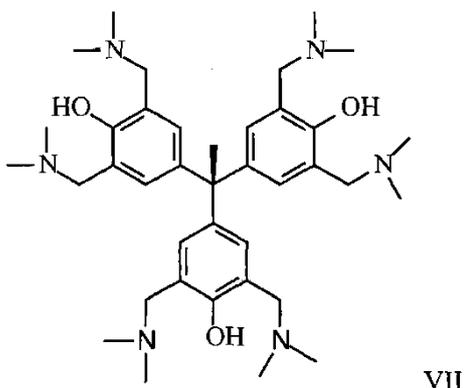
o por la estructura de la fórmula XVI:



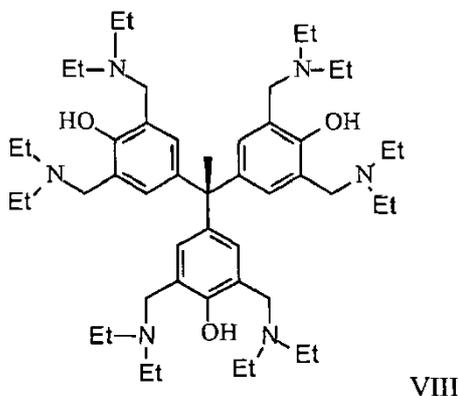
para su uso en el tratamiento en un sujeto de enfermedades que se pueden tratar mediante la estimulación o el aumento de la expresión y/o la actividad de la telomerasa y seleccionadas de una enfermedad neurodegenerativa, lesión del sistema nervioso, enfermedad vascular, una enfermedad o un trastorno asociados al envejecimiento, una enfermedad degenerativa de las articulaciones, una enfermedad degenerativa del sistema esquelético, una enfermedad degenerativa de la musculatura, degeneración macular, infección, deterioro del sistema inmunitario, cáncer, enfermedad degenerativa inflamatoria, un trastorno genético que causa renovación celular acelerada, anemia, infertilidad masculina o femenina y una enfermedad aguda o crónica o trastorno de la piel por contacto de la piel afectada con el compuesto.

5 2. El compuesto para el uso de la reivindicación 1, en donde dicha enfermedad de la piel aguda o crónica o trastorno son una herida, una quemadura, una abrasión, una incisión, un sitio de injerto, una lesión causada por un agente infeccioso, una úlcera venosa crónica, una úlcera diabética, una úlcera por compresión, una úlcera por presión, un dolor o úlcera de la mucosa, melanoma o formación de queloides.

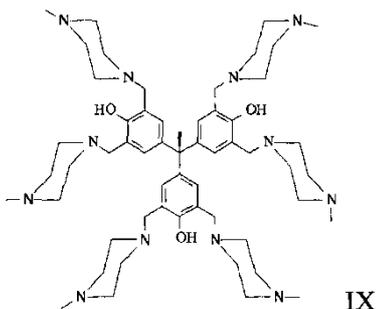
10 3. El compuesto para el uso de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2, en el que dicho compuesto está representado por la estructura de fórmula VII:



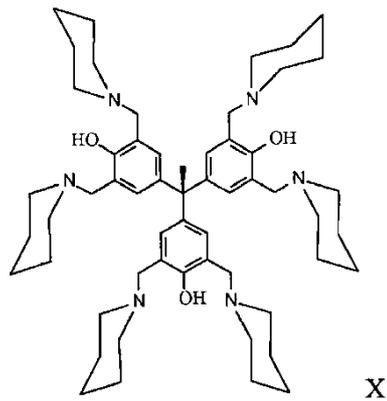
20 o por la estructura de la fórmula VIII:



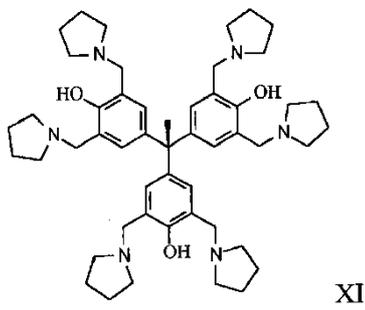
25 o por la estructura de la fórmula IX:



o por la estructura de la fórmula X:

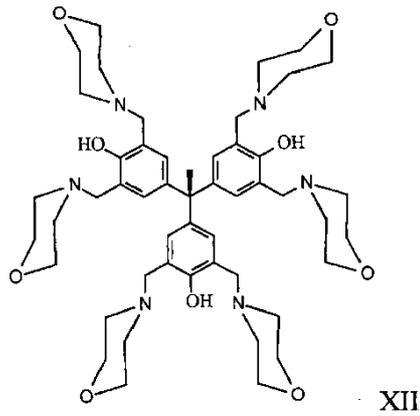


o por la estructura de fórmula XI:



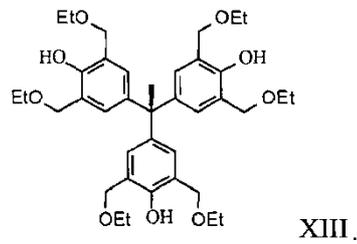
5

o por la estructura de fórmula XII:

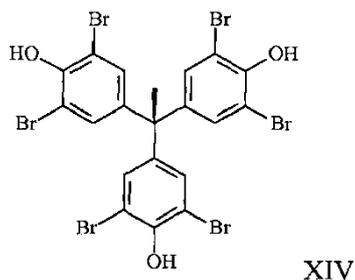


10

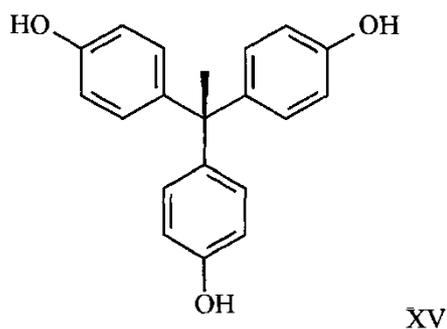
o por la estructura de fórmula XIII:



15 4. El compuesto para el uso de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2, en el que dicho compuesto está representado por la estructura de fórmula XIV:

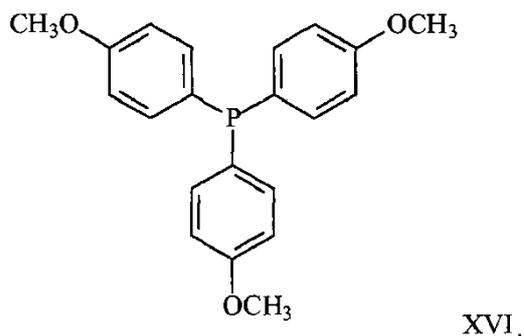


o por la estructura de fórmula XV:



5

o por la estructura de la fórmula XVI:



10

5. Uso de un compuesto representado por la estructura de fórmula VI, XIV, XV o XVI como se define en la reivindicación 1 para el tratamiento de una afección relacionada con la edad que se puede tratar mediante la estimulación o el aumento de expresión y/o de actividad de la telomerasa, en donde la afección relacionada con la edad es arrugamiento de la piel o encanecimiento del cabello.

15

6. El uso de la reivindicación 5, en el que dicho compuesto está representado por la estructura de fórmula VII, VIII, IX, X, XI, XII o XIII como se define en la reivindicación 3.

20

7. El uso de la reivindicación 5, en el que dicho compuesto está representado por la estructura de fórmula XIV, XV o XVI como se define en la reivindicación 4.

Figura 1A

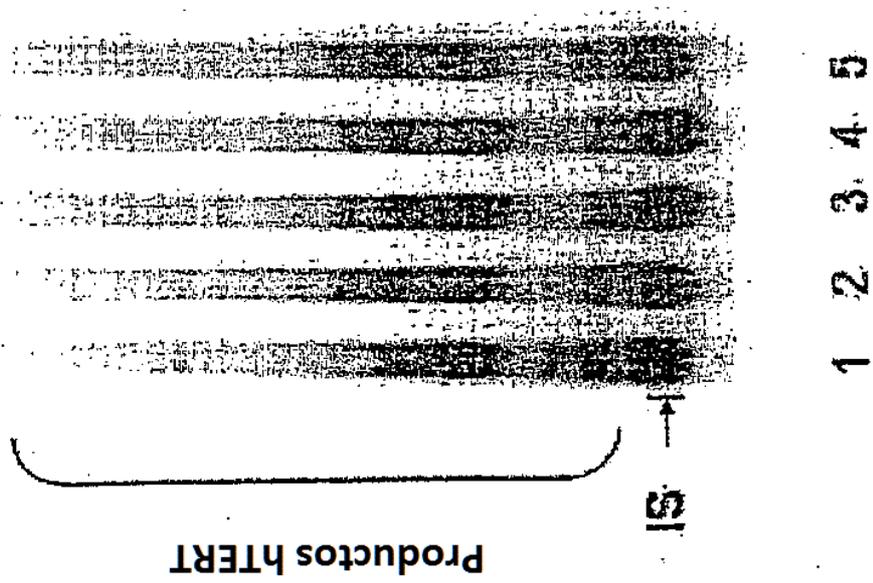


Figura 2B

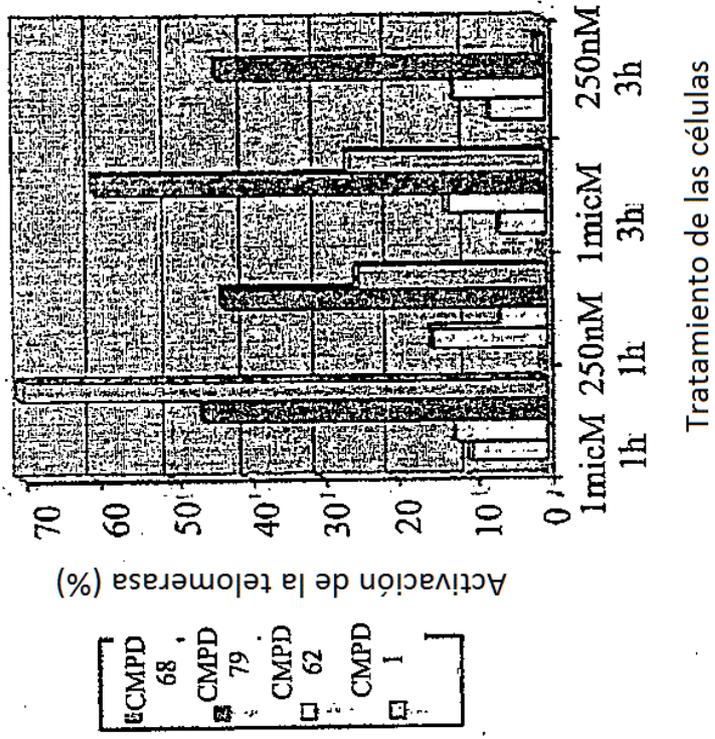


Figura 1

Patrón interno IS

Figura 2A

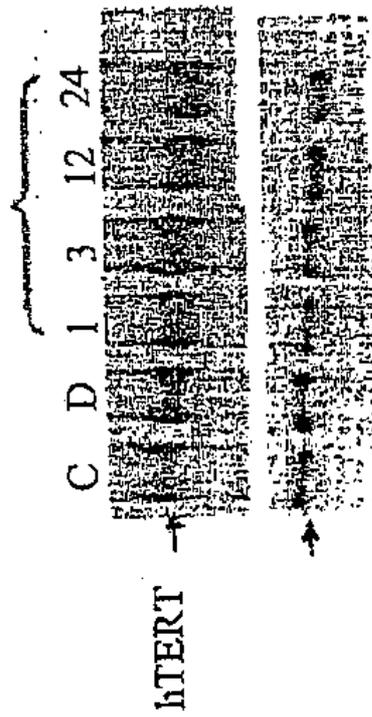
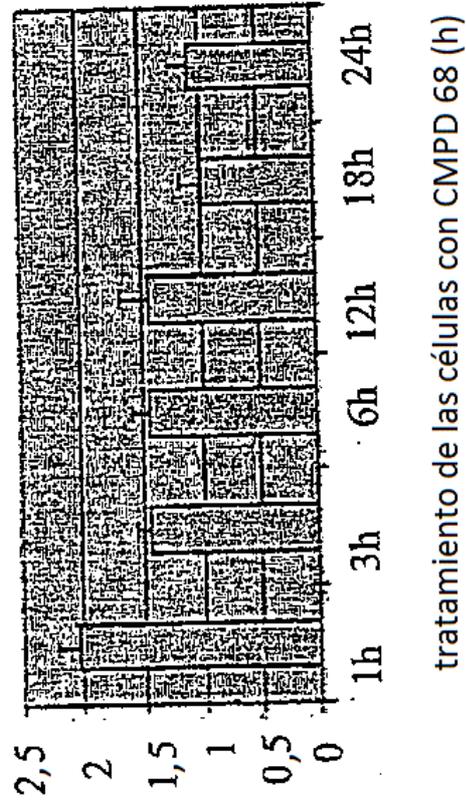


Figura 2B



Nivel de proteína telomerasa [Veces de control]

Figura 2

Figura 3A

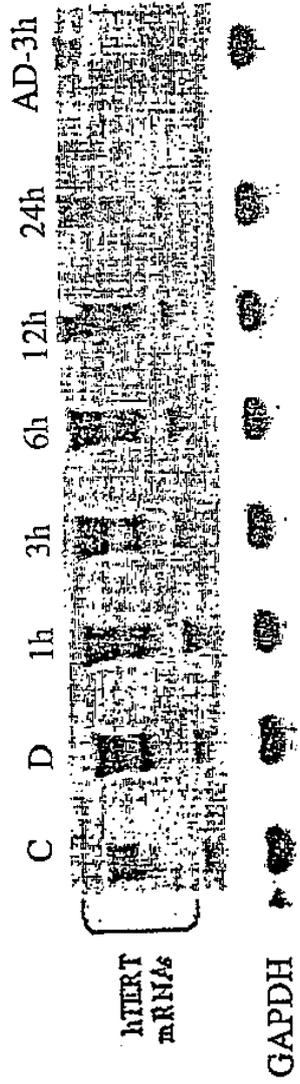
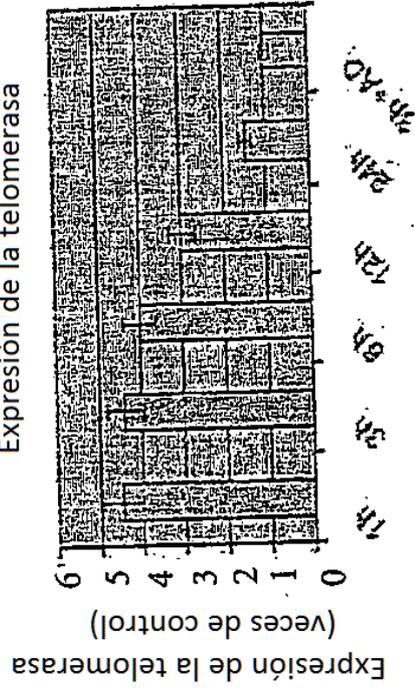


Figura 3B



tratamiento con CMPD 68 - 1 mic a nM
(h)

Figura 3

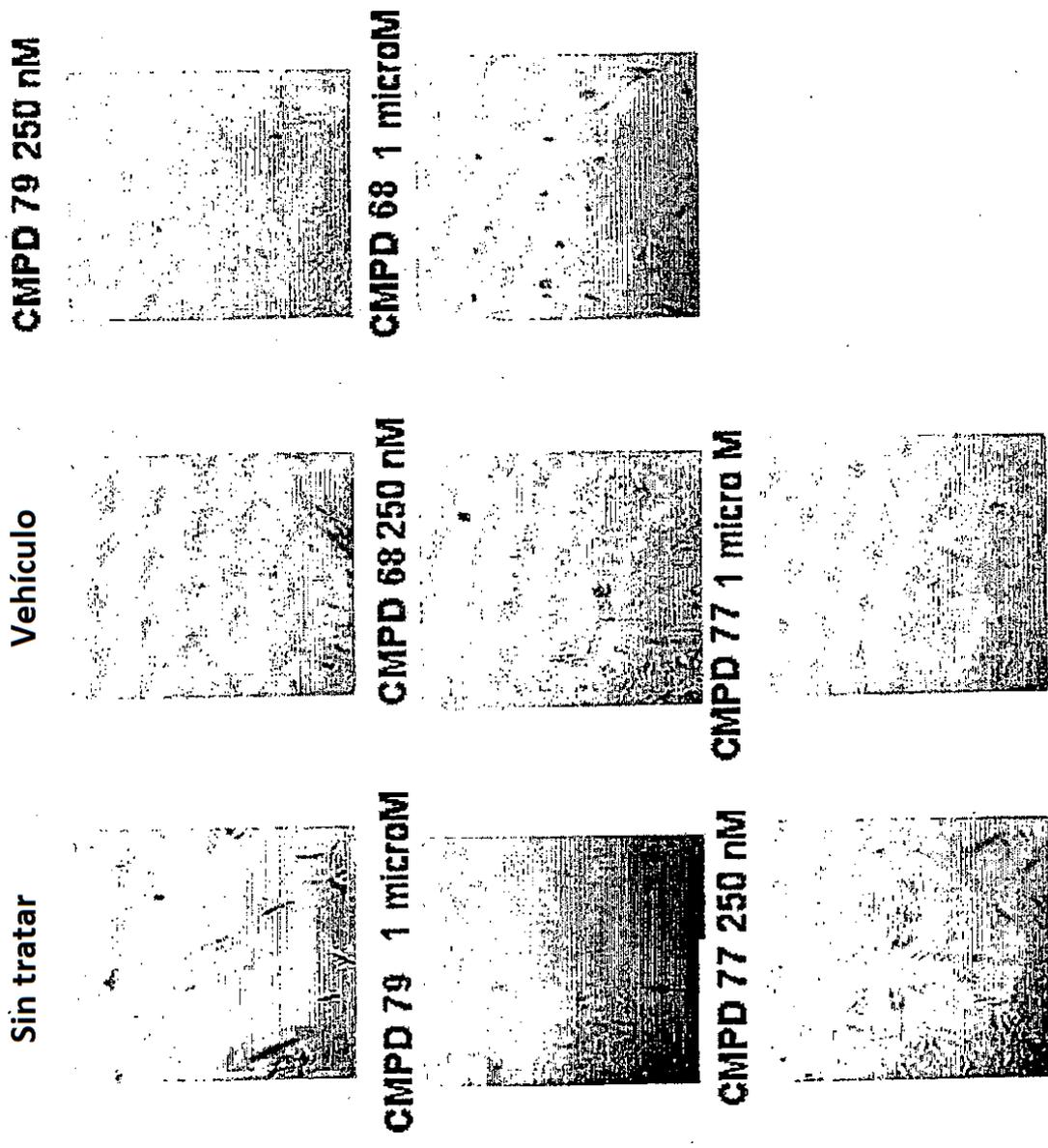


Figura 4

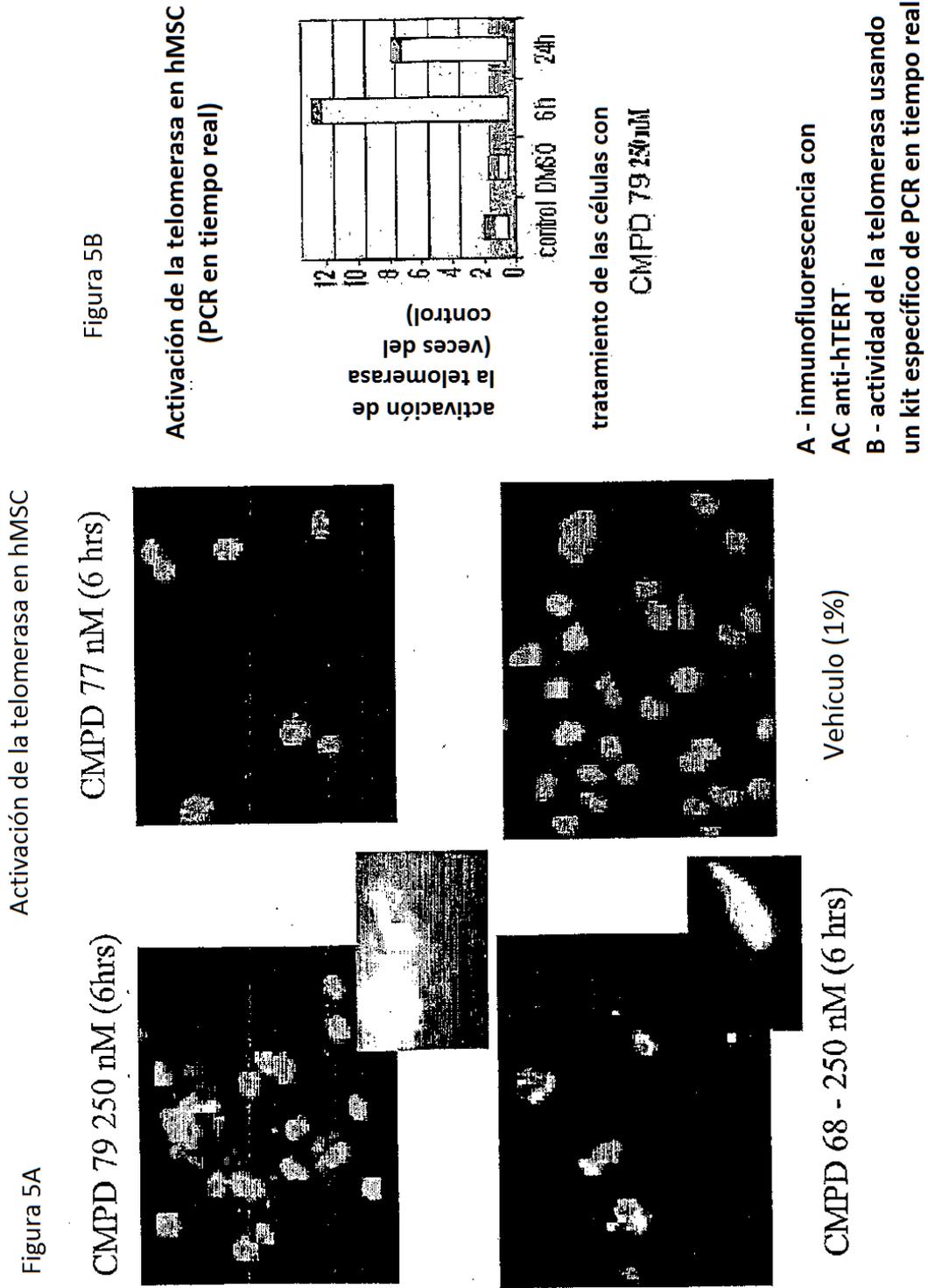


Figura 5

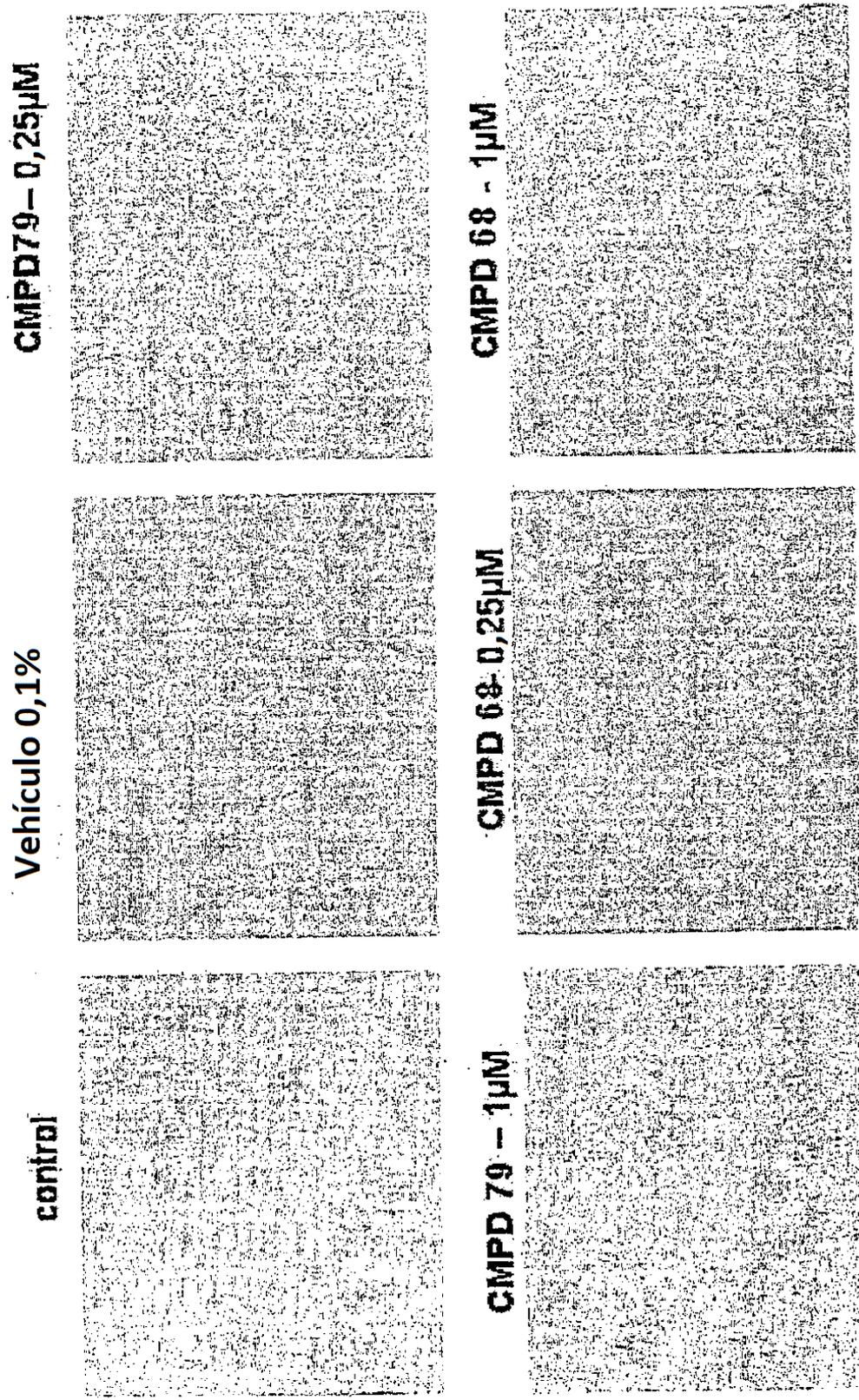


Figura 6

x10

A-KFEE17

CONTROL

CMPD 79-

CMPD 68-

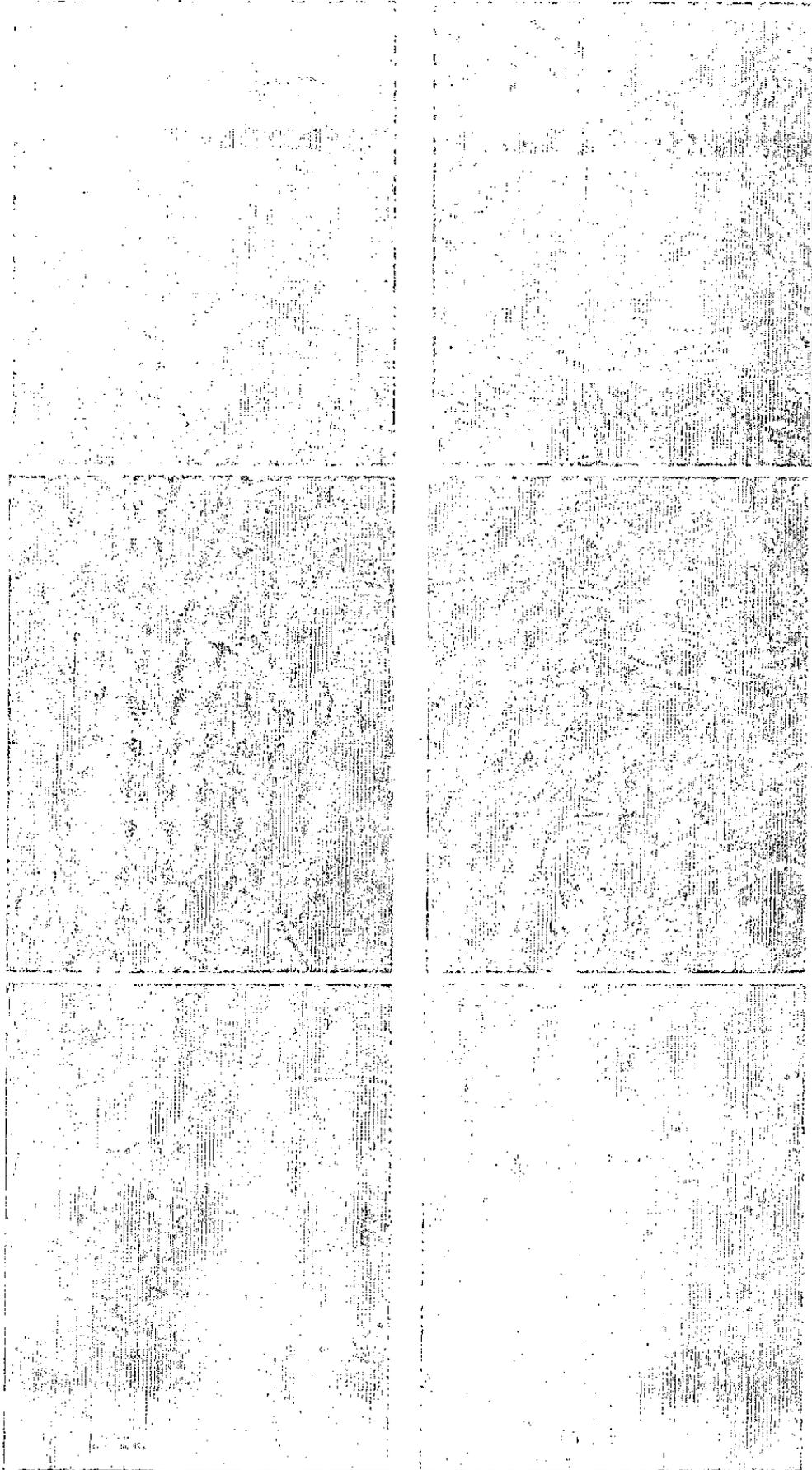


FIGURA 7A

**activación de la telomerasa en células RPE (tratamiento
24 horas) usando un kit de PCR en tiempo real**

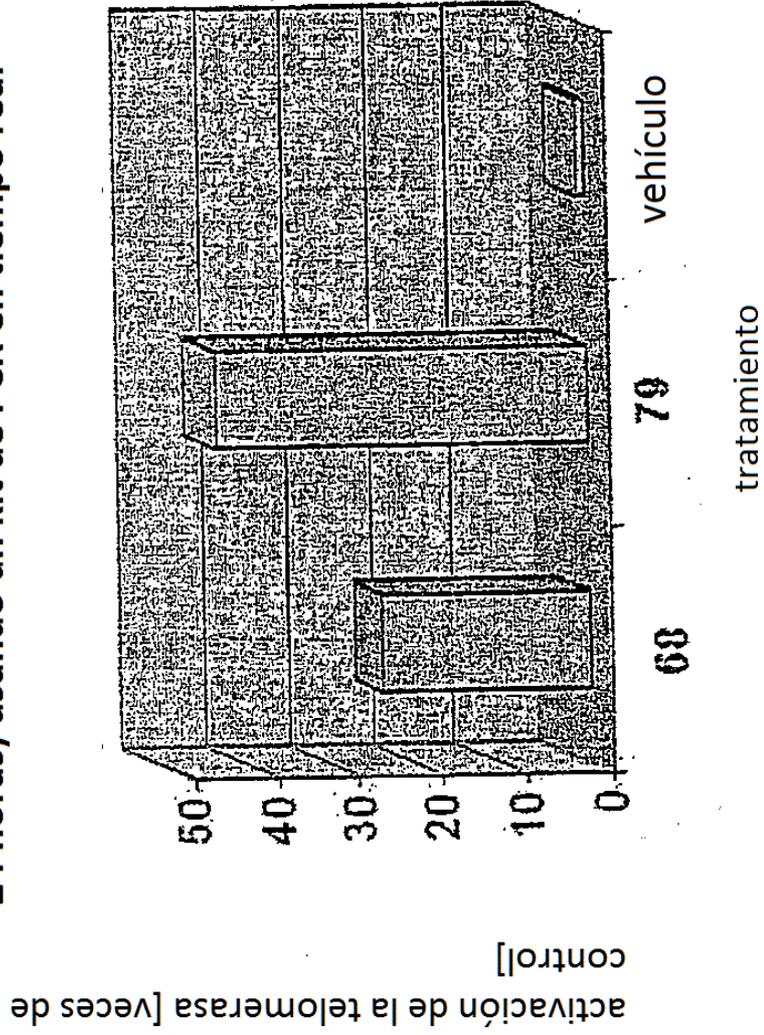


Figura 7B

Prolongación de la supervivencia en *C. elegans*

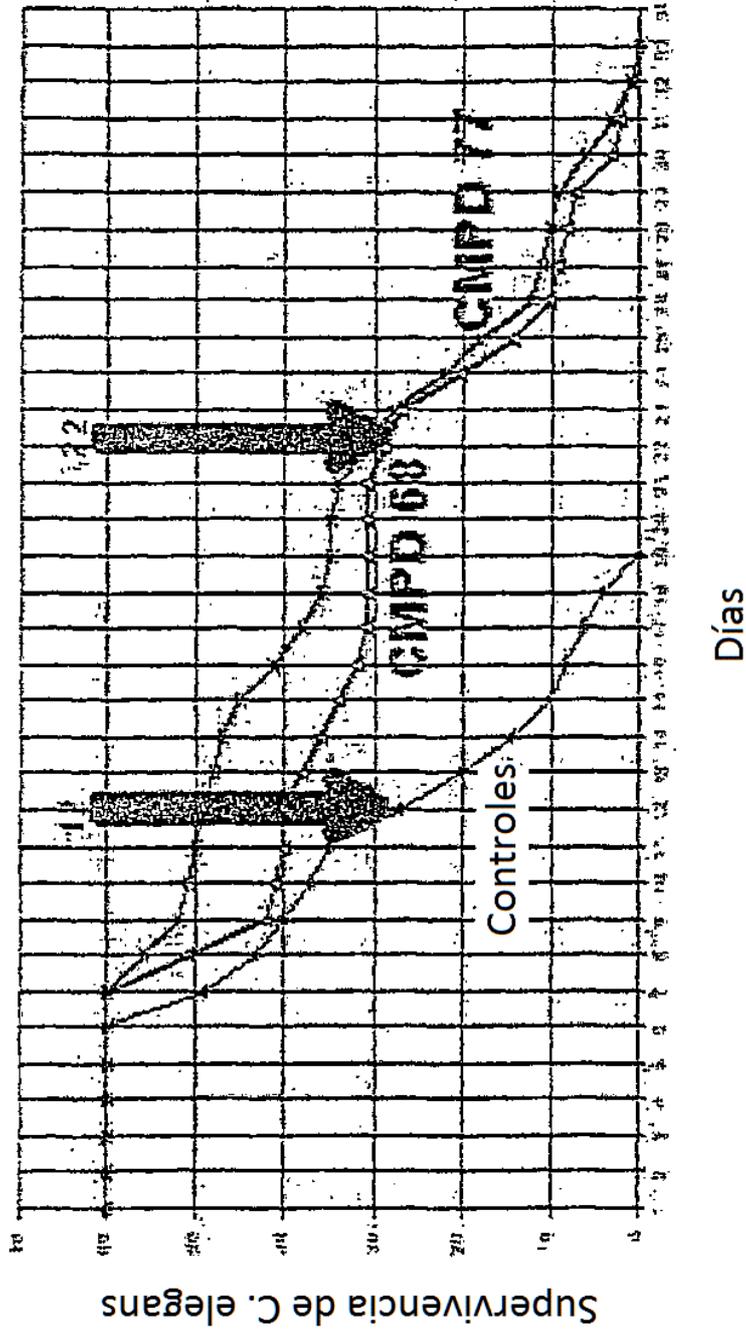
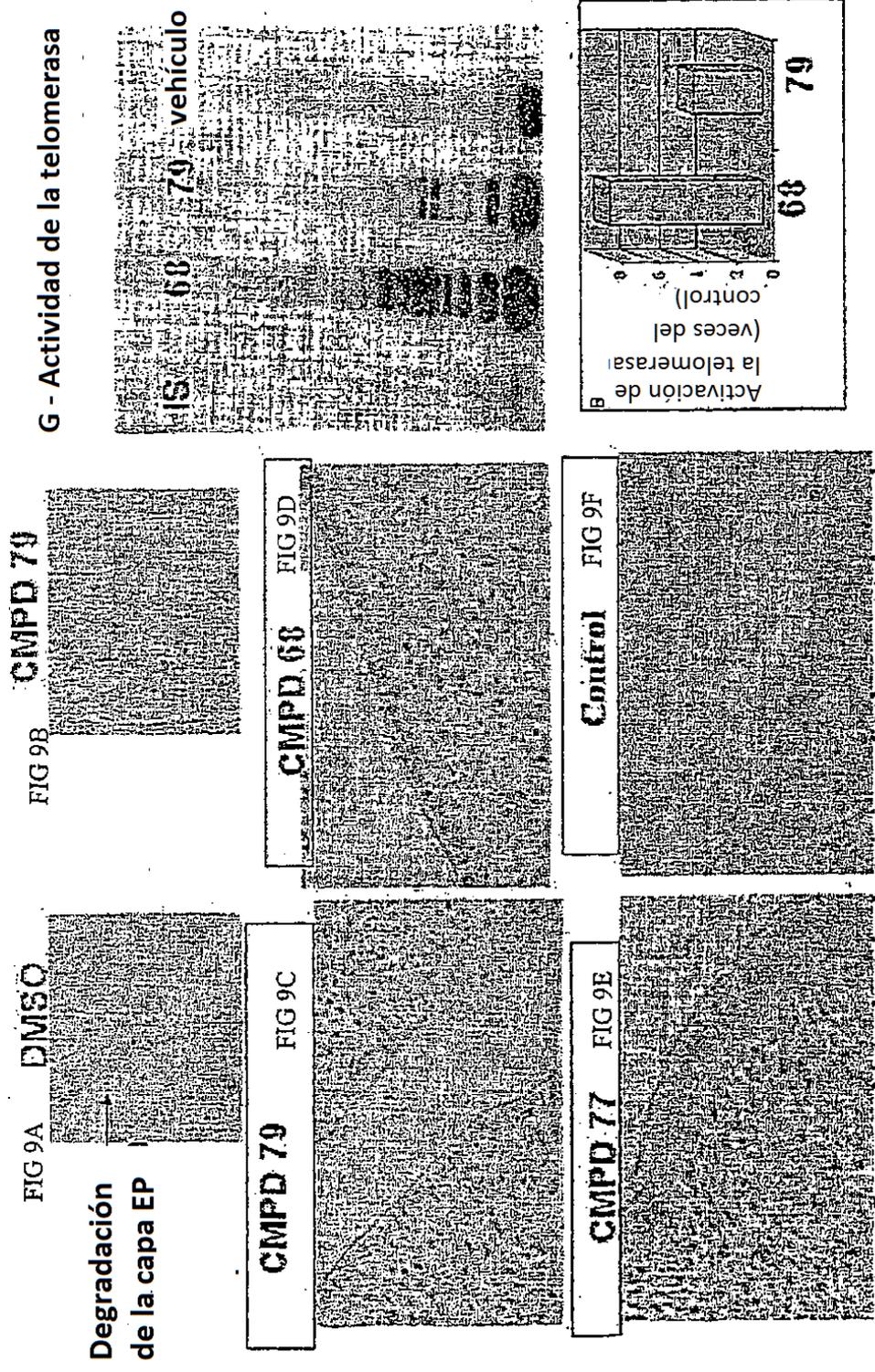


Figura 8

LOS ACTIVADORES DE LA TELOMERASA INYECTADOS (S.C.) A RATAS HEMBRA
ACTIVAN LA EXPRESIÓN DE LA TELOMERASA EN LAS CÉLULAS ENDOMETRIALES



G - Actividad de la telomerasa

Figura 9

Activación de la telomerasa en la corteza cerebral (X40)

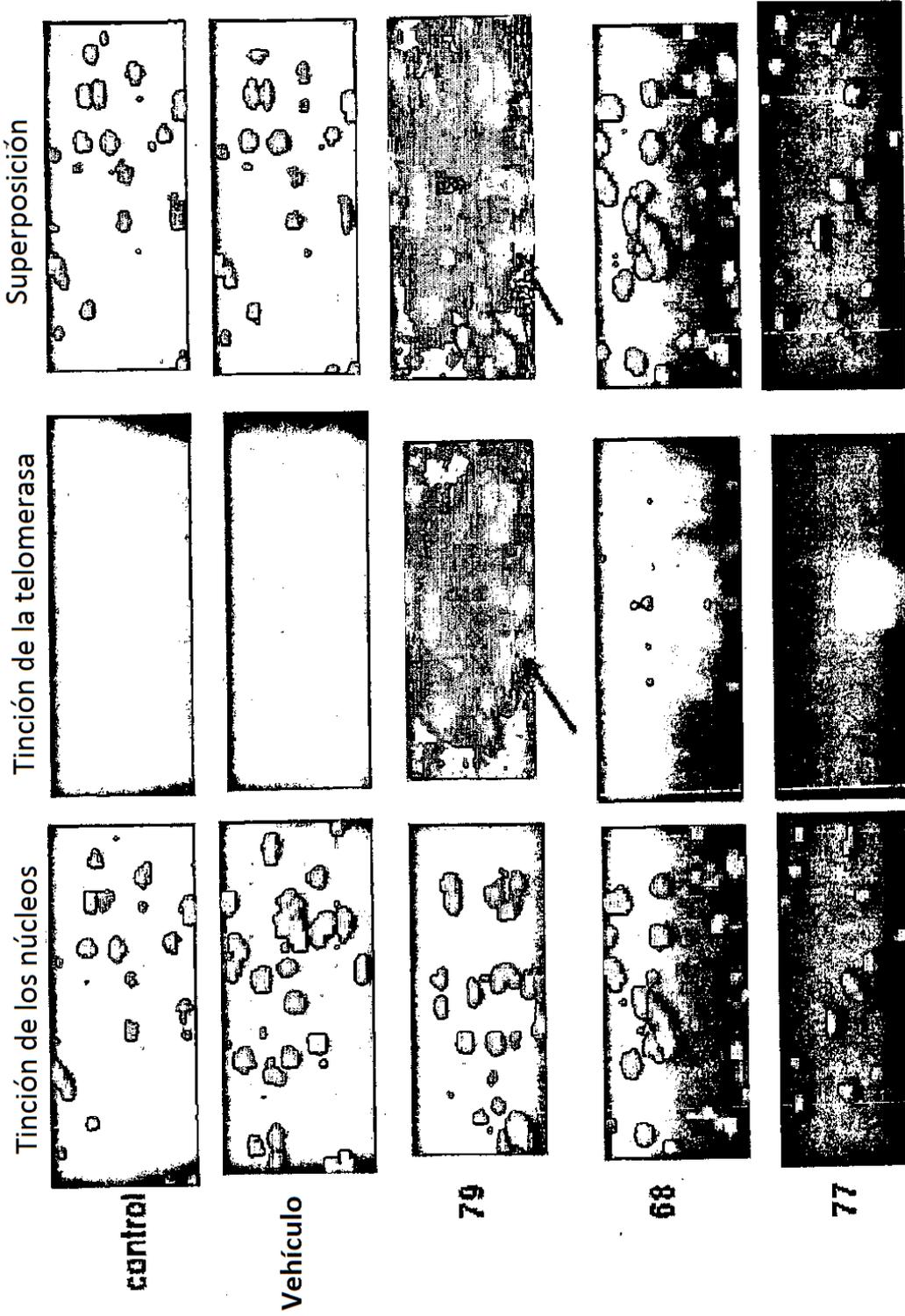


Figura 10

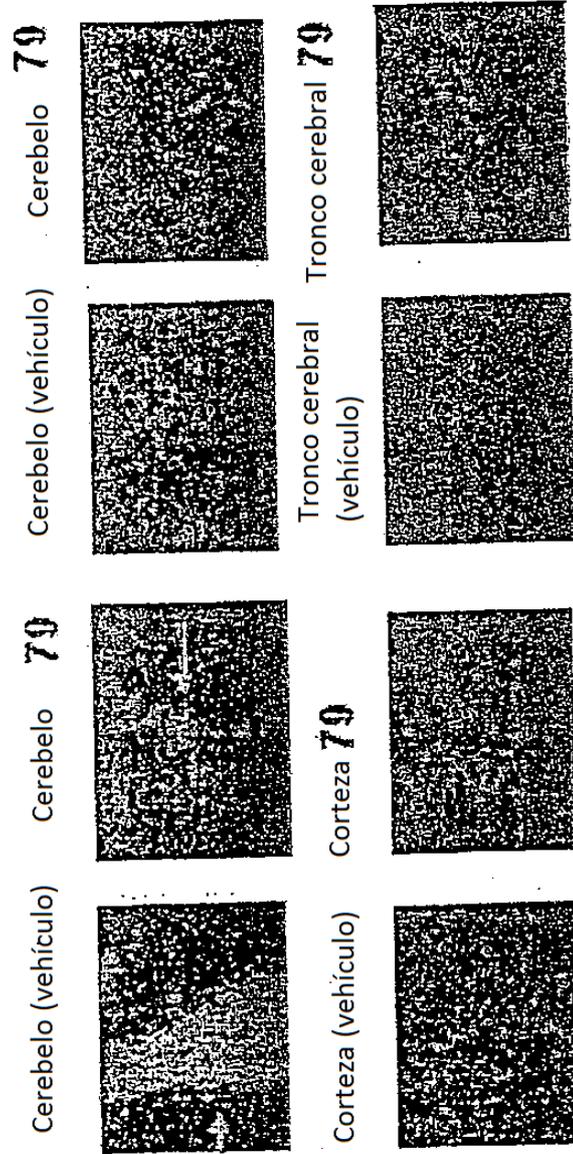


Figura 11

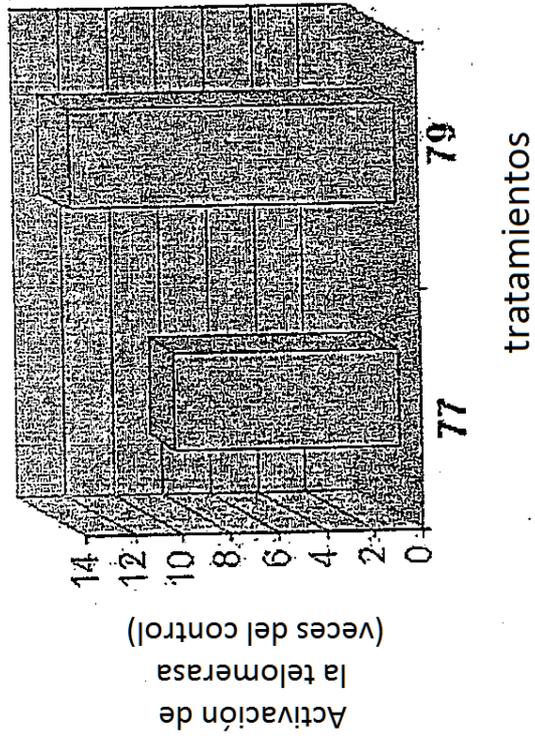
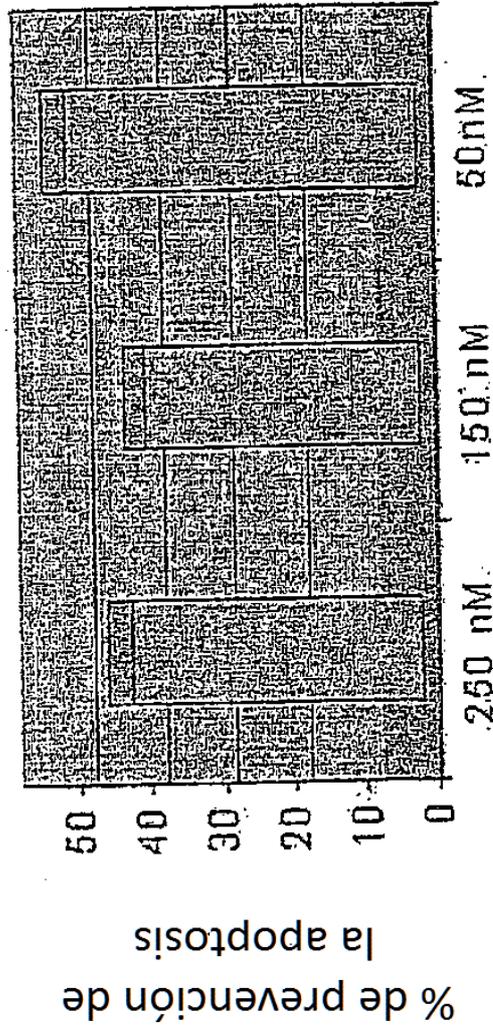


Figura 12

PREVENCIÓN DE LA APOPTOSIS INDUCIDA POR GLUTAMATO EN
CEREBELO DE RATÓN

Prevencción de la apoptosis por CMPD 79
en cerebello de ratón



tratamiento con glutamato

Figura 13

La expresión de la telomerasa está activada en corazón de ratones



Figura 14

CMPD 68 previene el efecto perjudicial de los medicamentos sobre el desarrollo del embrión en ratas

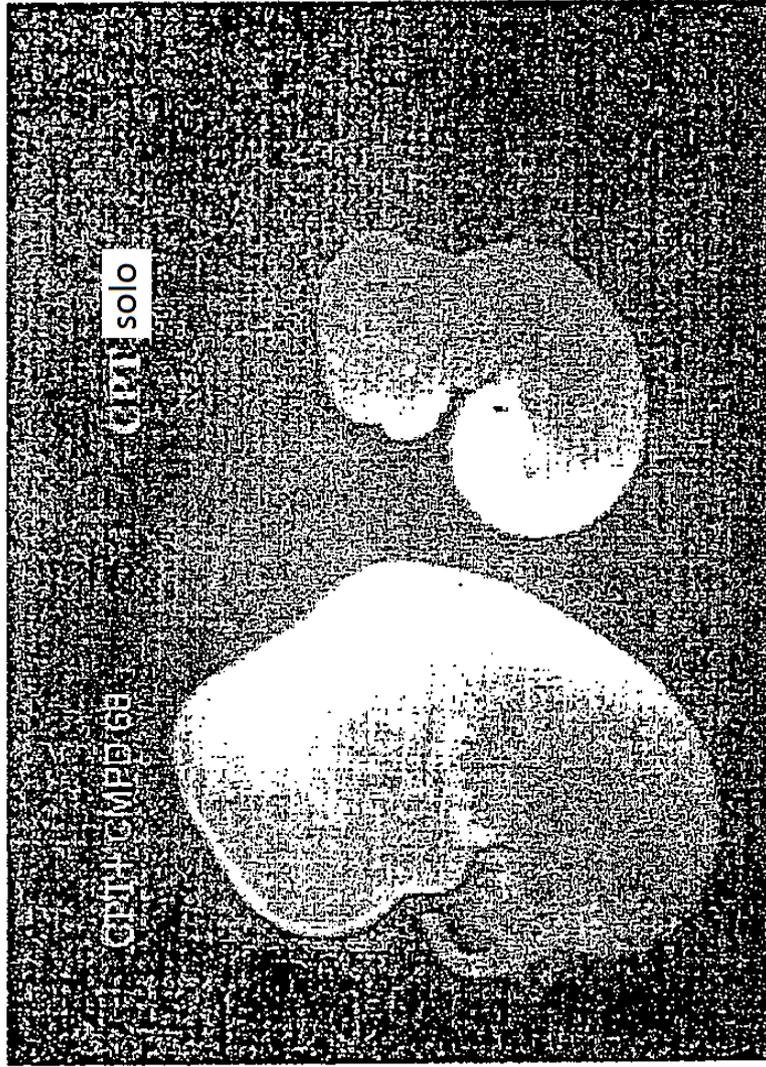


Figura 15