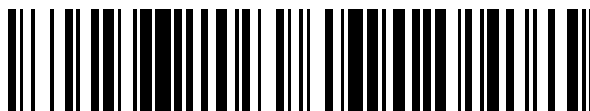


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 573 641**

51 Int. Cl.:

A61K 31/675 (2006.01)

A61K 31/22 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61P 31/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.12.2008 E 08873368 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.03.2016 EP 2234620**

54 Título: **Triterapia utilizable para el tratamiento de un paciente infectado por VIH**

30 Prioridad:

03.01.2008 US 18688 P

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

09.06.2016

73 Titular/es:

**UNIVERSITÉ D'AIX-MARSEILLE (100.0%)
Jardin du Pharo, 58 boulevard Charles Livon
13284 Marseille Cedex 07, FR**

72 Inventor/es:

**CAU, PIERRE;
BOURGEOIS, PATRICE;
BONNIOL, VINCENT y
LEVY, NICOLAS**

74 Agente/Representante:

VIGAND, Philippe

ES 2 573 641 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

Triterapia utilizable para el tratamiento de un paciente infectado por VIH

5 Solicitudes relativas

La presente solicitud se refiere a la solicitud de patente francesa N.º FR 08/50019 presentada el 3 de enero de 2008. También se refiere a la solicitud de patente francesa N.º FR 06/06097 presentada la 5 de julio de 2006 y a su solicitud de PCT correspondiente presentada el 5 de julio de 2007 que tiene como título « Medicamento destinado al tratamiento de enfermedades con persistencia y/o acumulación de proteínas preniladas ».

Descripción

Campo técnico

15

La invención se refiere a una composición que comprende:

20

- al menos un inhibidor de la hidroximetilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasa o una de sus sales fisiológicamente aceptables, siendo dicho inhibidor una molécula de la familia de las estatinas o una de sus sales fisiológicamente aceptables
- al menos un inhibidor de la farnesil-pirofosfato sintasa o de una de sus sales fisiológicamente aceptables, siendo dicho inhibidor una molécula de la familia de los aminobifosfonatos (NBP) o una de sus sales fisiológicamente aceptables, y
- al menos un agente anti-VIH, siendo dicho agente anti-VIH un inhibidor de proteasa o un inhibidor de la transcriptasa inversa.

25

La presente invención encuentra una aplicación en el tratamiento de los efectos secundarios generados por un agente anti-VIH, por ejemplo, envejecimiento precoz, lipodistrofia, que pueden estar generados por los inhibidores de proteasa o los inhibidores de la transcriptasa inversa.

30

En la siguiente descripción, las referencias entre paréntesis (X) se refieren al listado de referencias al final de los ejemplos. Las referencias entre paréntesis con el nombre del autor y la fecha se refieren también a este listado de referencias.

35

Técnica anterior

El núcleo de las células eucarióticas está delimitado por una doble membrana perforada con poros, la envoltura nuclear, que controla los intercambios moleculares entre los compartimientos, nuclear y citoplásmico. Esta envoltura aísla parcialmente el contenido del núcleo, es decir, el material genético y toda la maquinaria enzimática necesaria para las funciones del genoma nuclear.

40

La envoltura nuclear está formada por 2 membranas concéntricas, la membrana externa, en continuidad con el retículo endoplásmico, y la membrana interna. Esta última está revestida en su cara interna por una malla fibrilar densa llamada *lamina* nuclear. Se trata de una red proteica que está formada esencialmente por polímeros de laminas y proteínas asociadas. En los vertebrados, se distinguen dos subclases de laminas: las laminas de tipo A (laminas A y C) y de tipo B (laminas B1, B2 y B3), que contribuyen a la elaboración de la proteína *lamina*. Esta última se mantiene en su lugar por asociación con otras proteínas, fijadas a la membrana interna de la envoltura nuclear (para revisión, Gruenbaum *et al.*, 2005 (19)).

45

Las laminas son proteínas con forma de filamento que pertenecen a la familia de los filamentos intermedios (tipo V) todos los cuales tienen una estructura común: un segmento corto globular N-terminal (cabeza) separado de otro segmento globular C-terminal (cola) por un largo dominio central organizado en varias hélices *alfa* (*dominio de varilla*). La cola globular contiene en particular una señal de localización nuclear (*NLS*) que permite dirigirse al núcleo después de la síntesis. El dominio central permite la asociación de dos moléculas de lamina paralelas y su organización en filamentos por asociación de dímeros de forma "antiparalela". Esta estructura les da propiedades mecánicas muy resistentes.

55

Solo la lamina A y las laminas B experimentan una maduración después de la síntesis de un precursor (para revisión, Gruenbaum *et al.*, 2000 (20)). La lamina C se sintetiza directamente en su forma madura.

60

El precursor de la lamina A y de las laminas B terminan en un motivo característico *CaaX* (C es una cisteína, a un aminoácido con cadena alifática sin carga y X un aminoácido cualquiera, en el presente documento una metionina, para revisión, Levy y Cau 2003 (29)).

65

El motivo *CaaX* C-terminal permite la fijación de un ácido graso (en general, un ácido graso en C15, farnesilo) gracias a una farnesil transferasa. Este prenilación (el motivo de farnesilo derivado de una unidad alifática de base

- en C5 denominado isopreno) permite que las prelaminas se inserten en la membrana del retículo endoplasmático después de su síntesis en el citosol. Allí experimentan la acción de una endoproteasa la cual se inserta en la membrana de la envoltura del retículo y cuyo sitio activo es citosólico. La endoproteasa específica de la prelamina A es Face1 (o ZMPSTE24, *Metallo-Proteasa de Cinc* homóloga de STE24 de levadura), mientras que Face2 (o Rce1, *enzima convertidora de ras*) es específica de las prelaminas B. Estas enzimas catalizan la hidrólisis del enlace peptídico entre la cisteína y el aminoácido siguiente (alifático), acortando las prelaminas de 3 aminoácidos. A continuación, el extremo carboxilo de la cisteína farnesilada es reconocido por una isoprenilcisteína-carboximetil transferasa (ICMT) que acaba de fijar un grupo metilo por esterificación.
- Solo la maduración de prelamina A se persigue con una segunda escisión endoproteolítica con Face1, que libera un farnesil-péptido de 15 aminoácidos y la lamina A madura. Esta lamina A, que ya no incluye el ácido graso, se vuelve soluble, es importada en el núcleo a través de un señal de localización nuclear, y se localiza en la propia *lamina* nuclear, así como en el resto del compartimento nuclear, constituyendo un esqueleto nuclear real (Gruenbaum *et al.*, 2005 (19)). La lamina B madura por otra parte siempre posee en el extremo C-terminal su cisteína farnesilada y metilesterificada. Por lo tanto permanece insertada en la membrana de la envoltura del retículo, a continuación en la cara nucleoplasmática de la envoltura nuclear, de ahí su localización exclusiva en la *lamina* nuclear, bajo la membrana interna de la envoltura nuclear en la que está anclada.
- Con el término prenilación se hace referencia a la fijación, al grupo tiol de una cisteína, ya sea de una cadena de farnesilo de 15 átomos de carbono, entonces se denomina farnesilación, ya sea de una cadena de geranil-geranilo de 20 átomos de carbono, entonces se denomina geranil-geranilación (Reid *et al.*, 2004 (39)), o cualquier otro derivado de isopreno.
- La farnesilación, catalizada por la farnesil-transferasa (FTasa) que reconoce la secuencia consenso C-terminal (*CaaX*), fija preferentemente un grupo farnesilo en el resto de cisteína del motivo.
- La geranil-geranilación es la fijación por la geranilgeranil-transferasa (GGTasa) de un grupo de geranil-geranilo al resto de cisteína del motivo.
- Estos ácidos grasos se originan en la ruta de biosíntesis, que, a partir de la hidroximetil-glutaril-Coenzima A, se usan por las células para preparar en particular colesterol, esteroides, heme en la hemoglobina y ubiquinonas (Hampton *et al.*, 1996 (20)).
- La familia de las proteínas preniladas comprende aproximadamente 300 miembros en el genoma humano, la mayoría de los cuales se puede identificar con el motivo *CaaX* C-terminal (Reid *et al.*, 2004 (39)). Las proteínas de las familias *Ras*, *Rho*, *Rab* (Leung *et al.*, 2006 (28)), ciertas proteínas que aseguran una función de importación hacia la mitocondria (HDJ2), ciertas proteínas mitóticas (CENPE, CENPF) están preniladas en particular (Winter-Vann y Casey 2005 (51)). En general, si en el motivo *CaaX*, X es una serina, una metionina, una cisteína, una alanina o un glutamato, el isoprenoide injertado preferentemente es el farnesilo. Si X es una leucina, el reconocimiento del motivo *CaaL* se realizará preferentemente con la GGTasa que catalizar a la transferencia de un grupo de geranil-geranilo (Basso *et al.*, 2006 (1)). Es probable que otros grupos derivados del isopreno también se puedan fijar en esta cisteína, aunque esto no se ha descrito en la bibliografía.
- En el hombre, existen tres géneros de laminas. El gen *LMNA*, situado en 1q21.2-q21.3 (Wydner *et al.*, 1996 (52)), dado por el corte y empalme alternativo de las laminas A y C. El gen *LMNA* está formado por 12 exones. El comienzo del exón 1 codifica el extremo globular N-terminal común a las laminas A y C; el final del exón 1 y hasta el comienzo del exón 7 codifican la parte helicoidal central; por último, los otros exones codifican el extremo globular C-terminal (Lévy y Cau 2003 (29)).
- De hecho, el gen codifica 4 productos cortados y empalmados de forma diferente, cuyas laminas C y la prelamina A son las 2 principales (Lin y Worman 1993 (31)). La producción diferencial de las laminas A y C se realiza mediante la utilización de un sitio de corte y empalme alternativo al nivel del exón 10 del mensajero previo, de un modo tal que la lamina C está codificada por los exones de 1 a 10 y la lamina A está codificada por los exones de 1 a 9, los 90 primeros pares de bases del exón 10, y los exones 11 y 12 (específicos de lamina A).
- En consecuencia, los péptidos prelamina A y lamina C son idénticos a nivel de los primeros 566 aminoácidos, los extremos C-terminales de las laminas C y de la prelamina A conteniendo a continuación 6 y 98 aminoácidos específicos respectivamente.
- Las laminas de tipo B comprenden tres proteínas diferentes (Shelton *et al.*, 1981 (43)): las laminas B1, B2 (las dos isoformas más representadas) y B3. El gen *LMNB1* está situado en 5q23.3-q31.1 y comprende 11 exones que codifican la lamina B1 (Lin y Worman 1995 (30)). El gen *LMNB2* está localizado en 19p13.3 y codifica las laminas B2 y B3 mediante un mecanismo de corte y empalme alternativo (Biamonti *et al.*, 1992 (2)).
- Las laminas de tipo B se expresan de forma constitutiva en todas las células a partir de los primeros estadios de desarrollo, mientras que las laminas de tipo A en general están ausentes en las células madre embrionarias (Stewart

et al., 1987 (45)) y se expresan en todas las células somáticas diferenciadas. Su expresión está sometida a regulaciones de acuerdo con el tejido y durante el transcurso de la vida (Duque *et al.*, 2006 (9)). Parece que su expresión no es necesaria, ya que algunos ratones en los que se ha bloqueado de forma específica la expresión de la lamina A, pero que sin embargo expresan la lamina C y las otras laminas, no tienen fenotipo aparente (Fong *et al.*, 2006 (14)).

Las laminas interactúan con un número muy elevado de compañeros trópicos que tienen funciones muy diversas; por consiguiente, están implicadas en un gran número de procesos nucleares, incluyendo la replicación y la reparación del ADN, el control de la transcripción y del corte y empalme, la organización de la estructura de la cromatina (para revisión, véanse Shumaker *et al.*, 2003 (44), Zastrow *et al.*, 2004 (54), Hutchison *et al.*, 2004 (26), Gruenbaum *et al.*, 2005 (19)). Las alteraciones de la estructura de la lamina están en el origen de numerosas patologías hereditarias humanas. Estas deben a mutaciones de genes que codifican las laminas, u otras proteínas de la lamina. Estas patologías se han reagrupado con el término genérico de laminopatías (Broers *et al.*, 2006 (5), Mattout *et al.*, 2006 (33)). Recientemente, se han identificado algunas mutaciones en los genes de las enzimas responsables de la maduración de las laminas (en particular Face1), dando lugar a patologías que pertenecen del mismo modo al grupo de las laminopatías (Navarro *et al.*, 2004 (36) y 2005 (35)).

Hasta el momento, la única patología en el ser humano asociada a mutaciones de los genes *LMNA1* o *2* es una leucodistrofia causada por una duplicación completa del gen *LMNB1* (Padiath *et al.*, 2006 (37)). Subsiste una duda en la implicación potencial de variaciones de secuencias encontradas en *LMNB2* en pacientes que padecen el síndrome de Barraquer-Simon (Hegele *et al.*, 2006 (22)). Sin embargo, se ha demostrado *in vitro*, mediante experimentos de ARNi (ARN de interferencia) (Harborth *et al.*, 2001 (21)), así como en el modelo murino (Vergnes *et al.*, 2004 (50)), que las laminas de tipo B son esenciales para el desarrollo y la integridad celular. En efecto, la deficiencia de lamina B1 conlleva, en el ratón, una letalidad perinatal. Además, los núcleos de los fibroblastos embrionarios de los mismos ratones deficientes en *LMNB1* muestran alteraciones notables de la morfología nuclear, cercanas a las observadas en los pacientes portadores de mutaciones del gen *LMNA*. Además, recientemente se ha mostrado que las laminas B son necesarias para la formación del huso de división durante la mitosis, lo que tiende a demostrar que su papel es dinámico y múltiple en el transcurso del ciclo celular, y no se limita únicamente al mantenimiento de la arquitectura del núcleo (Tsai *et al.*, 2006 (48)). Con respecto a este último papel, un artículo reciente constituye la demostración de la función estructural de las laminas B: células privadas artificialmente de laminas B1 tienen un núcleo "flotante" en la célula, que gira en sí mismo (Liu *et al.*, 2007 (45)). La redundancia funcional que existe entre las dos laminas B1 y B2 también es sin duda el reflejo directo de su indispensabilidad, ejerciendo una fuerte presión de selección y enmascarando el efecto de las mutaciones opcionales de la secuencia de los genes correspondientes.

Las alteraciones funcionales de las laminas A/C, debidas a mutaciones del gen *LMNA*, están en el origen de al menos 15 desórdenes que reagrupan patologías muy diversas en un espectro clínico que va de formas poco severas, que afectan a un solo tejido de forma aislada, formas sistémicas de tales en el periodo perinatal.

Un número de mutaciones del gen *LMNA* modifican de forma notable el ensamblaje de proteínas en la envoltura nuclear con una alteración del funcionamiento. Las células de diversos tejidos, la morfología de los núcleos está alterada: a menudo presentan hernias que se extruyen del material genético en el citoplasma (Goldman *et al.*, 2004 (18)).

Las proteínas asociadas normalmente a la envoltura nuclear, las laminas B, ciertas proteínas de los poros nucleares y las proteínas LAP2, están ausentes de la periferia de estas hernias.

Estas anomalías morfológicas van seguidas de alteraciones funcionales, que por último conducen a la muerte celular. Entre todas las patologías agrupadas bajo el nombre laminopatías, solamente las relacionados con la acumulación anómala de de una forma prenilada de proteína interesan en la presente invención.

Estas son principalmente el síndrome de Hutchinson-Gilford, o Progeria (De Sandre-Giovannoli *et al.*, 2003 (7), Eriksson *et al.*, 2003 (11)), y la dermatopatía restrictiva (Navarro *et al.*, 2004 (36)). En estos 2 síndromes, la causa fisiopatológica es una acumulación y una persistencia en las células de los enfermos con prelamina farnesilada no madurada.

La dermatopatía restrictiva, letal en todo el periodo natal, se caracteriza por signos clínicos que son, casi todos, la consecuencia de un déficit cutáneo que limita los movimientos en el útero. Esta patología es muy rara. La piel está rígida y tensa, cede en algunos lugares, provocando, por ejemplo, desgarros al nivel de las axilas o del cuello. Las pestañas, las cejas y el lanugo están ausentes o son muy escasos. A menudo está presente un hidramnios, y la disminución de los movimientos fetales se percibe desde el 6^o mes de embarazo. Al nivel del esqueleto, la radiografía revela contracturas de todas las articulaciones, pies en piolet, clavículas finas, displásicas y bipartitas, costillas en cinta, huesos largos tubulares de los brazos y desmineralización a nivel del el cráneo. La transmisión de la dermatopatía restrictiva letal es autosómica recesiva.

Para esta patología se han informado mutaciones de LMNA y de ZMPSTE24/Face1 (Navarro *et al.*, 2004 (36)). En los 2 casos, el mecanismo histopatológico es el mismo: la prelamina A no puede madurar (mutación nula de Face1 o desaparición del sitio de escisión por mutación de la prelamina A), y resto farnesilado, y por lo tanto introducido en la membrana nuclear. La acumulación y la persistencia en las células de estos precursores anómalos, que probablemente impiden la interacción normal de las laminas B y C con sus compañeros, conlleva la muerte de las células y, a corto plazo, del paciente. Se ha demostrado claramente que la persistencia del grupo farnesilo, y no la ausencia de la lamina A madura, como se podría pensar en primer lugar, es la responsable de la toxicidad celular (Fong *et al.*, 2004 (16)).

En abril de 2003, a partir de una superposición de los síntomas comunes de displasia acromandibular y de ciertas enfermedades que dan como resultado un envejecimiento prematuro, los inventores mostraron que la progeria, la forma más habitual y la más grave de envejecimiento precoz, resultado de una mutación del gen *LMNA* (de Sandre-Giovannoli *et al.*, 2003 (7)). Los niños con esta enfermedad, también denominada síndrome de Hutchinson-Gilford, sufren un envejecimiento acelerado, hasta diez veces más rápido que el de un individuo normal, y tienen una esperanza de vida no supera los 13 años. En Europa, uno de cada seis millones de niños se ve afectado. Los síntomas son envejecimiento cutáneo, calvicie, reducción del tamaño de la mandíbula y problemas relacionados con la vejez, por ejemplo, rigidez de las articulaciones y trastornos cardiovasculares. Estos últimos, tales como el infarto de miocardio o la aterosclerosis, a menudo son la causa de la muerte.

La mutación implicada, situada en el exón 11 del gen *LMNA*, activa un sitio de corte y empalme críptico del ARNm previo, que conduce a un ARNm con supresión de 150 nucleótidos (De Sandre-Giovannoli *et al.*, 2003 (7), Eriksson *et al.*, 2003 (11)). Este ARNm con supresión se traduce en una prelamina A anómala, la progerina, que no se puede madurar en la lamina A normal: la ausencia de 50 aminoácidos del exón 11 que contienen el sitio de reconocimiento de proteasa bloquea la 2ª escisión de la progerina cuyo extremo C-terminal conserva su grupo farnesilo. Por lo tanto, permanece insertada en la cara nucleoplasmática de la envoltura nuclear, que presenta las alteraciones características, hernias del nucleoplasma en el citosol y anomalías en el reparto de la heterocromatina periférica (Goldman *et al.*, 2004 (18)). En el presente documento, una vez más, la persistencia del grupo farnesilo, por otra parte necesario para el anclaje a la membrana de envoltura del retículo en la que se encuentran algunas de las enzimas responsables de la maduración (escisiones, metilación) es la responsable de la toxicidad celular la progerina (Fong *et al.*, 2004 (16)).

Estas patologías sistémicas presentan la particularidad de estar asociadas con la aparición precoz de signos relacionados habitualmente con el envejecimiento. Su característica fisiopatológica común es generar una lamina prenilada, con las consecuencias descritas.

Dos estudios recientes han mostrado que una reducción de la acumulación intranuclear de la prelamina farnesilada, truncada o no, evita de forma eficaz la aparición del fenotipo celular. El primero se realizó en el modelo de ratón murino progeroide deficiente en proteasa Face1 (Pendas *et al.*, 2002 (38)). Cuando se cruzan con ratones que expresan una mitad menos de la Lamina A (ratones *Lmna +/-*), los efectos de la ausencia de Face1 disminuyen (Varela *et al.*, 2005 (49)). El segundo estudio muestra que el tratamiento de las células de pacientes con HGPS con *morfolinos* (oligonucleótidos antisentido) que se dirigen al sitio de corte y empalme críptico suprimen el fenotipo mutante (Scaffidi y Misteli 2005 (43)).

Varios estudios recientes (véase Scaffidi y Mistelli 2006 (42)) muestran la participación de la lamina A en el proceso de envejecimiento fisiológico. En particular, se ha demostrado que durante el envejecimiento fisiológico, la progerina se sintetiza por las células en ausencia de cualquier mutación del gen *LMNA* debido a la utilización de baja interferencia del sitio críptico de corte y empalme de exón 11. Esta progerina se localiza en la *lamina*, en la periferia del núcleo de las células. El núcleo de las células de los pacientes envejecidos "normales" puede presentar hernias características de una laminopatía causada por estos sucesos de corte y empalme accidental que dan lugar a anomalías de funciones celulares y al menos en parte son probablemente responsables de su envejecimiento.

En la piel *in vivo*, la progerina también se sintetiza por una subpoblación de fibroblastos dérmicos y queratinocitos, células en las que se acumula con la edad. La progerina podría ser por lo tanto un marcador del envejecimiento cutáneo (McClintock *et al.*, 2007 (34)).

Parece que algunos mecanismos moleculares idénticos, son por una parte responsables de los signos de envejecimiento prematuro de los individuos que padecen Progeria y por otra parte, a un nivel mucho más bajo, intervienen en el envejecimiento fisiológico de los individuos no portadores de mutaciones.

En la técnica anterior existen dos enfoques terapéuticos descritos para mejorar el fenotipo celular causado por la producción patológica de progerina. La primera de estas soluciones es simplemente para impedir la utilización por el espliceosoma de este sitio de corte y empalme críptico en el exón 11, "enmascarándolo" para tratamiento con un oligonucleótido antisentido (Scaffidi Misteli 2005 (41)), o con un retrovirus que produce un ARNsi (Huang *et al.*, 2005 (25)). Los resultados son prometedores *in vitro*, pero en este punto se trata de terapia "genética", y el desarrollo de fármacos en torno a este enfoque es inevitablemente largo y complicado, con todos los inconvenientes relacionados con la vectorización de OAS para obtener un efecto *in vivo*. La segunda solución consiste en inhibir la farnesil-

transferasa, la enzima que cataliza la transferencia del grupo farnesilo en las prelaminas a partir del pirofosfato de farnesilo. Cuando se utilizan inhibidores de este tipo (FTI), una envoltura nuclear «normal» no se restaura más que parcialmente en las células HGPS (Progeria) en cultivo, y la supervivencia de los ratones RD (KO ZMPSTE24) mejora (Glynn y Glover 2005 (17), Capell *et al.*, 2005 (6), Toth *et al.*, 2005 (47), Fong *et al.*, 2006 (15)).

Sin embargo, el bloqueo de la farnesilación puede inducir una geranil-geranilación compensatoria (Bishop *et al.*, 2003 (3), Varela *et al.*, 2008 (54 bis)).

Por otra parte, se informó recientemente que los FTI inducen una parada del ciclo celular mediante el bloqueo del proteasoma (Demyanets *et al.*, 2006 (8), Efué y Keyomarsi 2006 (10)). Por lo tanto, el tratamiento induce sin duda una acumulación en el nucleoplasma de progerina probablemente no ubiquitinilada, no degradada por el proteasoma.

Además, algunos trabajos recientes informan que la disminución de la tasa de farnesilación de la progerina *in vivo* es muy baja, del orden de un 5 % (Young *et al.*, 2006 (53)), lo que no es suficiente para explicar la restauración de la morfología nuclear observada *in vitro*.

Por último, los FTI son específicos para una sola de las rutas de prenilación proteica, y no se pueden concebir como inhibidores globales de las prenilaciones después de la traducción.

Además, se informa de que la ausencia total de una de las enzimas de esta ruta, la mevalonato quinasa, es letal durante la infancia (mutación homocigótica de pérdida de función del gen que codifica esta enzima, síndrome informado por Hoffmann *et al.*, 2003 (24)).

Tratamientos anti-VIH y efectos secundarios

1. Los pacientes infectados con el VIH y sometidos a un tratamiento anti-retroviral presentan los signos clínicos y biológicos de un envejecimiento acelerado comparable al que presentan los pacientes portadores de un síndrome progeroide de origen genético.

Los tratamientos antirretrovirales, inhibidores de la transcriptasa inversa, nucleosídicos (NRTI) o no (NNRTI), inhibidores de la proteasa viral (PI) permitieron una prolongación de la duración de la vida de los pacientes infectados con el virus del SIDA en los que aparecen las consecuencias del envejecimiento « fisiológico » (Casau, 2005; Levy *et al.*, 2003).

Sin embargo, la propia infección y los tratamientos anti-retrovirales hacen aparecer los mismos signos clínicos y biológicos que los presentados por los pacientes que padecen un síndrome de envejecimiento acelerado de origen genético (para una revisión reciente de estos síndromes, véase (Navarro *et al.*, 2006).

Ciertas manifestaciones parecen relacionadas directamente con la infección viral:

Por ejemplo, la helicasa mutada en el síndrome de Werner (OMIM 277700), un síndrome de envejecimiento prematuro asociado con una predisposición al cáncer y la aterosclerosis, recluta cofactores proteínicos celulares indispensables para la transactivación del LTR del VIH-1 y la replicación del virus. La menor disponibilidad de la helicasa en las células infectadas podría conducir al envejecimiento y la inmunosupresión (Sharma *et al.*, 2007).

Por ejemplo incluso las modificaciones del transporte de colesterol en los macrófagos. La proteína viral Nef inhibe las permeasas de la familia ABC responsables del eflujo del colesterol (Bukrinsky y Sviridov, 2006; Mujawar *et al.*, 2006; Wang y Rader, 2007). La acumulación del colesterol en los macrófagos los transforma en células espumosas (foam cells) que participan en la formación de placas de ateroma en las paredes vasculares (Pennings *et al.*, 2006). Los medicamentos antirretrovirales también inhiben la salida de colesterol de los macrófagos y contribuyen a la formación de la placa de ateroma (Azzam *et al.*, 2006; Dressman *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2007).

Algunas manifestaciones clínicas y biológicas muy numerosas también parecen ser la consecuencia de los tratamientos anti-retrovirales:

Reproducen los signos observados en el transcurso de los síndromes progeroideos de origen genético, por ejemplo la progeria de Hutchinson-Gilford (OMIM 176670, véase (Hennekam, 2006), displasia acromandibular (OMIM 248370) y la forma letal neonatal, la demografía restrictiva (OMIM 275210) relacionadas con mutaciones en el gen LMNA que codifica las laminas A y C o con mutaciones en la proteasa ZMPSTE24 (FACE1) responsable de la escisión de la prelamina A en el transcurso de su maduración en lamina A :

- La alopecia (Torres *et al.*, 2007; Wiwanitkit, 2004), independiente de las manifestaciones infecciosas dermatológicas (Maurer, 2005).
- Las anomalías del sistema esquelético, en particular osteoporosis (Brown y Qaqish, 2006; Thomas y Doherty, 2003) de la que se propuso la corrección por la vitamina D y un bifosfonato (Mondy *et al.*, 2005)

- 5 • La fuente muscular desviamos que eso es que Francia y (Restrepo *et al.*, 2006; Restrepo *et al.*, 2004; Tehranzadeh *et al.*, 2004a; Tehranzadeh *et al.*, 2004b), en relación con el sistema de ubiquitina-proteasoma (Costelli y Baccino, 2003) o las calpaínas (Bartoli y Richard, 2005; Costelli *et al.*, 2005), dos sistemas proteolíticos inhibidos por ciertos tratamientos anti-retrovirales (véase más abajo). Las mutaciones de la calpaína 3 muscular son responsables de una forma de distrofia muscular periférica (LGMD2A, OMIM 253600; (Richard *et al.*, 1995) de la que la miositis eosinofílica podría ser uno de los primeros signos (Krahn *et al.*, 2006).
- 10 • Una cardiomiopatía (Barbaro, 2003; Restrepo *et al.*, 2006), independiente de las complicaciones cardiovasculares (véase a continuación), en relación con la toxicidad mitocondrial de los NRTI (Lewis, 2003).
- 15 • Las anomalías cardiovasculares (Mondy y Tebas, 2007) con problemas del metabolismo lipídico (Hui, 2003; Jones *et al.*, 2005; Moyle, 2007), ateroma (de Saint Martin *et al.*, 2006; Thomas y Smart, 2007; van Wijk *et al.*, 2006), presiones de las células endoteliales (Chen *et al.*, 2005; Jiang *et al.*, 2006; Zhong *et al.*, 2002) y anomalías de la diferenciación de las células adiposas (Kim *et al.*, 2006; Roche *et al.*, 2002). La dislipidemia se pudo tratar con estatinas (Benesic *et al.*, 2004; Liang *et al.*, 2006; Mallon *et al.*, 2006) o con un inhibidor de la absorción intestinal del colesterol (Negredo *et al.*, 2006). Se debe indicar que la pravastatina que corrige en parte ciertos parámetros alterados en el síndrome metabólico (Yamagishi *et al.*, 2006) induce un aumento del tejido adiposo subcutáneo sin mejora notable de la colesterolemia (Gharakhanian *et al.*, 2006; Mallon *et al.*, 2006).
- 20 • Algunas manifestaciones clínicas relacionadas con hipoandrogenismo se observan frecuentemente en los hombres (Cohan, 2006) y los casos de menopausia precoz en las mujeres seropositivas constituyen el objeto de varias publicaciones (Cohan, 2006; Ferreira *et al.*, 2007).

25 *Los inhibidores de la proteasa del virus (PI) presentan varias dianas celulares incluyendo proteasas:*

- 30 • La inhibición del proteasoma (Piccinini *et al.*, 2005) tiene consecuencias muy variadas debido al papel de este conjunto proteolítico con respecto a numerosas funciones celulares, renovación de proteínas, control del ciclo celular, apoptosis, transcripción genética, transducción de señales, senescencia, respuesta al estrés... (Naujokat *et al.*, 2007). Por ejemplo, una de las rutas de bloqueo por las PI de la diferenciación adipocitaria pasa por la no producción del factor de recuperación de la transcripción de NFκB que controla la transcripción del gen que codifica la metaloproteasa (de cinc) MMP9 implicada en la diferenciación adipocitaria (Bourlier *et al.*, 2005; De Barros *et al.*, 2007).
- 35 • Otro ejemplo es la ruta de señalización puesta en juego por la insulina (Rudich *et al.*, 2005; Schutt *et al.*, 2004). Las PI inhiben la actividad de la enzima de degradación de insulina (Hamel *et al.*, 2006), bloquean los canales potásico es responsable de la secreción de insulina (Neye *et al.*, 2006), interactúan con los transportadores de la glucosa Glut4 (Hertel *et al.*, 2004) e impiden su inserción en la membrana plasmática (Hruz, 2006; Parker *et al.*, 2005).
- 40 • Del mismo modo, las PI bloquean la ruta de señalización a través de la quinasa Akt que interviene mediante la activación de receptores de actividad de tirosina quinasa (Gupta *et al.*, 2005), por ejemplo la de IGFL. O IGF1 controla directamente la atrofia o la hipertrofia muscular (Glass, 2003).
- 45 • Las PI ejercen un efecto anti-apoptótico por inhibición de las calpaínas, proteasas citosólicas dependientes de Ca⁺⁺ (Ghibelli *et al.*, 2003; Lichtner *et al.*, 2006), y que controlan el equilibrio de apoptosis-autofagia mediante la escisión de ATG5, indispensable para la formación de la vacuola autofágica (Yousefi *et al.*, 2006).
- 50 • Otros dos sistemas enzimáticos están bloqueados por las PI: ciertos citocromos P450 de la subfamilia 3A, intestinales o hepáticos (Granfors *et al.*, 2006), mientras que otros citocromos P450 de la subfamilia 2A están inducidos (Yeh *et al.*, 2006) al mismo tiempo que otros transportadores (Dixit *et al.*, 2007; Yeh *et al.*, 2006); la glucuroconjugación en el RE en particular de la bilirrubina (Zhang *et al.*, 2005).
- 55 • La inhibición de varias actividades enzimáticas en particular del proteasoma inducciones tres del retículo endoplasmático, la liberación de la UPR (Respuesta de Proteína Sin Plegar) y la incorporación del mecanismo de señalización del retículo en el núcleo con la aparición de factores de regulación de la transcripción (Zhou *et al.*, 2006). Numerosas publicaciones demuestran el aumento de la cantidad de las isoformas de SREBP (Proteína de Unión al Elemento de Respuesta al Esterol), que controlan la activación de genes que regulan el metabolismo lipídico en particular el del colesterol (Colgan *et al.*, 2007; Miserez *et al.*, 2002; Nguyen *et al.*, 2000; Williams *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2005). La inducción por las PI de la transcripción de SREBP también se mostró con un estudio del transcriptoma (chips, PCR cuantitativa) de adipocitos en el transcurso de la diferenciación (Pacenti *et al.*, 2006) y el efecto aumenta por la ausencia de degradación de SREBP por el sistema de ubiquitina-proteasoma.
- 60 Las PI inducen la acumulación nuclear de SREBP en los hepatocitos ilos a dipocitos y sus consecuencias en el metabolismo lipídico (aumento de la síntesis de ácidos grasos y colesterol) (Hui, 2003; Riddle *et al.*, 2001).
- 65 • Tres artículos del mismo equipo parisino que analizan la diferenciación *in vitro* día dipocitos muestran sucesivamente que las PI comprenden un síndrome de resistencia a la insulina, la localización anómala de SREBP en el nucleoplasma, en relación con una anomalía de la localización de la lamina A (Caron *et al.*, 2001); la inhibición de la escisión de SREBP (por las proteasas golgianas S-1P y S-2P, véase (Seidah *et al.*, 2006), y sus consecuencias en la síntesis de enzimas del metabolismo lipídico, en la maduración anómala de la lamina A, mientras que la maduración de la lamina B no se modifica (Caron *et al.*, 2003); la similitud entre el estrés

mitocondrial observado en el transcurso de las lipodistrofias relacionadas con la mutación del gen *LMNA* y la resultante del tratamiento con las PI (Caron *et al.*, 2007). Uno de los intereses de estos trabajos de sugerir fuertemente que ciertas PI bloquean la proteasa (FACE1 o ZMPSTE24) implicada en la maduración de la prelamina A, dato que un equipo americano acaba de confirmar (Coffinier *et al.*, 2007). Al contrario, estas PI no

- 5 tienen efecto en la actividad de la proteasa FACE2 (o Rce1, enzima 1 convertidora de Ras), responsable de la escisión de las prelaminas B y además de la de la proteína G monomérica Ras, escisión necesaria para su maduración (Wright y Philips, 2006). Un estudio reciente de RT-PCR cuantitativa muestra que las PI inducen una disminución de la cantidad de los ARNm que codifican la lamina A sin modificar la cantidad de los ARNm que codifican la lamina C (Miranda *et al.*, 2007).
- 10 • Las PI inhiben las proteasas mitocondriales responsables de la escisión de las señales de dirección a la mitocondrial, de la renovación de las proteínas mitocondriales, del control de ciertas GTPasas mitocondriales (OPA1) implicadas en la fusión de las mitocondrias y la apoptosis (Mukhopadhyay *et al.*, 2002; Roehl White y Lauring, 2007).
- 15 • Independientemente de su acción sobre las calpaínas (véase anteriormente), las PI ejercen un efecto anti-apoptótico para los linfocitos T bloqueando, a través de la proteína UCP2, la despolarización de la membrana interna inducida por estímulos pro-apoptóticos (Matarrese *et al.*, 2003; Matarrese *et al.*, 2005).
- 20 • Por lo tanto, se debe indicar que las PI inhiben por tanto enzimas diferentes de la aspartil-proteasa específica del virus del SIDA (Dunn *et al.*, 2002). Aunque hasta este momento la bibliografía guarda silencio sobre este punto, las PI también podrían inhibir ciertas aspartil-proteasas eucariotas (véase el sitio « Degradome »: <http://www.uniovi.es/degradome/>) como la presenilina, la señal de péptido peptidasa, o Ddi1 (proteína inducible por daño en el ADN), capaz de fijar a la vez el proteasoma y proteínas ubiquitiniladas a la vista de la degradación de estas últimas (Sirkis *et al.*, 2006).

25 *Los nucleósidos inhibidores de la transcriptasa inversa del virus (NRTI) también tienen varias dianas celulares de las que la mitocondria es una de las más importantes:*

- Parece que los no nucleósidos inhibidores de la transcriptasa inversa del virus, menos estudiados, tienen una acción más específica sobre la enzima viral siempre induciendo la apoptosis de una línea de linfocitos T (Pilon *et al.*, 2002).
- 30 • Los NRTI se incorporan en el ADN nuclear (Olivero *et al.*, 1999) y su efecto mutágeno puede conllevar un bloqueo del ciclo celular (Olivero *et al.*, 2005). Se informó una mutación del ADN polimerasa gamma (Yamanaka *et al.*, 2007), responsable de la replicación y la reparación del ADN mitocondrial (Hudson y Chinnery, 2006).
- 35 • Un pequeño número de publicaciones muestran que los NRTI inhiben la N-glicosilación (en el retículo de plasmático), la O-glicosilación y la modificación de ramificaciones de azúcar (en el aparato de Golgi), al interferir con los nucleótidos transportadores en el aparato de Golgi de los precursores de las ramificaciones de azúcar (Lizzi *et al.*, 2007). Varias distrofias musculares están relacionadas con anomalías genéticas de la glicosilación (Muntoni *et al.*, 2004; Percival y Froehner, 2007).
- 40 • Los NRTI son transportados en la matriz mitocondrial por una familia de transportadores especializados en los de los desoxinucleósidos difosfatos, que son fosforilado es por una quinasa mitocondrial antes de su incorporación en el ADN mitocondrial por la ADN polimerasa gamma (Palmieri, 2004).
- 45 • La genotoxicidad de los NRTI tiene como consecuencia un aumento del índice de mutaciones del ADN mitocondrial y una disminución del número de sus copias en las mitocondrias (Kohler y Lewis, 2007; Olivero, 2007).
- 50 • Las anomalías del ADN mitocondrial y las del funcionamiento de la ADN polimerasa gamma tienen consecuencias en la síntesis de las 13 proteínas de membrana interna que constituyen, con proteínas codificadas por el genoma nuclear e importadas, los complejos de la cadena respiratoria y la ATP sintasa. Las alteraciones del ADN mitocondrial y de su polimerasa implican, por ejemplo, la disminución de la cantidad de citocromo oxidasa II (Vidal *et al.*, 2006), la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) (Jiang *et al.*, 2007) con consecuencias en los hepatocitos, adipocitos, cardiomiocitos y las células endoteliales que participan en la lipodistrofia y en las complicaciones cardiovasculares.
- 55 • El aumento del índice de ácido láctico plasmático es uno de los criterios de la disfunción mitocondrial inducida por los tratamientos anti-retrovirales (2007; John *et al.*, 2001).
- Los NRTI inhiben además la actividad de la telomerasa e inducen un acortamiento de los telómeros (Olivero, 2007; Yamaguchi *et al.*, 2001).

En conclusión, los tratamientos anti-retrovirales tienen un impacto en los mecanismos y en las rutas metabólicas reagrupados en varias teorías celulares que tratan de explicar el envejecimiento normal o acelerado:

- 60 • la teoría « mitocondrial »,
- la teoría « núcleo y lamina », aparecida en 2003 con el descubrimiento de que el gen *LMNA* es responsable de la progeria,
- la teoría « telomérica »,
- la teoría « regulación de la transcripción genética » en particular con las proteínas p53, NF-KkB
- 65 • la teoría « metabólica » con implicación de las rutas de señalización en particular ciertas actividades por receptores de membrana.

- Varios modelos animales de envejecimiento prematuro o al contrario de aumento de la duración de vida hacen aparecer superposiciones parciales entre las rutas metabólicas implicadas en cada una de estas teorías y las interrelaciones, a escala celular, entre el citosol en particular los mecanismos de degradación de las proteínas (Grillari *et al.*, 2006), la mitocondria, el núcleo de la membrana plasmática (Irminger-Finger, 2007; Kenyon, 2005; Martin y Loeb, 2004; Quarrie y Riabowol, 2004).

Varios modelos animales de envejecimiento prematuro o al contrario de aumento de la duración de vida hacen aparecer superposiciones parciales entre las rutas metabólicas implicadas en cada una de estas teorías y las interrelaciones, a escala celular, entre el citosol en particular los mecanismos de degradación de las proteínas (Grillari *et al.*, 2006), la mitocondria, el núcleo de la membrana plasmática (Irminger-Finger, 2007; Kenyon, 2005; Martin y Loeb, 2004; Quarrie y Riabowol, 2004).

2. La teoría « mitocondrial » del envejecimiento (Figura 6 adjunta).

Los tres componentes principales de la teoría mitocondrial del envejecimiento son i/ el aumento de la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) por los complejos I y II de la cadena respiratoria, ii/ las disfunciones progresivas de la misma y iii/ la acumulación de lesiones del ADN mitocondrial (Balaban *et al.*, 2005; Meissner, 2007; Wallace, 2005).

El ADN mitocondrial es más sensible que el ADN nuclear para los efectos de las ROS que se dirigen a la ADN polimerasa gamma (Graziewicz *et al.*, 2002; Richter *et al.*, 1988). Dos modelos murinos que expresan una ADN polimerasa gamma defectuosa en su función correctora de errores muestran un envejecimiento acelerado con mutaciones del ADN mitocondrial (Kujoth *et al.*, 2005; Trifunovic *et al.*, 2004). La toxicidad mitocondrial de las ROS se puede suprimir mediante la sobreexpresión de la catalasa peroxisómica dirigida al ámbito contienen un modelo de murino transgénico, con lo que la duración de la vida aumenta (Schriner *et al.*, 2005).

En el ser humano, el envejecimiento está asociado con una disminución de las funciones mitocondriales, de las que la cadena respiratoria (Short *et al.*, 2005; Trifunovic *et al.*, 2005), un aumento de delaciones en el ADN mitocondrial, particularmente observadas en el transcurso de enfermedades neurodegenerativas (Bender *et al.*, 2006; Kraytsberg *et al.*, 2006).

Un mecanismo de señalización, todavía demasiado poco conocido, de la mitocondria al núcleo, hace intervenir a la proteína p32, en particular en el transcurso del envejecimiento o patologías inducidas por las ROS (Jiang *et al.*, 1999; Storz, 2006). Esta proteína, codificada por el genoma nuclear y a continuación importada en la matriz mitocondrial, se vuelve a exportar hacia el nucleoplasma (Brokstad *et al.*, 2001) en el que controlan la transcripción (Chattopadhyay *et al.*, 2004) y el corto y empalme (Petersen-Mahrt *et al.*, 1999) del ARNm. Esta interactúa por otro lado con el receptor de la lamina B, localizado en la cara nucleoplasmática de la envoltura nuclear (Mylonis *et al.*, 2004; Simos y Georgatos, 1994).

El mecanismo de señalización del núcleo a la mitocondria hace intervenir a las aproximadamente 1500 proteínas codificadas por el genoma nuclear, y se sintetizan en el citosol y a continuación se importan en la mitocondria (Calvo *et al.*, 2006; Truscott *et al.*, 2003).

Entre estas proteínas, p53 está implicada en el envejecimiento acelerado en un modelo murino (Tyner *et al.*, 2002) y participa en las desregulaciones en el contexto de la teoría « nuclear » (véase a continuación). La proteína p53 controla la respiración mitocondrial (Matoba *et al.*, 2006), ejerce efectos pro- y anti-oxidantes mediante el control de la transcripción de genes nucleares (Bensaad y Vousden, 2005; Sablina *et al.*, 2005). Esta mantiene la estabilidad del ADN mitocondrial mediante la interacción con la ADN polimerasa gamma (Achanta *et al.*, 2005).

Por último, los mecanismos de fisión (división) y de fusión de las mitocondrias, en los que intervienen varias GTPasas de las membranas mitocondriales externas (Drp1, mitofusinas...) e internas (OPA1) y varias proteínas asociadas (Fis1...) modulan la senescencia celular : la elongación de la red mitocondrial por fusión permanente indujo una senescencia celular con disminución de la diferencia de potencial entre las dos caras de la membrana interna, aumento de la producción de ROS y lesiones en el ADN. Estas modificaciones fenotípicas son neutralizadas por la fragmentación de la red mitocondrial (Lee *et al.*, 2007).

3. Los mecanismos de los síndromes de envejecimiento acelerado de origen genético en el contexto de la teoría « núcleo y lamina »

Las laminas son las proteínas constitutivas de los filamentos intermedios localizados exclusivamente en el nucleoplasma. El gen LMNA codifica principalmente las laminas A y C, producidas por corte y empalme alternativo. Otros dos genes codifican las laminas B1 y B2.

Las Laminas A y B se sintetizan en el citosol en forma de un precursor que experimenta varias etapas de maduración. Las 3 proteínas poseen en su extremo C-terminal la caja CaaX (una cisteína, dos aminoácidos Alifáticos, un aminoácido indiferente). Esta secuencia CaaX permite la farnesilación de las laminas A y B (y de

aproximadamente otras 300 proteínas del genoma humano). El resto de farnesilo (isoprenoide de 15 átomos de carbono) se sintetiza en una capa intermedia de la ruta de síntesis de colesterol (Figura 7 adjunta). Una enzima citosólica, la farnesil-transferasa, fija el resto de farnesilo en la cisteína.

5 La presencia del resto de ácido graso permite el anclaje de las prelaminas A y B en el estrato citosólico de la membrana de envoltura del retículo endoplasmático (RE). Las prelaminas A y B se extienden entonces por FACE1 (ZMPSTE24) o FACE2 (Rce1) respectivamente y pierden sus tres últimos aminoácidos C-terminales, aaX. Las proteínas siempre están ancladas en la membrana de envoltura del RE en el que experimentan la acción de una segunda enzima, ICMT, que fija un grupo metilo en la cisteína ya farnesilada.

10 La maduración de las laminas B se termina en esta etapa. Éstas proteínas se insertan en el plano de la membrana de envoltura del RE, después de la cara citosólica de la envoltura nuclear, atraviesan el poro nuclear y se localizan en el estrato nucleoplasmático de la envoltura nuclear en el que entran en la constitución de la *lamina* nuclear y en el que interactúan con varias proteínas, por lo tanto el receptor de la lamina B. El anclaje en la envoltura tiene como consecuencia la ausencia de laminas B en la matriz nuclear, en el interior del nucleoplasma y a distancia de la envoltura.

15 La prelamina A farnesilada y carboximetilada sobre la misma cisteína C-terminal experimenta una última etapa de maduración por escisión proteolítica de los 15 últimos aminoácidos por FACE1 (y quizá por Rce1). La lamina A pierde su anclaje al RE, se hace soluble, y se importa en el nucleoplasma (como la lamina C) a través del poro nuclear, como todas las proteínas solubles, gracias a su señal de localización nuclear que recluta el complejo de importación necesario (Figura 8 adjunta).

20 En el nucleoplasma, la lamina A (y la lamina C) se localiza en la *lamina* nuclear, bajo la envoltura nuclear, en la que interactúa con numerosas proteínas insertadas en la lámina nucleoplasmática de la envoltura. Las laminas A y C (a diferencia de las laminas B) también están dispersas en el resto del nucleoplasma en el que entran en la constitución de la matriz nuclear o nucleoesqueleto (Figura 6 adjunta).

25 La matriz nuclear controla el funcionamiento del genoma nuclear: replicación, reparación del ADN, transcripción de los ARN, corte y empalme de los ARNm, maduración de los otros ARN... y sus componentes, en particular las laminas A y C, interactúan con proteínas muy numerosas importadas en el nucleoplasma (p53, SREBP...) como mostraron las anomalías observadas en el transcurso de las laminopatías de origen genético (Broers *et al.*, 2006; Vlcek *et al.*, 2001; Vlcek y Foisner, 2006). El lado nucleoplasmático de la envoltura nuclear y sus proteínas transmembrana así como las laminas de la *lamina* contribuye a la conservación de factores de regulación de la transcripción, antes de su utilización y a la regulación de la expresión genética (Heessen y Fornerod, 2007; Shaklai *et al.*, 2007).

30 Las primeras laminopatías descubiertas a partir de 1999 se presentaban como enfermedades predominantes en un tejido dado, músculo esquelético, músculo cardíaco..., mientras que las laminas son proteínas ubiquistas (Vlcek y Foisner, 2007a; Vlcek y Foisner, 2007b; Worman y Bonne, 2007). Las lipodistrofias asocian anomalías del metabolismo de los lípidos y una resistencia a la insulina con un trastorno de la distribución de la grasa corporal, al ser comparada con la lipodistrofia observada en tratamientos anti-retrovirales (Capeau *et al.*, 2005).

35 Las laminopatías « sistémicas » se descubrieron después de 2002: displasia acromandibular (OMIM 248370; (Agarwal *et al.*, 2003; Novelli *et al.*, 2002); progeria de Hutchinson-Gilford (OMIM 176670; (De Sandre-Giovannoli *et al.*, 2003; Eriksson *et al.*, 2003); dermatopatía restrictiva (OMIM 275210; (Navarro *et al.*, 2005; Navarro *et al.*, 2004). Se refieren a todos los tejidos del organismo de los pacientes, piel y apéndices, músculos esquelético y cardíaco, tejido óseo y cartilaginoso, tejido adiposo y sus consecuencias metabólicas, pero sobre todo van acompañadas de un envejecimiento acelerado, cuyo máximo se alcanza con la dermatopatía restrictiva, letal en el momento del nacimiento. Estas tres enfermedades están relacionadas o bien con una mutación en el gen *LMNA* que codifica las laminas A y C, o vienen del gen *FACE1* (*ZMPSTE24*) que codifica la proteasa del RE que escinde en dos repeticiones a la prelamina A. La mutación del gen *LMNA* tiene como consecuencia que hace desaparecer el sitio de reconocimiento por FACE1 de la prelamina A: la proteína no se extiende, por lo tanto conserva su resto de farnesilo, se importa en el nucleoplasma por deslizamiento a lo largo de las membranas de envoltura como lo son las laminas B (Pan *et al.*, 2007). La prelamina A farnesilada quedar anclada en la cara nucleoplasmática de la envoltura nuclear en la que altera la organización de la *lamina* y las interacciones entre la *lamina* y las proteínas de membrana de la envoltura, lo que se traduce en deformaciones nucleares características (Goldman *et al.*, 2004).

40 El resto de la matriz nuclear está desprovisto de lamina A, con consecuencias funcionales múltiples, por ejemplo, la activación de las rutas cadena arriba de p53 (Varela *et al.*, 2005), anomalías de la mitosis (Cao *et al.*, 2007; Dechat *et al.*, 2007), reparación del ADN (Liu *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2007b)... conduciendo a la senescencia celular (Kudlow *et al.*, 2007). El análisis del transcriptoma de células de pacientes con progeria mostró anomalías de la expresión de genes implicados en aterosclerosis (Csoka *et al.*, 2004).

65 Parece probable que el envejecimiento acelerado presentado por los pacientes tratados con ciertos agentes anti-retrovirales, en particular las PI que inhiben ZMPSTE24 (FACE1), obedece a los mismos mecanismos.

La mutación del gen LMNA responsable de la progeria expone un sitio crítico de corte y empalme que conduce a la síntesis de un ARNm desprovisto de 150 nucleótidos, que codifica la progerina, una prelamina A desprovista de 50 aminoácidos y que conserva su grupo farnesilo. Esta misma proteína se produce en el transcurso del envejecimiento fisiológico, en ausencia de cualquier mutación en el gen *LMNA*, después de un error, relacionado con la edad, de la maquinaria de corte y empalme (Scaffidi y Misteli 2006). La progerina se acumula en los fibroblastos dérmicos situados bajo la lámina basal, así como en los queratinocitos. Podría representar un marcador de la senescencia cutánea (McClintock *et al.*, 2007).

Las modificaciones nucleares (hernias del nucleoplasma en el citosol, ruptura de la envoltura, irregularidades del contorno nuclear...) observadas en las células de pacientes que padecen progeria también parecen inducidas por la proteína viral Vpr que facilita la entrada, mediante rotura transitoria de la envoltura nuclear y de la *lamina*, del complejo de integración previa del virus del SIDA, complejo demasiado voluminoso para ser importado en el nucleoplasma a través de los poros nucleares (de Noronha *et al.*, 2001). Para una revisión reciente sobre estos mecanismos de importación nuclear (Suzuki y Craigie, 2007).

Por otra parte, se ha mostrado que varias proteínas de la cara nucleoplasmática de la envoltura nuclear, por ejemplo la emerina, mutada en una forma de distrofia muscular de Emery-Dreifuss, son indispensables para la penetración en el nucleoplasma del virus del SIDA y para la infección de células que no se dividen (Jacque y Stevenson, 2006).

La expresión laminopatía genética reagrupa por lo tanto las patologías que resultan de mutaciones en los genes que codifican las laminas, en particular LMNA que codifica las laminas A y C, y además las provocadas por mutaciones de proteínas asociadas, incluyendo las implicadas en la maduración de las laminas.

Las anomalías inducidas por las PI en la matriz nuclear representan por lo tanto una de las laminopatías, adquirida, yatrogénica. Ya sean de origen genético o adquirido, estas anomalías de la matriz nuclear tienen como consecuencias una inestabilidad genómica y el envejecimiento celular (Mérita *et al.*, 2007; Oberdoerffer y Sinclair, 2007).

4. La teoría « telomérica » del envejecimiento

El envejecimiento celular está controlado por un « reloj » que mide la longitud de los telómeros, que se acortan en cada mitosis, un fenómeno que se puede compensar por la actividad de la subunidad catalítica de la telomerasa (Gilson y Geli, 2007; Stewart and Weinberg, 2006).

Antes de la aparición de la PCR cuantitativa que permite la medida directa de la longitud de los telómeros en particular en las células sanguíneas mononucleares (Cawthon, 2002; Gil y Coetzer, 2004; Njajou *et al.*, 2007), la medida de la actividad de la telomerasa (ensayo TRAP) se realizó en células de pacientes tratados con anti-retrovirales, con resultados variables, en particular de acuerdo con el subtipo de linfocitos T analizados (Effros, 2000).

Los NRTI inhiben la actividad de la telomerasa (Olivero, 2007; Yamaguchi *et al.*, 2001).

Las anomalías de la lamina A comprenden una disminución de la actividad de la telomerasa, que conduce a un acortamiento acelerado de los telómeros. Estos efectos se observan en las células de paciente que padecen progeria, tantas las células se han transfectado o no para sobreexpresar la subunidad catalítica de la telomerasa (Wallis *et al.*, 2004). Se obtuvieron resultados comparables en fibroblastos de sujetos sanos que sobreexpresan,, después de transfección la lamina A, normal, mutada o suprimida como en la progeria (Huang *et al.*, 2008). La matriz nuclear y las proteínas de la envoltura nuclear que se le asocian al nivel de la *lamina* controlan por lo tanto directa o indirectamente la actividad de la telomerasa (Pandita *et al.*, 2007).

5. Ciertos factores de regulación de la transcripción, en particular p53 y NF-κB, están implicados en el fenómeno de envejecimiento o su regulación.

Dos familias de proteínas, p53 (Zafon, 2007) y NF-κB (Hayden y Ghosh, 2004), controlan la transcripción de genes muy numerosos y están implicadas en particular en el fenómeno de envejecimiento. Estas proteínas también participan en los mecanismos descritos en las otras teorías del envejecimiento y se relacionan entre sí.

Además de sus funciones bien caracterizadas en el control del ciclo celular, la respuesta al estrés, oncogénesis, la reparación de lesiones del ADN (Fuster *et al.*, 2007; Helton y Chen, 2007; Sengupta y Harris, 2005), p53 interviene en el envejecimiento celular (véase, por ejemplo: (Bauer y Helfand, 2006; Ben-Porath y Weinberg, 2005; Papazoglu y Mills, 2007; Sharpless y DePinho, 2002; Tyner *et al.*, 2002). La proteína p53 está implicada también en las anomalías inducidas por las laminopatías (Varela *et al.*, 2005), en el funcionamiento de la helicasa cuya mutación es responsable del síndrome de Werner (Brosh *et al.*, 2001; Sommers *et al.*, 2005), la regulación de los telómeros (Wynford-Thomas, 1996), el control de la respiración mitocondrial (Matoba *et al.*, 2006) independientemente del papel de p53 en la inducción de la apoptosis por su interacción con las moléculas apoptógenas de la membrana

externa (Manfredi, 2003; Mihara *et al.*, 2003; Moll *et al.*, 2005). p53 también regula la ruta metabólica de « insulina-IGF1-klotho » (véase a continuación).

5 NF- κ B también está en la intersección de muy numerosas rutas metabólicas. Su inactivación por el ARNr interferencia en fibroblastos en cultivo les protege de la senescencia (Hardy *et al.*, 2005). Además, el bloqueo inducible de la expresión de NF- κ B en las células epidérmicas de ratón ralentiza su envejecimiento a través de las variaciones de la expresión de numerosos genes analizados por micromatriz (Adler *et al.*, 2007).

10 6. La teoría « metabólica » del envejecimiento a través de la restricción calórica y las rutas de señalización de la insulina, de NGF1 y de la hormona klotho relacionan a la membrana plasmática, el núcleo y la mitocondria

15 La restricción calórica induce el aumento de la del periodo de vida en los roedores (Bordone y Guarente, 2005). Activa algunas sirtuina desacetilasas, que dirigen a la vez las histonas (con un remodelado de la cromatina) (Vijg y Suh, 2006), otras numerosas proteínas nucleares (factores de transcripción por ejemplo p53, proteínas que participan en la reparación del ADN...) y además citosólicas (tubulina) y mitocondriales (Guarente y Picard, 2005; North y Verdin, 2004; Porcu y Chiarugi, 2005).

20 La restricción calórica provoca la biogénesis de las mitocondrias a través de la expresión de la NO-sintasa endotelial, eNOS (Nisoli y Carruba, 2006; Nisoli *et al.*, 2005), dando como resultado del aumento de la producción de ROS (Gredilla y Barja, 2005).

Las rutas de señalización de la insulina y el IGF, implicadas en el envejecimiento (Bartke, 2005; Russell y Kahn, 2007) se inhiben por la restricción calórica (Holzenberger *et al.*, 2004; Masoro, 2004).

25 La restricción calórica también inhibe las rutas de señalización reguladas por la hormona klotho (Kurosu *et al.*, 2005; Unger, 2006), cuyas mutaciones están asociadas con un envejecimiento prematuro en ratones (Kuro-o *et al.*, 1997). Klotho es un regulador de la respuesta inducida por el receptor FGF-23 (Kurosu *et al.*, 2006). Las mutaciones de klotho y FGF-23 inducen el mismo fenotipo de envejecimiento prematuro, del que se sabe que está causado por una hipervitaminosis D y que se corrige por la supresión de un gen que aumenta el efecto de la vitamina D (Razzaque y Lanske, 2006). Además, Klotho bloquear la respuesta de los receptores Wnt (Liu *et al.*, 2007a), lo que muestra la variedad de rutas metabólicas implicadas en el envejecimiento. Por último, la insulina estimula, a través de la fosfatidil-inositol 3 quinasa, la escisión del precursor transmembrana de klotho por metaloproteasas de la familia ADAM y la liberación de klotho en el medio extracelular (Chen *et al.*, 2007).

35 La proteína p53 también está implicada en la regulación de estas rutas metabólicas (Campisi, 2004; de Oliveira, 2006; Kim *et al.*, 2007; Schmid *et al.*, 2007).

40 La proteína p66^{shc} representa una de las señales de comunicación entre los receptores de la membrana plasmática para la insulina y para NGF1, el núcleo y la mitocondria (Martin y Friedman, 2004). Los ratones KO p66^{shc} muestran una mayor resistencia al estrés y un aumento de su periodo de vida (Migliaccio *et al.*, 1999). p66^{shc} es una diana de p53, que se encuentra en la mitocondria desde la que controla el metabolismo y la producción de ROS (Migliaccio *et al.*, 2006; Nemoto *et al.*, 2006; Orsini *et al.*, 2004; Trinei *et al.*, 2002). Una delección de p66^{shc} inhibe el envejecimiento de las células madre cardíacas y previene ataques al corazón, dos fenómenos inducidos por la diabetes (Rota *et al.*, 2006). p66^{shc} también es una enzima redox. Como respuesta al estrés celular, p66^{shc} se importa en la mitocondria y se localiza en el espacio intermembrana en el que sintetiza H₂O₂ (es decir, un 30 % del H₂O₂ celular, siendo producido el resto por el peroxisoma) utilizando electrones cedidos por el citocromo C (Giorgio *et al.*, 2005). El H₂O₂ podría representar una señal intracelular de regulación del periodo de vida (Giorgio *et al.*, 2007).

50 Descripción de la invención

Después de extensas investigaciones, los inventores han mostrado que la combinación de un inhibidor de la hidroximetil-coenzima A reductasa (familia de las estatinas) y un inhibidor de la farnesil pirofosfato sintasa (familia de los amino-bifosfonatos, NBP), o de una de sus sales fisiológicamente aceptables, es un tratamiento eficaz de situaciones, patológicas o no, relacionadas con la acumulación y/o la persistencia en las células de proteínas preniladas, porque en este sentido actúa sobre el conjunto de la ruta de prenilación de las proteínas, tanto en C15 como en C20 o en las formas no caracterizadas. Además, los inventores también han encontrado que la combinación de un inhibidor de la hidroximetilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasa y de un inhibidor de la farnesil-pirofosfato sintasa presenta un efecto aditivo en la restauración del fenotipo normal en fibroblastos de pacientes que padecen Progeria y en ratones que presentan un modelo de dermatopatía restrictiva. El efecto de la combinación es significativamente superior al del efecto de uno u otro de los inhibidores utilizados individualmente (Varela *et al.*, 2008 (54 bis)).

65 La utilización de la asociación en las células de pacientes que padecen Progeria conduce a una inhibición de la prenilación de las proteínas, por lo tanto ha la aparición de prelamina A no farnesilada, a la mejora de los síntomas nucleares y a la corrección parcial de anomalías de reparación del ADN. La inhibición de la prenilación también se

observa en ratones que tienen un modelo de dermatopatía restrictiva y en parte restaura el periodo de vida de los ratones (Varela *et al.*, 2008 (54 bis)).

Los tratamientos anti-retrovirales se dirigen a varias rutas metabólicas y varios compartimentos celulares, citosol, nucleoplasma, mitocondria.

5 Los efectos secundarios de estos tratamientos reproducen ciertos signos clínicos y biológicos observados en pacientes que padecen laminopatías genéticas causadas por mutaciones en el gen *LMNA* o en el gen *ZMPSTE24*. La característica común de estas mutaciones es conservar el grupo farnesilo fijado en la lamina A o en la prelamina A. Este grupo farnesilo ancla la lamina A en la cara nucleoplasmática de la envoltura nuclear a nivel de la *lamina*,
10 mientras que el resto del nucleoplasma está desprovisto de lamina soluble.

15 Estas dos anomalías de la distribución de la lamina A comprenden consecuencias perjudiciales a nivel de varias rutas metabólicas nucleares (replicación y reparación del ADN, transcripción genética, acortamiento de los telómeros...), y también tienen consecuencias perjudiciales en otros compartimentos celulares, incluyendo la mitocondria. La disfunción general de la célula provoca su envejecimiento acelerado y la reducción de su periodo de vida.

20 Una familia de tratamientos antirretrovirales, los inhibidores de proteasa, inhiben *ZMPSTE24*, bloquear la maduración de la prelamina A y provoca la persistencia en la célula de la prelamina A farnesilada. La figura 9 adjunta representa de forma esquemática la teoría del envejecimiento desarrollada por los inventores de la presente y basada en las anomalías de la maduración de la prelamina A y sus consecuencias funcionales.

25 Por otra parte, además de los efectos indirectos de los inhibidores de la proteasa viral en la mitocondria, una segunda familia de medicamentos antirretrovirales, los nucleósidos inhibidores de la transcriptasa inversa viral, alteran directamente la mitocondria, un orgánulo del que se dice que las anomalías de su funcionamiento están asociadas al envejecimiento.

30 Por lo tanto con el objetivo es analizar los mecanismos mediante los cuales estos dos tipos de tratamiento anti-retroviral conllevan el envejecimiento acelerado de los pacientes infectados por el virus del SIDA y verificar que estos mecanismos son comparables a los que provocan el envejecimiento acelerado de los pacientes que padecen laminopatía genética.

35 Los inventores de la presente han deducido que los efectos secundarios descritos anteriormente de los tratamientos anti-retrovirales se pueden minimizar gracias a una composición que comprende o un tratamiento que combina:

- al menos un inhibidor de la hidroximetilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasa o de una de sus sales fisiológicamente aceptables, y
- al menos un inhibidor de la farnesil-pirofosfato sintasa o de una de sus sales fisiológicamente aceptables.

40 Por lo tanto, la presente invención se refiere a una composición que comprende:

- al menos un inhibidor de la hidroximetilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasa o una de sus sales fisiológicamente aceptables, siendo dicho inhibidor una molécula de la familia de las estatinas o una de sus sales fisiológicamente aceptables
- 45 - al menos un inhibidor de la farnesil-pirofosfato sintasa o de una de sus sales fisiológicamente aceptable, siendo dicho inhibidor una molécula de la familia de los aminobifosfonatos (NBP) o una de sus sales fisiológicamente aceptables, y
- al menos un agente anti-VIH, siendo dicho agente anti-VIH un inhibidor de proteasa o un inhibidor de la transcriptasa inversa.

50 Esta composición se puede destinar, por ejemplo, al tratamiento de situaciones, patológicas o no, relacionadas con la acumulación y/o la persistencia en las células de proteínas preniladas. En particular con esta composición es útil para el tratamiento de un paciente infectado por el VIH.

55 La presente invención también describe una composición en la que el agente anti-VIH es un agente anti-retroviral o una mezcla de agentes anti-retrovirales.

La presente invención se refiere a una composición, en la que el agente anti-VIH es un inhibidor de proteasa o un inhibidor de la transcriptasa inversa.

60 La presente invención también se refiere a una composición de acuerdo con la invención, en la que el agente anti-VIH es un inhibidor de proteasa elegido entre el grupo que comprende fosamprenavir, lopinavir, ritonavir, amprenavir, atazanavir e indinavir.

La presente invención también se refiere a una composición de acuerdo con la invención, en la que el agente anti-VIH es un inhibidor de la transcriptasa inversa elegido entre el grupo que comprende zidovudina, lamivudina, didanosina y epizicom.

5 En la composición descrita, el agente anti-VIH puede ser una asociación de una o de varias antiproteasas del virus y/o de uno o de varios inhibidores de la transcriptasa inversa del virus y/o de uno o de varios inhibidores de la entrada del virus en las células y/o de uno o de varios inhibidores de la integrasa y/o de cualquier otro tratamiento que posea un efecto antiviral, en particular cualquier parlamento reconocido por las instituciones reguladoras nacionales y/o internacionales y por la comunidad científica.

10 La presente invención también se refiere a una composición de acuerdo con la invención, en la que se usan compuestos que son a la vez inhibidores de la hidroximetilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasa e inhibidores de la farnesil-pirofosfato sintasa.

15 De forma muy particular, la composición de acuerdo con la invención está destinada al tratamiento de un paciente infectado por el VIH y que desarrolla efectos secundarios relacionados con la acumulación y/o la persistencia en las células de progerina; incluso de forma más particular, al tratamiento de situaciones relacionadas con la acumulación y/o la persistencia en las células de prelamina A farnesilada, tanto si está, o no, truncada o modificada.

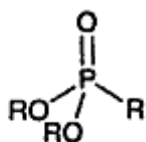
20 En la presente, se describen inhibidores de la farnesil-pirofosfato sintasa, o una de sus sales fisiológicamente aceptables, que se pueden usar en la preparación de la composición.

25 Las sales fisiológicamente aceptables descritas pueden ser, por ejemplo, sales formadas con los ácidos clorhídrico, bromhídrico, nítrico, sulfúrico, fosfórico, ácidos carboxílicos tales como, por ejemplo, los ácidos acético, fórmico, propiónico, benzoico, maleico, fumárico, succínico, tartárico, cítrico, oxálico, glioxílico, aspártico, alcano sulfónicos tales como los ácidos metano o etano sulfónicos, arilsulfónicos, tales como los ácidos benceno o paratolueno sulfónicos.

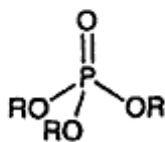
30 De acuerdo con la invención, el inhibidor de la farnesil-pirofosfato sintasa es uno de los miembros de la familia de los aminobifosfonatos (NBP), o una de sus sales fisiológicamente aceptables.

Los polifosfonatos son moléculas sintéticas muy usadas en el tratamiento de en la osteoporosis y de la regeneración ósea.

35 El término fosfonato se aplica a moléculas muy parecidas al fosfato:



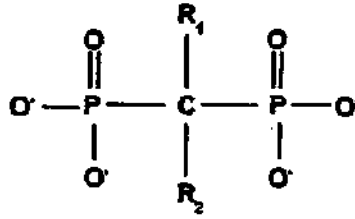
Fosfonato



Fosfato

40 El núcleo de los bifosfonatos (BP) es el equivalente de un enlace PO-P como en el ATP, por ejemplo, pero en el que el oxígeno está sustituido por un carbono. Esto confiere una estabilidad bastante particular a estas moléculas.

Un bifosfonato simple sería equivalente al ADP, estando los 2 grupos fosfato (03P-) sustituidos por el grupo bifosfonato.

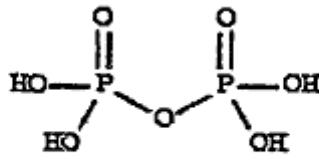


El carbono central, a diferencia del oxígeno de los fosfatos, puede estar incluso implicado en 2 enlaces, y es la naturaleza de los grupos insertados en este carbono lo que consiguió la especificidad de los bifosfonatos.

- 5 Cuando las cadenas "laterales" (R1 y R2) comprenden una función aminada (NH), o más generalmente, uno o varios átomos de nitrógeno, se refiere a amino-bifosfonato, o NBP.

Por supuesto, otros sustituyentes pueden estar fijados en los oxígenos.

- 10 El ácido pirofosfórico, o pirofosfato en solución (PPi)



Ácido pirofosfórico

- 15 se usa en numerosas reacciones metabólicas como transportador de sustratos, y se restablece al final de la reacción. Una de las rutas metabólicas que usan moléculas acopladas al pirofosfato es la de la prenilación proteica.

El injerto de un isopentenil-PP (unidad de base en C5) en un geranyl-PP (C10) para proporcionar farnesil-PP, reacción catalizada por la enzima farnesil-pirofosfato sintasa (FPS), libera un PPi.

- 20 Esta etapa es la que está específicamente inhibida por los NBP.

En este sentido y a modo de ejemplo, el aminobifosfonato (inhibidor de la farnesil-pirofosfato sintasa) se puede elegir entre

- 25 - ácido alendrónico o su forma iónica, alendronato;
 - ácido clodrónico o su forma iónica, clodronato;
 - ácido etidrónico o su forma iónica, etidronato;
 - ácido ibandrónico, o su forma iónica, ibandronato;
 - ácido medrónico o su forma iónica medronato;
 30 - ácido neridrónico o su forma iónica, neridronato;
 - ácido olpadrónico o su forma iónica, olpadronato;
 - ácido pamidrónico o su forma iónica, pamidronato;
 - ácido risedrónico o su forma iónica, risedronato;
 - ácido tiludrónico o su forma iónica tiludronato;
 35 - ácido zoledrónico o su forma iónica zoledronato;
 - ácido 4-N,N-dimetilaminometano difosfónico o su forma iónica, dimetilaminometanodifosfonato;
 - difosfonato de α -amino-(4-hidroxibencilideno).

- 40 Preferentemente de acuerdo con la invención, se prefiere usar ácido zoledrónico (también denominado ácido zolendrónico) o su forma iónica, zoledronato (también denominado zolendronato).

En la presente invención, se describen inhibidores de la HMG-CoA reductasa, o una de sus sales fisiológicamente aceptables, que se pueden usar en la preparación de la composición.

- 45 De acuerdo con la invención con el inhibidor de la HMG-CoA reductasa es una molécula de la familia de las estatinas, ya sea liposoluble o hidrosoluble, o una de sus sales fisiológicamente aceptables.

Las estatinas se han identificado en hongos. Estas tienen una actividad de inhibición de la HMG-CoA reductasa, enzima fundamental de la biosíntesis del colesterol y los esteroides, que cataliza la reducción del glutarato de

hidroximetilo acoplado a la Coenzima A en el ácido mevalónico (mevalonato en solución). Esta inhibición está asegurada por su analogía estructural con el esqueleto del glutarato de hidroximetilo. La ruta metabólica implicada es sin duda la de la biosíntesis de colesterol, certamen es la de la síntesis de los grupos prenilo, polímeros de la unidad de base con 5 carbonos de isopreno usados para modificar aproximadamente 300 proteínas en las células y para unirles a una cola lipófila, lo que permite en particular su anclaje en las membranas.

Los principales poliprenos, todos originados en el piruvato y en la HMG-CoA, son el geranilo (C10), el farnesilo (C15) y el geranil-geranilo (C20).

En general, todas las estatinas son hepatoselectivas, pero no todas tienen el mismo modo de entrada en las células. De hecho, tanto pravastatina como rosuvastatina son 2 hidrófilas, por lo tanto hidrosolubles, al contrario de todas las demás que son lipófilas, por lo tanto se pueden difundir libremente a través de las membranas plasmáticas (bicapas lipídicas), lo que explica sin duda su toxicidad más elevada. Las estatinas hidrosolubles necesitan un transportador específico para entrar en la célula, *Transportador 3 Aniónico Orgánico*, u OAT3, o SLC22A8 (Takedaa *et al.*, 2004 (46)).

Se usan mucho para el tratamiento de la hipercolesterolemia, y sus efectos secundarios, grados, están bien caracterizados. En particular, se trata de casos de rbdomiólisis (de un 1 a un 7 % de los casos según la molécula usada, Evans *et al.*, 2002 (12)), cuyo signo precursor, los dolores musculares en el paciente tratado, conlleva la parada inmediata del tratamiento.

En este sentido y a modo de ejemplo, una estatina se puede elegir entre atorvastatina, simvastatina, pravastatina, rivastatina, mevastatina (o compactina), fluindostatina, velostatina, fluvastatina, dalvastatina, cerivastatina, pentostatina, rosuvastatina, lovastatina, pitavastatina, o una de sus sales fisiológicamente aceptables.

La lovastatina, la pravastatina y la simvastatina son moléculas derivadas de metabolitos fúngicos, mientras que las otras, (atorvastatina, cerivastatina, fluvastatina, pitavastatina y rosuvastatina) son totalmente sintéticas. Preferentemente, de acuerdo con la invención, se usa pravastatina, una estatina seminatural hidrosoluble.

Por supuesto, de acuerdo con la invención es posible utilizar un, dos o varios inhibidor(es) de la farnesil-pirofosfato sintasa asociados a un, dos ovarios inhibidos(es) de la HMG-CoA reductasa.

De acuerdo con una forma particular de la invención, la composición se puede destinar al tratamiento de los efectos secundarios del tratamiento anti-VIH, por ejemplo, el envejecimiento de la piel, la pérdida de pelos y/o de cabello, osteoporosis y lipodistrofia.

La presente invención también tiene como objeto la composición de acuerdo con la invención para su aplicación como medicamento en el tratamiento de los efectos secundarios de envejecimiento precoz generado(s) en un paciente por un tratamiento anti-VIH.

De acuerdo con la invención, el inhibidor de la farnesil-pirofosfato sintasa y el inhibidor de la HMG-CoA reductasa están presentes en la composición de forma ventajosa en dosis fisiológicamente eficaces.

De manera general, las cantidades a administrar se pueden adaptar en función del paciente, la patología, modo de administración, etc. Se entiende que se pueden realizar aplicaciones repetidas, opcionalmente en combinación con otros principios activos o cualquier vehículo.

En general, la dosis diaria de los inhibidores será la dosis mínima para obtener el efecto deseado.

De acuerdo con la invención, el inhibidor de la hidroximetilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasa, el inhibidor de la farnesil-pirofosfato sintasa, y el agente anti-VIH se pueden usar en la composición, en mezcla con uno o varios excipientes o vehículos inertes, es decir, fisiológicamente inactivos y no tóxicos. Por ejemplo, se pueden mencionar los ingredientes usados habitualmente en los medicamentos destinados al tratamiento de pacientes infectados con el VIH y que acompañan al agente anti-VIH.

La composición de la presente invención también puede comprender al menos otro principio activo, en particular otro ingrediente terapéuticamente activo, por ejemplo, para un uso simultáneo, separado o escalonado en el tiempo siguiendo la formación galénica usada. Este otro ingrediente puede ser, por ejemplo, 1 principio activo usado por ejemplo en el tratamiento de enfermedades oportunistas que se puedan desarrollar en un paciente infectado por el VIH.

La composición de la presente invención es una composición que se puede usar a la vez para tratar un paciente infectado por el VIH y para prevenir y/o tratar desórdenes cutáneos originados por el uso del agente anti-VIH. Esta composición se puede usar dentro de una terapia múltiple de un paciente infectado por el VIH. El agente anti-VIH puede ser único o múltiple (varios agentes anti-VIH en mezcla). En el caso de una terapia múltiple (por ejemplo di-, tri- o tetra-terapia), la mezcla de inhibidores puede acompañar a uno o varios de los agentes anti-VIH.

5 El agente anti-VIH también puede ser una asociación de una o varias antiproteasas del virus y/o uno o varios inhibidores de la transcriptasa inversa del virus y/o uno o varios inhibidores de la entrada del virus en las células y/o uno o varios inhibidores de la integrasa y/o cualquier otro tratamiento que posea un efecto antiviral, en particular cualquier tratamiento reconocido por las instituciones reguladoras nacionales y/o internacionales y por la comunidad científica.

10 Se describe un método de tratamiento de un paciente infectado por el VIH que comprende la administración de una composición de acuerdo con la invención. La composición de la invención es tal como se ha definido anteriormente. De acuerdo con la invención, la administración se puede realizar siguiendo todas las vías conocidas por el experto en la materia para la administración de una composición anti-VIH. Por ejemplo, se puede tratar de una administración realizada por vía oral o por inyección.

15 Como se ha indicado anteriormente, la dosis administrada de la composición de la invención depende de las necesidades del paciente y también se determina teniendo en cuenta lo que es fisiológicamente aceptable para el paciente.

20 La cantidad de inhibidores en la composición de la presente invención puede ser una tal que permita, a modo de ejemplo, la administración de una dosis de inhibidor de la hidroximetilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasa de 0,01 a 2 mg/kg de peso corporal y una dosis de inhibidor de la farnesil-pirofosfato sintasa de 0,01 a 40 mg/kg de peso corporal.

25 De acuerdo con la invención, a modo de ejemplo, en la composición de la invención, la proporción del inhibidor de la farnesil-pirofosfato sintasa con respecto al inhibidor de la de la hidroximetil glutaril coenzima A reductasa, o de una de sus sales fisiológicamente aceptables, puede estar comprendida entre 0,01 y 0,2, de manera preferente de 0,05 a 0,35.

30 La cantidad de agente anti-VIH en la composición de la presente invención se determina de manera clásica siguiendo los conocimientos actuales del experto en la materia en el tratamiento de pacientes infectados por el VIH. Se puede elegir, por ejemplo, entre las usadas de forma clásica en los pacientes infectados por el VIH.

35 Algunos ejemplos de concentración de agente anti-VIH para cada uno de los ejemplos de agente anti-VIH descritos en la presente invención y cada una de las letras o asociación de agentes anti-VIH descritos en el presente invención, se proporcionan en el Diccionario VIDAL (marca registrada), por ejemplo, en la Edición de 2007. Las concentraciones indicadas en este Diccionario son además las autorizadas por el ser humano.

40 La presente invención también se refiere a un método para tratar los efectos secundarios de envejecimiento precoz y/o lipodistrofia generado(s) en un paciente sometido a un tratamiento anti-VIH, comprendiendo dicho método, que se describe, la administración de una mezcla que comprende al menos un inhibidor de la hidroximetilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasa y al menos un inhibidor de la farnesil-pirofosfato sintasa.

45 La presente invención también tiene como objeto una composición de acuerdo con la invención para su aplicación como medicamento en el tratamiento de los efectos secundarios de envejecimiento precoz generado(s) en un paciente por un tratamiento anti-VIH.

Las condiciones, cantidades y vías de administración pueden ser las que se describen en la presente invención, por ejemplo como se ha mencionado anteriormente. El agente anti-VIH es por ejemplo un agente anti-VIH o una asociación tal como se ha definido anteriormente.

50 Una aplicación de la mezcla de inhibidores mencionados anteriormente como adyuvante de tratamientos que tiene un efecto yatrógeno, por ejemplo un envejecimiento anticipado, cuya aplicación, por ejemplo como "adyuvante para las terapias anti-VIH que comprenden al menos una anti-proteasa" que implica en particular este efecto yatrógeno, se describe. Por lo tanto, cualquier tratamiento que genere los efectos secundarios mencionados en la presente invención está incluido por la presente.

55 La presente invención también tiene como objeto una composición de acuerdo con la invención para su aplicación como medicamento en el tratamiento de los efectos secundarios de envejecimiento precoz generado(s) en un paciente por un tratamiento anti-VIH utilizando un inhibidor de proteasa o un inhibidor de la transcriptasa inversa.

60 La presente invención también describe un método de tratamiento de un paciente infectado por el VIH que comprende, en cualquier orden, las etapas siguientes:

- administración de una mezcla que comprende al menos un inhibidor de la hidroximetilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasa y al menos un inhibidor de la farnesil-pirofosfato sintasa,
- 65 - administración de un agente anti-VIH,

en el que las administraciones son simultáneas, sucesivas o alternativas.

La presente invención también tiene como objeto una composición para su aplicación como medicamento en el tratamiento del VIH que comprende, en cualquier orden, las etapas siguientes:

- 5 i. administración de una mezcla que comprende al menos un inhibidor de la hidroximetilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasa, siendo dicho inhibidor una molécula de la familia de las estatinas o una de sus sales fisiológicamente aceptables, y al menos un inhibidor de la farnesil-pirofosfato sintasa, siendo dicho inhibidor una molécula de la familia de los aminobifosfonatos (NBP) o una de sus sales fisiológicamente aceptables
- 10 ii. administración de un agente anti-VIH, siendo dicho agente anti-VIH un inhibidor de proteasa o un inhibidor de la transcriptasa inversa,

en la que las administraciones son simultáneas, sucesivas o alternativas.

- 15 De acuerdo con la invención, dicha mezcla y dicho agente anti-VIH se pueden coadministrar. Esto se une al método de la invención definido anteriormente.

De acuerdo con la invención, el agente anti-VIH puede ser tal como se ha definido anteriormente.

- 20 De acuerdo con la invención, al menos una de las administraciones se puede realizar por vía oral o por inyección. Las dos administraciones se pueden realizar de la misma manera o de manera diferente.

25 En otros términos, incluso si en la presente descripción se hace referencia a una composición, se entiende bien que cada uno de los compuestos de la composición se puede administrar de forma simultánea con los otros compuestos (por ejemplo, en una sola composición o en dos composiciones o en tres composiciones, comprendiendo cada una de estas composiciones uno o varios de los compuestos mencionados anteriormente, pudiendo ser el modo de administración de cada uno de los componentes o composición o composiciones idéntico o diferente), o independientemente los unos de los otros, por ejemplo, de forma sucesiva, por ejemplo, administración independiente de un inhibidor de la hidroximetilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasa, administración independiente de al menos un inhibidor de la farnesil-pirofosfato sintasa y administración independiente de un agente anti-VIH, siendo realizadas estas administraciones en un mismo paciente, de forma simultánea o sucesiva o alternativa, en un orden que se ha mencionado anteriormente o en otro orden. Estas diferentes administraciones se pueden realizar, independientemente la una de la otra o de manera unida (composición o coadministración), mediante un modo de administración idéntico diferente (inyección, ingestión, aplicación tópica, etc.), una o varias veces al día, durante uno o varios días sucesivos o no.

30

35

La administración de dicha mezcla de inhibidores se puede realizar por ejemplo con una dosis de inhibidor de la hidroximetilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasa de 0,01 a 2 mg/kg de peso corporal y con una dosis de inhibidor de la farnesil-pirofosfato sintasa de 0,01 a 40 mg/kg de peso corporal.

40

La administración del agente anti-VIH se puede realizar como se ha indicado anteriormente.

45 A modo de ejemplo únicamente, en la tabla se describen posologías que se siguen para la realización de uno otro de los métodos definidos anteriormente. A partir de esta tabla se pueden deducir algunos ejemplos de cantidades de inhibidores y de agente anti-VIH en una composición de acuerdo con la presente invención.

	Posología 1	Posología 2	Vía	Intervalo amplio anti-VIH
Pravastatina	10 a 20 mg/d	20 a 40 mg/d	oral	1 a 100 mg/d
Simvastatina	10 mg/d	10 a 40 mg/d	oral	1 a 100 mg/d
Alendronato	10 mg/d	20 a 40 mg/d	oral	1 a 50 mg/d
Zolendronato	4 mg/3 s	de 0,20 mg/d	IV	0,01 a 0,50 mg/d
Pamidronato	15 a 90 mg/d	-	IV	1 a 100 mg/d
Clodronato	1600 mg/	en dos veces	oral	100 mg a 2 g/d
« IV » significa por vía intravenosa « d » significa « día ». Dosis/d = dosis/día.				

De acuerdo con la invención, las posologías con respecto al agente anti-VIH que se pueden usar para la realización de la presente invención pueden ser las conocidas por el experto en la materia. Se puede tratar, por ejemplo, de

posologías descritas en el Diccionario VIDAL (marca registrada), por ejemplo en la Edición de 2007. Para cada uno de los ejemplos de agente anti-VIH descritos anteriormente y para cada una de las mezclas o asociación de agentes anti-VIH descritos anteriormente, también se encontrarán, en el Diccionario VIDAL (marca registrada), por ejemplo, en la Edición de 2007, posología si se pueden usar para realizar la presente invención.

5 Con la lectura de los ejemplos que siguen a continuación proporcionados de modo ilustrativo e ilustrados con las figuras adjuntas podrán aparecer incluso otras ventajas para el experto en la materia.

Breve descripción de las figuras

- 10
- La Figura 1 ilustra los resultados obtenidos en Transferencia de Western en fibroblastos de muestra "normales" tratados con dosis crecientes de una estatina hidrosoluble (pravastatina P, 20 a 100 μ M), y un aminobifosfonato (NBP, zoledronato Z, 20 a 100 μ M) (Pistas A a I, respectivamente P20/Z20, P20/Z60, P20/Z100, P60/Z20, P60/Z60, P60/Z100, P100/Z20, P100/Z60, P100/Z100). La pista J es un control positivo de presencia de prelamina A (fibroblastos de pacientes DR), la pista K es el control negativo, tratado con el disolvente solo (PBS).
 - 15 - La Figura 2 ilustran los resultados obtenidos con las dosis eficaces de cada uno de los productos.
 - La Figura 3 ilustra el efecto superior obtenido durante la administración de 2 productos juntos.
 - La Figura 4 ilustra la acción de la asociación de los 2 productos en células envejecidas.
 - La Figura 5 ilustra la multiplicación celular de los fibroblastos por medida del índice mitótico en función de las condiciones de cultivo celular. El índice mitótico corresponde a la relación entre el número de núcleos etiquetados (que entran en división) con respecto al número de núcleos totales del campo observado en función de cada tratamiento.
 - 20 - Figura 6: Representación esquemática de la teoría mitocondrial del envejecimiento. Las dianas mitocondriales de los tratamientos antirretrovirales. Leyenda: NRTI: nucleósidos inhibidores de la transcriptasa inversa, PI: inhibidor de la proteasa, ADNmt: ADN mitocondrial y ROS: especie reactiva del oxígeno.
 - Figura 7: Representación esquemática de la ruta de biosíntesis de los isoprenoides y sus inhibidores.

NBP: aminobifosfonato

FTI: inhibidor de la farnesil-transferasa

30 GGTI: inhibidor de la geranyl-geranyl transferasa

- Figura 8: Representación esquemática de la maduración post-traducción de la prelamina A, su importación nuclear y su localización en el nucleoplasma.

35 a : prelamina A normal

b : maduración de la prelamina A suprimida en progeria (progerina) o durante la mutación de la proteasa ZMPSTE24 en la dermatopatía restrictiva. Los inhibidores de la proteasa del virus del SIDA (PI) inhiben

ZMPSTE24 NPC : poro nuclear

NE : envoltura nuclear

40 HGPS : Síndrome de progeria de Hutchinson-Gilford

RD : dermatopatía restrictiva.

- Figura 9: Representación esquemática de la teoría del envejecimiento basada en las anomalías de las laminas sus consecuencias funcionales. Leyenda: PI: inhibidores de la proteasa viral.
- 45 - Figura 10: Transferencia de Western mostrando que el bloqueo de la prenilación de la prelamina A necesita a la vez la inhibición de la farnesil-transferasa y de la geranyl-geranyl-transferasa de tipo I. Detección de la lamina A/C en células HeLa tratadas con inhibidores de la farnesil-transferasa y/o de la geranyl-geranyl-transferasa de tipo I. LA = lamina A, LC = lamina C, Pre = prelamina A.
- Figura 11: Análisis por espectrometría de masas de proteínas extraídas de la envoltura nuclear de células no tratadas (a), de células de pacientes con progeria tratados con FTI (2,5 μ M, b) o tratados con la mezcla de pravastatina + zoledronato (cada uno 1 μ M, c).
- Figura 12: Análisis por espectrometría de masas de proteínas extraídas de la envoltura nuclear de fibroblastos no tratados (a) o tratados con la mezcla de pravastatina + zoledronato (cada uno 1 μ M, b) que provienen de ratones *Zmpste24^{-/-}*.
- 55 - Figura 13: La lamina A (células de control) y la prelamina A (células de ratón *Zmpste24^{-/-}*) se analizaron por espectrometría de masas (MALDI-ToF). a, b: partes del espectro que corresponden a los péptidos trípticos farnesilados (a) y geranylgeranilados (b).
- Figura 14: representaciones de resultados de diferentes experimentos que demuestran el efecto sinérgico de la combinación de pravastatina + zoledronato en la acumulación de prelamina A en células de control y de
- 60 pacientes con progeria: (a) Detección inmunocitoquímica de la lamina A/C y de la prelamina A en fibroblastos humanos normales, no tratados, tratados con pravastatina y/o parzoledronato. (b) Detección inmunocitoquímica de la lamina A/C y de la prelamina A en fibroblastos humanos normales y de pacientes con progeria tratados con la combinación de pravastatina + zoledronato. (c) Análisis cuantitativo del efecto del tratamiento con pravastatina + zoledronato en la morfología nuclear de las células de pacientes con progeria. (d) Análisis
- 65 cuantitativo del efecto del tratamiento con pravastatina + zoledronato en la morfología nuclear de células de

pacientes con progeria en presencia de farnesol, geranilgeraniol o de los dos compuestos. Barras de error = media \pm error estándar de la media. Barra de escala = 10 μ m.

- 5 - Figura 15: representación de los resultados del tratamiento con pravastatina + zoledronato que muestran la corrección de la morfología nuclear y la inducción de una relocalización parcial de las isoformas de la lamina A/C y de la lamina B1 de la lamina nuclear en el nucleoplasma, en células de pacientes con progeria. (A) Inmunofluorescencia y microscopía confocal. Las imágenes a a c de cada panel son proyecciones de la intensidad media de 27 imágenes de la pila y muestran los túbulos del retículo nuclear etiquetados con calreticulina en las células de progeria incubadas con PBS. Imágenes d a l: cortes confocales aislados de 0,2 μ m de espesor. Efecto del tratamiento con pravastatina + zoledronato (g) y (h). (B) Colocalización de la lamina B1 y de la calreticulina. Barra de escala = 5 μ m.
- 10 - Figura 16: representación del efecto de la pravastatina y del zoledronato asociados o no en la morfología nuclear de células de ratón *Zmpste24^{-/-}* (a) y de ratones de control (b) en cultivo, en presencia de farnesol, geranilgeraniol o de las dos moléculas.
- 15 - Figura 17: Efecto del tratamiento con pravastatina + zoledronato en las anomalías de la reparación de rupturas de la doble hebra (DSB) del ADN en las células de pacientes con progeria. Inmunodetección de focos de la histona H2AX fosforilada detectados 24 h después de radiación, focos que corresponden a las rupturas de la doble hebra no reparadas (imágenes de la parte superior). Marcado nuclear de DAPI (imágenes de la parte inferior). Curvas de la parte inferior: evolución del número de focos de histona H2AX fosforilada en función del tiempo después de radiación en las células de control (cuadrado relleno) y las células de progeria (círculo vacío) incubadas con PBS o tratadas con pravastatina + zoledronato. Cada curva representa la media \pm error estándar de la media de al menos 3 experimentos.
- 20 - Figura 18: Efecto del tratamiento con pravastatina + zoledronato en el fenotipo progeroide de ratones *Zmpste24^{-/-}*: (a) Fotografías representativas de ratones *Zmpste24^{+/+}* con 3 meses de edad, *Zmpste24^{-/-}* y *Zmpste24^{-/-}* tratados con la combinación de pravastatina + zoledronato. Barra de escala = 1 cm. (b) Peso de los ratones *Zmpste24^{+/+}* con 3 meses de edad (n = 12), *Zmpste24^{-/-}* (n = 13) y *Zmpste24^{-/-}* tratados (n = 15). (c) Curvas de Kaplan-Meier que muestran un aumento significativo del periodo de vida de los ratones *Zmpste24^{-/-}* tratados. (d) Representación tridimensional - mediante microtomografía informatizada de la tibia de ratón *Zmpste24^{-/-}* tratado y no tratado (imagen de la parte superior). El panel de la parte inferior representa el volumen óseo relativo y el número de trabéculas del hueso en los ratones *Zmpste24^{-/-}* no tratados y tratados. (e) Cuantificación de las anomalías nucleares de los hepatocitos de ratón *Zmpste24^{+/+}*, *Zmpste24^{-/-}* y *Zmpste24^{-/-}* tratados. Las flechas de color blanco muestran los núcleos anómalos. Barra de escala = 10 μ m. (f) Expresión relativa de los genes diana de la p53 en el hígado y el corazón de los ratones *Zmpste24^{+/+}*, *Zmpste24^{-/-}* y *Zmpste24^{-/-}* tratados, analizada por RT-PCR cuantitativa. *P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001. Las barras de error representan la media \pm error estándar de la media.
- 25 - Figura 19: Efecto de la pravastatina sola o del zoledronato durante el periodo de vida de los ratones *Zmpste24^{-/-}*: Curvas de Kaplan-Meier de pravastatina sola (a) y de zoledronato solo (b) en ratones *Zmpste24^{-/-}* tratados (diamante vacío) y no tratados (círculos rellenos).
- 30 - Figura 20: Efecto de un tratamiento con pravastatina + zoledronato durante el periodo de vida de ratones *Lmna^{-/-}*: Curvas de Kaplan-Meier a partir de ratones *Lmna^{-/-}* tratados con pravastatina + zoledronato (n= 12, diamante vacío), en comparación con el de ratones no tratados (círculos rellenos, n = 11).

Ejemplos

- 45 EJEMPLO 1: Efecto aditivo de la asociación de un inhibidor de la hidroximetilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasa hidrosoluble (una estatina hidrosoluble: pravastatina) y de un inhibidor de la farnesil-pirofosfato sintasa (un aminobifosfonato: zoledronato) en cultivos de células normales y progeroides

A. PROTOCOLOS

- 50 A.1 Células en cultivo celular

Las líneas de células son o bien fibroblastos AG16409 de control que provienen del Instituto Coriell, o bien fibroblastos obtenidos de biopsias de pacientes que padecen Dermopatía Restrictiva. Se cultivan a 37 °C en atmósfera de CO₂ al 5 % en habitación P2.

El medio de cultivo completo habitual es

- 60 - RPMI (Invitrogen) complementado con
- Suero Bovino Fetal al 20 % (Invitrogen)
- L-Glutamina 200 mM (Invitrogen)
- Mezcla de Penicilina/Estreptomicina/Fungizona 1 X (Solución de reserva 100 X, Cambrex)

A.2 Recogida de las células

65

La recogida de las células se realiza por tripsinación de la manera siguiente (protocolo para un matraz grande, 75 cm², BD Falcon):

- El medio se aspira;
 - 5 - Las células se lavan con 10 ml de PBS 1X (Invitrogen);
 - Se añaden 5 ml de una solución de Tripsina/EDTA 1X (Cambrex);
 - El matraz se incuba aproximadamente 6 min a 37 °C, el tiempo para que las células se desprendan;
 - La tripsina se inhibe por dilución en 15 ml de medio completo;
 - Las células experimentan por centrifugación durante 10 min a 1000 revoluciones por minuto a 16 °C;
 - 10 - El sedimento se vuelve a suspender en 2 ml de PBS 1X, y se vuelve a centrifugar en las mismas condiciones.
- Las células obtenidas o bien se congelan para un uso posterior, o bien se trasplantan a partir de este sedimento lavado.

A.3 Tratamientos

15 La solución de pravastatina (una estatina hidrosoluble) utilizada se prepara como sigue a continuación:

40 mg de pravastatina (Sigma Aldrich, P4498) se recogen en agua estéril para constituir una solución de reserva a 10 mM.

20 Las concentraciones finales sometidas a ensayo fueron de 500 nM, 1,5, 50 y 100 µM, obtenidas diluyendo la solución de reserva en medio completo.

La solución de zoledronato (NBP) utilizada se prepara como sigue a continuación:

25 Una solución de reserva de ácido (1-hidroxi-2-imidazol-1-il-1-fosfono-etil) fosfónico (0,8 mg/ml, Novartis) se ajusta a una concentración de 2 mM.

30 Las concentraciones finales sometidas a ensayo fueron de 500 nM, 1, 5, 50 y 100 µM, obtenidas diluyendo la solución de reserva en medio completo.

A.4 Transferencia de Western

A.4.1 Preparación de las células

35 Para un experimento de transferencia de Western, las células se tratan como sigue a continuación:

Aproximadamente 7,5 x 10⁵ células se siembran en un matraz grande y se cultivan en las condiciones mencionadas anteriormente hasta casi confluencia (4 días).

40 Después de 4 días, las células se lavaron con PBS 1X, y se recogen en medio completo complementado con el tratamiento.

45 Las células se incuban el tiempo del tratamiento (de 6 a 72 h, de forma secuencial o simultánea) en la incubadora a 37 °C.

Al final del tratamiento, las células se tripsinizan (protocolo mencionado anteriormente) y el sedimento obtenido se almacena a -80 °C hasta la extracción de las proteínas.

50 A.4.2 Extracción de las proteínas por transferencia de Western

El sedimento celular se recoge en 300 µl de tampón de lisis

Triton X 100	1 %
SDS	0,1 %
Desoxicolato sódico	0,5 %
NaCl	50 mM
EDTA	1 mM
Tris HCl a pH 7,4	20 mM
Inhibidor de proteasa (Roche 11697498001)	1 pastilla para 50 ml

55 De forma extemporánea, se añade

ES 2 573 641 T3

Ortovanadiato sódico 1 mM

PMSF 1 mM

5 Las células se exponen a una sonicación 2 veces durante 30 segundos (*Brandson Sonifier Cell Disruptor B15*).

Los residuos celulares se centrifugan durante 10 min a 10 000 revoluciones por minuto a 4 °C.
El sobrenadante proteico se conserva a -80 °C hasta su utilización.

10 La dosificación de las proteínas se realiza en el momento de la descongelación.

A.4.3 Transferencia de Western

Gel

15 Normalmente se usa un gel de acrilamida al 8 % para detectar las diferentes formas de laminas A/C.

Acrilamida/bisacrilamida 37/1	8 %
Tris HCl a pH 8,8	375 mM
SDS	0,1 %
APS	0,1 %
TEMED	0,01 %

Un gel de concentración se vierte en el gel de separación

Acrilamida/bisacrilamida 37/1	3 %
Tris HCl a pH 6,8	375 mM
SDS	0,1 %
APS	0,1 %
TEMED	0,01 %

20 La concentración de proteínas de las muestras de ensayo se dosifica, y las alícuotas se ajustan a 50 µg obtuivo en tampón de lisis en csp 15 µl.

25 A cada muestra de ensayo se añaden 5 µl de tampón de carga

SDS	4 %
Tris HCl a pH 6,8	100 mM
SDS	20 %
β-mercaptoetanol	20 %
Azul de bromofenol	trazas

Las muestras de ensayos desnaturalizan por calentamiento 5 min a 95 °C y se depositan en los pocillos.

30 La migración se produce a 50, a continuación a 100 Voltios, en un tampón

SDS	0,3 %
Glicina	1,44 %
SDS	0,1 %

=> Transferencia

ES 2 573 641 T3

La membrana de transferencia (Hybon P, Amersham Biosciences) se prepara por inmersión en etanol, seguido de un baño de 5 min en agua estéril, y 10 min en el tampón de transferencia:

Base Tris	12 mM
Glicina	96 mM
Etanol	20 %

5 El gel se humidifica durante 20 min en el tampón de transferencia, a continuación se monta el sándwich (sistema Mini-protean, Biorad).

La transferencia se produce en general por la noche, en cámara fría, a 10 Voltios.

10 La membrana se aclara en PBS 1X, se conserva en humedad, y se utiliza tal como para la detección.

=> Detección

La membrana se incuba 1 h a temperatura ambiente en una solución de saturación:

15

Caseína	10 %
Tween 20	0,1 %
PBS	1 X

Se aclara 2 veces 10 min en un tampón de lavado (Tween 20 al 0,1 % / PBS 1X).

20 El anticuerpo primario se diluye en el tampón de saturación (detalles y dilución, véase a continuación inmunoetiquetado).

La membrana se incuba con los anticuerpos primarios 1 h a temperatura ambiente con agitación.

25

Al final, se aclara 3x con tampón de lavado, a continuación se lava 3x 15 min con el mismo tampón.

El anticuerpo secundario (sistema acoplado a peroxidasa, Jackson Immunoresearch) se diluye a 1/10000e en tampón de saturación.

30

La membrana se incuba con esta solución de 30 a 45 min a temperatura ambiente con agitación.

Al final, se aclara 3x con tampón de lavado, a continuación se lava 3x 15 min con el mismo tampón.

35

La detección se realiza con el kit ECL Plus Western Blotting System de Amersham Bioscience, de acuerdo con las instrucciones del proveedor.

Después de revelación, la membrana se expone en película Biomax MR (Kodak), el tiempo necesario para tener una señal satisfactoria.

40

A.5 Inmunoetiquetado

A.5.1 Preparación de las células

Un cultivo de células se tripsiniza, y se hace recuento de las células en cámara de Neubauer.

45

Los pocillos de cultivo de tipo Labtech (Nunc, ref. 177399) se siembran, a razón de 5×10^4 células por pocillo.

El medio de cultivo completo se suplementa con el o los tratamientos (estatina, NBP, los 2), y las células se cultivan durante el tiempo *ad hoc*.

50

Al final, el medio de cultivo se aspira, los pocillos se desmontan.

Los portaobjetos se lavan en PBS 1X.

55

Las células se fijan en una solución de paraformaldehído al 4 % (en PBS) durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Se realiza un lavado de 10 min en PBS 1X.

ES 2 573 641 T3

Las células se deshidratan con baños sucesivos de 3 min en soluciones de porcentaje etanólico creciente (70, 90, 100 %, repitiéndose este último baño).

5 Después de secado, los portaobjetos se almacenan a -80 °C hasta su uso.

A.5.2 Etiquetado

10 Después de descongelación, las células se incuban 5 min a temperatura ambiente en cámara húmeda 50 µl de una solución de permeabilización:

PBS	1 X
Triton X100	0,5 %
RNS	5 %
(Suero Normal de Conejo, Vector S5000)	
Inhibidor de Proteasa (Roche 11697498001)	1 pastilla para 50 ml

Se realizan 3 baños de incubación previa de 15 min cada uno en 50 µl de la solución de incubación:

PBS	1 X
RNS	5 %
Inhibidor de Proteasa (Roche 11697498001)	1 pastilla para 50 ml

15 El anticuerpo primario se diluye a 1/100^e en 50 µl de solución de incubación y se pone en contacto con células durante 1 h a temperatura ambiente en cámara húmeda.

Los anticuerpos primarios usados son de 2 tipos:

- 20
- Ratón anti-lamina A/C (lado N-terminal), clon 4A7, donación de G. Morris (Oswestry, Reino Unido)
 - Cabra anti-prelamina A (extremo C-terminal de 15 aa), producto SC6214, Santa Cruz Biotechnology, Inc.

Se realizan 3 aclarados en 50 µl de PBS 1X durante 15 min cada uno.

25 La incubación con el anticuerpo secundario se produce durante 1 h en 50 µl de solución de incubación a temperatura ambiente en cámara húmeda. Los anticuerpos secundarios son de dos tipos:

- Burro anti-ratón, Jackson Immunoresearch, dilución a 1/100^e
- Burro anti-cabra, Jackson Immunoresearch, dilución a 1/200^e.

30 Se realizan 3 aclarados en 50 µl de PBS 1X durante 15 min cada uno.

Se realiza una incubación con 100 µl de solución de DAPI de 50 ng/ml (SERVA, ref. 18860) durante 15 min a temperatura ambiente en cámara húmeda.

35 Se realizan 3 aclarados en PBS 1X en bandejas de portaobjetos durante 5 min cada uno.

Se realiza un último aclarado durante 5 min en una solución de Tween 20 al 0,1 % en PBS.

A.5.3 Montaje

40 Las células se sumergen en una gota de VectaShield (Vector), recubiertas por una lámina de cubreobjeto y se observan en un microscopio de fluorescencia (Leica DMR, Leica Microsystems), equipado con un sistema de cámara coolSNAP (Princeton).

45 B. RESULTADOS

B.1. Transferencia de Western (Figura 1)

50 Los fibroblastos de control "normales" se trataron con una estatina hidrosoluble (pravastatina P, 20 a 100 µM), y con un aminobifosfonato (NBP zoledronato Z, 20 a 100 µM) en asociación (Pistas A a I, respectivamente P20/Z20,

P20/Z60, P20/Z100, P60/Z20, P60/Z60, P60/Z100, P100/Z20, P100/Z60, P100/Z100). La transferencia de Western muestra "la aparición" de una banda correspondiente a la del tamaño de la prelamina A no madura (no truncada) en función del aumento de la concentración de las dos moléculas, lo que confirma que la farnesilación es necesaria para la maduración de la lamina A. Este resultado muestra que el bloqueo de la síntesis de la farnesil-PP en 2 puntos de la ruta metabólica es más eficaz que un bloqueo en un solo punto con respecto a la inhibición de la farnesilación de la prelamina A, al menos *ex vivo*.

B.2. Respuesta de dosis y duración en inmunohistoquímica (Figura 2)

Las curvas de dosis-respuesta y de duración-respuesta permitieron determinar una eficacia máxima en la medida de 2 parámetros en células de control sanas por un lado, y a continuación en células de pacientes con HGPS.

La asociación de pravastatina (hidrosoluble) / zoledronato (NBP) más eficaz se obtuvo mediante una administración de 1 μM de pravastatina durante 24 h, zoledronato durante 12 h en las células sanas. No se observó ninguna toxicidad. Sobre las células HGPS (Células con anomalías nucleares), usando el mismo protocolo de administración, el número de núcleos "deformados" disminuyó de un 75 % a un 40 %. Se realizó la medida del índice de prelamina A obtenida en células sanas. Esta medida mostró que este índice es máximo.

B.3. Efecto del tratamiento en inmunohistoquímica (Figura 3)

La acción combinada de pravastatina y zoledronato, tratamiento: Pravastatina 50 μM durante 12 h, Zoledronato 20 μM durante 6 h, muestra una eficacia mejor, ya que el índice de prelamina A producida en células sanas tratadas (calculada en un 35 %) es mucho más elevada en asociación que estas moléculas se añaden solas (respectivamente un 25 % y un 15 %). Además, el índice de núcleos deformados (signo de una toxicidad en las células sanas) es mínimo (inferior a un 10 %), e inferior al que se encuentra en células tratadas solamente con pravastatina (aproximadamente un 12 %).

B.4. Acción en células envejecidas en inmunohistoquímica (Figura 4)

En función del número de "pasajes" (número de células trasplantadas), por lo tanto, de la edad de las células, la proporción de núcleos anómalos aumenta. Esta característica es habitual de las células HGPS no tratadas. Si las células HGPS se tratan con Pravastatina 1 μM durante 24 h y Zoledronato 1 μM durante 12 h., esta proporción se mantiene, e incluso disminuye un poco (menos de un 40 % con respecto a más de un 80 % en las células tratadas con un placebo).

B.5. Conclusión

La asociación de pravastatina/zoledronato es eficaz a dosis para las que no se observa casi ningún efecto con las moléculas administradas por separado.

El efecto fisiológico del bloqueo de la ruta de prenilación se obtiene por lo tanto con dosis bastante inferiores a las usadas en el tratamiento único en artículos publicados en cultivos de células (Kusuyama *et al.*, 2006 (27), solamente 10 μM de pravastatina en precursores de células vasculares; Flint *et al.*, 1997 (13), solamente 25 μM de pravastatina en células de músculo de rata neonatal).

EJEMPLO 2: Efecto de una composición de acuerdo con la invención que comprende un inhibidor de la hidroximetilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasa hidrosoluble y un inhibidor de la farnesil-pirofosfato sintasa en la división de fibroblastos humanos envejecidos y en fibroblastos humanos jóvenes

A. OBJETO DEL EJEMPLO

En el presente ejemplo, se midió la evaluación del efecto *in vitro* de una composición de acuerdo con la invención que comprende un inhibidor de la hidroximetilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasa hidrosoluble y un inhibidor de la farnesil-pirofosfato sintasa en el índice de división celular (índice mitótico) de fibroblastos. También se realizó una comparación del efecto de la composición en fibroblastos humanos envejecidos con respecto a fibroblastos humanos jóvenes. El número de agentes activos usados en este experimento es de cuatro, siendo los productos usados en combinaciones de dos a dos. Los agentes activos usados son:

A1: Zoledronato
A2: Alendronato
B1: Pravastatina
B2: Simvastatina

Las asociaciones en particular que se usaron en este ejemplo son: A1B1, A1B2, A2B1, A2B2.

B. PROTOCOLO

5 En este ejemplo, se pusieron en cultivo dos lotes de fibroblastos, fibroblastos envejecidos (n.º de lote: 9052) y jóvenes (n.º de lote : 7080), en un medio RPMI (Invitrogen) que contenía suero de bovino fetal al 10 % sin antibióticos durante 24 h después de tripsinación en los envases proporcionados.

10 Los diferentes agentes activos se añaden a una concentración final de 1 µM cada uno durante 24 h (se realizó una dilución a 1000 de una solución de reserva en agua para los compuestos A1, A2 et B1, o en etanol al 100 % para el compuesto B2).

15 El índice mitótico se evaluó mediante incorporación de Bromo-desoxi-uridina (BrdU) durante 45 minutos después de un periodo de incubación de 24 h de las células con una de las combinaciones de agentes activos. Una revelación inmunohistoquímica permitió revelar las células en fase de síntesis de ADN (célula en división previa). Una coloración de los núcleos (del material genético) se realizó mediante incorporación de di-amino fenil indol (DAPI).

20 La entrada de 6 campos microscópicos (OLYMPUS IX 70) permitió una medida del índice mitótico mediante análisis de imágenes (OLYMPUS AnalySIS). El índice mitótico corresponde a la proporción del número de núcleos que han incorporado BrdU con respecto al número de núcleos que han incorporado DAPI. Un índice medio se calcula de forma estadística con una desviación estándar (desviación típica) comprendido entre 0,005 y 0,061.

Un ensayo de Student bilateral permitió medir la significación estadística de los resultados obtenidos.

C. RESULTADOS

25 C.1. Observación visual general de las células

Estos resultados muestran una capacidad muy baja de división de los fibroblastos envejecidos en ausencia de cualquier tratamiento, previamente al estudio.

30 Les fibroblastos jóvenes mostraron una capacidad de división superior a la de los fibroblastos envejecidos. La capacidad de división de los fibroblastos envejecidos era inferior a un 5 %, mientras que la capacidad de división de los fibroblastos jóvenes era de un 15,6 %. Por tanto la diferencia de capacidad de división entre los fibroblastos envejecidos no tratados y los fibroblastos jóvenes no tratados era igual a 3.

35 En el transcurso de la realización de este ejemplo, no se observó ninguna toxicidad visualmente después de 24 h de incubación de los fibroblastos con las combinaciones de agentes activos sometidos a ensayo.

40 En el transcurso de la realización de este ejemplo, no se observó ningún efecto tóxico del etanol (0,1 % final) después de 24 h de incubación.

D. EVALUACIÓN DEL ÍNDICE MITÓTICO (Figura 5)

45 De una manera general, el número de fibroblastos envejecidos sin ningún tratamiento en fase de síntesis de ADN era extremadamente bajo: menos de un 5 % (véase la figura 5, columna 1).

El índice mitótico ya no era más elevado para los fibroblastos jóvenes: del orden de un 15 % (véase la figura 5, columna 6).

50 Por comparación con los fibroblastos envejecidos de control sin ningún tratamiento, los fibroblastos de control expuestos al etanol (0,1 % - 24 h), no presentan una diferencia significativa ($p = 0,11$, $n = 6$) de subíndice mitótico. Entonces, los valores se reagruparon (Control, $n = 12$).

55 Los resultados presentados en la figura 5, columna 2, maestra, en el índice mitótico de los fibroblastos envejecidos un efecto activador de A1B1 - Zolendronato-Pravastatina con respecto al control (estimulación de un factor 2 máximo) ($p < 0,001$, $n > 6$).

Por lo tanto este ejemplo muestra que la aplicación de la combinación de Zolendronato-Pravastatina tiene un efecto activador de la división celular de fibroblastos del sujeto envejecido.

60 Ejemplo 3: Efecto de la asociación de un inhibidor de la hidroximetilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasa hidrosoluble y de un inhibidor de la farnesil-pirofosfato sintasa en un modelo de ratón que presenta un síndrome progeroide

65 Los ratones KO *Zmpste24*^{-/-} usados en este ejemplo son los descritos en el artículo mencionado por Varela *et al.*, 2005 (49). Una prueba de eficacia de la asociación de las 2 moléculas (pravastatina y zoledronato) fue aportada en

colaboración con un laboratorio español (Pr C. Lopez-Otin). La eficacia se obtiene a dosis combinadas que no tienen efecto cuando los productos se usan por separado, lo que demuestra un efecto aditivo.

5 Las 2 moléculas (100 µg/kg/día de Ácido zoledrónico (Zometa (marca registrada)) y 100 mg/kg/día de Pravastatina) se diluyeron en PBS 1X y se inyectaron por vía intraperitoneal, diariamente, en ratones envejecidos de 1 mes y hasta su muerte. Los controles son ratones silvestres de la misma camada, tratados solamente con PBS IX.

10 La supervivencia de los ratones tratados mejoró en gran medida, es máxima en particular para las hembras, con una prolongación de la duración de vida media de aproximadamente un 80 %. Todos los síntomas clínicos de la enfermedad se reducen de forma considerable con respecto a los individuos solamente tratados con PBS. En particular, se observó un efecto del tratamiento en la piel y la regeneración del pelo de estos ratones con respecto a los ratones tratados con PBS, que mostraban grandes zonas sin pelo.

15 EJEMPLO 4: Efectos de la asociación de un inhibidor de la hidroximetilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasa hidrosoluble y de un inhibidor de la farnesil-pirofosfato sintasa en extractos *ex vivo* de piel humana.

A. Protocolo

20 En el presente ejemplo, los ensayos se realiza en una piel que proviene de un donante envejecido de aproximadamente 60 años. Se realiza una preparación de 21 explantes de piel humana y se deja que sobreviva en medio BEM (Medio de Explantes de BIO-EC).

Los explantes se reparten en 3 lotes de seis explantes y un lote de control T0 de 3 explantes, como sigue a continuación:

- 25
- T0 Control Plastia: 3 explantes
 - T Control no tratado: 6 explantes
 - R Control positivo: 6 explantes
 - P Explantes tratados con la composición de la invención: 6 explantes
- 30

A.1. Tratamiento

35 El tratamiento se realiza en días diferentes, el primer día (J0), 2 horas después de la preparación de los explantes, a continuación en el día J+1, J+2 días, J+4 días, J+6 días, J+8 días y J10+ días.

Los productos se aplican en los explantes como sigue a continuación:

- 40
- T los explantes no recibe ningún tratamiento,
 - R cada uno de los explantes recibe en J0, J+2 y J+4, 1 mg del control positivo (crema de retinol)
 - P1 cada uno de los explantes recibe, y en cada tiempo de tratamiento, 2 mg del producto P.

45 El tratamiento se realiza mediante aplicación tópica de la composición de la invención. La composición se reparte a continuación en toda la superficie del explante, con la ayuda de una espátula. La mitad del medio de cultivo se renueva cada dos días y los explantes se ponen en supervivencia a 37°C en atmósfera húmeda enriquecida con un 5 % de CO₂.

A.2. Toma de muestras para histología

50 En J0, se toman muestras de los 3 explantes del lote T0.

En J+6 días y J+11 días, se toman muestras de 3 explantes de cada lote. Las muestra se cortan en dos, una mitad se fija en formol y la otra mitad se congela a -80 °C, siguiendo el procedimiento BIO-EC « P006-PPEH ».

B. Estudio histológico

55 Después de 24 horas de fijación en formol, las muestras se deshidratan, se impregnan y se revisten con parafina. Se realizan dos cortes de 5 µm para la observación morfológica.

B.1. Primera etapa: estudio morfológico

60 El estudio morfológico de las estructuras epidérmicas y dérmicas se realiza en los cortes teñidos con tricromo de Masson, variante de Goldner.

B.2. Segunda etapa

65 B.2.1 Inmunoetiquetado del KI67

El inmunoetiquetado de las células en mitosis se realiza en cortes congelados con el anticuerpo policlonal anti-KI 67 (Novo Castra) revelado en DAB. Se hace el recuento de las células positivas a lo largo de toda la epidermis y las medidas llevadas a número de células etiquetadas por cm.

5 B.2.2 Inmunoetiquetado del colágeno I

El inmunoetiquetado del colágeno I se realizará en cortes congelados con el anticuerpo policlonal anti-colágeno I revelado en FITC. Los núcleos se contratiñen con yoduro de propidio.

10 B.2.3 Inmunoetiquetado del colágeno III

El inmunoetiquetado del colágeno III se realiza en cortes congelados con el anticuerpo policlonal anti-colágeno III revelado en DAB. Los núcleos se contratiñen con hemalun de Masson.

15 B.2.4 Inmunoetiquetado del colágeno IV

El inmunoetiquetado del colágeno IV se realiza en cortes congelados con el anticuerpo policlonal anti-colágeno IV (Cliniscience) revelado en FITC. Los núcleos se contratiñen con yoduro de propidio.

20 B.2.5 Inmunoetiquetado del colágeno VII

El inmunoetiquetado del colágeno VII se realiza en cortes congelados con el anticuerpo monoclonal anti-colágeno VII revelado en FITC. Los núcleos se contratiñen con yoduro de propidio.

25 B.2.6 Inmunoetiquetado de PECAM1

La visualización de las células endoteliales se realiza gracias al inmunoetiquetado de PECAM-1, realizado en cortes congelados con el anticuerpo monoclonal anti-PECAM-1 revelado en rojo Rápido.

30 EJEMPLO 5: Efecto de la asociación de un inhibidor de la hidroximetilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasa hidrosoluble y de un inhibidor de la farnesil-pirofosfato sintasa en cultivos *in vitro* de células constitutivas de la piel

Este ejemplo se realiza con las mismas combinaciones de agentes activos presentes en el ejemplo 2 mencionado anteriormente. Estas diferentes combinaciones de agentes activos que usan *in vitro* con el fin de evaluar su efecto en parámetros fisiológicos que intervienen en el envejecimiento cutáneo.

35 Las combinaciones usadas en el presente ejemplo son A1B1, A1B2, A2B1, A2B2, respectivamente. Estas cuatro combinaciones se someten al ensayo a diversas concentraciones, realizándose los experimentos por triplicado (lo que representa al menos 36 puntos experimentales).

40 Las concentraciones de las 4 combinaciones son propuestas por el solicitante y por lo tanto no está previsto en este estadio del estudio (salvo a modo de control simple) de citotoxicidad *in vitro*. La experimentación se realiza en cultivos de células de una línea de fibroblastos tales como los que se presentan en el ejemplo 1. Este ensayo también se aplica a cultivos de queratinocitos. Los parámetros siguientes se examinan para las 4 combinaciones de agentes activos a las concentraciones indicadas.

- Medida del índice mitótico
- Medida de la remodelación de la matriz extracelular por contracción de redes de colágeno.
- Medida de la reparación del ADN genómico después de radiación con UVB (El estrés fotoinducido se aproxima a las condiciones del baño de sol).

50 La medida del índice mitótico se realiza después de exposición de las células a los agentes activos durante un periodo de tiempo único. El índice se evalúa por recuento, en análisis de imágenes, de los núcleos celulares que han incorporado un análogo de timidina que se hace fluorescente, con el nombre de núcleos totales. Se analizan varios campos. Las fotografías se archivan para iconografía.

55 El remodelado de la matriz extracelular inducido por los fibroblastos expuestos a los agentes activos se evalúa mediante la incorporación de estas células en las redes de colágeno y cuantificando su capacidad para retraer estas redes. La evaluación de la superficie retraída proporciona un índice de remodelado. Las fotos se archivan para iconografía.

60 La medida de la reparación del ADN genómico se realiza después de radiación de las células a una dosis de UV-B que imita las condiciones de un golpe de sol. En un primer momento, se contempla evaluar el efecto de los agentes activos en el transcurso de la reparación del ADN seguido con una cinética de 3 tiempos. La cuantificación se realiza por detección y análisis de imágenes de los dímeros de pirimidina y ciclobutano inducidos por radiación UVB con la ayuda de una técnica de inmunohistoquímica.

Las fotografías se archivan para iconografía.

5 Ejemplo 6: Objetivo principal: Medida del impacto del virus VIH y de agentes terapéuticos antirretrovirales en los marcadores nucleares, mitocondriales y citosólicos del envejecimiento celular

■ Objetivos secundarios

- 10
- Analizar la prevalencia de las alteraciones de las funciones nucleares, mitocondriales y citosólicas en pacientes infectados con el VIH.
 - Medir la incidencia de aparición de estas anomalías.
 - Analizar el tipo y la frecuencia de estas anomalías en función de la duración de la exposición a los antirretrovirales, de forma global, por las y por moléculas (duración acumulada de exposición).
 - Analizar el tipo y la frecuencia de estas anomalías en función de la carga viral de VIH intracelular.
- 15
- Al realizar el tipo y la frecuencia de estas anomalías en función de la duración seguido por la infección con VIH.

A. PLAN EXPERIMENTAL

■ Elección del plan experimental

20 Este estudio observacional comprende 3 grupos de pacientes:

- Grupo A: Pacientes infectados con VIH1 sin tratamiento previo antirretroviral
 - Grupo B: Pacientes infectados con VIH1 con tratamiento antirretroviral desde al menos 12 meses.
- 25
- Grupo C: Controles seronegativos para VIH emparejados por edad y sexo.

B. CRITERIOS DE ADMISIÓN

■ Criterios de inclusión:

- 30
- edad > 18 años y < 65 años:
 - haber firmado un formulario de consentimiento informado
 - seropositivo para VIH confirmado en Elisa y Transferencia de Western desde al menos 5 años
 - seronegativo para VIH2
- 35
- No haber recibido jamás tratamiento antirretroviral o en primera línea de tratamiento desde al menos 12 meses.

■ Criterios de no inclusión:

- 40
- edad < 18 años y >65 años:
 - no haber firmado un formulario de consentimiento informado
 - seropositivo para VIH2
 - Pacientes tratados con estatinas o amino-bifosfonatos
 - Tratamientos simultáneos no autorizados: testosterona, tratamiento de una diabetes insulino dependiente.

45 C. DESARROLLO DEL ESTUDIO

■ Número de pacientes evaluados:

50 200 pacientes de los cuales:

- Grupo A: n = 50
- Grupo B: n = 100
- Grupo C: n = 50.

55 Los pacientes del grupo A que necesitan en el transcurso de su seguimiento la realización de una ruta terapéutica antirretroviral tienen una evaluación suplementaria durante la instauración del tratamiento y se analizan a partir de esta fecha con los pacientes del grupo B.

60 Los datos medidos en el transcurso del periodo durante el que éstos se incluyeron en el Grupo A permite medir el papel directo opcional del virus VIH estas funciones nucleares y mitocondriales.

65 Los pacientes del grupo B que necesitan una modificación del tratamiento antirretroviral en el transcurso de los estudios, tienen una evaluación clínica y para clínica idéntica a las previstas en el contexto del seguimiento durante el cambio de tratamiento. Los datos que siguen a continuación de estos pacientes se toman teniendo en cuenta el cálculo de la incidencia de las alteraciones de las funciones nucleares y mitocondriales observadas en los pacientes expuestos a los antirretrovirales.

■ Duración del estudio

La duración del estudio es de 36 meses.

5

Para los pacientes de los Grupos A y B

■ Historia de infección por VIH:

10

- Fecha del diagnóstico de infección por VIH
- Modo de contaminación
- Estadio CDC
- Para los estadios C: diagnóstico de la afección considerada SIDA
- Tratamientos antirretrovirales en curso (Fecha de introducción, Moléculas administradas)

15

■ Examen Clínico:

- Peso, Talla, Índice de masa corporal
- Circunferencia de la cintura, circunferencia de la cadera, cálculo de la relación de Cintura / cadera

20

■ Análisis de sangre:

25

- Medida de la carga viral del VIH (umbral de detección de 40 copias/ml)
- Dosificación de la tasa de linfocitos CD4 y CD8
- Glucemia, Insulinemia, cálculo del HOMA
- Colesterol Total, LDL, Colesterol HDL
- Triglicéridos
- Toma de muestras de 3 tubos con EDTA de 7,5 ml para análisis de las funciones nucleares y mitocondriales, medida del ADN proviral del VIH y celuloteca

30

■ Análisis de proteínas nucleares, mitocondriales y citosólicas diana de los anti retrovirales:

35

- Transferencia de Western e inmunoetiquetados:
- La producción de NFkB y de IkB como controles de la actividad del proteasoma
- a maduración de las laminas A y B, modelos de proteínas nucleares
- la producción de isoformas de SREBP y su importación nuclear
- N- y O-glicosilación de CD36 purificado y desglucosilado (\pm 30 kDa de azúcares) (Abcam)
- Importación en la mitocondrial de Hsp70 que posee una señal de direccionamiento erróneo, como medida de la actividad de las proteasas mitocondriales (Abcam)
- Las funciones « respiratorias » mitocondriales: producción de ROS, estudio de subunidades II y IV de la citocromo oxidasa (Molecular Probes)

40

La investigación de una posible susceptibilidad a los tratamientos antirretrovirales se realiza formando genotipo es de ciertas dianas, como se ha mostrado para la sensibilidad de la proteasa viral a los PI (Baxter *et al.*, 2006):

45

- ZMPSTE24 y Rce1 implicadas en la maduración de las prelaminas A y B1/B2 (de rutina en el Laboratorio de genética Molecular).
- Las proteasas S1-P y S2-P que permiten la producción del dominio de SREBP activos en la transcripción de los genes del metabolismo lipídico
- Los transportadores mitocondriales de los desoxinucleósidos.

50

Para el grupo de control C:

■ Examen Clínico:

55

- Peso, Talla, Índice de masa corporal
- Circunferencia de la cintura, circunferencia de la cadera, cálculo de la relación de cintura / cadera
- Toma de muestras de 3 tubos con EDTA de 7,5 ml para análisis de las proteínas nucleares, mitocondriales y citosólicas y puesta en ADNteca y celuloteca.

60

Visitas de seguimiento

La evaluación comprende:

65

■ Un Examen Clínico:

- Peso, Talla, Índice de masa corporal
- Circunferencia de la cintura, circunferencia de la cadera, cálculo de la relación de Cintura / cadera

■ Un Análisis de sangre:

- 5
- Medida de la carga viral del VIH (umbral de detección de 40 copias/ml)
 - Dosificación de la tasa de linfocitos CD4 y CD8
 - Glucemia, Insulinemia, cálculo del HOMA
 - Colesterol Total, LDL, Colesterol HDL
- 10
- Triglicéridos
 - Toma de muestras de 3 tubos con EDTA de 7,5 ml para análisis de proteínas nucleares, mitocondriales y citosólicas medida del ADN proviral del VIH y puesta en ADNteca y celuloteca.

■ Análisis de proteínas nucleares, mitocondriales y citosólicas diana de los antirretrovirales (véase anteriormente)

Para los pacientes del Grupo A:

Los pacientes que necesitan la realización de una ruta de tratamiento antirretroviral tienen una evaluación clínica y paraclínica idéntica a la prevista en el contexto del seguimiento en el momento de la instauración del tratamiento. Los datos de seguimiento de estos pacientes se analizan a partir de esta fecha en el grupo de los pacientes tratados (grupo B).

Para los pacientes del Grupo B:

En caso de modificación de tratamiento antirretroviral en el transcurso de los estudios, una evaluación clínica y paraclínica idéntica a las previstas en el contexto del seguimiento se realiza durante el cambio de tratamiento. Los datos de seguimiento de estos pacientes se tienen en cuenta para el cálculo de la incidencia de las alteraciones de las funciones nucleares y mitocondriales observadas en los pacientes expuestos a los antirretrovirales.

D. Resultados esperados, perspectivas

Confirmar *in vivo* en pacientes infectados con el virus del SIDA y sometidos a tratamientos anti-estos tratamientos, en particular los inhibidores de la proteasa, inducen un envejecimiento acelerado de acuerdo con los mismos mecanismos que las laminopatías genéticas (con producción de prelamina A farnesilada o de progerina) o que el envejecimiento « fisiológico » (con producción de progerina).

Consolidar la hipótesis de acuerdo con la que la combinación de fármacos (estatina y aminobifosfonato) utilizada en la progeria se podría usar para luchar contra el envejecimiento acelerado de los pacientes infectados con el virus del SIDA y sometidos a un tratamiento anti-retroviral y permitir el establecimiento de un ensayo terapéutico.

Ejemplo 7: Un tratamiento que asocia una estatina y un aminobifosfonato aumenta el periodo de vida de un modelo de ratón que reproduce un síndrome humano de envejecimiento prematuro.

Este ejemplo también se publica en Varela *et al.*, Nature Medicine 2008, 7, 767 (54 bis).

Material y métodos

Ratón

La producción de ratones *Zmpste24^{-/-}* y *Lmna^{-/-}* se ha descrito (Pendas *et al.*, 2002 (38); Sullivan *et al.*, 1999 (285). La microtomografía informatizada ósea de ratones se realizó con la ayuda del Sistema micro-CT SkyScan 1172 (SkyScan – marca comercial)). Todos los experimentos en ratones obedecen a las reglas promulgadas por el Comité de Experimentación Animal de la Universidad de Oviedo (España). La pravastatina (100 mg/kg/día) y el zoledronato (100 mg/kg/día) diluidos en PBS se administran a los ratones todos los días. Los ratones que reciben el tratamiento de pravastatina-zoledronato por los ratones de control que reciben únicamente PBS no presentan ningún daño aparente ni estrés.

Cultivo celular

Los fibroblastos dérmicos de un sujeto de control (GM00038) y de pacientes que padecen progeria y portadores de la mutación G608G (AG11498 y AG01972) se obtuvieron del Depósito Celular Coriell. Las células HeLa provienen de la Colección Americana de Cultivos Tipo. Las células se cultivan en DMEM (Gibco) complementado con FBS al 10 % (Gibco) y un 1 % de antibiótico antimicótico (Gibco). Los fibroblastos provienen de colas de ratones envejecidos de 12 días (Varela *et al.*, 2005). La concentración en la duración del tratamiento con la estatina y el aminobifosfonato se indican en la leyenda de las figuras. Durante el tratamiento combinado de estatina + aminobifosfonato en presencia de farnesol y/o geranilgeraniol, 1 mM de pravastatina y 1 mM de

zoletronato se añadieron al medio de cultivo con concentraciones crecientes de farnesol y/o de geranilgeraniol. El porcentaje de núcleos anómalos se mide 48 h después del inicio del tratamiento.

Inmunocitoquímica

Los fibroblastos se cultivan en cámaras Lab Tek (Nalgen Nunc International), se lavan en PBS, a continuación se fijan en paraformaldehído al 4 % durante 15 min. Las células se deshidratan en baños de etanol en concentración creciente y se permeabilizan 5 min a 25 °C en PBS que contiene Triton X-100 (0,5 %), 5 % de suero (de cabra o de conejo). Los portaobjetos incuban previamente a 25 °C en PBS durante 5 min.

La dilución de los anticuerpos primarios es de 1:100 para el anticuerpo policlonal de cabra anti-prelamina A (Sc-6214, Santa Cruz Biotechnologies), 1:40 para el anticuerpo anti-lamina A/C(4A7 proporcionado por G. Morris), 1:200 el anticuerpos de conejo anti-calreticulina (Stressgen) y 1:100 para el anticuerpo anti-lamina B1 (Abcam). Después del lavado en PBS, los portaobjetos se incuban 1 h a 25 °C con los anticuerpos secundarios diluidos en la solución de incubación. La dilución de anticuerpos secundarios es la siguiente : 1:100 para la IgG de burro anti-ratón acoplada al FITC (Jackson ImmunoResearch), 1:400 para la IgG de burro anti-cabra acoplada a Alexa 488, 1:800 para la IgG de burro anti-cabra acoplada a Alexa 568 (Molecular Probes) y 1:100 para la IgG de burro anti-conejo acoplada a isotiocianato de tetrametilrodamina (Sigma). Las células se lavan a continuación, los núcleos se tiñen durante 15 min a 25 °C con DAPI (100 ng/ml, Sigma-Aldrich), por último se lavan 3 veces con PBS que contiene un 0,5 % de Tween 20. Los portaobjetos se montan en Vectashield (Vector). Las imágenes digitales se graban con un microscopio Leica DMR equipado con una cámara CoolSnap o con un microscopio confocal Leica TCS SP5. Los museos se observan en las células después del etiquetado de la lamina A/C. Se analizaron más de 100 núcleos en los fibroblastos de control para cada uno de los tratamientos. El número de núcleos de células de pacientes que padecen progeria analizados es de 250 (pasaje 8), 198 (pasaje 13) y 150 (pasaje 20).

Rayos X y estudio de la histona H2AX fosforilada.

Las células de pacientes con progeria y las células de control 1 BR3 se irradian con un aparato X Philips. El haz de rayos X lo produce un ánodo de tungsteno sometido a una tensión de 200 kV con una intensidad de 20 mA con un filtro de cobre de 0,1 mm de diámetro. La tasa de la dosis es de 1,243 Gy/min. La histona H2AX fosforilada se detecta con anticuerpos que reconocen específicamente la serina 139 fosforilada (Upstate Biotechnology-Euromedex, Mundolsheim, Francia) a la dilución de 1:800 y anticuerpos anti-ratón conjugados con FITC (1:100, Sigma-Aldrich). El número de rupturas de la doble hebra (DSB) en función de la duración de la reparación se ajustó con la fórmula $Nt = N0 (1 / 1 + \beta t)^\alpha$, en la que α y β son parámetros que se pueden ajustar y Nt y N0 el número de DSB en el tiempo t y en el tiempo 0.

Transferencia de Western

Las células se homogeneizan en el medio siguiente: Tris 50 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM, NP-40 al 1 %, NaF50 mM, ditiotreitilol 1 mM, 2 mg/ml de pepstatina A, en presencia de inhibidores de proteasas (cóctel de inhibidor completo, Roche) e inhibidores de fosfatasa (Cócteles I y II de Inhibidor de Fosfatasa, Sigma). Después de electroforesis, las proteínas se transfieren en membranas de nitrocelulosa bloqueadas con 5 % de leche en polvo desnatada, con la ayuda del tampón TBS-T (Tris 20 mM a pH 7,4, NaCl 150 mM y Tween-20 al 0,05 %), y se incuban 1 h bien con un anticuerpo anti-lamina A/C específico (4A7,1:500), bien con una anti-lamina A específica (C20, Santa Cruz Biotechnology, 1:250) o una anti-beta actina (A5441, Sigma, 1:5000). Los anticuerpos se diluyen en TBS-T que contiene un 3 % de leche en polvo desnatada. Las transferencias se incuban a continuación con un anticuerpo acoplado a peroxidasa (cabra anti-ratón o anti-conejo, Jackson ImmunoResearch) en TBS-T que contiene un 1,5 % de leche en polvo desnatada, a continuación se lavan, por último se revelan por quimioluminiscencia (sustrato de HRP quimioluminiscente para transferencia de Western, Immobilon, Millipore - marca comercial).

Análisis mediante espectrometría de masas

Los fibroblastos de ratón de control y *Zmpste24*^{-/-} así como las células linfoblastoides de pacientes con progeria se homogeneizaron, los núcleos se aislaron por ultracentrifugación y las proteínas nucleares se obtuvieron como se describe en Blobel y Potter, V.R. Nuclei from rat liver: isolation method that combines purity with high yield, Science 154, 1662-1665, 1966. Las proteínas de la lamina nuclear se separaron por electroforesis SDS-PAGE, y las bandas que contenían lamina A, prelamina A y progerina se escindieron. Los fragmentos del gel se lavaron dos veces con 180 ml de una mezcla de bicarbonato amónico/acetronitrilo (70:30, 25 mM), se secaron (15 min, 90 °C) y se digirieron (1 h, 60 °C) con tripsina (12 ng/ml, Promega) en bicarbonato amónico 25 mM. En una experimentación habitual, 1 ml de CHCA (ácido α -ciano-4-hidroxicinámico, Waters) se coloca en un espectrómetro MALDI-ToF. Una vez seco, 1 ml de la solución de péptidos y 1 ml de la matriz (CHCA) se colocan en el espectrómetro equipado con una fuente de láser (Voyager-DE STR (marca comercial), Applied Biosystems). Los datos recogidos a partir de 200 disparos de láser se producen espectros analizados con el programa Data Explorer (versión 4.0.0.0, Applied Biosystems).

PCR cuantitativa en tiempo real

La tasa de expresión de genes diana de p53 (*Atf3*, *Gadd45g* y *Cdkn1a*, que codifica p21) se midió con el aparato ABI PRISM 7900HT de sistema de detección de secuencias (Applied Biosystems).

Análisis estadístico

5 La diferencia entre los diferentes grupos de ratones y células, tratados o no, se analizó con la ayuda del ensayo de Student. Los cálculos se realizaron con la ayuda del programa Microsoft Excel. Los datos se expresan en media \pm error estándar de la media (ETM).

10 Resultados

Las células HeLa se cultivan en presencia de inhibidores de la farnesil-transferasa (FTI-277, Sigma-Aldrich) y/o la geranil-geranil transferasa de tipo I (GGTI-2147, Sigma-Aldrich) en las concentraciones indicadas. Solamente la combinación de los dos inhibidores condujo a la acumulación en las células de una cantidad importante de prelamina A no prenilada con respecto al efecto de cada uno de los inhibidores utilizados solos.

15 Estos resultados se muestran en las figuras 10 que es una fotografía de una transferencia de Western obtenida que muestra la detección de la lamina A/C en células HeLa tratadas con inhibidores de la farnesil-transferasa y/o de la geranil-geranil transferasa de tipo I. LA = lamina A, LC = lamina C, Pre = prelamina A.

20 Estos resultados confirman que el bloqueo de la prenilación de la prelamina A necesita a la vez la inhibición de la farnesil-transferasa y de la geranil-geranil transferasa de tipo I de acuerdo con la presente invención.

25 El inhibidor de la farnesil-transferasa (FTI) induce la geranil-geranilación compensatoria de la progerina (en células de pacientes que padecen progeria) y en fibroblastos de ratón *Zmpste24*^{-/-}.

30 El análisis por espectrometría de masas muestra, como se esperaba, la presencia de péptidos trípticos de la prelamina A farnesilada y carboximetilada en las células de ratón *Zmpste24*^{-/-} pero no en las células de ratón de control. Estos resultados se muestran en la Figura 13a. El péptido farnesilado está desprovisto de 3 restos de SIM, lo que muestra que *Zmpste24* no es indispensable para la primera escisión en el transcurso de la maduración de la prelamina A. Una disminución de la cantidad de prelamina A farnesilada se observa en las células de ratón tratadas con FTI. Durante la observación de la parte del espectro correspondiente a los péptidos geranilgeranilados, no se pudo detectar ningún péptido derivado de la prelamina A en las células de ratón *Zmpste24*^{-/-} no tratadas. Pero un péptido cuya masa es compatible con un fragmento geranilgeranilado de la prelamina A se detecta después de tratamiento con FTI. Estos resultados se muestran en la Figura 13b.

35 En las células de pacientes con progeria, se detectan péptidos que corresponden a la progerina farnesilada y carboximetilada en ausencia de cualquier tratamiento, como se indica en la Figura 11a. El tratamiento de estas células con FTI-127 provoca la aparición de péptidos cuya masa corresponde a la de los péptidos geranilgeranilados de la progerina, como aparece en la Figura 11b.

40 El conjunto de estos datos muestra que la progerina y la prelamina A están geranilgeraniladas de manera alternativa bajo el efecto de FTI y proporciona una explicación a la escasa eficacia de los tratamientos con FTI en modelos murinos de síndromes progeroides.

45 Las células de pacientes con progeria y de ratón *Zmpste24*^{-/-} se utilizaron para evaluar estrategias terapéuticas destinadas a prevenir la prenilación cruzada de la prelamina A y de la progerina. Los inventores han realizado la hipótesis de que la farnesilación de las variantes anómalas de la lamina A con fármacos que actúan en la ruta de biosíntesis del pirofosfato de farnesilo, sustrato de la farnesil-transferasa y precursor del pirofosfato de geranilgeranilo, sustrato de la geranil-geranil transferasa de tipo I. Por lo tanto, los inventores sometieron a ensayo el efecto de dos fármacos, una estatina y un aminobifosfonato, conocidos por actuar en dos etapas de esta ruta metabólica, en dos células de pacientes con progeria. El análisis por espectrometría de masas muestra que la asociación de pravastatina (estatina) zoledronato (aminobifosfonato) provoca la aparición de un péptido correspondiente al extremo C-terminal no prenilado de la progerina, Péptido no detectables en las células tratadas con FTI, mientras que ni los péptidos farnesilados, ni los péptidos geranilgeranilados se detectan más, como aparece en la Figura 11c). El tratamiento con estatina + aminobifosfonato inhibe bien la prenilación de la progerina. La misma observación se realizó para la prelamina A, como aparece en la Figura 12. Su péptido C-terminal, no prenilado, se detectan las células tratadas con la mezcla de estatina + aminobifosfonato, mientras que está ausente en las no tratadas, en las que se encuentra el péptido farnesilado y carboximetilado. Por último, el tratamiento con pravastatina + zoledronato no hacía aparecer a la prelamina A geranilgeranilada, a diferencia de FTI.

60 Leyenda de la figura 13: La lamina A (células de control) y la prelamina A (células de ratón *Zmpste24*^{-/-}) se analizaron por espectrometría de masas (MALDI-ToF). a, b: partes del espectro que corresponden a los péptidos trípticos farnesilados (a) y geranilgeranilados (b). Cada uno de los picos está marcado con la masa teórica (entre paréntesis) del péptido que proviene de la digestión con tripsina de la lamina A o de la prelamina A. El número de

restos está indicado en color azul. La secuencia de los péptidos y su masa están indicados en color rojo. Farn = farnesilado; CM = carboximetilado; Ger = geranilgeranilado.

5 Leyenda de la figura 11: Análisis por espectrometría de masas de proteínas extraídas de la envoltura nuclear de células no tratadas (a), células de pacientes con progeria tratados con FTI (2,5 μ M, b) o tratados con la mezcla de pravastatina + zoledronato (cada uno 1 μ M, c). La parte de los espectros que corresponden a las proteínas no modificadas, farnesiladas y geranilgeraniladas se muestra en la parte superior, en la parte media y en la parte baja de la figura. Cada pico corresponde al péptido tríptico de la progerina y está marcado por la masa monoisotópica medida en el experimento y por la masa teórica (entre paréntesis). El número de restos de aminoácidos está
10 indicado en color azul. La secuencia de los péptidos y su masa están indicados en color rojo.

La progerina está mayoritariamente farnesilada (F) y carboximetilada (Cm) en las células no tratadas (a, panel de la parte media), mientras que bajo el efecto de FTI, este pico está muy reducido y la progerina aparece geranilgeranilada y fosforilada (b, panel de la parte inferior). Después del tratamiento con pravastatina + zoledronato,
15 la progerina no modificada es la forme predominante.

Leyenda de la figura 12: Análisis por espectrometría de masas de proteínas extraídas de la envoltura nuclear de fibroblastos no tratados (a), o tratados con la mezcla de pravastatina + zoledronato (cada uno 1 μ M, b) que provienen de ratón *Zmpste24*^{-/-}. La parte de los espectros que corresponde a las proteínas no modificadas, farnesiladas y geranilgeraniladas se muestra la parte superior, en la parte media y en la parte baja de la figura. Cada
20 pico corresponde al péptido tríptico de la progerina y está marcado por la masa monoisotópica medida en el experimento y con la masa teórica (entre paréntesis). El número de restos de aminoácidos está indicado en color azul. La secuencia de los péptidos y su masa están indicados en color rojo.

25 Sobre esta figura, se observa que la prelamina A está mayoritariamente farnesilada (F) y carboximetilada (Cm) en las células no tratadas (a, panel de la parte media), mientras que las formas no modificadas o geranilgeraniladas no se detectan. Después del tratamiento con pravastatina + zoledronato, los péptidos prenilados no se detectan más y la forma no modificada de la prelamina A es predominante (b, anhelé la parte superior).

30 El tratamiento con pravastatina + zoledronato corrige las anomalías nucleares de las células de pacientes con progeria y de ratones *Zmpste24*^{-/-} en cultivo, y restaura en parte los mecanismos de reparación de las lesiones del ADN inducidas por rayos X (Figuras 14,15,16 y 17).

El tratamiento con pravastatina + zoledronato provoca la aparición de prelamina A en el núcleo de células de control (Fig. 14a), como en el núcleo de células de pacientes con progeria, pero con una clara mejoría de la morfología nuclear en estas últimas (Fig. 14b). El análisis ponderativo muestra un aumento de las anomalías nucleares en las células de pacientes con progeria con el número de pasajes, número de anomalías que disminuyen bajo el efecto del
35 tratamiento con pravastatina + zoledronato (Fig. 14c). Observadas en el microscopio confocal, las células de paciente con progeria contienen agregados de lamina A/C, invaginaciones profundas de la cara nucleoplasmática de la envoltura nuclear en el nucleoplasma (el retículo nuclear) marcadas por anticuerpos anti-calreticulina (Fig. 15a-f). Estos agregados de lamina A/C están ausentes en células de sujetos de control (Fig. 14J-I) y desaparecen de
40 células de pacientes con progeria bajo el efecto del tratamiento con pravastatina + zoledronato (Fig. 14g-i). La localización de la lamina B1, un componente farnesilado de la lamina nuclear, está modificado bajo el efecto del tratamiento, lo que confirma que el tratamiento bloquea la presnilación de las laminas.

45 Los inventores han verificado que la mejoría de la forma de los núcleos con el tratamiento con pravastatina + zoledronato está bien ligado al bloqueo de la prenilación de la progerina, incubando las células con farnesol y/o geranilgeraniol. La suplementa acción de las células con farnesol y geranilgeraniol permite que las células sinteticen el pirifosfato de farnesilo y el pirofosfato de geranilgeraniol y por lo tanto prenilar la progerina
50 incluso en presencia de pravastatina + zoledronato (Fig. 14d). El farnesol anula el efecto del tratamiento con pravastatina + zoledronato, lo que es otra prueba de que el efecto del tratamiento pasa por la inhibición de la síntesis del pirifosfato de farnesilo. Se debe indicar que el geranilgeraniol también bloquear el efecto del tratamiento, lo que demuestra que la forma geranilgeranilada de la progerina también es tóxica para las células (Fig. 14d). Los mismos efectos se observan en las células *Zmpste24*^{-/-} (Fig. 16a) lo que sugiere que los datos que se refieren a la progerina se pueden prolongar a la prelamina A, la proteína acumulada en las células *Zmpste24*^{-/-}. Ni el farnesol, ni el
55 geranilgeraniol producen efectos en fibroblastos de control, lo que elimina la opcionalidad de un artefacto inducido por estas moléculas (Fig. 16b).

60 Por último, el tratamiento con pravastatina + zoledronato provoca una reducción del número de focos de histona de H2AX fosforiladas, focos que se correlacionan directamente con el número de rupturas de la doble hebra del ADN sin reparar (Fig. 17).

65 En conclusión, los datos adquiridos *in vitro* muestran que la combinación de pravastatina + zoledronato inhibe parcialmente la farnesilación y la geranilgeranilación, y provoca las modificaciones esperadas de localización a nivel de la lamina y la redistribución en el nucleoplasma, de la prelamina A y de la progerina no preniladas en las células *Zmpste24*^{-/-} y en pacientes con progeria. Además como la disminución de la cantidad de progerina farnesilada a nivel

de la lamina y su relocalización en el nucleoplasma explica los efectos beneficiosos del tratamiento en las células de los pacientes con progeria.

5 Leyenda de la figura 14: Efecto sinérgico de la combinación de pravastatina + zoledronato en la acumulación de prelamina A en células de control y pacientes con progeria.

(a) Detección inmunocitoquímica de la lamina A/C y de la prelamina A en fibroblastos humanos normales, no tratados, tratados con pravastatina (60 μ M, 12 h), con zoledronato (60 μ M, 6 h) solos o asociados.

10 (b) Detección inmunocitoquímica de la lamina A/C y de la prelamina A en fibroblastos humanos normales y de pacientes con progeria tratados durante 24 h con la combinación de pravastatina + zoledronato (1 μ M cada uno).

(c) Análisis cuantitativo del efecto del tratamiento con pravastatina + zoledronato (1 μ M cada uno) en la morfología nuclear de células de pacientes con progeria. Las células tratadas o no se inmunotiquetaron con un anticuerpo anti-lamina A/C en los pasajes 8 (p8), 13 (p13) y 20 (p20). Las flechas de color blanco muestran los núcleos anómalos.

15 (d) Análisis cuantitativo del efecto del tratamiento con pravastatina + zoledronato (1 μ M cada uno) s en la morfología nuclear de células de pacientes con progeria en presencia de farnesol, geranilgeraniol o los dos compuestos. Barras de error = media \pm error estándar de la media. Barra de escala = 10 μ m.

20 Leyenda de la figura 15: El tratamiento con pravastatina + zoledronato corrige la morfología nuclear e induce una relocalización parcial de las isoformas de la lamina A/C y de la lamina B1 de la lamina nuclear en el nucleoplasma, en células de pacientes con progeria.

25 (A) la colocalización de la lamina A/C y de la calreticulina en estas células de progeria tratadas o no. Inmunofluorescencia y microscopía confocal (Leica TCS SP5, pila tridimensional de imágenes de 2048 x 2048 pixeles, sin 0,2 μ m, media de 3 líneas, acumulación de 3 imágenes, zoom x 1,7). Las imágenes a a c de cada panel son proyecciones de intensidad media de 27 imágenes de la pila en muestra los túbulos del retículo nuclear marcados por la calreticulina en las células de progeria incubadas con PBS. Imágenes d a l: cortes confocales aislados de 0,2 μ m de espesor. El tratamiento con pravastatina + zoledronato corrige la forme de los núcleos de las células con progeria, disminuyó el número de túbulos del retículo nuclear (g) y el espesor de la lamina nuclear (h).

30 (B) Colocalización de la lamine B1 y de la calreticulina. El tratamiento con pravastatina + zoledronato aumenta la señal de etiquetado nucleoplasmático por la lamine B1, lo que indica que la farnesilación de esta proteína está inhibida en parte. Barra de escala = 5 μ m.

35 Leyenda de la figura 16: Los precursores del pirofosfato de farnesilo y del pirofosfato de geranil-geranilo anulan el efecto del tratamiento con pravastatina + zoledronato en las células de ratón *Zmpste24*^{-/-} en cultivo.

40 Cuantificación del efecto de la pravastatina (1 μ M) y del zoledronato (1 μ M) asociados o no en la morfología nuclear de células de ratón *Zmpste24*^{-/-} (a) y de ratones de control (b) en cultivo, en presencia de farnesol, geranilgeraniol o de las dos moléculas.

Farnesol, geranilgeraniol solos o asociados anulan el efecto del tratamiento con pravastatina + zoledronato en la morfología nuclear de las células *Zmpste24*^{-/-}.

45 Leyenda de la figura 17: El tratamiento con pravastatina + zoledronato corrige en parte las anomalías de la reparación de las rupturas de la doble hebra (DSB) del ADN en las células de pacientes con progeria.

50 Los fibroblastos de control y de pacientes con progeria se incubaron con la mezcla de pravastatina + zoledronato (1 μ M cada uno) o con PBS y se irradiaron con rayos X (2 Gy). La inmunodetección de los focos de la histona H2AX fosforiladas detectados 24 h después de radiación, focos que corresponden a las rupturas de la doble era no reparadas (imágenes de la parte superior). Etiquetado nuclear de DAPI (imágenes de la parte inferior).

55 Curvas de la parte inferior: evolución del número de focos de histona H2AX fosforilado en función del tiempo después de radiación en las células de control (cuadrado relleno) y las células de progeria (círculo vacío) incubadas con PBS o tratadas con pravastatina + zoledronato. Cada curva representa la media \pm error estándar de la media de al menos 3 experimentos.

60 El tratamiento que asocia pravastatina + zoledronato mejora el fenotipo progeroide de ratones *Zmpste24*^{-/-} (Figuras 18,19 y 20)

65 Los ratones *Zmpste24*^{-/-} y los ratones de control se trataron diariamente con pravastatina, zoledronato o la combinación de los dos fármacos a una dosis que anteriormente se había demostrado que estaba desprovista de toxicidad en el ratón. Como ya se ha observado para las células del paciente con progeria, cada uno de los fármacos aislados, pravastatina o zoledronato, no mejora el periodo de vida de los ratones *Zmpste24*^{-/-} (Fig. 19). Por el contrario, la combinación de los dos fármacos mejora de manera significativa el fenotipo progeroide de los ratones *Zmpste24*^{-/-} : el tratamiento mejora el aumento de peso, aumenta la cantidad de grasa subcutánea, reduce la

importancia de cifosis y la noticia y aumenta el periodo de vida. El valor medio de la supervivencia pasa de 101 a 179 días y la supervivencia máxima pasa de 151 a 222 días ($P < 0,001$, Fig. 18c). Se debe indicar que todos los signos fenotípicos corregidos con el tratamiento en los ratones también son las características de la progeria en el ser humano. El tratamiento combinado corrige la disminución de la densidad ósea que es una de las características de los ratones *Zmpste24^{-/-}* y de pacientes que padecen progeria o de un síndrome progeroide aparente. La microtomografía poeía informatizada muestra un aumento de la mineralización del hueso y del espesor de la cortical tibial en los ratones tratados (Fig. 18d). Además, la cuantificación de las anomalías morfológicas nucleares en el hígado de ratón *Zmpste24^{+/+}*, *Zmpste24^{-/-}* y *Zmpste24^{-/-}* tratados muestra que el tratamiento pravastatina + zoledronato con normalizará forma de los núcleos de las células *Zmpste24^{-/-}* (Fig. 18e). El tratamiento corrige además del aumento de la transcripción de los genes diana de la proteína p53, aumento que se ha descrito en las células de ratón *Zmpste24^{-/-}* (Varela *et al.*, 2005 (54 bis)) (Fig. 18f). Por último, los inventores han investigado es el tratamiento podría tener un efecto en los ratones *Lmna^{-/-}* que no pueden acumular prelamina A. El tratamiento con pravastatina + zoledronato no tiene ningún efecto en el periodo de vida de estos ratones (Fig. 20), lo que es una prueba complementaria de que este tratamiento no puede actúan en ratones que acumulan la prelamina A farnesilada en la envoltura nuclear.

Leyenda de la figura 18: Tratamiento con pravastatina + zoledronato mejora el fenotipo progeroide de ratones *Zmpste24^{-/-}*:

- (a) Fotografías representativas de ratones envejecidos de 3 meses *Zmpste24^{+/+}*, *Zmpste24^{-/-}* y *Zmpste24^{-/-}* tratados con la combinación de pravastatina (100 mg/kg/día) y zoledronato (100 mg/kg/día). Barra de escala = 1 cm. (b) Peso de los ratones envejecidos de 3 meses *Zmpste24^{+/+}* (n = 12), *Zmpste24^{-/-}* (n = 13) y *Zmpste2^{-/-}* tratados (n = 15). (c) Curvas de Kaplan-Meier que muestran un aumento significativo del periodo de vida de los ratones *Zmpste24^{-/-}* tratados (n = 15) en comparación con la de los ratones no tratados (n = 13). (d) Representación tridimensional mediante microtomografía informatizada de la tibia de ratón *Zmpste24^{-/-}* tratado y no tratado (imagen de la parte superior). El panel de la parte inferior representa el volumen óseo relativo (volumen de tejido óseo/volumen de la tibia) y el número de trabéculas óseas en los ratones *Zmpste24^{-/-}* no tratados (n = 6) y tratados (n = 5). (e) Cuantificación de las anomalías nucleares de los hepatocitos de ratón *Zmpste24^{+/+}*, *Zmpste24^{-/-}* y *Zmpste24^{-/-}* tratados. Las flechas de color blanco muestran los núcleos anómalos. Barra de escala = 10 μ m. (f) Expresión relativa de los genes diana de la p53 en el hígado y el corazón de ratones *Zmpste24^{+/+}*, *Zmpste24^{-/-}* y *Zmpste24^{-/-}* tratados, analizada por RT-PCR cuantitativa. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$. Las barras de error representan a media \pm error estándar de la media.

Leyenda de la figura 19: Ni la pravastatina sola, ni el zoledronato solo aumentan la duración de la vida de los ratones *Zmpste24^{-/-}*.

Las curvas de Kaplan-Meier que muestran que la pravastatina sola (n = 5) (a), y el zoledronato solo (n = 5) (b) no corrigen del periodo de vida de los ratones *Zmpste24^{-/-}* tratados (diamante vacío) y no tratados (círculos rellenos, n = 11).

Leyenda de la figura 20: El tratamiento con pravastatina + zoledronato no corrige el periodo de vida de los ratones *Lmna^{-/-}*:

Curvas de Kaplan-Meier que muestran el periodo de vida de los ratones *Lmna^{-/-}* tratados con pravastatina + zoledronato (n = 12, diamante vacío), en comparación con el de los ratones no tratados (círculos rellenos, n = 11). El tratamiento con pravastatina + zoledronato no tiene efecto en ratones desprovistos de lamina A/C.

Resumen/conclusión/perspectivas

Varios síndromes progeroides humanos, entre ellos la progeria de Hutchinson-Gilford, están causados por la acumulación a nivel de la envoltura nuclear de una forma farnesilada de prelamina A suprimida (progerina) o no. La progerina también se produce en el transcurso del envejecimiento fisiológico. Algunos estudios precedentes realizados con células de pacientes que padecen progeria mostraron que los inhibidores de la farnesiltransferasa (FTI) mejoran la morfología de los núcleos, lo que sugiere que estos inhibidores podrían representar un tratamiento para estos síndromes devastadores.

Los inventores muestran en el presente documento que la prelamina A y la progerina experimentan una prenilación alternativa por la geranilgeraniltransferasa cuando la farnesiltransferasa está inhibida, lo que podría explicar la baja eficacia de FTI para mejorar el fenotipo de modelos murinos de estos síndromes progeroides.

También muestran que la combinación de un estatina y de un aminobifosfonato inhibe de manera eficaz a la vez la farnesilación y la geranilgeranilación de la prelamina A y de la progerina, mejoró de manera significativa el fenotipo de envejecimiento de ratones en los que se ha inactivado el gen que codifica la metaloproteasa *Zmpste24* implicada en la maduración de la prelamina A. La mejoría del fenotipo incluye la de la curva de crecimiento, peso, lipodistrofia, caída de pelo y las anomalías óseas.

Además, el periodo de vida de estos ratones aumenta de manera sustancial.

5 Estos datos abren un nuevo enfoque terapéutico de los síndromes progeroides humanos con acumulación de proteínas preniladas de la envoltura nuclear.

10 El tratamiento con pravastatina + aminobifosfonato está en periodo de aplicación en Marsella durante los 3 años siguientes en niños que padecen progeria en el contexto de un ensayo terapéutico europeo (15 niños) colocado bajo la responsabilidad del Pr. Nicolas Lévy, financiado por el ministerio de Sanidad (PHRC 2008) y la Asociación Francesa contra las Miopatías (AFM) y que ha recibido la autorización de AFSSAPS y del CCP del Mediterráneo del Sur.

15 El mismo tratamiento se proporcionará próximamente en Roma, bajo la responsabilidad del Pr. Giuseppe Novelli, a pacientes que padecen displasia acromandibular, otro síndrome progeroide con acumulación de prelamina A farnesilada.

Listado de referencias

- 20 (1) Basso AD, Kirschmeier P, Bishop WR. Farnesyl transferase inhibitors. *J Lipid Res* 47:15-31, 2006.
- (2) Biamonti G, Giacca M, Perini G, Contreas G, Zentilin L, Weighardt F, Guerra M, Delia Valle G, Saccone S, Riva S et al. The gene for a novel human lamin maps at a highly transcribed locus of chromosome 19 which replicates at the onset of S-phase. *Mol Cell Biol* 12:3499-3506, 1992.
- 25 (3) Bishop WR, Kirschmeier P, Baun C. Farnesyl transferase inhibitors: mechanism of action, translational studies and clinical evaluation. *Cancer Biol Ther* 2:S96-104, 2003.
- (4) Broers JL, Hutchinson CJ, Ramaekers FC. Laminopathies. *J Pathol* 204:478-488, 2004.
- 30 (5) Broers JLV, Ramaekers FCS, Bonne G, Ben Yaou R, Hutchinson CJ. Nuclear lamins: laminopathies and their role in premature, aging. *Physiol Rev* 86:967-1008, 2006.
- 35 (6) Capell BC, Erdos MR, Madigan JP, Fiordalisi JJ, Varga R, Conneely KN, Gordon LB, Der CJ, Cox AD, Collins FS. Inhibiting farnesylation of progerin prevents the characteristic nuclear blebbing of Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:12879-12884, 2005.
- (7) De Sandre-Giovannoli A, Bernard R, Cau P, Navarro C, Amiel J, Boccaccio I, Lyonnet S, Stewart CL, Munnich A, Le Merrer M, Levy N. Lamin A truncation in Hutchinson-Gilford progeria. *Science* 300:2055, 2003.
- 40 (8) Demyanets S, Kaun C, Pfaffenberger S, Philipp J, Hohensinner PJ, Rega G, Pammer J, Maurer G, Huber K, Wojta J. Hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors induce apoptosis in human cardiac myocytes in vitro. *Biochem Pharmacol* 71:1324-1330, 2006.
- 45 (9) Duque G, Rivas D. Age-related changes in Lamin A/C expression in the osteoarticular system: laminopathies as a potential new aging mechanism. *Mech Aging Dev* 127:378-383, 2006.
- (10) Efuot ET, Keyomarsi K. Farnesyl and geranylgeranyl transferase inhibitors induce G1 arrest by targeting the proteasome. *Cancer Res* 66:1040-1051, 2006.
- 50 (11) Eriksson M, Brown WT, Gordon LB, Glynn MW, Singer J, Scott L, Erdos MR, Robbins CM, Moses TY, Berglund P, Dutra A, Pak E, Durkin S, Csoka AB, Boehnke M, Glover TW, Collins FS. Recurrent de novo point mutation in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature* 423:293-298, 2003.
- 55 (12) Evans M, Rees A The myotoxicity of statins. *Cur Op Lipid*, 13:415-420, 2002.
- (13) Flint OP, Masters BA, Gregg RE, Durham SK. HMG CoA reductase inhibitor-induced myotoxicity: pravastatin and lovastatin inhibit the geranylgeranylation of low-molecular-weight proteins in neonatal rat muscle cell culture. *Tox Appl Pharmacol* 145:99-110, 1997.
- 60 (14) Fong LG, Frost D, Meta M, Qiao X, Yang SH, Coffinier C, Young SG. A protein farnesyltransferase inhibitor ameliorates disease in a mouse model of progeria. *Science*, 311 : 1621-1623, 2006.
- 65 (15) Fong LG, Ng JK, Lammerding J, Vickers TA, Meta M, Cote N, Gavino B, Qiao X, Chang SY, Young SR, Yang SH, Stewart CL, Lee RT, Bennett CF, Bergo MO, Young SG. Prelamin A and Lamin A appear to be dispensable in the nuclear lamina. *J Clin Invest* 116:743-752, 2006.

- (16)Fong LG, Ng JK, Meta M, Cote N, Yang SH, Stewart CL, Sullivan T, Burghardt A, Majumdar S, Reue K, Bergo MO, Young SG. Heterozygosity for Lmna deficiency eliminates the progeria-like phenotypes in Zmpste24-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:18111-18116, 2004.
- 5 (17)Glynn MW, Glover TW. Incomplete processing of mutant lamin A In Hutchinson-Gilford progeria leads to nuclear abnormalities, which are reversed by farnesyltransferase inhibition. *Hum Mol Genet* 14:2959-2969, 2005.
- (18)Goldman RD, Shumaker DK, Erdos MR, Eriksson M, Goldman AE, Gordon LB, Gruenbaum Y, Khuon S, Mendez M, Varga R, Collins FS. Accumulation of mutant lamin A causes progressive changes in nuclear architecture in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:8963-8968, 2004.
- 10 (19)Gruenbaum Y, Margalit A, Goldman RD, Shumaker DK, Wilson KL. The nuclear lamina comes of age. *Nat Mol Cell Biol* 6:21-31, 2005.
- (20)Hampton R, Dimster-Denk D, Rine J. The biology of HMG-CoA reductase: the pros of contra-regulation. *Trends Biochem Sci* 21:140-145,1996.
- 15 (21)Harborth J, ElbashirSM, BechertK, TuschlT, Weber K. Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs. *J Cell Sci* 114:4557-4565, 2001.
- 20 (22)Hegele RA, Cao H, Liu DM, Costain GA, Charkon-Menys V, Rodger NW, Durrington PN. Sequencing of reannotated LMNB2 gene reveals novel mutations in patients with acquired partial lipodystrophy. *Am J Hum Genet* 79:383-389, 2006.
- (23)Hildebrand T, Ruegsegger P. A new method for the model independent assessment of thickness in three dimensional images. *J Microsc* 185:67-75, 1997.
- 25 (24)Hoffmann GF, Charpentier C, Mayatepek E, Mancini J, Leichsenring M, Gibson KM, Divry P, Hrebicek M, Lehnert W, Sartor K. Clinical and biochemical phenotype in 19 patients with mevalonic aciduria. *Pediatrics* 91:915-921, 1993.
- 30 (25)Huang S, Chen L, Libina N, Janes J, Martin GM, Campisi J, Oshima J. Correction of cellular phenotypes of Hutchinson-Gilford Progeria cells by RNA interference. *Hum Genet.* 2005 Oct 6; 1-7
- 35 (26)Hutchinson CJ, Worman HJ. A-type lamins: guardians of the soma? *Nat Cell Biol* 6:1062-1067, 2004.
- (27)Kusuyama T, Omura T, Nishiya D, Enomoto S, Matsumoto R, Murata T, Takeuchi K, Yoshikawa J, Yoshiyama M. The effects of HMG-CoA reductase inhibitor on vascular progenitor cells. *J Pharmacol Sci* 1001:344-349, 2006.
- 40 (28)Leung KF, Baron R, Seabra MC. Geranylgeranylation of Rab GTPases. *J Lipid Res* 47:467-475, 2006.
- (29)Levy N, Cau P. Anomalies du noyau et maladies. *Pour la Science* 313:2-7, 2003.
- 45 (30)Lin F, Worman HJ. Structural organization of the human gene (LMNB1) encoding nuclear lamin B1. *Genomics* 27:230-236, 1995.
- (31)Lin F, Worman HJ. Structural organization of the human gene encoding nuclear lamin A and nuclear lamin C. *J Biol Chem* 268:16321-16326, 1993.
- 50 (32)Liu Y, Wang Y, Rusinol AE, Sinensky MS, Liu J, Shell SM, Zou Y. Involvement of xeroderma pigmentosum group A (XPA) in progeria arising from defective maturation of prelamin A. *FASEB J.* 2007 Sep 11;
- (33)Mattout A, Dechat T, Adam SA, Goldman RD, Gruenbaum Y. Nuclear lamins, diseases and aging. *Cur Op Cell Biol* 18:335-341,2006.
- 55 (34)McClintock D, Ratner D, Lokuge M, Owens DM, Gordon LB, Collins FS, Djhabali K. The mutant form of lamin A that causes Hutchinson-Gilford progeria is a biomarker of cellular aging in human skin. *PLoS One*, 2007,2,e1269
- 60 (35)Navarro CL, Cadinanos J, De Sandre-Giovannoli A, Bernard R, Courrier S, Boccaccio I, Boyer A, Kleijer WJ, Wagner A, Giuliano F, Beemer FA, Freije JM, Cau P, Hennekam RC, Lopez-Otin C, Badens C, Levy N. Loss of ZMPSTE24 (FACE-1) causes autosomal recessive restrictive dermopathy and accumulation of Lamin A precursors. *Hum Mol Genet* 14:1503-1513, 2005.
- 65

- 5 (36) Navarro CL, De Sandre-Giovannoli A, Bernard R, Boccaccio I, Boyer A, Genevieve D, Hadj-Rabia S, Gaudy-Marqueste C, Smitt HS, Vabres P, Faivre L, Verloes A, Van Essen T, Flori E, Hennekam R, Beemer FA, Laurent N, Le Merrer M, Cau P, Levy N. Lamin A and ZMPSTE24 (FACE-1) defects cause nuclear disorganization and identify restrictive dermopathy as a lethal neonatal laminopathy. *Hum Mol Genet* 13:2493-2503,2004.
- (37) Padiath QS, Saigoh K, Schiffmann R, Asahara H, Yamada T, Koeppen A, Hogan K, Ptacek LJ, Fu YH. Lamin B1 duplications cause autosomal dominant leukodystrophy. *Nature Genet* 38:1114-1123, 2006.
- 10 (38) Pendas AM, Zhou Z, Cadinanos J, Freije JM, Wang J, Hultenby K, Astudillo A, Wernerson A, Rodriguez F, Tryggvason K, Lopez-Otin C. Defective prelamin A processing and muscular and adipocyte alterations in Zmpste24 metalloproteinase-deficient mice. *Nat Genet* 31:94-99, 2002.
- 15 (39) Reid TS, Terry KL, Casey PJ, Beese LS. Crystallographic analysis of CaaX prenyltransferases complexed with substrates defines rules of protein substrate selectivity. *J Mol Biol* 343:417-433, 2004.
- (40) Scaffidi P, Misteli T. Lamin A-dependent nuclear defects in human aging. *Scienceexpress*, 27 avril 2006.
- (41) Scaffidi P, Misteli T. Reversal of the cellular phenotype in the premature aging disease Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nat Med* 11:440-445, 2005.
- 20 (42) Scaffidi P, Misteli T. Reversal of the cellular phenotype in the premature aging disease Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature Med* 11:440-445, 2005.
- (43) Shelton KR, Egle PM, Cochran DL. Nuclear envelope proteins: identification of lamin B subtypes. *Biochem Biophys Res Comm* 103:975-981, 1981.
- 25 (44) Shumaker DK, Kuczmarski ER, Goldman RD. The nucleoskeleton: lamins and actin are major players in essential nuclear functions. *Curr Opin Cell Biol* 15:358-366, 2003.
- 30 (45) Stewart C, Burke B. Teratocarcinoma stem cells and early mouse embryos contain only a single major lamin polypeptide closely resembling lamin B. *Cell* 51:383-392, 1987.
- (46) Takeda M, Noshiro A, Onozato B, Tojiba A, Hasannejada H, Huang C, Narikawa S, Endou H. Evidence for a role of human organic anion transporters in the muscular side effects of HMG-CoA reductase inhibitors. *Eur J Pharm* 483:133-138, 2004.
- 35 (47) Toth JI, Yang SH, Qiao X, Beigneux AP, Gelb MH, Moulson CL, Miner JH, Young SG, Fong LG. Blocking protein farnesyltransferase improves nuclear shape in fibroblasts from humans with progeroid syndromes. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:12873-12878, 2005.
- 40 (48) Tsai MY, Wang S, Heidinger JM, Shumaker DK, Adam SA, Goldman RD, Zheng Y. A mitotic lamin B matrix induced by RanGTP required for spindle assembly. *Science* 311:1887-1893, 2006.
- 45 (49) Varela I, Cadinanos J, Pendas AM, Gutierrez-Fernandez A, Folgueras AR, Sanchez LM, Zhou Z, Rodriguez FJ, Stewart CL, Vega JA, Tryggvason K, Freije JM, Lopez-Otin C. Accelerated ageing in mice deficient in Zmpste24 protease is linked to p53 signalling activation. *Nature* 437:564-568, 2005.
- 50 (50) Vergnes L, Peterfy M, Bergo MO, Young SG, Reue K. Lamin B1 is required for mouse development and nuclear integrity. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:10428-10433, 2004.
- (51) Winter-Vann AM, Casey PJ. Post-prenylation-processing enzymes as new targets in oncogenesis. *Nat Rev Cancer* 5:405-412, 2005.
- 55 (52) Wydner KL, McNeil JA, Lin F, Worman H J, Lawrence JB. Chromosomal assignment of human nuclear envelope protein genes LMNA, LMNA1 and LBR by fluorescence in situ hybridization. *Genomics* 32:474-478,1996.
- 60 (53) Young SG, Meta M, Yang SH, Fong LG. Prelamin A farnesylation and progeroid syndromes. *J Biol Chem* 281:39741-39745,2006.
- (54) Zastrow MS, Vlcek S, Wilson KL. Proteins that bind A-type lamins: integrating isolated clues. *J Cell Sci* 117:979-987,2004.
- 65 (54 bis) Varela, I. Pereira, S. Ugalde, A. P. Navarro, C. L. Suarez, M. F. Cau, P. Cadinanos, J. Osorio, F. G. Foray, N. Cobo, J. de Carlos, F. Levy; N. Freije, J. M. Lopez-Otin, C. Combined treatment with statins and

aminobisphosphonates extends longevity in a mouse model of human premature aging. *Nature Medicine* 14: 767-772, 2008.

VIH

- 5
- (55) Achanta, G., R. Sasaki, L. Feng, J.S. Carew, W. Lu, H. Pelicano, M.J. Keating, and P. Huang. 2005. Novel role of p53 in maintaining mitochondrial genetic stability through interaction with DNA Pol gamma. *Embo J.* 24:3482-92.
- 10
- (56) Adler, A.S., S. Sinha, T.L. Kawahara, J.Y. Zhang, E. Segai, and H.Y. Chang. 2007. Motif module map reveals enforcement of aging by continual NF- κ B activity. *Genes Dev.* 21:3244-57.
- (57) Agarwal, A.K., J.P. Fryns, R.J. Auchus, and A. Garg. 2003. Zinc metalloproteinase, ZMPSTE24, is mutated in mandibuloacral dysplasia. *Hum Mol Genet.* 12:1995-2001.
- 15
- (58) Azzam, R., L. Lai, S.L. Goh, K. Kedzierska, A. Jaworowski, E. Nairn, C.L. Cherry, S.L. Wesselingh, J. Mills, and S.M. Crowe. 2006. Adverse effects of antiretroviral drugs on HIV-1-infected and uninfected human monocyte-derived macrophages. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 42:19-28.
- 20
- (59) Balaban, R.S., S. Nemoto, and T. Finkel. 2005. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell.* 120:483-95.
- (60) Barbara, G. 2003. Pathogenesis of HIV-associated cardiovascular disease. *Adv Cardiol.* 40:49-70.
- 25
- (61) Bartke, A. 2005. Minireview: role of the growth hormone/insulin-like growth factor system in mammalian aging. *Endocrinology.* 146:3718-23.
- (62) Bartoli, M., and I. Richard. 2005. Calpains in muscle wasting. *Int J Biochem Cell Biol.* 37:2115-33.
- 30
- (63) Bauer, J.H., and S.L. Helfand. 2006. New tricks of an old molecule: lifespan regulation by p53. *Aging Cell.* 5:437-40.
- (64) Baxter, J.D., J.M. Schapiro, C.A. Boucher, V.M. Kohlbrenner, D.B. Hall, J.R. Scherer, and D.L. Mayers. 2006. Genotypic changes in human immunodeficiency virus type 1 protease associated with reduced susceptibility and virologic response to the protease inhibitor tipranavir. *J Virol.* 80:10794-801.
- 35
- (65) Ben-Porath, I., and R.A. Weinberg. 2005. The signals and pathways activating cellular senescence. *Int J Biochem Cell Biol.* 37:961-76.
- 40
- (66) Bender, A., K.J. Krishnan, C.M. Morris, G.A. Taylor, A.K. Reeve, R.H. Perry, E. Jaros, J.S. Hersheson, J. Betts, T. Klopstock, R.W. Taylor, and D.M. Turnbull. 2006. High levels of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons in aging and Parkinson disease. *Nat Genet.* 38:5.15-7.
- (67) Benesic, A., M. Zilly, F. Kluge, B. Weissbrich, R. Winzer, H. Klinker, and P. Langmann. 2004. Lipid lowering therapy with fluvastatin and pravastatin in patients with HIV infection and antiretroviral therapy: comparison of efficacy and interaction with indinavir. *Infection.* 32:229-33.
- 45
- (68) Bensaad, K., and K.H. Vousden. 2005. Savior and slayer: the two faces of p53. *Nat Med.* 11:1278-9.
- 50
- (69) Bordone, L., and L. Guarente. 2005. Calorie restriction, SIRT1 and metabolism: understanding longevity. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6:298-305.
- (70) Bourlier, V., A. Zakaroff-Girard, S. De Barros, C. Pizzacalla, V.D. de Saint Front, M. Lafontan, A. Bouloumie, and J. Galitzky. 2005. Protease inhibitor treatments reveal specific involvement of matrix metalloproteinase-9 in human adipocyte differentiation. *J Pharmacol Exp Ther.* 312:1272-9.
- 55
- (71) Broers, J.L., F.C. Ramaekers, G. Bonne, R.B. Yaou, and C.J. Hutchison. 2006. Nuclear lamins: laminopathies and their role in premature ageing. *Physiol Rev.* 86:967-1008.
- 60
- (72) Brokstad, K.A., K.H. Kalland, W.C. Russell, and D.A. Matthews. 2001. Mitochondrial protein p32 can accumulate in the nucleus. *Biochem Biophys Res Commun.* 281:1161-9.
- (73) Brosh, R.M., Jr., P. Karmakar, J.A. Sommers, Q. Yang, X.W. Wang, E.A. Spillare, C.C. Harris, and V.A. Bohr. 2001. p53 Modulates the exonuclease activity of Werner syndrome protein. *J Biol Chem.* 276:35093-102.
- 65
- (74) Brown, T.T., and R.B. Qaqish. 2006. Antiretroviral therapy and the prevalence of osteopenia and osteoporosis: a meta-analytic review. *Aids.* 20:2165-74.

- (75) Bukrinsky, M., and D. Sviridov. 2006. Human immunodeficiency virus infection and macrophage cholesterol metabolism. *J LeukocBiol.* 80:1044-51.
- 5 (76) Calvo, S., M. Jain, X. Xie, S.A. Sheth, B. Chang, O.A. Goldberger, A. Spinazzola, M. Zeviani, S.A. Carr, and V.K. Mootha. 2006. Systematic identification of human mitochondrial disease genes through integrative genomics. *Nat Genet.* 38:576-82.
- (77) Campisi, J. 2004. Fragile fugue: p53 in aging, cancer and IGF signaling. *Nat Med.* 10:231-2.
- 10 (78) Cao, K., B.C. Capell, M.R. Erdos, K. Djabali, and F.S. Collins. 2007. A lamin A protein isoform overexpressed in Hutchinson-Gilford progeria syndrome interferes with mitosis in progeria and normal cells. *Proc Natl Acad Sci U SA.* 104:4949-54.
- 15 (79) Capeau, J., J. Magre, O. Lascols, M. Caron, V. Bereziat, C. Vigouroux, and J.P. Bastard. 2005. Diseases of adipose tissue: genetic and acquired lipodystrophies. *Biochem Soc Trans.* 33:1073-7.
- (80) Caron, M., M. Auclair, B. Donadille, V. Bereziat, B. Guerci, M. Laville, H. Narbonne, C. Bodemer, O. Lascols, J. Capeau, and C. Vigouroux. 2007. Human lipodystrophies linked to mutations in A-type lamins and to HIV protease inhibitor therapy are both associated with prelamin A accumulation, oxidative stress and premature cellular senescence. *Cell Death Differ.* 14:1759-67.
- 20 (81) Caron, M., M. Auclair, H. Sterlingot, M. Komprobst, and J. Capeau. 2003. Some HIV protease inhibitors alter lamin A/C maturation and stability, SREBP-1 nuclear localization and adipocyte differentiation. *Aids.* 17:2437-44.
- 25 (82) Caron, M., M. Auclair, C. Vigouroux, M. Glorian, C. Forest, and J. Capeau. 2001. The HIV protease inhibitor indinavir impairs sterol regulatory element-binding protein-1 intranuclear localization, inhibits preadipocyte differentiation, and induces insulin resistance. *Diabetes.* 50:1378-88.
- 30 (83) Casau, N.C. 2005. Perspective on HIV infection and aging: emerging research on the horizon. *Clin Infect Dis.* 41:855-63.
- (84) Cawthon, R.M. 2002. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res.* 30:e47.
- 35 (85) Chattopadhyay, C, D. Hawke, R. Kobayashi, and S.N. Maity. 2004. Human p32, interacts with B subunit of the CCAAT-binding factor, CBF/NF-Y, and inhibits CBF-mediated transcription activation in vitro. *Nucleic Acids Res.* 32:3632-41.
- 40 (86) Chen, C, X.H. Lu, S. Yan, H. Chai, and Q. Yao. 2005. HIV protease inhibitor ritonavir increases endothelial monolayer permeability. *Biochem Biophys Res Commun.* 335:874-82.
- (87) Chen, CD., S. Podvin, E. Gillespie, S.E. Leeman, and C.R. Abraham. 2007. Insulin stimulates the cleavage and release of the extracellular domain of Klotho by ADAM10 and ADAM17. *Proc Natl Acad Sci US A.* 104:19796-801.
- 45 (88) Coffinier, C, S.E. Hudon, E.A. Farber, S.Y. Chang, C.A. Hrycyna, S.G. Young, and L.G. Fong. 2007. HIV protease inhibitors block the zinc metalloproteinase ZMPSTE24 and lead to an accumulation of prelamin A in cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 104:13432-7.
- 50 (89) Cohan, G.R. 2006. HIV-associated hypogonadism. *AIDS Read.* 16:341-5, 348, 352-4.
- (90) Colgan, S.M., D. Tang, G.H. Werstuck, and R.C. Austin. 2007. Endoplasmic reticulum stress causes the activation of sterol regulatory element binding protein-2. *Int J Biochem Cell Biol.* 39:1843-51.
- 55 (91) Costelli, P., and F.M. Baccino. 2003. Mechanisms of skeletal muscle depletion in wasting syndromes: role of ATP-ubiquitin-dependent proteolysis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 6:407-12.
- (92) Costelli, P., P. Reffo, F. Penna, R. Autelli, G. Bonelli, and F.M. - Baccino. 2005. Ca(2+)-dependent proteolysis in muscle wasting: *Int J Biochem Cell Biol.* 37:2134-46.
- 60 (93) Csoka, A.B., S.B. English, C.P. Simkevich, D.G. Ginzinger, A.J. Butte, G.P. Schatten, F.G. Rothman, and J.M. Sedivy. 2004. Genome-scale expression profiling of Hutchinson-Gilford progeria syndrome reveals widespread transcriptional misregulation leading to mesodermal/mesenchymal defects and accelerated atherosclerosis. *Aging Cell.* 3:235-43.
- 65

- (94) De Barros, S., A. Zakaroff-Girard, M. Lafontan, J. Galitzky, and V. Bourlier. 2007. Inhibition of human preadipocyte proteasomal activity by HIV protease inhibitors or specific inhibitor lactacystin leads to a defect in adipogen-esis, which involves matrix metalloproteinase-9. *J Pharmacol Exp Ther.* 320:291-9.
- 5 (95) de Noronha, CM., M.P. Sherman, H.W. Lin, M.V. Cavois, R.D. Moir, R.D. Goldman, and W.C. Greene. 2001. Dynamic disruptions in nuclear envelope architecture and integrity induced by HIV-1 Vpr. *Science.* 294:1105-8.
- (96) de Oliveira, R.M. 2006. Klotho RNAi induces premature senescence of human cells via a p53/p21 dependent pathway. *FEBS Lett.* 580:5753-8.
- 10 (97) de Saint Martin, L., O. Vandhuick, P. Guillo, V. Bellein, L. Bressollette, N. Roudaut, A. Amaral, and E. Pasquier. 2006. Premature atherosclerosis in HIV positive patients and cumulated time of exposure to antiretroviral therapy (SHIVA study). *Atherosclerosis.* 185:361-7.
- 15 (98) De Sandre-Giovannoli, A., R. Bernard, P. Cau, C. Navarro, J. Amiel, I. Boccaccio, S. Lyonnet, CL. Stewart, A. Munnich, M. Le Merrer, and N. Levy. 2003. Lamin a truncation in Hutchinson-Gilford progeria. *Science.* 300:2055.
- (99) Dechat, T., T. Shimi, S.A.Adam, A.E. Rusinol, D.A.Andres, H.P. Spielmann, M.S. Sinensky, and R.D. Goldman. 2007. Alterations in mitosis and cell cycle progression caused by a mutant lamin A known to accelerate human aging. *Proc Natl Acad Sci USA.* 104:4955-60.
- 20 (100) Dixit, V., N. Hariparsad, F. Li, P. Desai, K.E. Thummel, and J.D. Unadkat. 2007. Cytochrome P450 enzymes and transporters induced by anti-human immunodeficiency virus protease inhibitors in human hepatocytes: implications for predicting clinical drug interactions. *Drug Metab Dispos.* 35:1853-9.
- 25 (101) Dressman, J., J. Kincer, S.V. Matveev, L. Guo, R.N. Greenberg, T. Guerin, D. Meade, X.A Li, W. Zhu, A. Uittenbogaard, M.E. Wilson, and E.J. Smart. 2003. HIV protease inhibitors promote atherosclerotic lesion formation independent of dyslipidemia by increasing CD36-dependent cholesteryl ester accumulation in macrophages. *J Clin Invest.* 111:389-97.
- 30 (102) Dunn, B.M., M.M. Goodenow, A. Gustchina, and A. Wlodawer. 2002. Retroviral proteases. *Genome Biol.* 3:REVIEWS3006.
- 35 (103) Effros, R.B. 2000. Telomeres and HIV disease. *Microbes Infect.* 2:69-76.
- (104) Eriksson, M., W.T. Brown, L.B. Gordon, M.W. Glynn, J. Singer, L. Scott, M.R. Erdos, CM. Robbins, T.Y. Moses, P. Berglund, A. Dutra, E. Pak, S. Durkin, A.B. Csoka, M. Boehnke, T.W. Glover, and F.S. Collins. 2003. Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature.* 423:293-8.
- 40 (105) Ferreira, C.E., A.M. Pinto-Neto, D.M. Conde, L Costa-Paiva, S.S. Morais, and J. Magalhaes. 2007. Menopause symptoms in women infected with HIV: prevalence and associated factors. *Gynecol Endocrinol.* 23:198-205.
- 45 (106)Fuster, J.J., S.M. Sanz-Gonzalez, U.M. Moll, and V.Andres. 2007. Classic and novel roles of p53: prospects for anticancer therapy. *Trends Mol Med.* 13:192-9.
- (107) Gharakhanian, S., F. Boccara, and J. Capeau. 2006. Statins in HIV-associated lipodystrophy and metabolic syndrome: is there a missing link? *Aids.* 20:1061-3.
- 50 (108) Ghibelli, L, F. Mengoni, M. Lichtner, S. Coppola, M. De Nicola, A. Bergamaschi, C. Mastroianni, and V. Vullo. 2003. Anti-apoptotic effect of HIV protease inhibitors via direct inhibition of calpain. *Biochem Pharmacol.* 66:1505-12.
- 55 (109) Gil, M.E., and T.L. Coetzer. 2004. Real-time quantitative PCR of telomere length. *Mol Biotechnol.* 27:169-72.
- (110) Gilson, E., and V. Geli. 2007. How telomeres are replicated. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8:825-38.
- 60 (111) Giorgio, M., E. Migliaccio, F. Orsini, D. Paolucci, M. Moroni, C. Contursi, G. Pelliccia, L. Luzi, S. Minucci, M. Marcaccio, P. Pinton, R. Rizzuto, P. Bernardi, F. Paolucci, and P.G. Pelicci. 2005. Electron transfer between cytochrome c and p66Shc generates reactive oxygen species that trigger mitochondrial apoptosis. *Cell.* 122:221-33.
- 65 (112) Giorgio, M., M. Trinei, E. Migliaccio, and P.G. Pelicci. 2007. Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8:722-8.

- (113) Glass, D.J. 2003. Signalling pathways that mediate skeletal muscle hypertrophy and atrophy. *Nat Cell Biol.* 5:87-90.
- 5 (114) Goldman, R.D., D.K. Shumaker, M.R. Erdos, M. Eriksson, A.E. Goldman, L.B. Gordon, Y. Gruenbaum, S. Khuon, M. Mendez, R. Varga, and F.S. Collins. 2004. Accumulation of mutant lamin A causes progressive changes in nuclear architecture in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101:8963-8.
- 10 (115) Granfors, M.T., J.S. Wang, L.I. Kajosaari, J. Laitila, P.J. Neuvonen, and J.T. Backman. 2006. Differential inhibition of cytochrome P450 3A4, 3A5 and 3A7 by five human immunodeficiency virus (HIV) protease inhibitors in vitro. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 98:79-85.
- 15 (116) Graziewicz, M.A., B.J. Day, and W.C. Copeland. 2002. The mitochondrial DNA polymerase as a target of oxidative damage. *Nucleic Acids Res.* 30:2817-24.
- (117) Gredilla, R., and G. Barja. 2005. Minireview: the role of oxidative stress in relation to caloric restriction and longevity. *Endocrinology.* 146:3713-7.
- 20 (118) Grillari, J., H. Katinger, and R. Voglauer. 2006. Aging and the ubiquitinome: traditional and non-traditional functions of ubiquitin in aging cells and tissues. *Exp Gerontol.* 41:1067-79.
- (119) Guarente, L, and F. Picard. 2005. Calorie restriction-the SIR2 connection. *Cell.* 120:473-82.
- 25 (120) Gupta, A.K., G.J. Cerniglia, R. Mick, W.G. McKenna, and R.J. Muschel. 2005. HIV protease inhibitors block Akt signaling and radiosensitize tumor cells both in vitro and in vivo. *Cancer Res.* 65:8256-65.
- (121) Hamel, F.G., J. Fawcett, B.T. Tsui, R.G. Bennett, and W.C. Duckworth. 2006. Effect of nelfinavir on insulin metabolism, proteasome activity and protein degradation in HepG2 cells. *Diabetes Obes Metab.* 8:661-8.
- 30 (122) Hardy, K., L. Mansfield, A. Mackay, S. Benvenuti, S. Ismail, P. Arora, M.J. O'Hare, and P.S. Jat. 2005. Transcriptional networks and cellular senescence in human mammary fibroblasts. *Mol Biol Cell.* 16:943-53.
- (123) Hayden, M.S., and S. Ghosh. 2004. Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev.* 18:2195-224.
- 35 (124) Heessen, S., and M. Fornerod. 2007. The inner nuclear envelope as a transcription factor resting place. *EMBO Rep.* 8:914-9.
- (125) Helton, E.S., and X. Chen. 2007. p53 modulation of the DNA damage response. *J Cell Biochem.* 100:883-96.
- 40 (126) Hennekam, R.C. 2006. Hutchinson-Gilford progeria syndrome: Review of the phenotype. *Am J Med Genet A.*
- 45 (127) Hertel, J., H. Struthers, C.B. Horj, and P.W. Hruz. 2004. A structural basis for the acute effects of HIV protease inhibitors on GLUT4 intrinsic activity. *J Biol Chem.* 279:55147-52.
- (128) Holzenberger, M., L. Kappeler, and C. De Magalhaes Filho. 2004. IGF-1 signaling and aging. *Exp Gerontol.* 39:1761-4.
- 50 (129) Hruz, P.W. 2006. Molecular Mechanisms for Altered Glucose Homeostasis in HIV Infection. *Am J Infect Dis.* 2:187-192.
- (130) Huang, S., R.A. Risques, G.M. Martin, P.S. Rabinovitch, and J. Oshima. 2008. Accelerated telomere shortening and replicative senescence in human fibroblasts overexpressing mutant and wild-type lamin A. *Exp Cell Res.* 314:82-91.
- 55 (131) Hudson, G., and P.F. Chinnery. 2006. Mitochondrial DNA polymerase-gamma and human disease. *Hum Mol Genet.* 15 Spec No 2:R244-52.
- 60 (132) Hui, D.Y. 2003. Effects of HIV protease inhibitor therapy on lipid metabolism. *Prog Lipid Res.* 42:81-92.
- (133) Irminger-Finger, I. 2007. Science of cancer and aging. *J Clin Oncol.* 25:1844.-51.
- 65 (134) Jacque, J.M., and M. Stevenson. 2006. The inner-nuclear-envelope protein emerlin regulates HIV-1 infectivity. *Nature.* 441:641-5.

- (135) Jiang, B., V.Y. Hebert, Y. Li, J.M. Mathis, J.S. Alexander, and T.R. Dugas. 2007. HIV antiretroviral drug combination induces endothelial mitochondrial dysfunction and reactive oxygen species production, but not apoptosis. *Toxicol Appl Pharmacol.* 224:60-71.
- 5 (136) Jiang, B., V.Y. Hebert, J.H. Zavec, and T.R. Dugas. 2006. Antiretrovirals induce direct endothelial dysfunction in vivo. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 42:391-5.
- (137) Jiang, J., Y. Zhang, A.R. Krainer, and R.M. Xu. 1999. Crystal structure of human p32, a doughnut-shaped acidic mitochondrial matrix protein. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96:3572-7.
- 10 (138) John, M., C.B. Moore, I.R. James, D. Nolan, R.P. Upton, E.J. McKinnon, and S.A. Mallal. 2001. Chronic hyperlactatemia in HIV-infected patients taking antiretroviral therapy. *Aids.* 15:717-23.
- (139) Jones, R., S. Sawleshwarkar, C. Michailidis, A. Jackson, S. Mandalia, J. Stebbing, M. Bower, M. Nelson, B.G. Gazzard, and G.J. Moyle. 2005. Impact of antiretroviral choice on hypercholesterolaemia events: the role of the nucleoside reverse transcriptase inhibitor backbone. *HIV Med.* 6:396-402.
- 15 (140) Kenyon, C. 2005. The plasticity of aging: insights from long-lived mutants. *Cell.* 120:449-60.
- (141) Kim, K.S., Y.B. Seu, S.H. Baek, M.J. Kim, K.J. Kim, J.H. Kim, and J.R. Kim. 2007. Induction of cellular senescence by insulin-like growth factor binding protein-5 through a p53-dependent mechanism. *Mol Biol Cell.* 18:4543-52.
- 20 (142) Kim, R.J., C.G. Wilson, M. Wabitsch, M.A. Lazar, and CM. Stepan. 2006. HIV protease inhibitor-specific alterations in human adipocyte differentiation and metabolism. *Obesity (Silver Spring).* 14:994-1002.
- 25 (143) Kohler, J.J., and W. Lewis. 2007. A brief overview of mechanisms of mitochondrial toxicity from NRTIs. *Environ Mol Mutagen.* 48:166-72.
- (144) Krahn, M., A. Lopez de Munain, N. Streichenberger, R. Bernard, C. Pecheux, H. Testard, J.L. Pena-Segura, E. Yoldi, A. Cabello, N.B. Romero, J.J. Poza, S. Bouillot-Eimer, X. Ferrer, M. Goicoechea, F. Garcia-Bragado, F. Leturcq, J.A. Urtizberea, and N. Levy. 2006. CAPN3 mutations in patients with idiopathic eosinophilic myositis. *Ann Neurol.* 59:905-11.
- 30 (145) Kravtsov, Y., E. Kudryavtseva, A.C. McKee, C. Geula, N.W. Kowall, and K. Khrapko. 2006. Mitochondrial DNA deletions are abundant and cause functional impairment in aged human substantia nigra neurons. *Nat Genet.* 38:518-20.
- 35 (146) Kudlow, B.A., B.K. Kennedy, and R.J. Monnat, Jr. 2007. Werner and Hutchinson-Gilford progeria syndromes: mechanistic basis of human progeroid diseases. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8:394-404.
- 40 (147) Kujoth, G.C., A. Hiona, T.D. Pugh, S. Someya, K. Panzer, S.E. Wohlgemuth, T. Hofer, A.Y. Seo, R. Sullivan, W.A. Jobling, J.D. Morrow, H. Van Remmen, J.M. Sedivy, T. Yamasoba, M. Tanokura, R. Weindruch, C. Leeuwenburgh, and T.A. Prolla. 2005. Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging. *Science.* 309:481-4.
- 45 (148) Kuro-o, M., Y. Matsumura, H. Aizawa, H. Kawaguchi, T. Suga, T. Utsugi, Y. Ohshima, M. Kurabayashi, T. Kaname, E. Kume, H. Iwasaki, A. Iida, T. Shiraki-Iida, S. Nishikawa, R. Nagai, and Y.I. Nabeshima. 1997. Mutation of the mouse *klotho* gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature.* 390:45-51.
- 50 (149) Kurosu, H., Y. Ogawa, M. Miyoshi, M. Yamamoto, A. Nandi, K.P. Rosenblatt, M.G. Baum, S. Schiavi, M.C. Hu, O.W. Moe, and M. Kuro-o. 2006. Regulation of fibroblast growth factor-23 signaling by *klotho*. *J Biol Chem.* 281:6120-3.
- 55 (150) Kurosu, H., M. Yamamoto, J.D. Clark, J.V. Pastor, A. Nandi, P. Gurnani, O.P. McGuinness, H. Chikuda, M. Yamaguchi, H. Kawaguchi, I. Shimomura, Y. Takayama, J. Herz, C.R. Kahn, K.P. Rosenblatt, and M. Kuro-o. 2005. Suppression of aging in mice by the hormone *Klotho*. *Science.* 309:1829-33.
- (151) Lactic Acidosis International Study Group. 2007. Risk factors for lactic acidosis and severe hyperlactataemia in HIV-1-infected adults exposed to antiretroviral therapy. *Aids.* 21:2455-64.
- 60 (152) Lee, S., S.Y. Jeong, W.C. Lim, S. Kim, Y.Y. Park, X. Sun, R.J. Youle, and H. Cho. 2007. Mitochondrial fission and fusion mediators, hFis1 and OPA1, modulate cellular senescence. *J Biol Chem.* 282:22977-83.
- 65 (153) Levy, J.A., M.G. Ory, and S. Crystal. 2003. HIV/AIDS interventions for midlife and older adults: current status and challenges. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 33 Suppl 2:S59-67.

- (154) Lewis, W. 2003. Defective mitochondrial DNA replication and NRTIs: pathophysiological implications in AIDS cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 284:H1-9.
- 5 (155) Liang, S.L., H. Liu, and A. Zhou. 2006. Lovastatin-induced apoptosis in macrophages through the Rac1/Cdc42/JNK pathway. *J Immunol.* 177:651-6.
- (156) Lichtner, M., F. Mengoni, CM. Mastroianni, I. Sauzullo, R. Rossi, M. De Nicola, V. Vullo, and L. Ghibelli. 2006. HIV protease inhibitor therapy reverses neutrophil apoptosis in AIDS patients by direct calpain inhibition. *Apoptosis.* 11:781-7.
- 10 (157) Liu, B., J. Wang, K.M. Chan, W.M. Tjia, W. Deng, X. Guan, J.D. Huang, K.M. Li, P.Y. Chau, D.J. Chen, D. Pei, A.M. Pendas, J. Cadinanos, C. Lopez-Otin, H.F. Tse, C. Hutchison, J. Chen, Y. Cao, K.S. Cheah, K. Tryggvason, and Z. Zhou. 2005. Genomic instability in laminopathy-based premature aging. *Nat Med.* 11:780-5.
- 15 (158) Liu, H., M.M. Fergusson, R.M. Castilho, J. Liu, L. Cao, J. Chen, D. Malide, Rovira, Il, D. Schimel, C.J. Kuo, J.S. Gutkind, P.M. Hwang, and T. Finkel. 2007a. Augmented Wnt signaling in a mammalian model of accelerated aging. *Science.* 317:803-6.
- (159) Liu, Y., A. Rusinol, M.Sinensky, Y.Wang, and Y.Zou. 2006. DNA damage responses in progeroid syndromes arise from defective maturation of prelamin A. *J Cell Sci.* 119:4644-9.
- 20 (160) Liu, Y., Y. Wang, A.E. Rusinol, M.S. Sinensky, J. Liu, S.M. Shell, and Y. Zou. 2007b. Involvement of xeroderma pigmentosum group A (XPA) in progeria arising from defective maturation of prelamin A. *Faseb J.*
- 25 (161) Lizzi, A.R., A.M. D'Alessandro, A. Bozzi, B. Cinque, A. Oratore, and G. D'Andrea. 2007. Pattern expression of glycan residues in AZT-treated K562 cells analyzed by lectin cytochemistry. *Mol Cell Biochem.* 300:29-37.
- (162) Mallon, P.W., J. Miller, J.C. Kovacic, J. Kent-Hughes, R. Noms, K. Samaras, M.P. Feneley, D.A. Cooper, and A. Carr. 2006. Effect of pravastatin on body composition and markers of cardiovascular disease in HIV-infected men-a randomized, placebo-controlled study. *Aids.* 20:1003-10.
- 30 (163) Manfredi, J.J. 2003. p53 and apoptosis: it's not just in the nucleus anymore. *Mol Cell.* 11:552-4.
- (164) Martin, F.M., and J.S. Friedman. 2004. Ticking fast or ticking slow, through She must you go? *Sci Aging Knowledge Environ.* 2004:pe32.
- 35 (165) Martin, G.M., and L.A. Loeb. 2004. Ageing: mice and mitochondria. *Nature.* 429:357-9.
- (166) Masoro, E.J. 2004. Role of sirtuin proteins in life extension by caloric restriction. *Mech Ageing Dev.* 125:591-4.
- 40 (167) Matarrese, P., L. Gambardella, A. Cassone, S. Vella, R. Cuda, and W. Malorni. 2003. Mitochondrial membrane hyperpolarization hijacks activated T lymphocytes toward the apoptotic-prone phenotype: homeostatic mechanisms of HIV protease inhibitors. *J Immunol.* 170:6006-15.
- 45 (168) Matarrese, P., A. Tinari, L. Gambardella, E. Mormone, P. Narilli, M. Pierdominici, R. Cuda, and W. Malorni. 2005. HIV protease inhibitors prevent mitochondrial hyperpolarization and redox imbalance and decrease endogenous uncoupler protein-2 expression in gp 120-activated human T lymphocytes. *Antivir Ther.* 10 Suppl 2:M29-45.
- 50 (169) Matoba, S., J.G. Kang, W.D. Patino, A. Wragg, M. Boehm, O. Gavrilova, P.J. Hurley, F. Bunz, and P.M. Hwang. 2006. p53 regulates mitochondrial respiration. *Science.* 312:1650-3.
- (170) Maurer, T.A. 2005. Dermatologic manifestations of HIV infection. *Top HIV Med.* 13:149-54.
- 55 (171) Mehta, I.S., M. Figgitt, C.S. Clements, I.R. Kill, and J.M. Bridger. 2007. Alterations to nuclear architecture and genome behavior in senescent cells. *Ann N Y Acad Sci.* 1100:250-63.
- (172) Meissner, C. 2007. Mutations of mitochondrial DNA - cause or consequence of the ageing process? *Z Gerontol Geriatr.* 40:325-333.
- 60 (173) Migliaccio, E., M. Giorgio, S. Mele, G. Pelicci, P. Reboldi, P.P. Pandolfi, L. Lanfrancone, and P.G. Pelicci. 1999. The p66shc adaptor protein controls oxidative stress response and life span in mammals. *Nature.* 402:309-13.
- 65

- (174) Migliaccio, E., M. Giorgio, and P.G. Pelicci. 2006. Apoptosis and aging: role of p66Shc redox protein. *Antioxid Redox Signal*. 8:600-8.
- 5 (175) Mihara, M., S. Erster, A. Zaika, O. Petrenko, T. Chittenden, P. Pancoska, and U.M. Moll. 2003. p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol Cell*. 11:577-90.
- (176) Miserez, A.R., P.Y. Muller, and V. Spaniol. 2002. Indinavir inhibits sterol-regulatory element-binding protein-1c-dependent lipoprotein lipase and fatty acid synthase gene activations. *Aids*. 16:1587-94.
- 10 (177) Moll, U.M., S. Wolff, D. Speidel, and W. Deppert. 2005. Transcription-independent pro-apoptotic functions of p53. *Curr Opin Cell Biol*. 17:631-6.
- (178) Mondy, K., W.G. Powderly, S.A. Claxton, K.H. Yarasheski, M. Royal, J.S. Stoneman, M.E. Hoffmann, and P. Tebas. 2005. Alendronate, vitamin D, and calcium for the treatment of osteopenia/osteoporosis associated with HIV infection. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 38:426-31.
- 15 (179) Mondy, K., and P. Tebas. 2007. Cardiovascular risks of antiretroviral therapies. *Annu Rev Med*. 58:141-55.
- (180) Moyle, G. 2007. Metabolic issues associated with protease inhibitors. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 45 Suppl 1:S19-26.
- 20 (181) Mujawar, Z., H. Rose, M.P. Morrow, T. Pushkarsky, L. Dubrovsky, N. Mukhamedova, Y. Fu, A. Dart, J.M. Orenstein, Y.V. Bobryshev, M. Bukrinsky, and D. Sviridov. 2006. Human immunodeficiency virus impairs reverse cholesterol transport from macrophages. *PLoS Biol*. 4:e365.
- 25 (182) Mukhopadhyay, A., B. Wei, S.J. Zullo, L.V. Wood, and H. Weiner. 2002. In vitro evidence of inhibition of mitochondrial protease processing by HIV-1 protease inhibitors in yeast: a possible contribution to lipodystrophy syndrome. *Mitochondrion*. 1:511-8.
- (183) Muntoni, F., M. Brockington, S. Torelli, and S.C. Brown. 2004. Defective glycosylation in congenital muscular dystrophies. *Curr Opin Neurol*. 17:205-9.
- 30 (184) Mylonis, I., V. Drosou, S. Brancorsini, E. Nikolakaki, P. Sassone-Corsi, and T. Giannakouros. 2004. Temporal association of protamine 1 with the inner nuclear membrane protein lamin B receptor during spermiogenesis. *J Biol Chem*. 279:11626-31.
- 35 (185) Naujokat, C, D. Fuchs, and C. Berges. 2007. Adaptive modification and flexibility of the proteasome system in response to proteasome inhibition. *Biochim Biophys Acta*. 1773:1389-97.
- (186) Navarro, C.L., J. Cadinanos, A. De Sandre-Giovannoli, R. Bernard, S. Courier, I. Boccaccio, A. Boyer, W.J. Kleijer, A. Wagner, F. Giuliano, F.A. Beemer, J.M. Freije, P. Cau, R.C. Hennekam, C. Lopez-Otin, C. Badens, and N. Levy. 2005. Loss of ZMPSTE24 (FACE-1) causes autosomal recessive restrictive dermopathy and accumulation of Lamin A precursors. *Hum Mol Genet*. 14:1503-13.
- 40 (187) Navarro, C.L., P. Cau, and N. Levy. 2006. Molecular bases of progeroid syndromes. *Hum Mol Genet*. 15 Suppl 2:R151-61.
- 45 (188) Navarro, C.L., A. De Sandre-Giovannoli, R. Bernard, I. Boccaccio, A. Boyer, D. Genevieve, S. Hadj-Rabia, C. Gaudy-Marqueste, H.S. Smitt, P. Vabres, L. Faivre, A. Verloes, T. Van Essen, E. Flori, R. Hennekam, F.A. Beemer, N. Laurent, M. Le Merrer, P. Cau, and N. Levy. 2004. Lamin A and ZMPSTE24 (FACE-1) defects cause nuclear disorganization and identify restrictive dermopathy as a lethal neonatal laminopathy. *Hum Mol Genet*. 13:2493-503.
- 50 (189) Negrodo, E., J. Molto, J. Puig, D. Cinquegrana, A. Bonjoch, N. Perez-Alvarez, R. Lopez-Blazquez, A. Blanco, B. Clotet, and C. Rey-Joly. 2006. Ezetimibe, a promising lipid-lowering agent for the treatment of dyslipidaemia in HIV-infected patients with poor response to statins. *Aids*. 20:2159-64.
- 55 (190) Nemoto, S., C.A. Combs, S. French, B.H. Ahn, M.M. Fergusson, R.S. Balaban, and T. Finkel. 2006. The mammalian longevity-associated gene product p66shc regulates mitochondrial metabolism. *J Biol Chem*. 281:10555-60.
- 60 (191) Neye, Y., M. Dufer, G. Drews, and P. Krippeit-Drews. 2006. HIV protease inhibitors: suppression of insulin secretion by inhibition of voltage-dependent K⁺ currents and anion currents. *J Pharmacol Exp Ther*. 316:106-12.
- (192) Nguyen, AT., A. Gagnon, J.B. Angel, and A. Sorisky. 2000. Ritonavir increases the level of active ADD-1/SREBP-1 protein during adipogenesis. *Aids*. 14:2467-73.
- 65

- (193) Nisoli, E., and M.O. Carruba. 2006. Nitric oxide and mitochondrial biogenesis. *J Cell Sci.* 119:2855-62.
- (194) Nisoli, E., C. Tonello, A. Cardile, V. Cozzi, R. Bracale, L. Tedesco, S. Falcone, A. Valerio, O. Cantoni, E. Clementi, S. Moncada, and M.O. Carruba. 2005. Calorie restriction promotes mitochondrial biogenesis by inducing the expression of eNOS. *Science.* 310:314-7.
- (195) Njajou, O.T., R.M. Cawthon, CM. Damcott, S.H. Wu, S. Ott, M.J. Garant, E.H. Blackburn, B.D. Mitchell, A.R. Shuldiner, and W.C. Hsueh. 2007. Telomere length is paternally inherited and is associated with parental lifespan. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:12135-9.
- (196) North, B.J., and E. Verdin. 2004. Sirtuins: Sir2-related NAD-dependent protein deacetylases. *Genome Biol.* 5:224.
- (197) Novelli, G., A. Muchir, F. Sangiulio, A. Helbling-Leclerc, M.R. D'Apice, C. Massart, F. Capon, P. Sbraccia, M. Federici, R. Lauro, C. Tudisco, R. Pallotta, G. Scarano, B. Dallapiccola, L. Merlini, and G. Bonne. 2002. Mandibuloacral dysplasia is caused by a mutation in LMNA-encoding lamin A/C. *Am J Hum Genet.* 71:426-31.
- (198) Oberdoerffer, P., and D.A. Sinclair. 2007. The role of nuclear architecture in genomic instability and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8:692-702.
- (199) Olivero, O.A. 2007. Mechanisms of genotoxicity of nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Environ Mol Mutagen.* 48:215-23.
- (200) Olivero, O.A., G.M. Shearer, C.A. Chougnet, A.A. Kovacs, A.L. Landay, R. Baker, A.M. Stek, M.M. Khoury, L.A. Praia, H.A. Kessler, B.E. Sha, R.E. Tarone, and M.C. Poirier. 1999. Incorporation of zidovudine into leukocyte DNA from HIV-1-positive adults and pregnant women, and cord blood from infants exposed in utero. *Aids.* 13:919-25.
- (201) Olivero, O.A., A.M. Tejera, J.J. Fernandez, B.J. Taylor, S. Das, R.L. Divi, and M.C. Poirier. 2005. Zidovudine induces S-phase arrest and cell cycle gene expression changes in human cells. *Mutagenesis.* 20:139-46.
- (202) Orsini, F., E. Migliaccio, M. Moroni, C. Contursi, V.A. Raker, D. Piccini, I. Martin-Padura, G. Pelliccia, M. Trinei, M. Bono, C. Puri, C. Tacchetti, M. Ferrini, R. Mannucci, I. Nicoletti, L. Lanfrancone, M. Giorgio, and P.G. Pelicci. 2004. The life span determinant p66Shc localizes to mitochondria where it associates with mitochondrial heat shock protein 70 and regulates trans-membrane potential. *J Biol Chem.* 279:25689-95.
- (203) Pacenti, M., L. Barzon, F. Favaretto, K. Fincati, S. Romano, G. Milan, R. Vettor, and G. Palu. 2006. Microarray analysis during adipogenesis identifies new genes altered by antiretroviral drugs. *Aids.* 20:1691-705.
- (204) Palmieri, F. 2004. The mitochondrial transporter family (SLC25): physiological and pathological implications. *Pflugers Arch.* 447:689-709.
- (205) Ran, Y., A. Garg, and A.K. Agarwal. 2007. Mislocalization of prelamin A Tyr646Phe mutant to the nuclear pore complex in human embryonic kidney 293 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 355:78-84.
- (206) Pandita, T.K., C.R. Hunt, G.G. Sharma, and Q. Yang. 2007. Regulation of telomere movement by telomere chromatin structure. *Cell Mol Life Sci.* 64:131-8.
- (207) Papazoglu, C, and A.A. Mills. 2007. p53: at the crossroad between cancer and ageing. *J Pathol.* 211:124-33.
- (208) Parker, R.A., O.P. Flint, R. Mulvey, C. Elosua, F. Wang, W. Fenderson, S. Wang, W.P. Yang, and M.A. Noor. 2005. Endoplasmic reticulum stress links dyslipidemia to inhibition of proteasome activity and glucose transport by HIV protease inhibitors. *Mol Pharmacol.* 67:1909-19.
- (209) Pennings, M., I. Meurs, D. Ye, R. Out, M. Hoekstra, T.J. Van Berkel, and M. Van Eck. 2006. Regulation of cholesterol homeostasis in macrophages and consequences for atherosclerotic lesion development. *FEBS Lett* 580:5588-96.
- (210) Percival, J.M., and S.C. Froehner. 2007. Golgi complex organization in skeletal muscle: a role for Golgi-mediated glycosylation in muscular dystrophies? *Traffic.* 8:184-94.
- (211) Petersen-Mahrt, S.K., C. Estmer, C. Ohrmalm, D.A. Matthews, W.C. Russell, and G. Akusjarvi. 1999. The splicing factor-associated protein, p32, regulates RNA splicing by inhibiting ASF/SF2 RNA binding and phosphorylation. *EmboJ.* 18:1014-24.

- (212) Piccinini, M., M.T. Rinaudo, A. Anselmino, B. Buccinna, C. Ramondetti, A. Dematteis, E. Ricotti, L. Palmisano, M. Mostert, and P.A. Tovo. 2005. The HIV protease inhibitors nelfinavir and saquinavir, but not a variety of HIV reverse transcriptase inhibitors, adversely affect human proteasome function. *Antivir Ther.* 10:215-23.
- 5 (213) Pilon, A.A., J.J. Lum, J. Sanchez-Dardon, B.N. Phenix, R. Douglas, and A.D. Badley. 2002. Induction of apoptosis by a nonnucleoside human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase inhibitor. *Antimicrob Agents Chemother.* 46:2687-91.
- 10 (214) Porcu, M., and A. Chiarugi. 2005. The emerging therapeutic potential of sirtuin-interacting drugs: from cell death to lifespan extension. *Trends Pharmacol Sci.* 26:94-103.
- (215) Quarrie, J.K., and K.T. Riabowol. 2004. Murine models of life span extension. *Sci Aging Knowledge Environ.* 2004:re5.
- 15 (216) Razzaque, M.S., and B. Lanske. 2006. Hypervitaminosis D and premature aging: lessons learned from Fgf23 and Klotho mutant mice. *Trends Mol Med.* 12:298-305.
- (217) Restrepo, C.S., L. Diethelm, J.A. Lemos, E. Velasquez, T.A. Ovella, S. Martinez, J. Carrillo, and D.F. Lemos. 2006. Cardiovascular complications of human immunodeficiency virus infection. *Radiographics.* 26:213-31.
- 20 (218) Restrepo, C.S., D.F. Lemos, H. Gordillo, R. Otero, T. Varghese, W. Tiernann, F.F. Rivas, R. Moncada, and C.R. Gimenez. 2004. Imaging findings in musculoskeletal complications of AIDS. *Radiographics.* 24:1029-49.
- 25 (219) Richard, I., O. Broux, V. Allamand, F. Fougousse, N. Chiannikulchai, N. Bourg, L. Brenguier, C. Devaud, P. Pasturaud, C. Roudaut, and et al. 1995. Mutations in the proteolytic enzyme calpain 3 cause limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Cell.* 81:27-40.
- 30 (220) Richter, C, J.W. Park, and B.N. Ames. 1988. Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc Natl Acad Sci USA.* 85:6465-7.
- (221) Riddle, T.M., D.G. Kuhel, L.A. Woollett, C.J. Fichtenbaum, and D.Y. Hui. 2001. HIV protease inhibitor induces fatty acid and sterol biosynthesis in liver and adipose tissues due to the accumulation of activated sterol regulatory element-binding proteins in the nucleus. *J Biol Chem.* 276:37514-9.
- 35 (222) Roche, R., I. Poizot-Martin, CM. Yazidi, E. Compe, J.A. Gastaut, J. Torresani, and R. Planells. 2002. Effects of antiretroviral drug combinations on the differentiation of adipocytes. *Aids.* 16:13-20.
- 40 (223) Roehl White, S., and B. Luring. 2007. AAA+ ATPases: Achieving Diversity of Function with Conserved Machinery. *Traffic.*
- (224) Rota, M., N. LeCapitaine, T. Hosoda, A. Boni, A. De Angelis, M.E. Padin-Iruegas, G. Esposito, S. Vitale, K. Urbanek, C. Casarsa, M. Giorgio, T.F. Luscher, P.G. Pelicci, P. Anversa, A. Leri, and J. Kajstura. 2006. Diabetes promotes cardiac stem cell aging and heart failure, which are prevented by deletion of the p66shc gene. *Circ Res.* 99:42-52.
- 45 (225) Rudich, A., R. Ben-Romano, S. Etzion, and N. Bashan. 2005. Cellular mechanisms of insulin resistance, lipodystrophy and atherosclerosis induced by HIV protease inhibitors. *Acta Physiol Scand.* 183:75-88.
- 50 (226) Russell, S.J., and C.R. Kahn. 2007. Endocrine regulation of ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8:681-91.
- (227) Sablina, A.A., A.V. Budanov, G.V. Ilyinskaya, L.S. Agapova, J.E. Kravchenko, and P.M. Chumakov. 2005. The antioxidant function of the p53 tumor suppressor. *Nat Med.* 11:1306-13.
- 55 (228) Saint-Marc, T., M. Partisani, I. Poizot-Martin, F. Bruno, O. Rouviere, J.M. Lang, J.A. Gastaut, and J.L. Touraine. 1999. A syndrome of peripheral fat wasting (lipodystrophy) in patients receiving long-term nucleoside analogue therapy. *Aids.* 13:1659-67.
- 60 (229) Saint-Marc, T., M. Partisani, I. Poizot-Martin, O. Rouviers, F. Bruno, R. Avellaneda, J.M. Lang, J.A. Gastaut, and J.L. Touraine. 2000. Fat distribution evaluated by computed tomography and metabolic abnormalities in patients undergoing antiretroviral therapy: preliminary results of the LIPOCO study. *Aids.* 14:37-49.
- 65 (230) Scaffidi, P., and T. Misteli. 2006. Lamin A-dependent nuclear defects in human aging. *Science.* 312:1059-63.

- (231) Schmid, G., M.P. Kramer, M. Maurer, S. Wandl, and J. Wesierska-Gadek. 2007. Cellular and organismal ageing: Role of the p53 tumor suppressor protein in the induction of transient and terminal senescence. *J Cell Biochem.* 101:1355-69.
- 5 (232) Schriener, S.E., N.J. Linford, G.M. Martin, P. Treuting, C.E. Ogburn, M. Emond, P.E. Coskun, W. Ladiges, N. Wolf, H. Van Remmen, D.C. Wallace, and P.S. Rabinovitch. 2005. Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria. *Science.* 308:1909-11.
- 10 (233) Schutt, M., J. Zhou, M. Meier, and H.H. Klein. 2004. Long-term effects of HIV-1 protease inhibitors on insulin secretion and insulin signaling in INS-1 beta cells. *J Endocrinol.* 183:445-54.
- (234) Seidah, N.G., A.M. Khatib, and A. Prat. 2006. The proprotein convertases and their implication in sterol and/or lipid metabolism. *Biol Chem.* 387:871-7.
- 15 (235) Sengupta, S., and C.C. Harris. 2005. p53: traffic cop at the crossroads of DNA repair and recombination. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6:44-55.
- 20 (236) Shalkai, S., N. Amariglio, G. Rechavi, and A.J. Simon. 2007. Gene silencing at the nuclear periphery. *Febs J.* 274:1383-92.
- (237) Sharma, A., S. Awasthi, C.K. Harrod, E.F. Matlock, S. Khan, L. Xu, S. Chan, H. Yang, C.K. Thammavaram, R.A. Rasor, D.K. Burns, D.J. Skiest, C. Van Lint, A.M. Girard, M. McGee, R.J. Monnat, Jr., and R. Harrod. 2007. The Werner syndrome helicase is a cofactor for HIV-1 long terminal repeat transactivation and retroviral replication. *J Biol Chem.* 282:12048-57.
- 25 (238) Sharpless, N.E., and R.A. DePinho. 2002. p53: good cop/bad cop. *Cell.* 110:9-12.
- (239) Short, K.R., M. Bigelow, J. Kahl, R. Singh, J. Coenen-Schimke, S. Raghavakaimal, and K.S. Nair. 2005. Decline in skeletal muscle mitochondrial function with aging in humans. *Proc Natl Acad Sci USA.* 102:5618-23.
- 30 (240) Simos, G., and S.D. Georgatos. 1994. The lamin B receptor-associated protein p34 shares sequence homology and antigenic determinants with the splicing factor 2-associated protein p32. *FEBS Lett.* 346:225-8.
- 35 (241) Sirkis, R., J.E. Gerst, and D. Fass. 2006. Ddi1, a eukaryotic protein with the retroviral protease fold. *J Mol Biol.* 364:376-87.
- (242) Sommers, J.A., S. Sharma, K.M. Doherty, P. Karmakar, Q. Yang, M.K. Kenny, C.C. Harris, and R.M. Brosh, Jr. 2005. p53 modulates RPA-dependent and RPA-independent WRN helicase activity. *Cancer Res.* 65:1223-33.
- 40 (243) Stewart, S.A., and R.A. Weinberg. 2006. Telomeres: cancer to human aging. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 22:531-57.
- (244) Storz, P. 2006. Reactive oxygen species-mediated mitochondria-to-nucleus signaling: a key to aging and radical-caused diseases. *Sci STKE.* 2006:re3.
- 45 (245) Suzuki, Y., and R. Craigie. 2007. The road to chromatin - nuclear entry of retroviruses. *Nat Rev Microbiol.* 5:187-96.
- 50 (246) Tehranzadeh, J., R.R. Ter-Oganesyan, and L.S. Steinbach. 2004a. Musculoskeletal disorders associated with HIV infection and AIDS. Part I: infectious musculoskeletal conditions. *Skeletal Radiol.* 33:249-59.
- (247) Tehranzadeh, J., R.R. Ter-Oganesyan, and L.S. Steinbach. 2004b. Musculoskeletal disorders associated with HIV infection and AIDS. Part II: non-infectious musculoskeletal conditions. *Skeletal Radiol.* 33:311-20.
- 55 (248) Thomas, C.M., and E.J. Smart. 2007. How HIV protease inhibitors promote atherosclerotic lesion formation. *Curr Opin Lipidol.* 18:561-5.
- 60 (249) Thomas, J., and S.M. Doherty. 2003. HIV infection-a risk factor for osteoporosis. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 33:281-91.
- (250) Torres, H.A., B.J. Bamett, and R.C. Arduino. 2007. Alopecia associated with ritonavir-boosted atazanavir therapy. *Aids.* 21:1391-2.
- 65

- (251) Trifunovic, A., A. Hansson, A. Wredenberg, AT. Rovio, E. Dufour, I. Khvorostov, J.N. Spelbrink, R. Wibom, H.T.Jacobs, and N.G. Larsson. 2005. Somatic mtDNA mutations cause aging phenotypes without affecting reactive oxygen species production. *Proc Natl Acad Sci USA*. 102:17993-8.
- 5 (252) Trifunovic, A., A. Wredenberg, M. Falkenberg, J.N. Spelbrink, AT. Rovio, C.E. Bruder, Y.M. Bohlooly, S. Gidlof, A. Oldfors, R. Wibom, J. Tornell, H.T. Jacobs, and N.G. Larsson. 2004. Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature*. 429:417-23.
- 10 (253) Trinei, M., M. Giorgio, A. Cicalese, S. Barozzi, A. Ventura, E. Migliaccio, E. Milia, I.M. Padura, V.A. Raker, M. Maccarana, V. Petronilli, S. Minucci, P. Bernardi, L. Lanfrancone, and P.G. Pelicci. 2002. A p53-p66Shc signalling pathway controls intracellular redox status, levels of oxidation-damaged DNA and oxidative stress-induced apoptosis. *Oncogene*. 21:3872-8.
- 15 (254) Truscott, K.N., K. Brandner, and N. Pfanner. 2003. Mechanisms of protein import into mitochondria. *Curr Biol*. 13:R326-37.
- (255) Tyner, S.D., S. Venkatachalam, J. Choi, S. Jones, N. Ghebranious, H. Igelmann, X. Lu, G. Soron, B. Cooper, C. Brayton, S. Hee Park, T. Thompson, G. Karsenty, A. Bradley, and L.A. Donehower. 2002. p53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes. *Nature*. 415:45-53.
- 20 (256) Unger, R.H. 2006. Klotho-induced insulin resistance: a blessing in disguise? *Nat Med*. 12:56-7.
- (257) van Wijk, J.P., E.J. de Koning, M.C. Cabezas, J. Joven, J. op't Roodt, T.J. Rabelink, and A.M. Hoepelman. 2006. Functional and structural markers of atherosclerosis in human immunodeficiency virus-infected patients. *J Am Coll Cardiol*. 47:1117-23.
- 25 (258) Varela, I., J. Cadinanos, A.M. Pendas, A. Gutierrez-Fernandez, A.R. Folgueras, L.M. Sanchez, Z. Zhou, F.J. Rodriguez, C.L Stewart, J.A. Vega, K. Tryggvason, J.M. Freije, and C. Lopez-Otin. 2005. Accelerated ageing in mice deficient in Zmpste24 protease is linked to p53 signalling activation. *Nature*. 437:564-8.
- 30 (259) Vidal, F., J.C. Domingo, J. Guallar, M. Saumoy, B. Cordobilla, R. Sanchez de la Rosa, M. Giralt, M.L. Alvarez, M. Lopez-Dupla, F. Torres, F. Villarroya, T. Cihlar, and P. Domingo. 2006. In vitro cytotoxicity and mitochondrial toxicity of tenofovir alone and in combination with other antiretrovirals in human renal proximal tubule cells. *Antimicrob Agents Chemother*. 50:3824-32.
- 35 (260) Vijg, J., and Y. Suh. 2006. Ageing: chromatin unbound. *Nature*. 440:874-5.
- (261) Vlcek, S., T. Dechat, and R. Foisner. 2001. Nuclear envelope and nuclear matrix: interactions and dynamics. *Cell Mol Life Sci*. 58:1758-65.
- 40 (262) Vlcek, S., and R. Foisner. 2006. A-type lamin networks in light of laminopathic diseases. *Biochim Biophys Acta*.
- (263) Vlcek, S., and R. Foisner. 2007a. Lamins and lamin-associated proteins in aging and disease. *Curr Opin Cell Biol*. 19:298-304.
- 45 (264) Vlcek, S., and R. Foisner. 2007b. A-type lamin networks in light of laminopathic diseases. *Biochim Biophys Acta*. 1773:661-74.
- 50 (265) Wallace, D.C. 2005. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev Genet*. 39:359-407.
- (266) Wallis, C.V., A.N. Sheerin, M.H. Green, C.J. Jones, D. Kipling, and R.G. Faragher. 2004. Fibroblast clones from patients with Hutchinson-Gilford progeria can senesce despite the presence of telomerase. *Exp Gerontol*. 39:461-7.
- 55 (267) Wang, X., H. Mu, H. Chai, D. Liao, Q. Yao, and C. Chen. 2007. Human immunodeficiency virus protease inhibitor ritonavir inhibits cholesterol efflux from human macrophage-derived foam cells. *Am J Pathol*. 171:304-14.
- 60 (268) Wang, X., and D.J. Rader. 2007. Molecular regulation of macrophage reverse cholesterol transport. *Curr Opin Cardiol*. 22:368-72.
- (269) Williams, K., Y.P. Rao, R. Natarajan, W.M. Pandak, and P.B. Hylemon. 2004. Indinavir alters sterol and fatty acid homeostatic mechanisms in primary rat hepatocytes by increasing levels of activated sterol regulatory element-binding proteins and decreasing cholesterol 7alpha-hydroxylase mRNA levels. *Biochem Pharmacol*. 67:255-67.
- 65

- (270) Wiwanitkit, V. 2004. Prevalence of dermatological disorders in Thai HIV-infected patients correlated with different CD4 lymphocyte count statuses: a note on 120 cases. *Int J Dermatol.* 43:265-8.
- 5 (271) Worman, H.J., and G. Bonne. 2007. "Laminopathies": a wide spectrum of human diseases. *Exp Cell Res.* 313:2121-33.
- (272) Wright, L.P., and M.R. Philips. 2006. Thematic review series: lipid posttranslational modifications. CAAX modification and membrane targeting of Ras. *J Lipid Res.* 47:883-91.
- 10 (273) Wynford-Thomas, D. 1996. Telomeres, p53 and cellular senescence. *Oncol Res.* 8:387-98.
- (274) Yamagishi, S., T. Matsui, T. Sato, and M. Takeuchi. 2006. Protective role of pravastatin in the pathogenesis of the metabolic syndrome. *Med Hypotheses.* 66:609-11.
- 15 (275) Yamaguchi, T., Y. Takayama, M. Saito, F. Ishikawa, and M. Saneyoshi. 2001. Telomerase-inhibitory effects of the triphosphate derivatives of some biologically active nucleosides. *Nucleic Acids Res Suppl.* 211-2.
- (276) Yamanaka, H., H. Gatanaga, P. Kosalaraksa, S. Matsuoka-Aizawa, T. Takahashi, S. Kimura, and S. Oka. 2007. Novel mutation of human DNA polymerase gamma associated with mitochondrial toxicity induced by anti-HIV treatment. *J Infect Dis.* 195:1419-25.
- 20 (277) Yeh, R.F., V.E. Gaver, K.B. Patterson, N.L. Rezk, F. Baxter-Meheux, M.J. Blake, J.J. Eron, Jr., C.E. Klein, J.C. Rublein, and A.D. Kashuba. 2006. Lopinavir/ritonavir induces the hepatic activity of cytochrome P450 enzymes CYP2C9, CYP2C19, and CYP1A2 but inhibits the hepatic and intestinal activity of CYP3A as measured by a phe-notyping drug cocktail in healthy volunteers. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 42:52-60.
- 25 (278) Yousefi, S., R. Perozzo, I. Schmid, A. Ziemiecki, T. Schaffner, L. Scapozza, T. Brunner, and H.U. Simon. 2006. Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. *Nat Cell Biol.* 8:1124-32.
- 30 (279) Zafon, C. 2007. Jekyll and Hyde, the p53 protein, pleiotropics antagonisms and the thrifty aged hypothesis of senescence. *Med Hypotheses.* 68:1371-7.
- (280) Zhang, D., T.J. Chando, D.W. Everett, C.J. Patten, S.S. Dehal, and W.G. Humphreys. 2005. In vitro inhibition of UDP glucuronosyltransferases by atazanavir and other HiV protease inhibitors and the relationship of this property to in vivo bilirubin glucuronidation. *Drug Metab Dispos.* 33:1729-39.
- 35 (281) Zhong, D.S., X.H. Lu, B.S. Conklin, P.H. Lin, A.B. Lumsden, Q. Yao, and C. Chen. 2002. HIV protease inhibitor ritonavir induces cytotoxicity of human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vase Biol.* 22:1560-6.
- 40 (282) Zhou, H., E.C. Gurley, S. Jarujaron, H. Ding, Y. Fang, Z. Xu, W.M. Pandak, Jr., and P.B. Hylemon. 2006. HIV protease inhibitors activate the unfolded protein response and disrupt lipid metabolism in primary hepatocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 291 :G1071-80.
- 45 (283) Zhou, H., W.M. Pandak, Jr., V. Lyall, R. Natarajan, and P.B. Hylemon. 2005. HIV protease inhibitors activate the unfolded protein response in macrophages: implication for atherosclerosis and cardiovascular disease. *Mol Pharmacol.* 68:690-700.
- 50 (284) Blobel et Potter, V.R. Nuclei from rat liver: isolation method that combines purity with high yield, *Science* 154, 1662-1665, 1966
- (285) Sullivan, T. Escalante-Alcalde, D. Bhatt, H. Anver, M. Bhat, N. Nagashima, K. Stewart, C. L. Burke, B. Loss of A-typelamin Expression compromises nuclear envelope integrity leading to muscular dystrophy. *J. Cell Biol.* 147: 913-920, 1999.
- 55

REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende:

- 5 - al menos un inhibidor de la hidroximetilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasa o una de sus sales fisiológicamente aceptables, siendo dicho inhibidor una molécula de la familia de las estatinas o una de sus sales fisiológicamente aceptables
 - al menos un inhibidor de la farnesil-pirofosfato sintasa o de una de sus sales fisiológicamente aceptables, siendo dicho inhibidor una molécula de la familia de los aminobifosfonatos (NBP) o una de sus sales fisiológicamente aceptables, y
 10 - al menos un agente anti-VIH, siendo dicho agente anti-VIH un inhibidor de proteasa o un inhibidor de la transcriptasa inversa.

15 2. Composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el inhibidor de la HMG-CoA reductasa es una estatina hidrosoluble.

3. Composición de acuerdo con la reivindicación 1 en la que el inhibidor de la HMG-CoA reductasa es una estatina liposoluble.

20 4. Composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el inhibidor de la HMG-CoA reductasa se elige entre el grupo que comprende atorvastatina, simvastatina, pravastatina, rivastatina, mevastatina (o compactina), fluindostatina, velostatina, fluvastatina, dalvastatina, cerivastatina, pentostatina, rosuvastatina, lovastatina, pitavastatina y sus sales fisiológicamente aceptables.

25 5. Composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el aminobifosfonato se puede elegir entre:

- 30 - ácido alendrónico o su forma iónica, alendronato;
 - ácido clodrónico o su forma iónica, clodronato;
 - ácido etidrónico o su forma iónica, etidronato;
 - ácido ibandrónico, o su forma iónica, ibandronato;
 - ácido medrónico, o su forma iónica, medronato;
 - ácido neridrónico, o su forma iónica, neridronato;
 - ácido olpadrónico, o su forma iónica, olpadronato;
 35 - ácido pamidrónico, o su forma iónica, pamidronato;
 - ácido risedrónico, o su forma iónica, risedronato;
 - ácido tiludrónico, o su forma iónica, tiludronato;
 - ácido zoledrónico (o zolendrónico), o su forma iónica, zoledronato (o zolendronato);
 - ácido 4-N,N-dimetilaminometano difosfónico, o su forma iónica, dimetilaminometanodifosfonato;
 40 - difosfonato de α -amino-(4-hidroxi-bencilideno).

6. Composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el inhibidor de la farnesil-pirofosfato sintasa es ácido zoledrónico, o su forma iónica, zoledronato.

45 7. Composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el agente anti-VIH es un inhibidor de proteasa elegido entre el grupo que comprende fosamprenavir, lopinavir, ritonavir, amprenavir, atazanavir e indinavir.

50 8. Composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el agente anti-VIH es un inhibidor de la transcriptasa inversa elegido entre el grupo que comprende zidovudina, lamivudina, didanosina y epzicom.

55 9. Composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para su aplicación como medicamento en el tratamiento de los efectos secundarios de envejecimiento precoz generado(s) en un paciente por un tratamiento anti-VIH.

10. Composición para su aplicación de acuerdo con la reivindicación 9, en la que la composición es una composición para administración por vía oral o por inyección.

60 11. Composición para su aplicación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 10 en la que el tratamiento es el de los efectos secundarios de envejecimiento precoz generado(s) en un paciente por un tratamiento anti-VIH usando un inhibidor de proteasa o un inhibidor de la transcriptasa inversa.

65 12. Composición para su aplicación como medicamento en el tratamiento del VIH que comprende, en cualquier orden, las etapas siguientes:

- 5
- i. administración de una mezcla que comprende al menos un inhibidor de la hidroximetilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasa, siendo dicho inhibidor una molécula de la familia de las estatinas o una de sus sales fisiológicamente aceptables, y al menos un inhibidor de la farnesil-pirofosfato sintasa, siendo dicho inhibidor una molécula de la familia de los aminobifosfonatos (NBP) o una de sus sales fisiológicamente aceptables
 - ii. administración de un agente anti-VIH, siendo dicho agente anti-VIH, un inhibidor de proteasa o un inhibidor de la transcriptasa inversa.

en la que, las administraciones son simultáneas, sucesivas o alternativas.

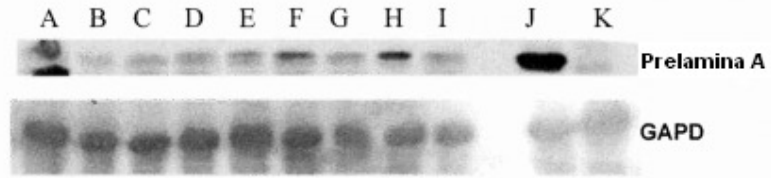


Figura 1

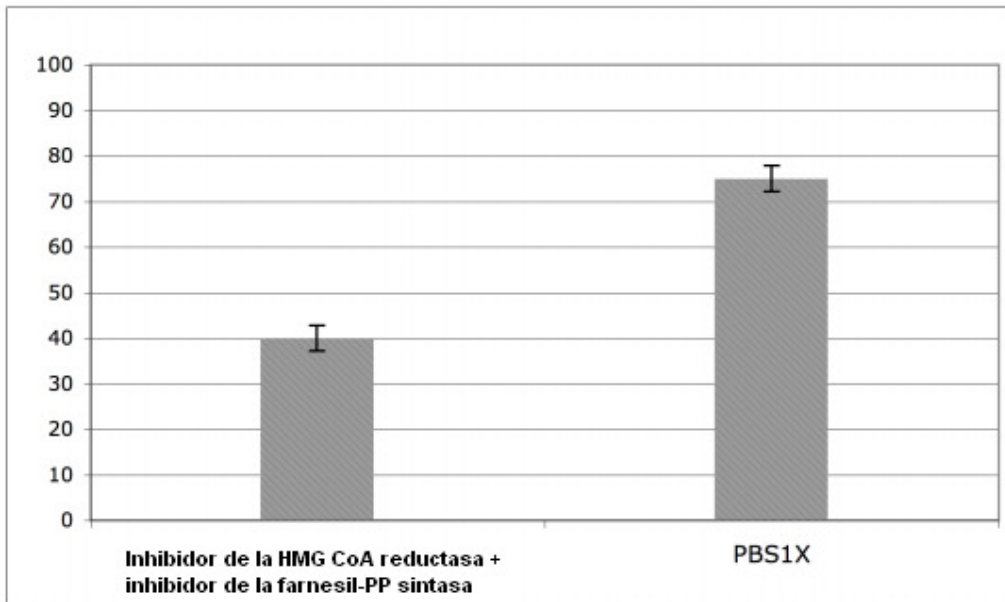


Figura 2

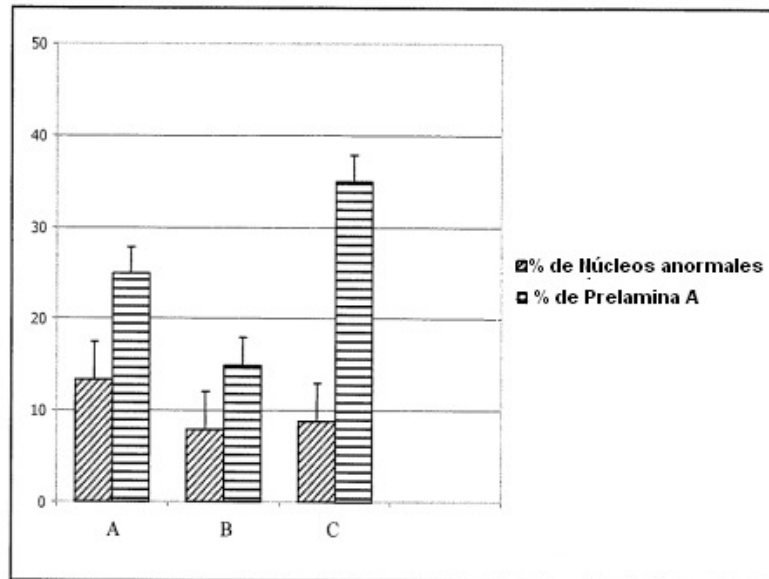


Figura 3

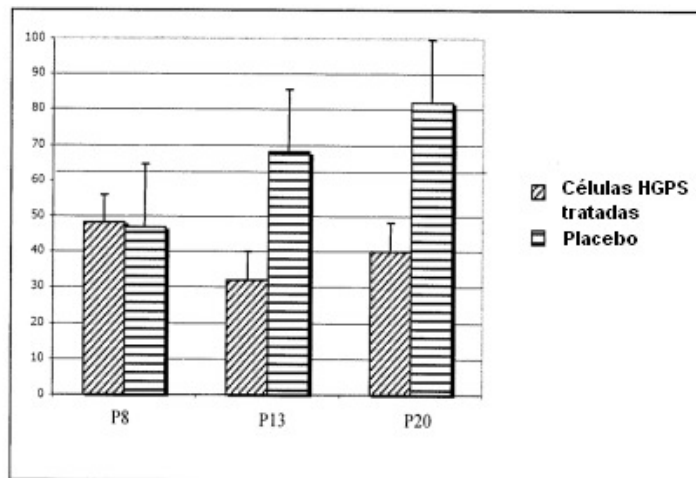


Figura 4

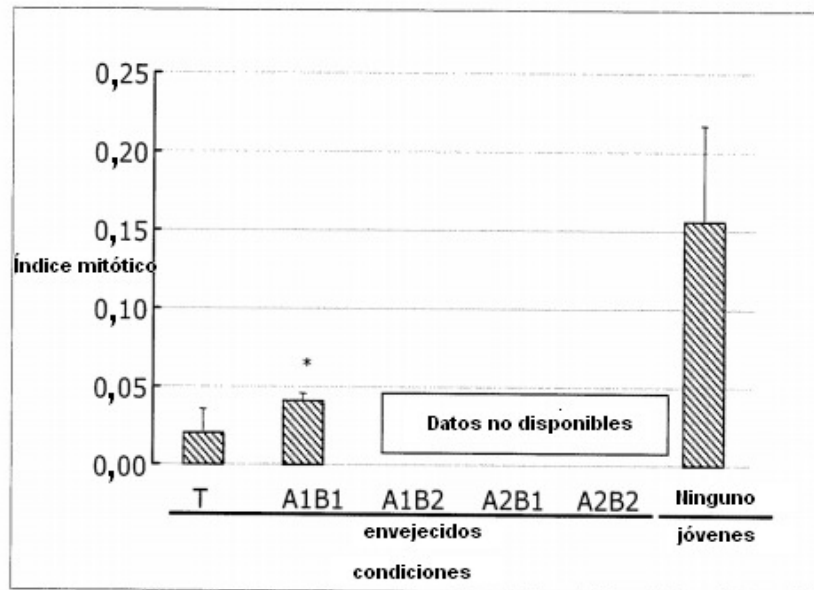


Figura 5

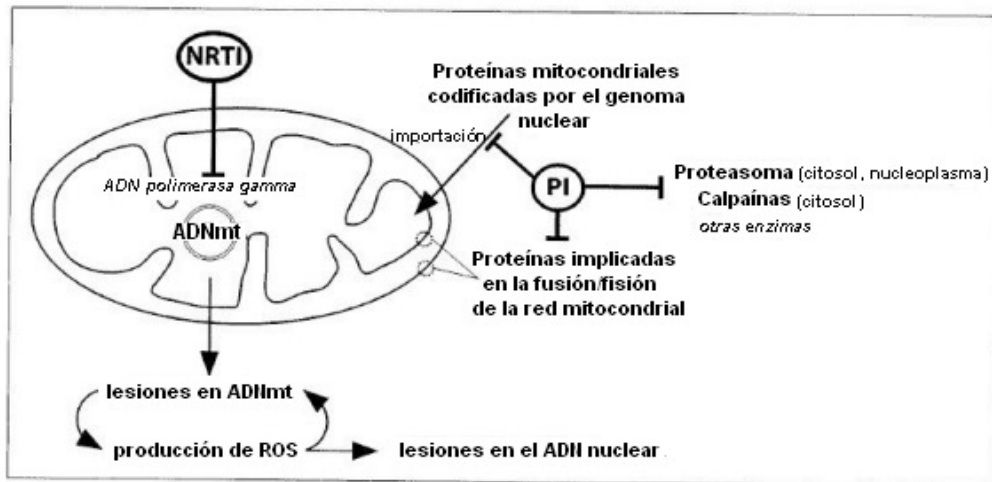


Figura 6

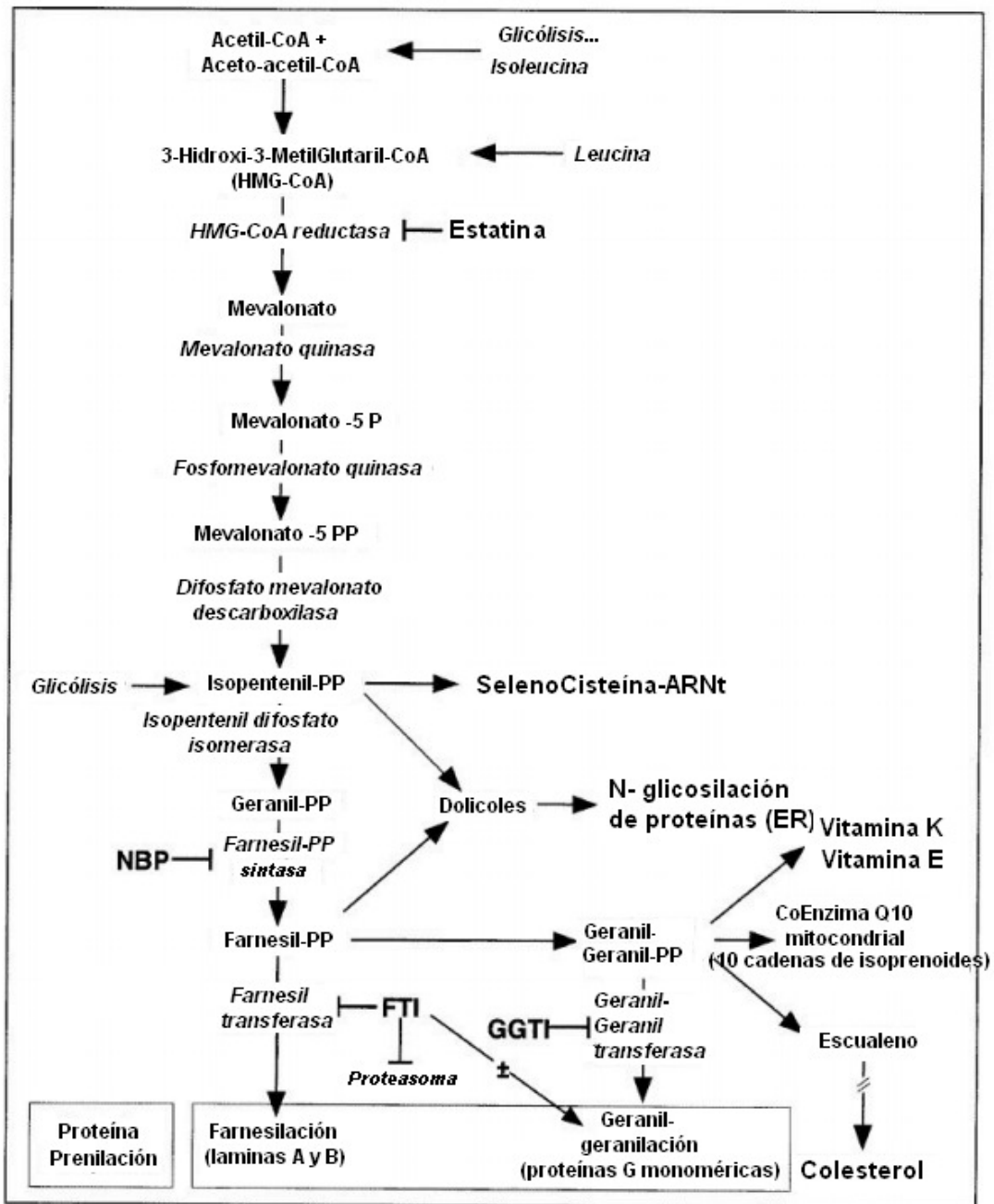


Figura 7

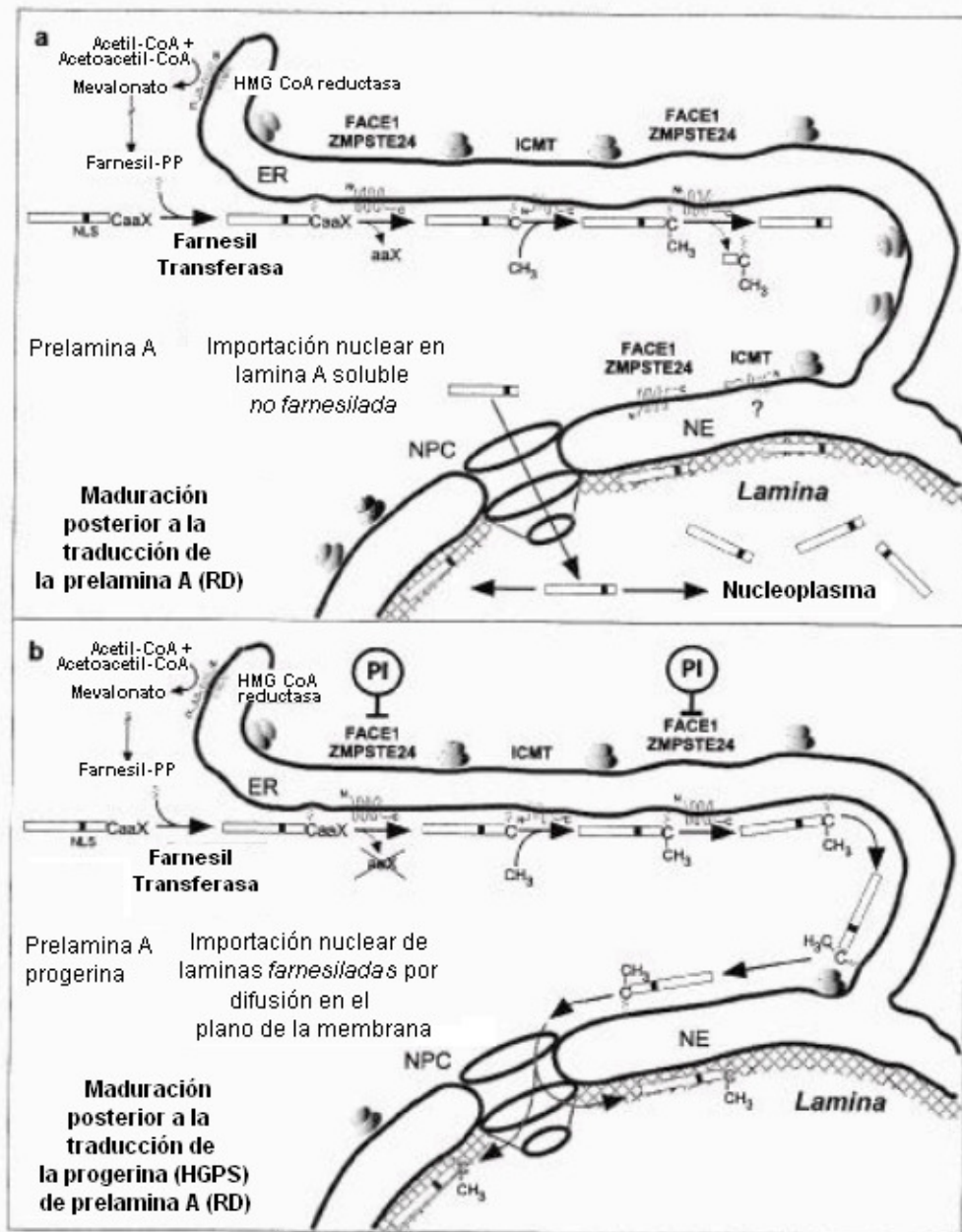


FIGURA 8

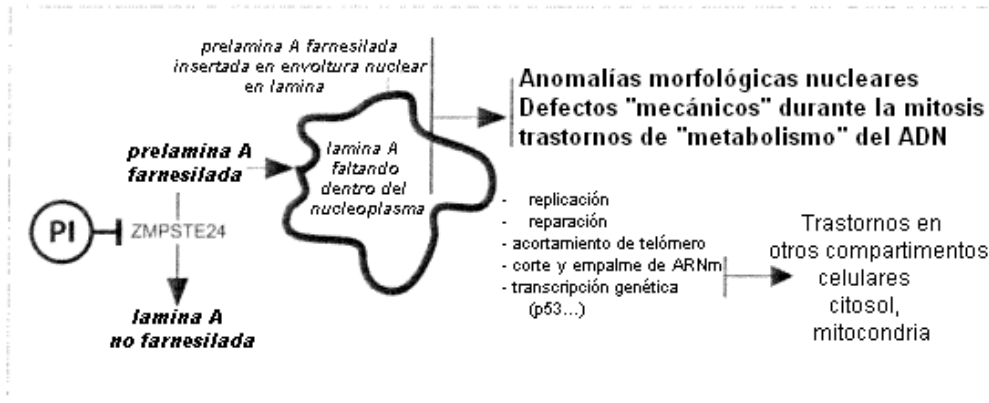


FIGURA 9

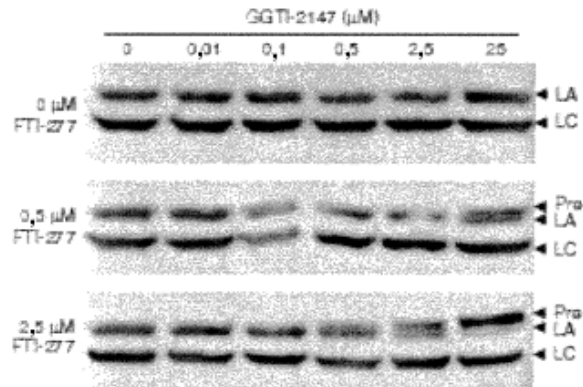


FIGURA 10

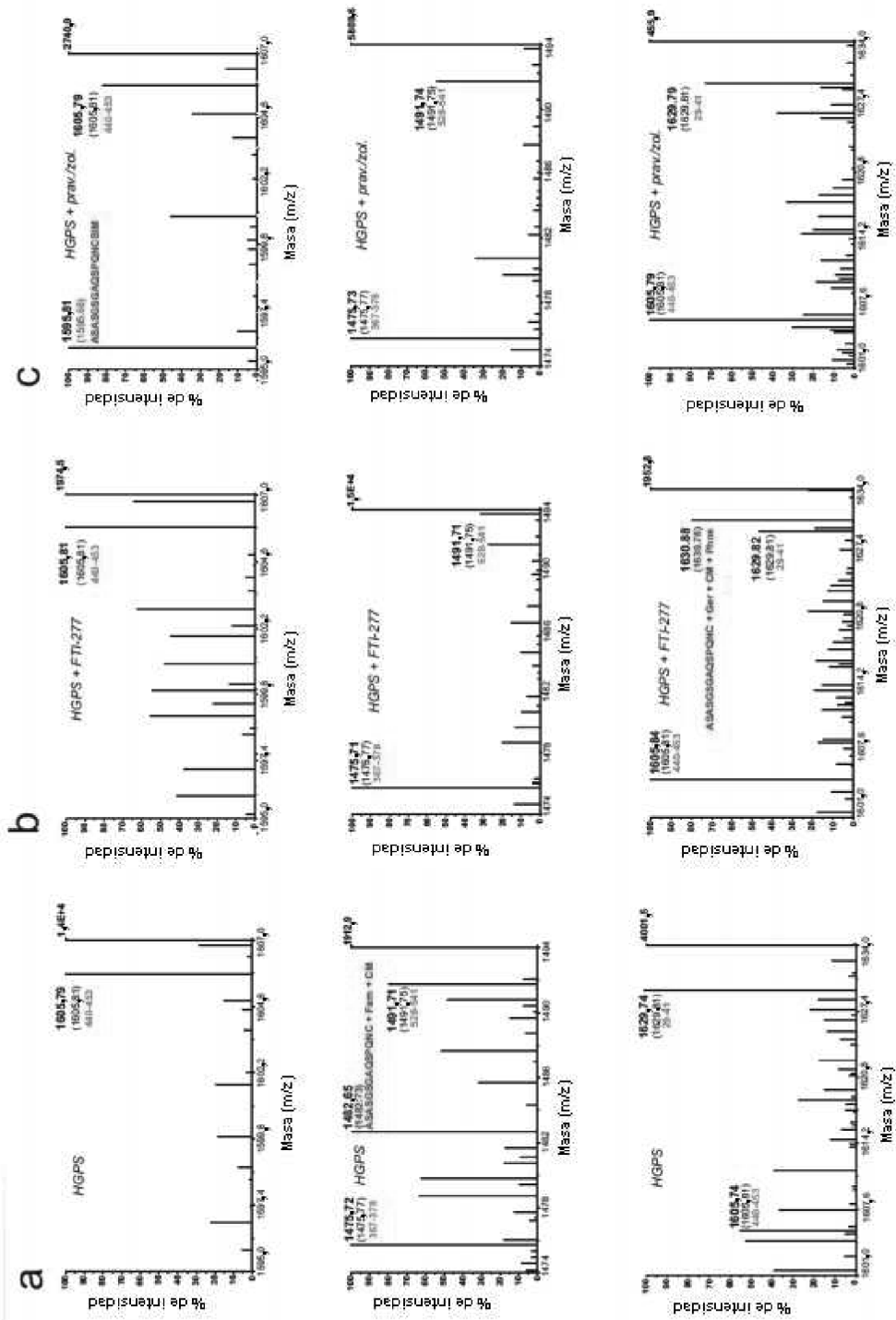


FIGURA 11

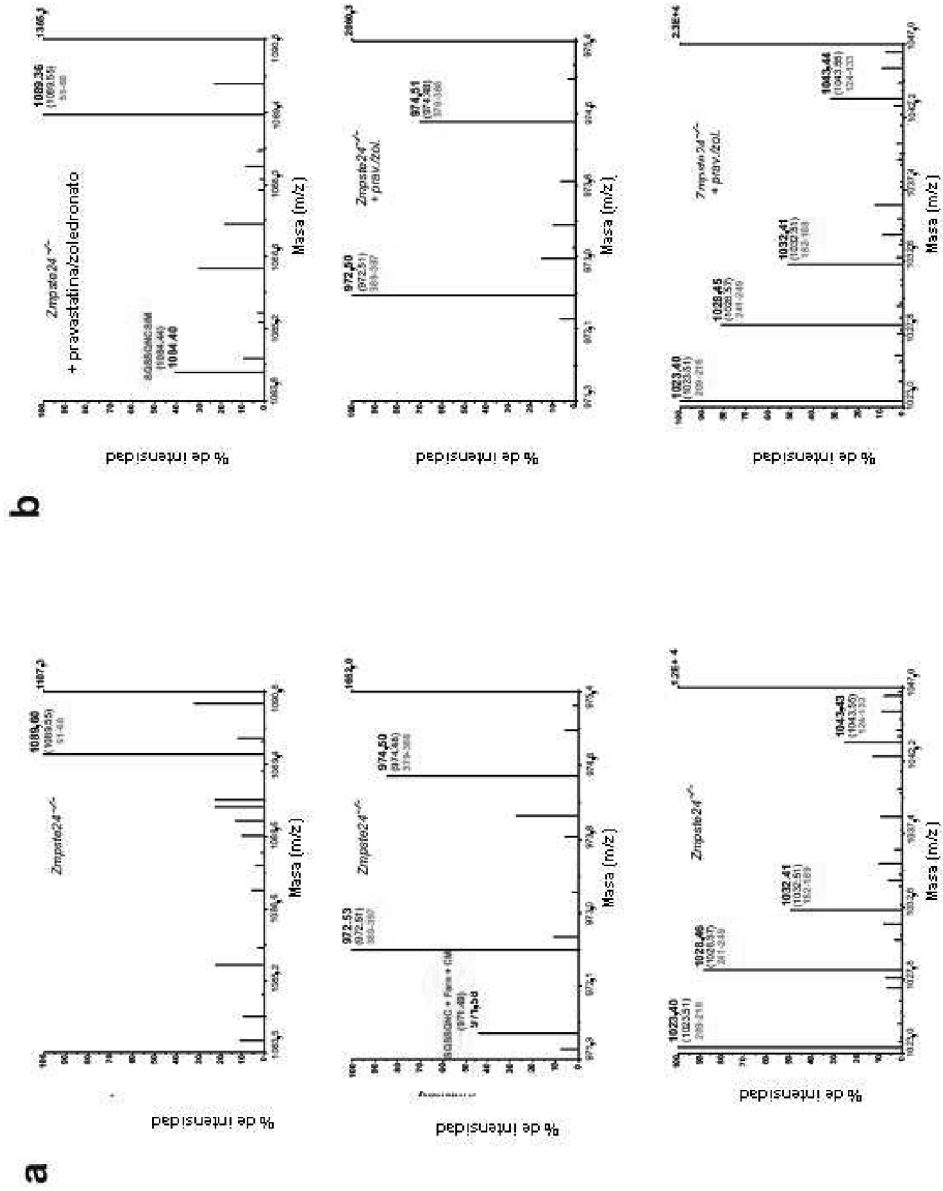


FIGURA 12

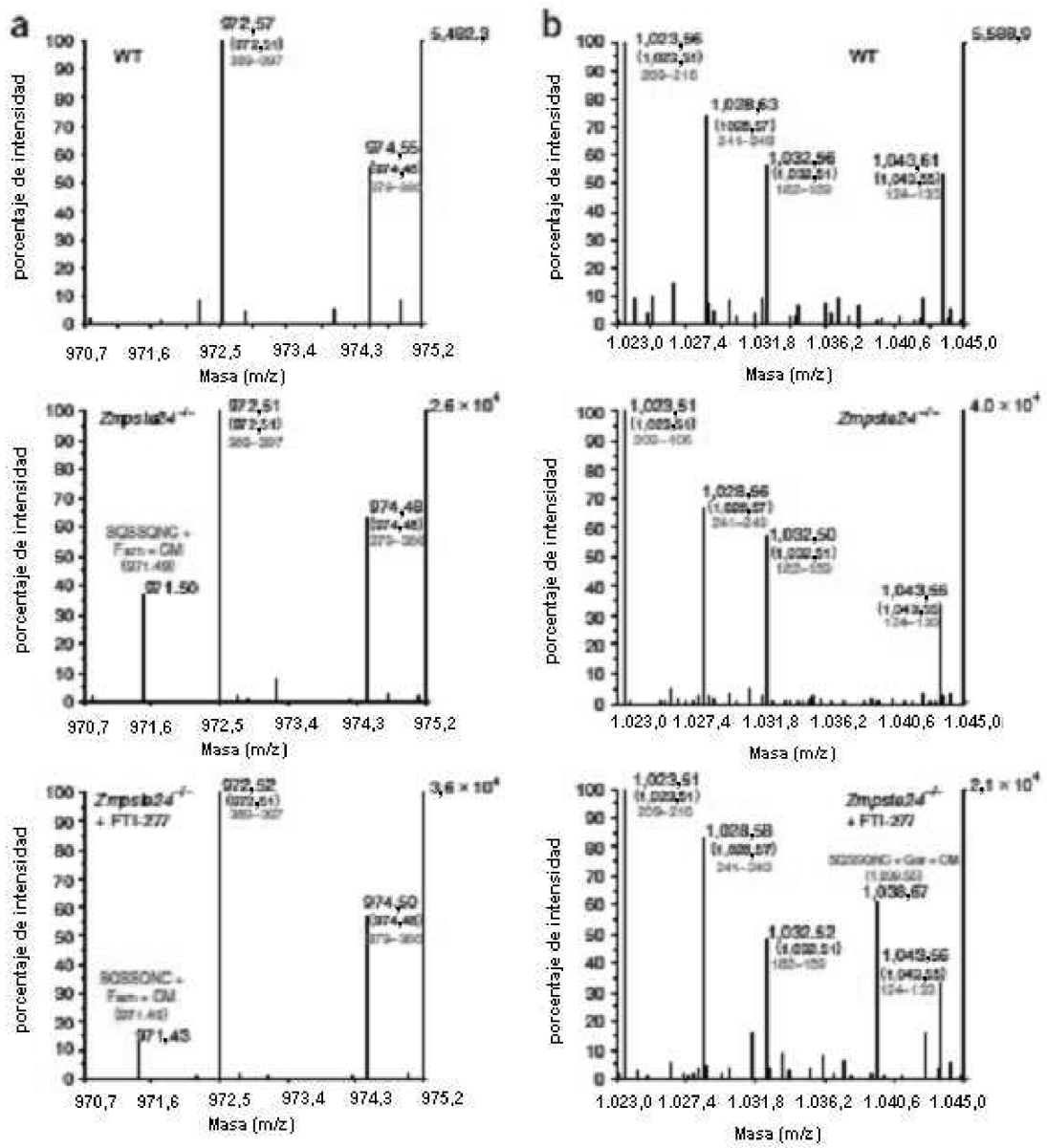


FIGURA 13

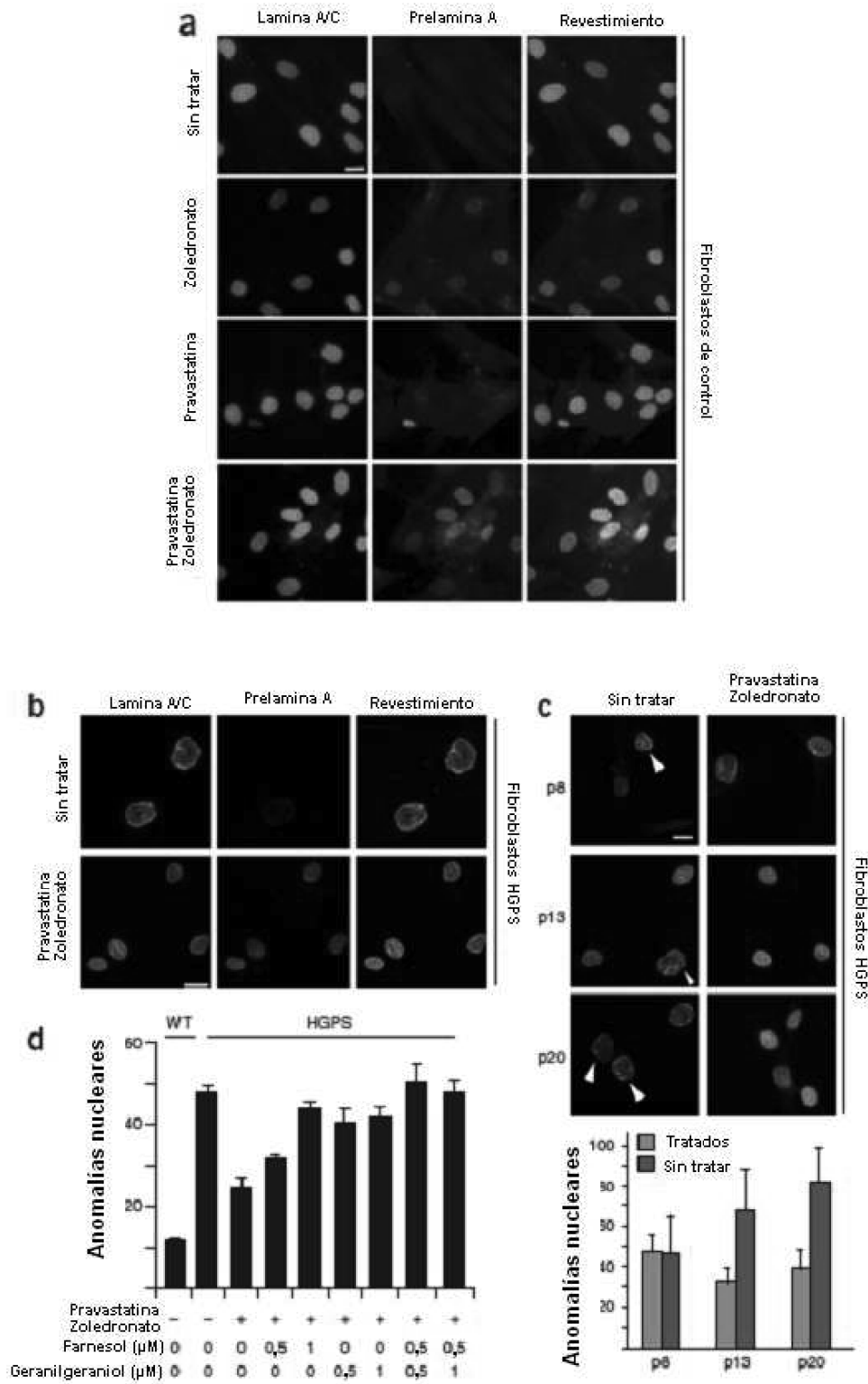


FIGURA 14

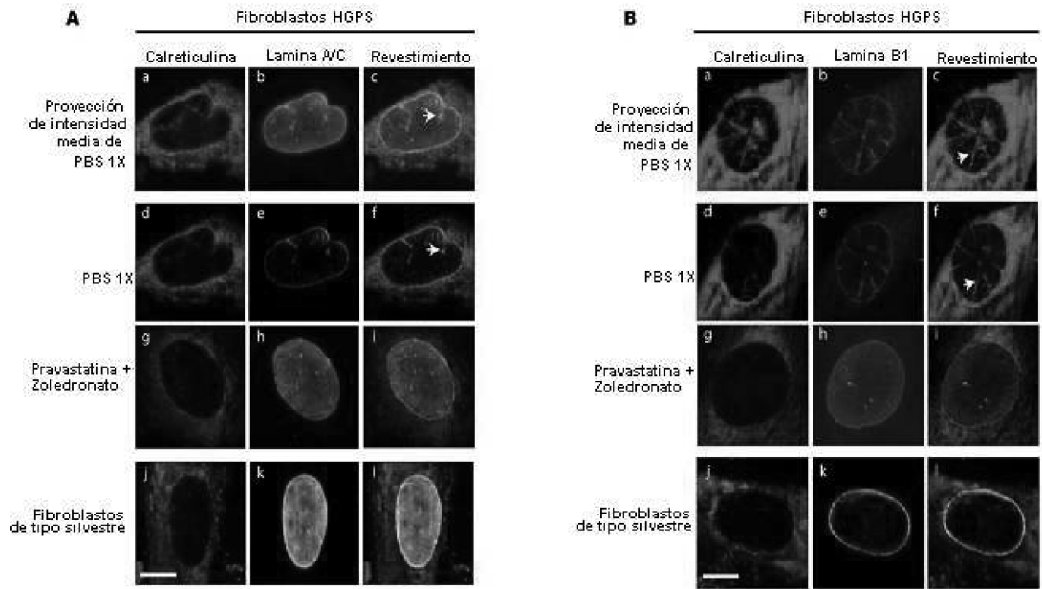
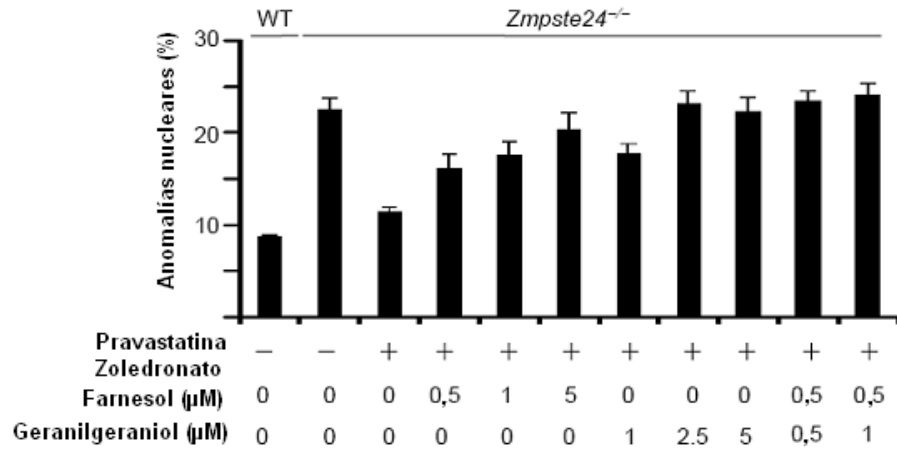
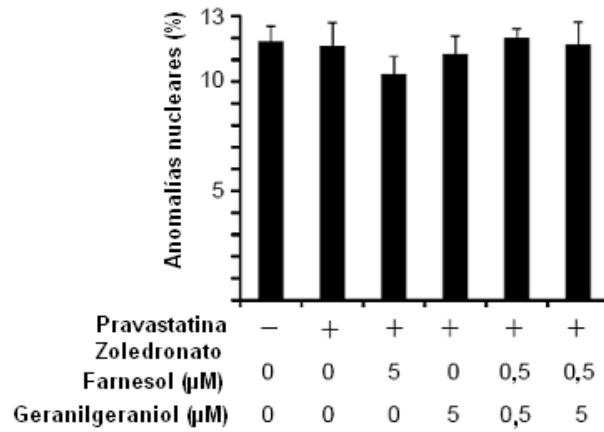


Figura 15

a



b



Figuras 16

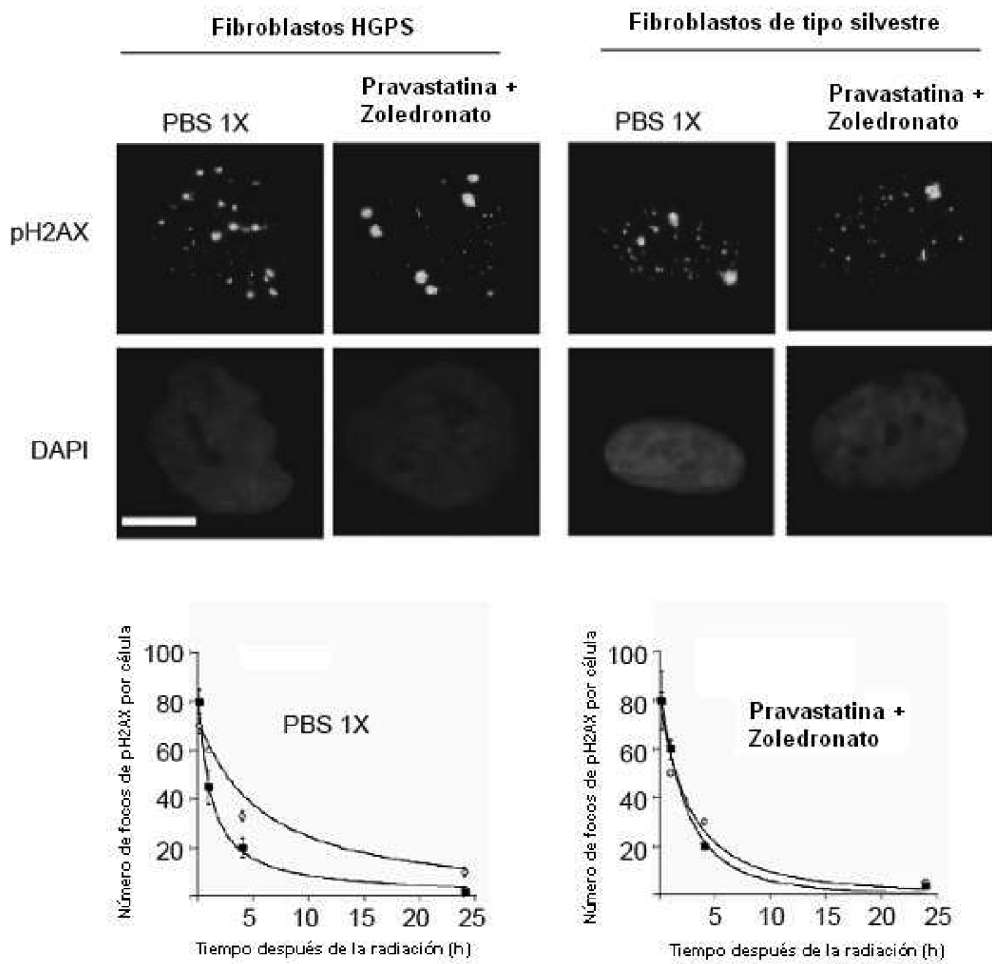


Figura 17

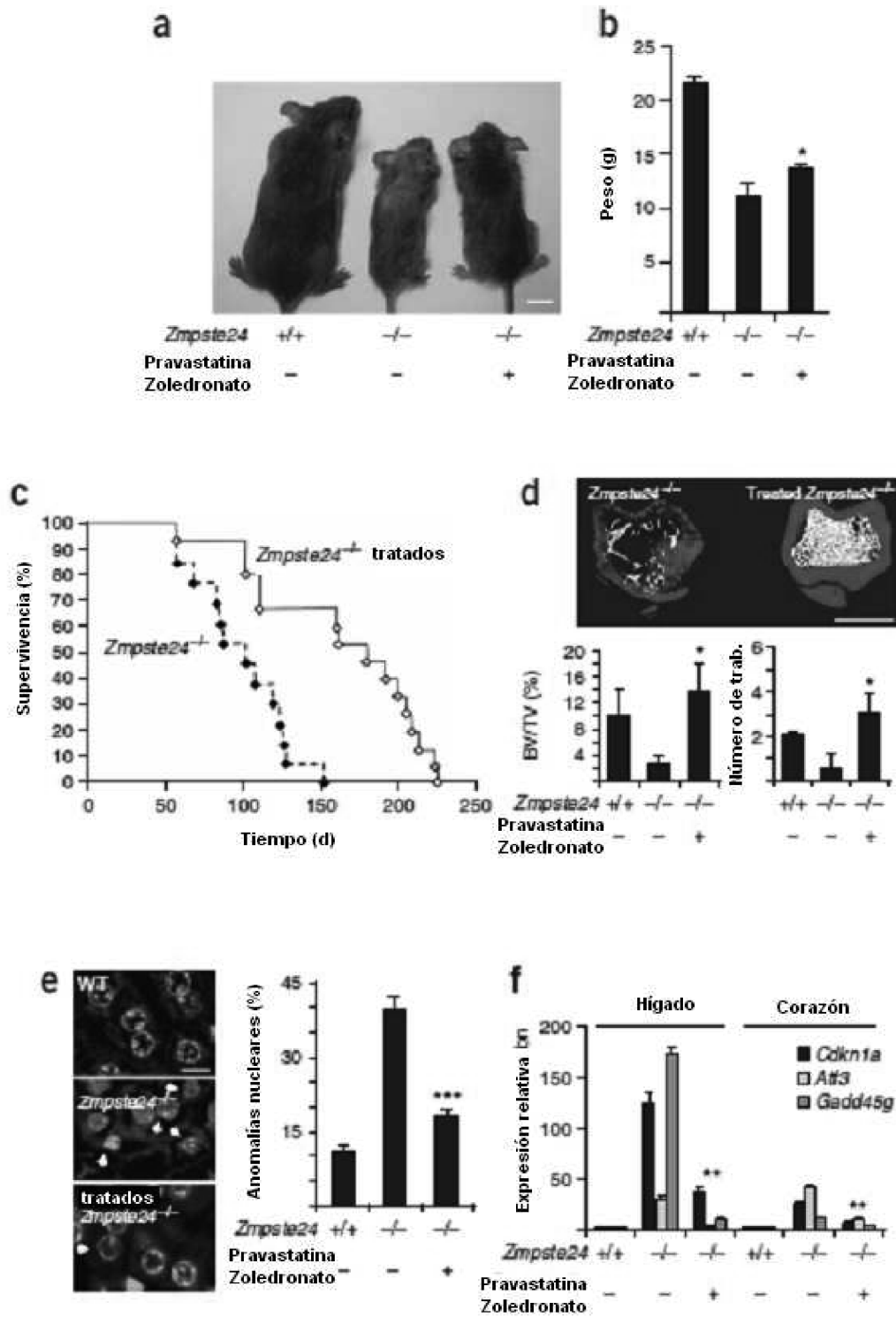
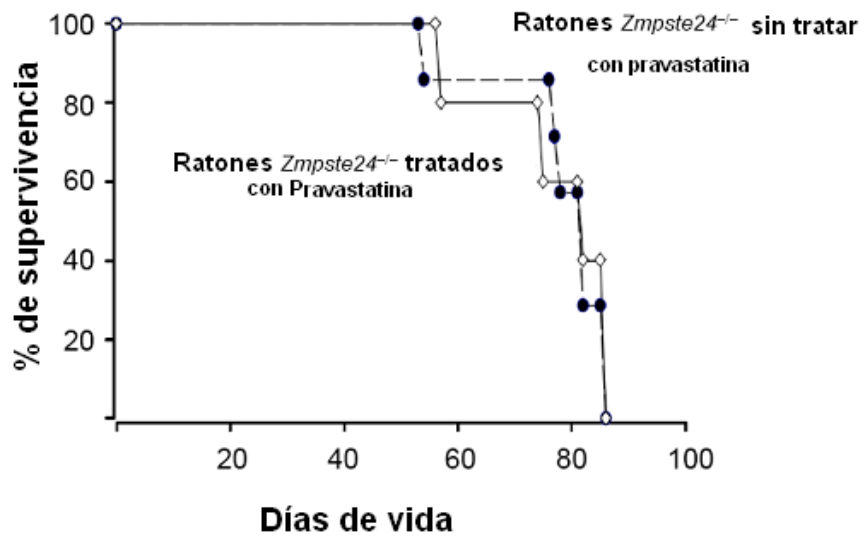


Figura 18

a



b

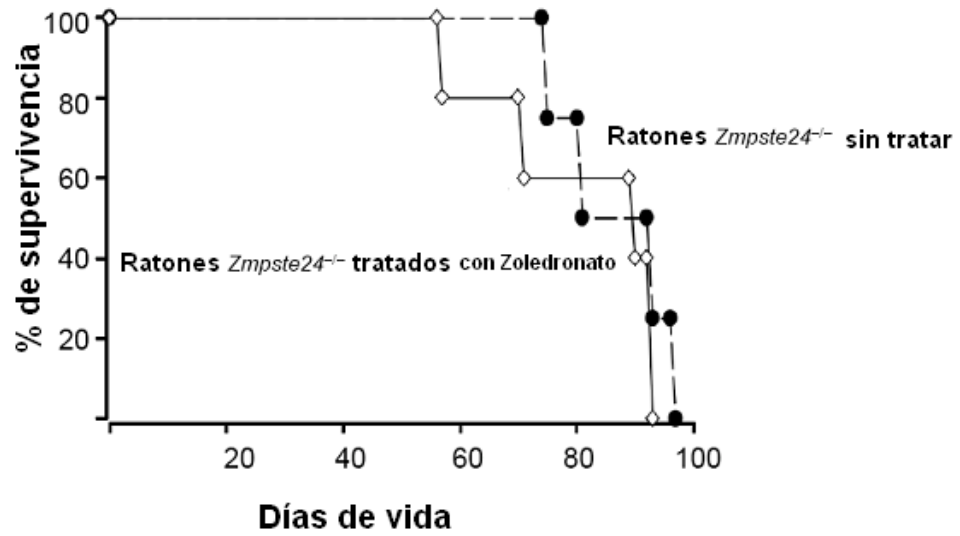


Figura 19

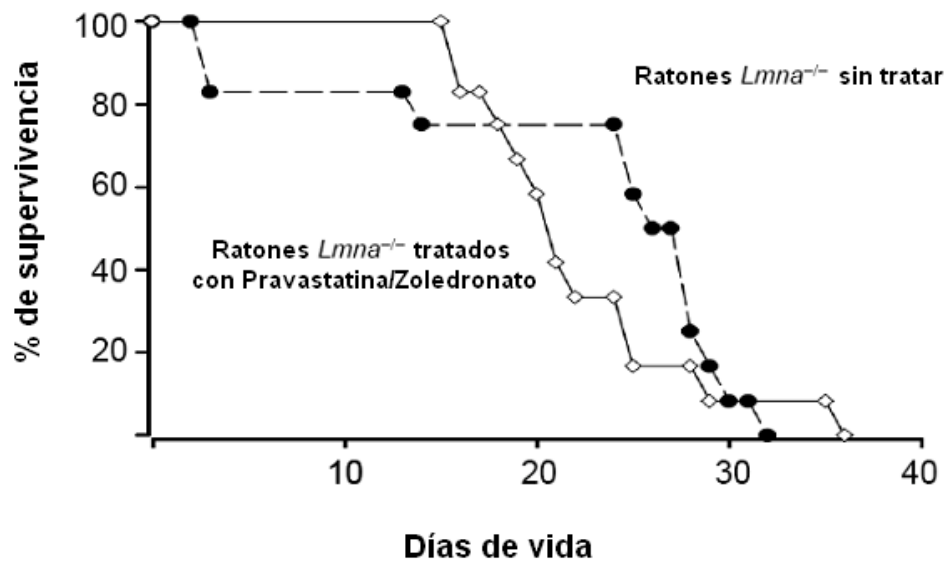


Figura 20