

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 596 631**

51 Int. Cl.:

**A01N 45/00** (2006.01)

**A61K 31/56** (2006.01)

**C07J 53/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.05.2010 PCT/US2010/035119**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.11.2010 WO10135247**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.05.2010 E 10778210 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.07.2016 EP 2437606**

54 Título: **Composiciones y métodos para aumentar la actividad telomerasa**

30 Prioridad:

**18.05.2009 US 179305 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**11.01.2017**

73 Titular/es:

**TELOMERASE ACTIVATION SCIENCES, INC.  
(100.0%)  
420 Lexington Ave, Suite 2900  
New York 10170, US**

72 Inventor/es:

**HARLEY, CALVIN B.;  
KHOR, SOO-PEANG;  
RAMASESHAN, MAHESH;  
RAMIYA, PREMCHANDRAN H.;  
PIROT, ZHU ZHEN;  
FAUCE, STEVEN y  
LIN, TONG**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 596 631 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

Composiciones y métodos para aumentar la actividad telomerasa

5 **Referencia a solicitudes anteriores**

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional en EE UU No. 61/179.305 presentada el 18 de mayo, 2009.

10 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a métodos y composiciones para aumentar la actividad telomerasa en células.

15 **Antecedentes de la invención**

15 La telomerasa es una ribonucleoproteína que cataliza la adición de repeticiones teloméricas a los extremos de los telómeros. Los telómeros son tramos largos de secuencias repetidas que tapan los extremos de los cromosomas y se cree que estabilizan el cromosoma. En seres humanos, los telómeros típicamente tienen de 7-10 kb de longitud y comprenden repeticiones múltiples de la secuencia -TTAGGG-. La telomerasa no se expresa en la mayoría de las  
20 células adultas, y la longitud de los telómeros disminuye con rondas sucesivas de replicación. Después de un cierto número de rondas de replicación, el acortamiento progresivo de los telómeros produce que las células entren en una fase de crisis telomérica, que a su vez lleva a senescencia celular. Ciertas enfermedades se asocian con pérdida telomérica rápida, lo que produce senescencia celular prematura. Se ha mostrado que la expresión del gen que codifica la proteína telomerasa humana en células humanas confiere un fenotipo inmortal, presumiblemente evitando  
25 la ruta de senescencia natural de las células. Además, se ha mostrado que la expresión del gen de la telomerasa en células que envejecen con telómeros cortos produce un aumento en la longitud de los telómeros y restablece un fenotipo típicamente asociado con células más jóvenes.

30 Las células somáticas, en contraste con las células tumorales y ciertas células madre, tienen poca o ninguna actividad telomerasa y dejan de dividirse cuando los extremos teloméricos de al menos algunos cromosomas se han acortado a una longitud crítica, lo que produce senescencia celular programada (muerte celular). Puesto que la pérdida de las repeticiones teloméricas en células somáticas, que produce senescencia, está aumentada por actividad telomerasa baja, la inducción de la actividad telomerasa, que tiene el efecto de añadir haces de repeticiones teloméricas a los telómeros, imparte de esta manera a células somáticas normales capacidad  
35 replicativa aumentada, e imparte a células senescentes la capacidad de proliferar y salir apropiadamente del ciclo celular tras la reparación del tejido dañado.

Los métodos de aumentar la actividad telomerasa terapéuticamente han sido investigados, por ejemplo, por Bodnar *Science* 279(5349):349-52 (16 de enero 1998); White, publicación de solicitud internacional PCT No. WO 2000/08135 (Feb. 2000); Hannon *et al.* publicación de solicitud internacional PCT. WO 99/35243 (Julio 1999) y publicación de solicitud internacional PCT No. WO 2000/031238 (Junio 2000); Franzese *et al. Lifescience* 69(13) 1509-20 (2001), y Yudoh *et al. J. Bone and Mineral Res.* 16(8):1453-1464 (2001). En estos artículos, la actividad telomerasa generalmente se aumenta por sobreexpresión de hTERT, el gen que codifica el componente de la proteína de la telomerasa humana, o por expresión de proteínas que median el ensamblaje de telomerasa, por  
45 ejemplo, proteínas de choque térmico (White, PCT NO. WO2000/08135). Franzese *et al.* describieron que Saquinavir, un inhibidor de proteasa recetado para el tratamiento de la infección por VIH, aumentaba la actividad telomerasa en células mononucleares de sangre periférica; Vasa *et al. Circ Res.* 87(7) 540-2 (2000) describió la activación de telomerasa, y un retraso resultante en senescencia endotelial, por administración de un precursor de óxido nítrico (NO).  
50

Se ha descrito que varias saponinas de la familia de los astragalósidos tienen varios efectos biológicos incluyendo aumentar la actividad telomerasa, Harley *et al.* publicación de solicitud internacional PCT No. WO2005/000245. Sería beneficioso desarrollar un compuesto que fuera un activador de telomerasa eficaz.

55 **Compendio de la invención**

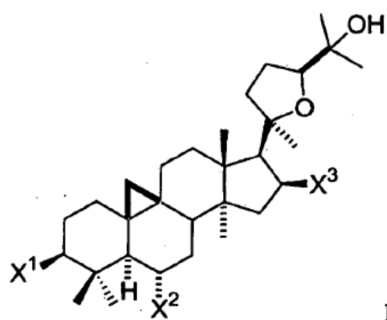
La invención descrita en el presente documento generalmente se refiere a compuestos y su uso para aumentar la actividad telomerasa en células y composiciones para uso en aumentar la actividad telomerasa en células. Tales compuestos y composiciones se pueden usar en células en cultivo celular, es decir, *in vitro*, o *ex vivo* o *in vivo*, tal como células que crecen en los tejidos de un sujeto, incluyendo sujetos humanos y mamíferos no humanos.  
60

Se ha descrito previamente que varias saponinas de la familia de los astragalósidos tienen varios efectos biológicos incluyendo aumentar la actividad telomerasa, Harley *et al.* publicación de solicitud internacional PCT No. WO2005/000245. Sin embargo, los inventores han encontrado que la biodisponibilidad de los compuestos naturales descritos en la misma incluyendo cicloastragenol es muy limitada cuando se administran por vía oral a ciertas especies de mamíferos. No estaba claro si la biodisponibilidad limitada era atribuible a la baja absorción de los  
65

compuestos por los mamíferos, o el alto metabolismo de los compuestos en ciertas especies de mamíferos o una combinación de ambos. Tal baja biodisponibilidad significa que los compuestos previamente descritos eran mucho menos eficaces como un activador de telomerasa oral en ciertas especies de mamíferos.

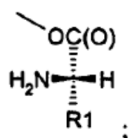
- 5 Se determinó que había una necesidad para nuevos compuestos que serían potentes activadores de telomerasa y que también estarían disponibles por vía oral a través de un número de especies de mamíferos y que tendrían una semivida mejorada en especies de mamíferos representativas. Los compuestos químicos descritos en el presente documento poseen estas propiedades deseadas.
- 10 En formas de realización particulares, las composiciones comprenden un compuesto de fórmula I y sales farmacéuticas del mismo como se describe posteriormente. Aspectos de la invención incluyen formulaciones de tales compuestos para uso en aplicaciones farmacéuticas, en particular, en aplicaciones donde se muestra que aumentar la actividad telomerasa en células es, o se espera que sea, beneficioso. También se proporciona el uso de los compuestos y formulaciones de los mismos para tales aplicaciones, incluyendo la aplicación o administración de
- 15 tales formulaciones tras haberse determinado la necesidad para, o ventaja de, aumentar la actividad telomerasa en células o tejidos.

La presente invención incluye, en un aspecto, un compuesto de fórmula I:



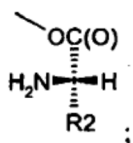
20

en donde  $X^1$ , se selecciona de ceto (=O), hidroxilo (-OH), y



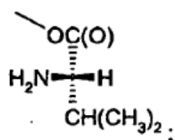
25

en donde  $X^2$ , se selecciona de ceto (=O), hidroxilo (-OH), y



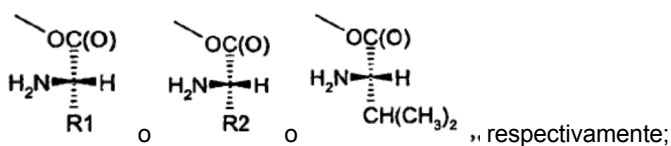
30

en donde  $X^3$ , se selecciona de ceto (=O), hidroxilo (-OH), y



35

en donde al menos uno de  $X^1$ ,  $X^2$  o  $X^3$  es



en donde R<sup>1</sup> o R<sup>2</sup> se seleccionan independientemente de -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, y -CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>;

5 y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

En una forma de realización X<sup>1</sup> es -OC(O)CH(NH<sub>2</sub>)R<sup>1</sup> en donde R<sup>1</sup> se selecciona del grupo que consiste en -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, o -CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>. En otra forma de realización X<sup>2</sup> es -OC(O)CH(NH<sub>2</sub>)R<sup>2</sup> en donde R<sup>2</sup> se selecciona del grupo que consiste en -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, o -CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>.

10 En una forma de realización al menos uno de X<sup>1</sup>, X<sup>2</sup> o X<sup>3</sup> es -OC(O)CH(NH<sub>2</sub>)CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. En otra forma de realización X<sup>1</sup> y X<sup>2</sup> son -OC(O)CH(NH<sub>2</sub>)CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.

15 En una forma de realización al menos uno de X<sup>1</sup>, o X<sup>2</sup> es -OC(O)CH(NH<sub>2</sub>)CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>. En otra forma de realización X<sup>1</sup> y X<sup>2</sup> son -OC(O)CH(NH<sub>2</sub>)CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>.

20 En formas de realización seleccionadas de la fórmula I, X<sup>1</sup> es un -OC(O)CH(NH<sub>2</sub>)CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, y X<sup>2</sup> y X<sup>3</sup> se seleccionan independientemente de hidroxilo y ceto. En formas de realización adicionales, X<sup>2</sup> es -OC(O)CH(NH<sub>2</sub>)CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, y X<sup>1</sup> y X<sup>3</sup> se seleccionan independientemente de hidroxilo y ceto. En formas de realización adicionales, X<sup>3</sup> es -OC(O)CH(NH<sub>2</sub>)CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, y X<sup>1</sup> y X<sup>2</sup> son ambos -OC(O)CH(NH<sub>2</sub>)CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, y X<sup>3</sup> es OH. En formas de realización aún adicionales, X<sup>1</sup> es -OC(O)CH(NH<sub>2</sub>)CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, y cada uno de X<sup>2</sup> y X<sup>3</sup> son OH. En formas de realización aún adicionales, X<sup>2</sup> es -OC(O)CH(NH<sub>2</sub>)CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, y cada uno de X<sup>1</sup> y X<sup>3</sup> son OH.

25 En formas de realización seleccionadas de la fórmula I, X<sup>1</sup> es un -OC(O)CH(NH<sub>2</sub>)CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, y X<sup>2</sup> y X<sup>3</sup> se seleccionan independientemente de hidroxilo y ceto. En formas de realización adicionales, X<sup>2</sup> es -OC(O)CH(NH<sub>2</sub>)CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, y X<sup>1</sup> y X<sup>3</sup> se seleccionan independientemente de hidroxilo y ceto. En formas de realización adicionales, X<sup>1</sup> y X<sup>2</sup> son ambos -OC(O)CH(NH<sub>2</sub>)CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, y X<sup>3</sup> es OH. En formas de realización aún adicionales, X<sup>1</sup> es -OC(O)CH(NH<sub>2</sub>)CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, y cada uno de X<sup>2</sup> y X<sup>3</sup> son OH. En formas de realización aún adicionales, X<sup>2</sup> es -OC(O)CH(NH<sub>2</sub>)CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, y cada uno de X<sup>1</sup> y X<sup>3</sup> son OH.

En algunas formas de realización de fórmula I, la sal farmacéuticamente aceptable es una sal clorhidrato.

Se contempla que los sustituyentes aminoácidos sean del estereoisómero L o natural.

35 Los compuestos ejemplares de fórmula I incluyen los designados en el presente documento como: éster 6 $\alpha$ ,16 $\beta$ -dihidroxi-17-[5-(1-hidroxi-1-metil-etil)-2-metil-tetrahydro-furan-2-il]-4,4,13,14-tetrametil-tetradecahidro-ciclopropa[9,10]ciclopenta[a]fenantren-3 $\beta$ -ílico del ácido 2-(L)-amino-3-metil-butírico (designado en el presente documento como **4**); éster 6 $\alpha$ -(2-amino-3-metil-butiriloxi)-16 $\beta$ -hidroxi-17-[5-(1-hidroxi-1-metil-etil)-2-metil-tetrahydro-furan-2-il]-4,4,13,14-tetrametil-tetradecahidro-ciclopropa[9,10]ciclopenta[a]fenantren-3 $\beta$ -ílico del ácido 2-(L)-amino-3-metil-butírico (designado en el presente documento como **7**); éster 3 $\beta$ ,16 $\beta$  dihidroxi-17-[5-(1-hidroxi-1-metil-etil)-2-metil-tetrahydro-furan-2-il]-4,4,13,14-tetrametil-tetradecahidro-ciclopropa[9,10]ciclopenta[a]fenantren-6 $\alpha$ -ílico del ácido 2-(L)-amino-3-metil-butírico, (designado en el presente documento como **12**), éster 6 $\alpha$ , 16 $\beta$ -dihidroxi-17-[5-(1-hidroxi-1-metil-etil)-2-metil-tetrahydro-furan-2-il]-4,4,13,14-tetrametil-tetradecahidro-ciclopropa[9,10]ciclopenta[a]fenantren-3 $\beta$ -ílico del ácido 2-(L)-amino-3-metil-pentanoico (designado en el presente documento como **14**), éster 16 $\beta$ -hidroxi-17-[5-(1-hidroxi-1-metil-etil)-2-metil-tetrahydro-furan-2-il]-4,4,13,14-tetrametil-3-oxo-tetradecahidro-ciclopropa[9,10]ciclopenta[a]fenantren-6 $\alpha$ -ílico del ácido 2-(L)-amino-3-metil-butírico, (designado en el presente documento como **30**), éster 6 $\alpha$ -(2-amino-3-metil-pentanoiloxi)-16 $\beta$ -hidroxi-17-[5-(1-hidroxi-1-metil-etil)-2-metil-tetrahydro-furan-2-il]-4,4,13,14-tetrametil-tetradecahidro-ciclopropa[9,10]ciclopenta[a]fenantren-3 $\beta$ -ílico del ácido 2-(L)-amino-3-metil-pentanoico (designado en el presente documento como **32**), éster 3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -dihidroxi-17-[5-(1-hidroxi-1-metil-etil)-2-metil-tetrahydro-furan-2-il]-4,4,13,14-tetrametil-tetradecahidro-ciclopropa[9,10]ciclopenta[a]fenantren-16 $\beta$ -ílico del ácido 2-(L)-amino-3-metil-butírico, (designado en el presente documento como **36**) y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

55 Los compuestos ejemplares de fórmula I incluyen los designados en el presente documento como: éster 6 $\alpha$ ,16 $\beta$ -dihidroxi-17-[5-(1-hidroxi-1-metil-etil)-2-metil-tetrahydro-furan-2-il]-4,4,13,14-tetrametil-tetradecahidro-ciclopropa[9,10]ciclopenta[a]fenantren-3 $\beta$ -ílico del ácido 2-(L)-amino-3-metil-butírico, sal clorhidrato; éster 6 $\alpha$ -(2-amino-3-metil-butiriloxi)-16 $\beta$ -hidroxi-17-[5-(1-hidroxi-1-metil-etil)-2-metil-tetrahydro-furan-2-il]-4,4,13,14-tetrametil-tetradecahidro-ciclopropa[9,10]ciclopenta[a]fenantren-3 $\beta$ -ílico del ácido 2-(L)-amino-3-metil-butírico, sal clorhidrato; éster 3 $\beta$ ,16 $\beta$  dihidroxi-17-[5-(1-hidroxi-1-metil-etil)-2-metil-tetrahydro-furan-2-il]-4,4,13,14-tetrametil-tetradecahidro-ciclopropa[9,10]ciclopenta[a]fenantren-6 $\alpha$ -ílico del ácido 2-(L)-amino-3-metil-butírico, sal

clorhidrato, éster 6 $\alpha$ , 16 $\beta$ -dihidroxi-17-[5-(1-hidroxi-1-metil-etil)-2-metil-tetrahydro-furan-2-il]-4,4,13,14-tetrametil-tetradecahidrociclopropa[9,10]ciclopenta[a]fenantren-3 $\beta$ -ílico del ácido 2-(L)-amino-3-metil-pentanoico, sal clorhidrato, éster 16 $\beta$ -hidroxi-17-[5-(1-hidroxi-1-metil-etil)-2-metil-tetrahydro-furan-2-il]-4,4,13,14-tetrametil-3-oxo-tetradecahidro-ciclopropa[9,10]ciclopenta[a]fenantren-6 $\alpha$ -ílico del ácido 2-(L)-amino-3-metil-butírico, sal clorhidrato, éster 6 $\alpha$ -(2-amino-3-metil-pentanoiloxi)-16 $\beta$ -hidroxi-17-[5-(1-hidroxi-1-metil-etil)-2-metil-tetrahydro-furan-2-il]-4,4,13,14-tetrametil-tetradecahidro-ciclopropa[9,10]ciclopenta[a]fenantren-3 $\beta$ -ílico del ácido 2-(L)-amino-3-metil-pentanoico, sal clorhidrato, o éster 3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -dihidroxi-17-[5-(1-hidroxi-1-metil-etil)-2-metil-tetrahydro-furan-2-il]-4,4,13,14-tetrametil-tetradecahidrociclopropa[9,10]ciclopenta[a]fenantren-16 $\beta$ -ílico del ácido 2-(L)-amino-3-metil-butírico, sal clorhidrato.

Un compuesto de fórmula I anterior, cuando se formula en un solvente, es eficaz para producir un nivel de actividad telomerasa en queratinocitos o CMSP, medido en un ensayo TRAP, al menos el 50% mayor, al menos el 70% mayor, al menos el 80% mayor, o al menos el 90% mayor que el nivel en dichas células tratadas con dicho solvente, medido en un ensayo TRAP como se describe en el presente documento. En formas de realización adicionales, el compuesto es eficaz para producir un nivel de actividad telomerasa en queratinocitos o CMSP, medido en un ensayo TRAP, al menos el 100% mayor que el nivel en dichas células tratadas con dicho solvente, medido en un ensayo TRAP como se describe en el presente documento.

La presente invención divulga, en un aspecto, un método de aumentar la actividad telomerasa en una célula o tejido. El método comprende poner en contacto la célula o tejido con un compuesto de fórmula I aislado. El método puede comprender además el paso preliminar de identificar una célula o tejido en el que se desea un aumento en la actividad telomerasa.

El método de poner en contacto un compuesto de fórmula I aislado con una célula o tejido puede comprender, antes de dicho contacto, identificar una célula o tejido en la que se desea un aumento de actividad telomerasa. Los beneficios que se van a llevar a cabo al aumentar la actividad telomerasa en una célula o tejido incluyen, por ejemplo, aumento de la capacidad replicativa y/o tiempo de vida de dicha célula o células en dicho tejido.

El método puede incluir identificar, determinar o diagnosticar una afección en un sujeto de modo que se desea aumentar la actividad telomerasa en las células o tejido del sujeto, y administrar el compuesto al sujeto. El sujeto es un sujeto mamífero, tal como un animal doméstico tal como un perro, gato, ratón, rata, mono o un sujeto o paciente humano.

Tales afecciones o enfermedades para prevención o tratamiento pueden incluir, por ejemplo, infecciones víricas y oportunistas incluyendo VIH, varias enfermedades degenerativas, tal como enfermedad neurodegenerativa, enfermedad degenerativa de los huesos o articulaciones, y tejidos conjuntivos, degeneración macular, retinopatía diabética, enfermedades cardiovasculares incluyendo enfermedades vasculares centrales y periféricas, enfermedad de Crohn y otras afecciones inmunitarias, enfermedades hepáticas incluyendo fibrosis y cirrosis, enfermedades pulmonares incluyendo fibrosis pulmonar, asma, enfisema y EPOC, trastornos hematopoyéticos (incluyendo anemia, trombocitopenia, neutropenia y otras citopenias), enfermedades gastrointestinales inflamatorias crónicas tal como esófago de Barrett, cualquier trastorno relacionado con la pérdida de capacidad proliferativa en poblaciones de células madre o células progenitoras. Tales afecciones pueden incluir síndrome de insuficiencia de la médula ósea, anemia aplásica, anemia mielodisplásica o síndrome mielodisplásico. Tales afecciones también incluyen heridas u otras afecciones agudas o crónicas de la piel y sus apéndices, tal como, por ejemplo, una quemadura, una abrasión, una incisión, un injerto, una lesión causada por un agente infeccioso, una úlcera venosa crónica, una úlcera diabética, una úlcera de compresión o decúbito, una úlcera mucosa, formación queloide, pérdida de pelo o pigmento, y otras aberraciones estructurales de la piel y sus apéndices. Tales afecciones también incluyen cáncer y estados precancerosos en los que la baja telomerasa o telómeros acortados se asocian con inestabilidad genómica, o tasas de mutación aumentadas, o pérdida de funciones supresoras de tumores, y consecuentemente los sujetos tienen un riesgo aumentado de inicio de tumor, evolución de tumor o recaída del tumor.

La invención proporciona el uso de un compuesto de fórmula I aislado como se ha definido anteriormente en prevenir o tratar una afección en un paciente, tal como las indicadas anteriormente, aumentando la actividad telomerasa en células o tejido del paciente, el método comprende administrar a un paciente en necesidad de tal prevención o tratamiento. Las composiciones se pueden administrar por varias vías, por ejemplo, por vía oral, tópica, parenteral, subcutánea, inhalación e intravenosa.

En una forma de realización adicional, la invención proporciona el uso de una formulación tópica de un compuesto de fórmula I aislado como se ha definido anteriormente en tratar un afección aguda o crónica de la epidermis, por lo cual las células epidérmicas se ponen en contacto con dicha formulación tópica.

Las células con las que la formulación se pone en contacto también pueden incluir células de explante que se ponen en contacto *ex vivo*, por ejemplo, para terapias celulares, u otras células en cultivo. Según esto, la invención proporciona el aumento de la capacidad replicativa y capacidad funcional mejorada de células *in vitro* o *ex vivo*, que comprende poner en contacto dichas células con una cantidad eficaz de una composición que comprende un compuesto de fórmula I como se ha definido anteriormente, incluyendo formas de realización seleccionadas de los

compuestos como se han definido anteriormente. En general, las células son células de mamífero; en formas de realización seleccionadas, las células son células madre, tal como células madre o progenitoras de médula ósea, células estromales de médula ósea, células madre epidérmicas y epiteliales de la piel y otros tejidos incluyendo intestino, hígado y páncreas, células precursoras de islotes, células de neuroesferas, células corticosuprarrenales, células satélite musculares, células madre y progenitoras mesenquimatosas incluyendo precursores de osteoblastos, células epiteliales pigmentadas de retina, células precursoras endoteliales, pericitos, y células inmunitarias capaces de expansión clonal incluyendo células T (CD4 y CD8) de memoria e indiferenciadas y B.

En una forma de realización adicional, la invención proporciona el aumento de trasplante de un tejido de un donante vivo o cadáver a un paciente vivo que comprende poner en contacto el tejido de trasplante con un compuesto de fórmula I aislado como se ha definido anteriormente. En una forma de realización adicional, la invención proporciona el aumento de trasplante de un tejido de un donante a un paciente vivo que comprende administrar el compuesto de fórmula I aislado como se ha definido anteriormente al paciente ya sea antes, simultáneo con, o durante un periodo de tiempo después del trasplante del tejido. El tejido trasplantado puede ser tejido sólido, tal como un riñón, corazón, pulmones, etc., o tejido hematopoyético tal como, sin limitación, células sanguíneas tal como leucocitos, linfocitos o células precursoras hematopoyéticas que pueden derivar de la médula ósea.

En una forma de realización, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende, en un vehículo farmacéuticamente aceptable, un compuesto de fórmula I como se ha descrito anteriormente.

En otra forma de realización, la invención proporciona una formulación farmacéutica tópica de un compuesto de fórmula I aislado como se ha definido anteriormente. Las formas de realización seleccionadas de los compuestos también se han definido anteriormente. La formulación tópica típicamente comprende uno o más componentes seleccionados del grupo que consiste en un emulsionante, un soporte (por ejemplo, liposomas), un espesante, y un emoliente de piel. Tales composiciones se pueden usar para el tratamiento de heridas u otras afecciones agudas o crónicas de la epidermis.

Uso de un compuesto de fórmula I aislado como se ha definido anteriormente, incluyendo formas de realización seleccionadas como se ha descrito anteriormente, en la fabricación de un medicamento para prevenir o tratar una enfermedad o afección. Uso de un compuesto de fórmula I aislado como se ha definido anteriormente, incluyendo formas de realización seleccionadas como se ha descrito anteriormente, en la fabricación de un medicamento para prevenir o tratar enfermedades objeto de prevención o tratamiento aumentando la actividad telomerasa en una célula o tejido. Uso de un compuesto de fórmula I aislado como se ha definido anteriormente, incluyendo formas de realización seleccionadas como se ha descrito anteriormente, para prevenir o tratar una enfermedad o afección. Uso de un compuesto de fórmula I aislado como se ha definido anteriormente, incluyendo formas de realización seleccionadas como se ha descrito anteriormente, para prevenir o tratar una enfermedad objeto de prevención o tratamiento aumentando la actividad telomerasa en una célula o tejido. El uso puede comprender además el paso preliminar de identificar una célula o tejido en la que se desea un aumento de actividad telomerasa. Los beneficios que se van a llevar a cabo al aumentar la actividad telomerasa en una célula o tejido incluyen, por ejemplo, aumento de la capacidad replicativa y/o tiempo de vida de dicha célula o células en dicho tejido y aumento de la capacidad funcional.

El uso puede incluir identificar, determinar o diagnosticar una afección o enfermedad en un sujeto de modo que se desea aumentar la actividad telomerasa en las células o tejido del sujeto. Tales afecciones pueden incluir, por ejemplo, infecciones víricas y oportunistas incluyendo VIH, varias enfermedades degenerativas, tal como enfermedad neurodegenerativa, enfermedad degenerativa de los huesos o articulaciones y tejidos conjuntivos, retinopatía diabética, degeneración macular, enfermedades cardiovasculares incluyendo enfermedades vasculares centrales y periféricas, enfermedad de Crohn y otras afecciones inmunitarias, enfermedades hepáticas incluyendo fibrosis y cirrosis, enfermedades pulmonares incluyendo fibrosis pulmonar, asma, enfisema y EPOC, trastornos hematopoyéticos (incluyendo anemia, trombocitopenia, neutropenia y otras citopenias), enfermedades gastrointestinales inflamatorias crónicas tal como esófago de Barrett, cualquier trastorno relacionado con la pérdida de capacidad proliferativa en poblaciones de células madre o células progenitoras. Tales afecciones pueden incluir síndrome de insuficiencia de la médula ósea, anemia aplásica, anemia mielodisplásica o síndrome mielodisplásico. Tales afecciones también incluyen heridas u otras afecciones agudas o crónicas de la piel y sus apéndices, tal como, por ejemplo, una quemadura, una abrasión, una incisión, un injerto, una lesión causada por un agente infeccioso, una úlcera venosa crónica, una úlcera diabética, una úlcera de compresión o decúbito, una úlcera mucosa, formación queloide, pérdida de pelo o pigmento, y otras aberraciones estructurales de la piel y sus apéndices. Tales afecciones también incluyen cáncer y estados precancerosos en los que la baja telomerasa o telómeros acortados se asocian con inestabilidad genómica, o tasas de mutación aumentadas, o pérdida de funciones supresoras de tumores, y consecuentemente los sujetos tienen un riesgo aumentado de inicio de tumor, evolución de tumor o recaída del tumor.

De forma similar, se contempla el uso de un compuesto de fórmula I aislado como se ha definido anteriormente, incluyendo formas de realización seleccionadas como se ha descrito anteriormente, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un afección crónica o aguda de la epidermis. Otra forma de realización es el uso de un compuesto de fórmula I aislado como se ha definido anteriormente, incluyendo formas de realización

seleccionadas como se ha descrito anteriormente, para el tratamiento de una afección crónica o aguda de la epidermis.

Estos y otros objetos y características de la invención serán más completamente aparentes cuando la siguiente descripción detallada de la invención se lea junto con las figuras acompañantes.

### Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra un aumento de la actividad telomerasa en células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de ratón después de una dosis del compuesto **4** C3-(L)-valil-cicloastragenol, medido en un ensayo TRAP.

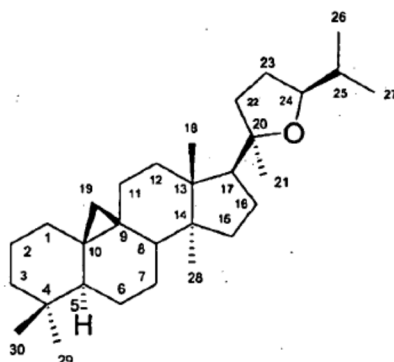
La figura 2 muestra un aumento de la actividad telomerasa en bigotes de ratón después de una dosis del compuesto **4** C3-(L)-valil-cicloastragenol, medido en un ensayo TRAP.

### 15 Descripción detallada de la invención

#### I. Definiciones

Los siguientes términos, como se usan en el presente documento, tienen los significados dados a continuación, a menos que se indique de otra manera.

Un esquema de numeración de átomos de carbono general usado para la nomenclatura de los compuestos descritos en el presente documento es como se muestra a continuación.



Por tanto, C3-(L)-valil-cicloastragenol se refiere a la (L) valina unida a través de un enlace éster al carbono 3 de la estructura del compuesto.

“Alquilo de C<sub>1-5</sub>” se refiere a un radical monovalente acíclico completamente saturado que contiene carbono e hidrógeno, que puede ser ramificado o lineal que tiene de 1 a 5 átomos de carbono. Los ejemplos de grupos alquilo son metilo, etilo, n-propilo, n-butilo, isopropilo, isobutilo, sec-butilo, tert-butilo.

“Ceto” significa =O.

“Hidroxi” significa -OH.

El término “aminoácido” comprende los residuos de los aminoácidos naturales (por ejemplo, Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Glu, Gln, Gly, His, Hyl, Hyp, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, y Val) en forma D o L, así como aminoácidos no naturales. El término también comprende aminoácidos naturales y no naturales que tienen un grupo protector de amino convencional (por ejemplo, acetilo o benziloxicarbonilo). Otros grupos protectores de amino adecuados los conocen los expertos en la materia (véase, por ejemplo, T.W. Green, *Protecting Groups in Organic Synthesis; Tercera Edición, Wiley Nueva York 1999*). A menos que se especifique de otra manera los sustituyentes aminoácidos están unidos al cicloastragenol a través sus grupos carboxi a través de enlaces ésteres. Por tanto, C3-(L)-valil-cicloastragenol es éster de C3-(L)-valil-cicloastragenol.

El término “isómero” incluye, pero no está limitado a isómeros ópticos y análogos, isómeros estructurales y análogos, isómeros conformacionales y análogos y similares.

Los expertos en la materia apreciarán que los compuestos de la invención que tienen un centro quiral pueden existir en y ser aislados en formas ópticamente activa y racémica. Algunos compuestos pueden mostrar polimorfismo. Se debe entender que la presente invención abarca cualquier forma racémica, ópticamente activa, polimórfica o estereoisomérica o mezclas de las mismas, de un compuesto de la invención que posee las propiedades útiles descritas en el presente documento, siendo bien conocido en la técnica cómo preparar formas ópticamente activas

(por ejemplo, por resolución de la forma racémica por técnicas de recristalización, por síntesis a partir de materiales de partida ópticamente activos, por síntesis quirál, o por separación cromatográfica usando una fase estacionaria quirál) y cómo determinar la capacidad de los compuestos para aumentar la actividad telomerasa usando las pruebas descritas en el presente documento. En una forma de realización, los aminoácidos están en la forma natural (L).

La invención incluye "sales farmacéuticamente aceptables" de los compuestos de esta invención, que se pueden producir, en una forma de realización, para formar sales de metales alcalinos y para formar sales de adición libre de ácidos libres o bases libres. Las sales de adición ácida farmacéuticamente aceptables adecuadas de compuestos de esta invención se pueden preparar a partir de un ácido inorgánico o a partir de un ácido orgánico. En una forma de realización, los ejemplos de ácidos inorgánicos son ácido clorhídrico, bromhídrico, yodhídrico, nítrico, carbónico, sulfúrico y fosfórico. En una forma de realización, los ácidos orgánicos se pueden seleccionar de las clases alifática, cicloalifática, aromática, aralifática, heterocíclica, carboxílica y sulfónica de ácidos orgánicos, ejemplos de los cuales son ácido fórmico, acético, propiónico, succínico, glicólico, glucónico, láctico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, glucurónico, maleico, fumárico, pirúvico, aspártico, glutámico, benzoico, antranílico, oxálico, mesílico, salicílico, esteárico y ácido galacturónico. En una forma de realización, las sales de adición de bases farmacéuticamente aceptables adecuadas de compuestos de esta invención incluyen sales metálicas hechas de aluminio, calcio, litio, magnesio, potasio, sodio y cinc o sales orgánicas hechas de N,N'-dibenciletilendiamina, colina, cloroprocaina, etanolamina, etilendiamina y procaina. Todas estas sales se pueden preparar por medios convencionales a partir de los compuestos correspondientes. Las sales farmacéuticamente aceptables se pueden preparar en otras formas de realización por tratamiento con bases inorgánicas, por ejemplo, hidróxido de sodio. En otra forma de realización, se pueden hacer ésteres de los compuestos con ácido carboxílicos alifáticos y aromáticos, por ejemplo, ésteres de ácido acético y ácido benzoico.

"Células madre" se refiere a células relativamente indiferenciadas de un linaje común que retienen la capacidad de dividirse y ciclar a lo largo de la vida posnatal, para proporcionar células que se pueden diferenciar adicionalmente y especializarse (por ejemplo, las células madre en las capas basales de la piel o en tejido hematopoyético, tal como células primitivas en la médula ósea de las que derivan varios tipos de células sanguíneas).

Mediante "eficaz para aumentar la actividad telomerasa en una célula", con referencia a un compuesto, se quiere decir que una composición que contiene el compuesto a una concentración de 10  $\mu\text{M}$  o menos es eficaz para producir un nivel de actividad telomerasa en un queratinocito o célula fibroblasto, medido en un ensayo de actividad telomerasa (por ejemplo, ensayo TRAP) como se describe en el presente documento, que es mayor, en un factor de al menos 1,5 (es decir, al menos el 50% mayor) que el nivel producido por una formulación similar que no contiene el compuesto, medido en un ensayo TRAP. En algunas formas de realización, el compuesto es eficaz, a una concentración de 10  $\mu\text{M}$  o menos, para producir un nivel de actividad telomerasa en tal célula, medido en un ensayo TRAP como se describe en el presente documento, que es mayor en un factor de al menos 2 (es decir, al menos el 100% mayor) que el nivel producido por una formulación similar que no contiene el compuesto.

Un "sujeto" es un mamífero. El sujeto puede ser un mamífero doméstico, por ejemplo, un perro, gato, ratón, rata, mono, etc. El sujeto o paciente puede ser un ser humano.

En referencia a la administración de un compuesto a un paciente, una "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad eficaz para aumentar la actividad telomerasa en las células o tejido del paciente, de modo que se alcanza un resultado terapéutico deseado. En referencia a un tratamiento de células *in vitro* o *ex vivo*, una "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad eficaz para aumentar la actividad telomerasa en las células, aumentando de esta manera la capacidad replicativa y/o tiempo de vida de las células.

En concentraciones expresadas en el presente documento como % (p/v), el 100% (p/v) corresponde a 1 g de soluto/ml de solvente. Por ejemplo, el 0,1% (p/v) = 1 mg/ml.

Una "formulación de un compuesto aislado" se refiere a una formulación preparada combinando el compuesto aislado con uno o más de otros ingredientes (que pueden ser ingredientes activos o inactivos) para producir la formulación. La frase "compuesto aislado" se refiere a un compuesto que (antes de la formulación) se ha producido por un proceso que implica uno o más pasos de síntesis química, resultando en una preparación del compuesto que no es de menos del 80% (p/p) de pureza.

## II. Métodos y composiciones para aumentar la actividad telomerasa

Según la presente invención, se proporcionan composiciones y métodos *in vitro* para aumentar la actividad telomerasa en una célula.

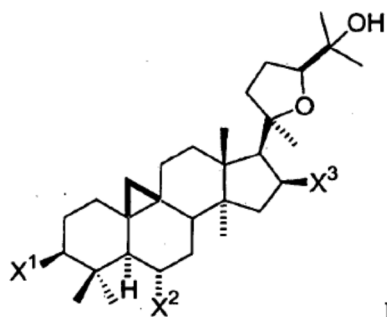
Se ha encontrado que los compuestos de la presente invención son capaces de aumentar la actividad telomerasa en células y están enseguida biológicamente disponibles cuando se administran a mamíferos sea por vía intravenosa u oral.



Según el método, una célula o tejido se pone en contacto con un compuesto de fórmula I aislado como se divulga en el presente documento, en una cantidad eficaz para aumentar la actividad telomerasa en la célula o tejido, relativo al nivel de la actividad telomerasa en la célula o tejido en ausencia del compuesto. El método también puede incluir un paso preliminar de identificar una célula o tejido en el que se desea un aumento en la actividad telomerasa.

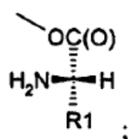
5

La presente invención incluye, en un aspecto, un compuesto de fórmula I:



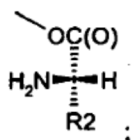
I

10 en donde  $X^1$ , se selecciona de ceto (=O), hidroxilo, y



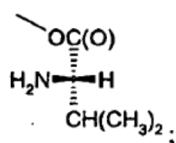
15

en donde  $X^2$ , se selecciona de ceto (=O), hidroxilo, y

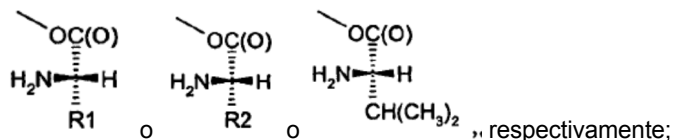


en donde  $X^3$ , se selecciona de ceto (=O), hidroxilo, y

20



en donde al menos uno de  $X^1$ ,  $X^2$  o  $X^3$  es



25

en donde  $R^1$  o  $R^2$  se seleccionan independientemente de  $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ , y  $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$ ;

y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

30

En una forma de realización  $X^1$  es  $-\text{OC}(\text{O})\text{CH}(\text{NH}_2)\text{R}^1$  en donde  $R^1$  se selecciona del grupo que consiste en  $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ , o  $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$ . En otra forma de realización  $X^2$  es  $-\text{OC}(\text{O})\text{CH}(\text{NH}_2)\text{R}^2$  en donde  $R^2$  se selecciona del grupo que consiste en  $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ , o  $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$ .

35

En una forma de realización al menos uno de  $X^1$ ,  $X^2$  o  $X^3$  es  $-\text{OC}(\text{O})\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ . En otra forma de realización  $X^1$  y  $X^2$  son  $-\text{OC}(\text{O})\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ .

En una forma de realización al menos uno de  $X^1$ , o  $X^2$  es  $-\text{OC}(\text{O})\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$ . En otra forma de realización  $X^1$  y  $X^2$  son  $-\text{OC}(\text{O})\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$ .

- 5 En formas de realización seleccionadas de la fórmula I,  $X^1$  es un  $-\text{OC}(\text{O})\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ , y  $X^2$  y  $X^3$  se seleccionan independientemente de hidroxilo y ceto. En formas de realización adicionales,  $X^2$  es  $-\text{OC}(\text{O})\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ , y  $X^1$  y  $X^3$  se seleccionan independientemente de hidroxilo y ceto. En formas de realización adicionales,  $X^3$  es  $-\text{OC}(\text{O})\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ , y  $X^1$  y  $X^2$  se seleccionan independientemente de hidroxilo y ceto. En formas de realización adicionales  $X^1$  y  $X^2$  son ambos  $-\text{OC}(\text{O})\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ , y  $X^3$  es OH. En formas de realización aún adicionales,  $X^1$  es  $-\text{OC}(\text{O})\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ , y cada uno de  $X^2$  y  $X^3$  son OH. En formas de realización aún adicionales,  $X^2$  es  $-\text{OC}(\text{O})\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ , y cada uno de  $X^1$  y  $X^3$  son OH.

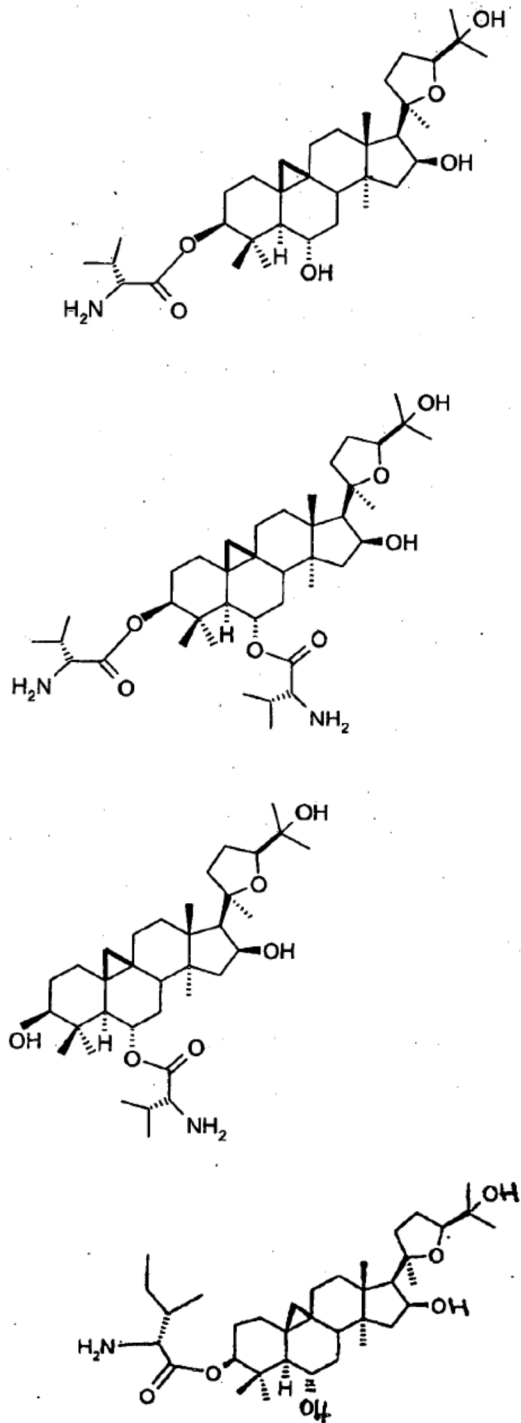
- 15 En formas de realización seleccionadas de la fórmula I,  $X^1$  es un  $-\text{OC}(\text{O})\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$ , y  $X^2$  y  $X^3$  se seleccionan independientemente de hidroxilo y ceto. En formas de realización adicionales,  $X^2$  es  $-\text{OC}(\text{O})\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$ , y  $X^1$  y  $X^3$  se seleccionan independientemente de hidroxilo y ceto. En formas de realización adicionales  $X^1$  y  $X^2$  son ambos  $-\text{OC}(\text{O})\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$ , y  $X^3$  es OH. En formas de realización aún adicionales,  $X^1$  es  $-\text{OC}(\text{O})\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$ , y cada uno de  $X^2$  y  $X^3$  son OH. En formas de realización aún adicionales,  $X^2$  es  $-\text{OC}(\text{O})\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$ , y cada uno de  $X^1$  y  $X^3$  son OH.

- 20 En algunas formas de realización de fórmula I, la sal farmacéuticamente aceptable es una sal clorhidrato.

Los compuestos ejemplares de fórmula I incluyen los designados en el presente documento como: éster 6 $\alpha$ ,16 $\beta$ -dihidroxi-17-[5-(1-hidroxi-1-metil-etil)-2-metil-tetrahydro-furan-2-il]-4,4,13,14-tetrametil-tetradecahidro-ciclopropa[9,10]ciclopenta[a]fenantren-3 $\beta$ -ílico del ácido 2-(L)-amino-3-metil-butírico (designado en el presente documento como **4**); éster 6 $\alpha$ -(2-amino-3-metil-butiriloxi)-16 $\beta$ -hidroxi-17-[5-(1-hidroxi-1-metil-etil)-2-metil-tetrahydro-furan-2-il]-4,4,13,14-tetrametil-tetradecahidro-ciclopropa[9,10]ciclopenta[a]fenantren-3 $\beta$ -ílico del ácido 2-(L)-amino-3-metil-butírico (designado en el presente documento como **7**); éster 3 $\beta$ ,16 $\beta$ -dihidroxi-17-[5-(1-hidroxi-1-metil-etil)-2-metil-tetrahydro-furan-2-il]-4,4,13,14-tetrametil-tetradecahidro-ciclopropa[9,10]ciclopenta[a]fenantren-6 $\alpha$ -ílico del ácido 2-(L)-amino-3-metil-pentanoico (designado en el presente documento como **12**), éster 6 $\alpha$ ,16 $\beta$ -dihidroxi-17-[5-(1-hidroxi-1-metil-etil)-2-metil-tetrahydro-furan-2-il]-4,4,13,14-tetrametil-tetradecahidro-ciclopropa[9,10]ciclopenta[a]fenantren-3 $\beta$ -ílico del ácido 2-(L)-amino-3-metil-pentanoico (designado en el presente documento como **14**), éster 16 $\beta$ -hidroxi-17-[5-(1-hidroxi-1-metil-etil)-2-metil-tetrahydro-furan-2-il]-4,4,13,14-tetrametil-3-oxo-tetradecahidro-ciclopropa[9,10]ciclopenta[a]fenantren-6 $\alpha$ -ílico del ácido 2-(L)-amino-3-metil-butírico, (designado en el presente documento como **30**), éster 6 $\alpha$ -(2-amino-3-metil-pentanoiloxi)-16 $\beta$ -hidroxi-17-[5-(1-hidroxi-1-metil-etil)-2-metil-tetrahydro-furan-2-il]-4,4,13,14-tetrametil-tetradecahidro-ciclopropa[9,10]ciclopenta[a]fenantren-3 $\beta$ -ílico del ácido 2-(L)-amino-3-metil-pentanoico (designado en el presente documento como **32**), éster 3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -dihidroxi-17-[5-(1-hidroxi-1-metil-etil)-2-metil-tetrahydro-furan-2-il]-4,4,13,14-tetrametil-tetradecahidro-ciclopropa[9,10]ciclopenta[a]fenantren-16 $\beta$ -ílico del ácido 2-(L)-amino-3-metil-butírico, (designado en el presente documento como **36**) y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

Los compuestos ejemplares de fórmula I incluyen los designados en el presente documento como: éster 6 $\alpha$ ,16 $\beta$ -dihidroxi-17-[5-(1-hidroxi-1-metil-etil)-2-metil-tetrahydro-furan-2-il]-4,4,13,14-tetrametil-tetradecahidro-ciclopropa[9,10]ciclopenta[a]fenantren-3 $\beta$ -ílico del ácido 2-(L)-amino-3-metil-butírico, sal clorhidrato; éster 6 $\alpha$ -(2-amino-3-metil-butiriloxi)-16 $\beta$ -hidroxi-17-[5-(1-hidroxi-1-metil-etil)-2-metil-tetrahydro-furan-2-il]-4,4,13,14-tetrametil-tetradecahidro-ciclopropa[9,10]ciclopenta[a]fenantren-3 $\beta$ -ílico del ácido 2-(L)-amino-3-metil-butírico, sal clorhidrato; éster 3 $\beta$ ,16 $\beta$ -dihidroxi-17-[5-(1-hidroxi-1-metil-etil)-2-metil-tetrahydro-furan-2-il]-4,4,13,14-tetrametil-tetradecahidro-ciclopropa[9,10]ciclopenta[a]fenantren-6 $\alpha$ -ílico del ácido 2-(L)-amino-3-metil-butírico, sal clorhidrato; éster 6 $\alpha$ ,16 $\beta$ -dihidroxi-17-[5-(1-hidroxi-1-metil-etil)-2-metil-tetrahydro-furan-2-il]-4,4,13,14-tetrametil-tetradecahidro-ciclopropa[9,10]ciclopenta[a]fenantren-3 $\beta$ -ílico del ácido 2-(L)-amino-3-metil-pentanoico, sal clorhidrato; éster 16 $\beta$ -hidroxi-17-[5-(1-hidroxi-1-metil-etil)-2-metil-tetrahydro-furan-2-il]-4,4,13,14-tetrametil-3-oxo-tetradecahidro-ciclopropa[9,10]ciclopenta[a]fenantren-6 $\alpha$ -ílico del ácido 2-(L)-amino-3-metil-butírico, sal clorhidrato; éster 6 $\alpha$ -(2-amino-3-metil-pentanoiloxi)-16 $\beta$ -hidroxi-17-[5-(1-hidroxi-1-metil-etil)-2-metil-tetrahydro-furan-2-il]-4,4,13,14-tetrametil-tetradecahidro-ciclopropa[9,10]ciclopenta[a]fenantren-3 $\beta$ -ílico del ácido 2-(L)-amino-3-metil-pentanoico, sal clorhidrato, o éster 3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -dihidroxi-17-[5-(1-hidroxi-1-metil-etil)-2-metil-tetrahydro-furan-2-il]-4,4,13,14-tetrametil-tetradecahidro-ciclopropa[9,10]ciclopenta[a]fenantren-16 $\beta$ -ílico del ácido 2-(L)-amino-3-metil-butírico, sal clorhidrato.

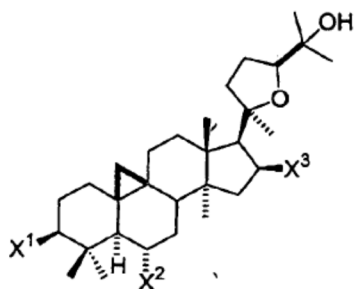
En una forma de realización, el compuesto se selecciona de los siguientes compuestos de fórmula I:



5

y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

Los compuestos ejemplares de fórmula I incluyen los compuestos en la siguiente tabla, con referencia a la fórmula I:



Número de compuesto	Nombre	X <sup>1</sup>	X <sup>2</sup>	X <sup>3</sup>
4	éster 6 $\alpha$ ,16 $\beta$ -dihidroxi-17-[5-(1-hidroxi-1-metil-etil)-2-metil-tetrahydro-furan-2-il]-4,4,13,14-tetrametil-tetradecahidro-ciclopropa[9,10]ciclopenta[a]fenantren-3 $\beta$ -ílico del ácido 2-(L)-amino-3-metil-butírico	-OC(O)CH(NH <sub>2</sub> ) CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	-OH	-OH
7	éster 6 $\alpha$ -(2-amino-3-metil-butiriloxi)-16 $\beta$ -hidroxi-17-[5-(1-hidroxi-1-metil-etil)-2-metil-tetrahydro-furan-2-il]-4,4,13,14-tetrametil-tetradecahidro-ciclopropa[9,10]ciclopenta[a]fenantren-3 $\beta$ -ílico del ácido 2-(L)-amino-3-metil-butírico	-OC(O)CH(NH <sub>2</sub> ) CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	-OC(O)CH(NH <sub>2</sub> ) CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	-OH
12	éster 3 $\beta$ ,16 $\beta$ dihidroxi-17-[5-(1-hidroxi-1-metil-etil)-2-metil-tetrahydro-furan-2-il]-4,4,13,14-tetrametil-tetradecahidro-ciclopropa[9,10]ciclopenta[a]fenantren-6 $\alpha$ -ílico del ácido 2-(L)-amino-3-metil-butírico	-OH	-OC(O)CH(NH <sub>2</sub> ) CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	-OH
14	éster 6 $\alpha$ , 16 $\beta$ -dihidroxi-17-[5-(1-hidroxi-1-metil-etil)-2-metil-tetrahydro-furan-2-il]-4,4,13,14-tetrametil-tetradecahidro-ciclopropa[9,10]ciclopenta[a]fenantren-3 $\beta$ -ílico del ácido 2-(L)-amino-3-metil-pentanoico	-OC(O)CH(NH <sub>2</sub> ) CH(CH <sub>3</sub> )CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-OH	-OH
30	éster 16 $\beta$ -hidroxi-17-[5-(1-hidroxi-1-metil-etil)-2-metil-tetrahydro-furan-2-il]-4,4,13,14-tetrametil-3-oxo-tetradecahidro-ciclopropa[9,10]ciclopenta[a]fenantren-6 $\alpha$ -ílico del ácido 2-(L)-amino-3-metil-butírico	=O	-OC(O)CH(NH <sub>2</sub> ) CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	-OH
32	éster 6 $\alpha$ -(2-amino-3-metil-pentanoiloxi)-16 $\beta$ -hidroxi-17-[5-(1-hidroxi-1-metil-etil)-2-metil-tetrahydro-furan-2-il]-4,4,13,14-tetrametil-tetradecahidro-ciclopropa[9,10]ciclopenta[a]fenantren-3 $\beta$ -ílico del ácido 2-(L)-amino-3-metil-pentanoico	-OC(O)CH(NH <sub>2</sub> ) CH(CH <sub>3</sub> )CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-OC(O)CH(NH <sub>2</sub> ) CH(CH <sub>3</sub> )CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-OH
36	éster 3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -dihidroxi-17-[5-(1-hidroxi-1-metil-etil)-2-metil-tetrahydro-furan-2-il]-4,4,13,14-tetrametil-tetradecahidro-ciclopropa[9,10]ciclopenta[a]fenantren-16 $\beta$ -ílico del ácido 2-(L)-amino-3-metil-butírico	-OH	-OH	-OC(O)CH (NH <sub>2</sub> )CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>

5 Un compuesto de la fórmula I anterior, cuando se formula en un solvente, es eficaz para producir un nivel de actividad telomerasa en queratinocitos o fibroblastos, medido en un ensayo TRAP, al menos el 50% mayor, al menos el 70% mayor, al menos el 80% mayor, o al menos el 90% mayor que el nivel en dichas células tratadas con dicho solvente, medido en un ensayo TRAP como se describe en el presente documento. En formas de realización adicionales, el compuesto es eficaz para producir un nivel de actividad telomerasa en queratinocitos o fibroblastos, medido en un ensayo TRAP, al menos el 100% mayor que el nivel en dichas células tratadas con dicho solvente, medido en un ensayo TRAP como se describe en el presente documento.

La invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más compuestos de fórmula I.

15 En un aspecto adicional, la invención proporciona el uso de un compuesto de fórmula I aislado para aumentar la telomerasa en una célula o tejido, poniendo en contacto la célula o tejido con dicho compuesto. De nuevo, esto puede incluir el paso de identificar una célula o tejido en el que se desea un aumento en actividad telomerasa.

### 20 III. Fuentes y síntesis de compuestos de fórmula I

Los compuestos de fórmula se pueden sintetizar como sigue.

25 Los astragalósidos I-VII se pueden aislar de raíz de *Astragalus membranaceus*, como se describe, por ejemplo, en A. Kadota *et al.*, documento JP Kokai No. 62012791 A2 (1987). Como se describe en el mismo, el tejido de la raíz (8 kg) que está comercialmente disponible de varias fuentes de hierbas beneficiosas, se somete a reflujo con MeOH, y

el extracto concentrado (200 g) se redisuelve en MeOH y se fracciona por cromatografía en columna en gel de sílice, usando mezclas de CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O como eluyentes. Cada fracción se procesa por cromatografía inversa en gel de sílice, usando mezclas de solventes similares, para dar las siguientes cantidades aproximadas de compuestos aislados: acetilastragalósido I (0,2 g), astragalósido I (3,5 g), isoastragalósido I (0,3 g), astragalósido II (2,3 g), astragalósido III (1,0 g), astragalósido IV (0,8 g), astragalósido V (0,1 g), astragalósido VI (0,3 g) y astragalósido VII (0,1 g). Véase también Kitagawa *et al.*, *Chem. Pharm. Bull.* 31(2):698-708 (1983b).

Se puede preparar cicloastragenol (**2**) por tratamiento de astragalósido IV (**1**) con HCl metanólico, seguido por neutralización, procesamiento estándar, y purificación por cromatografía como se describe en la sección experimental posteriormente (ejemplo 1). También se puede obtener cicloastragenol por degradación oxidativa (tratamiento con oxígeno y sodio elemental) de un extracto de butanol de *Astragalus membranaceus*, como se describe por P-H Wang *et al.*, *J. Chinese Chem. Soc.* 49:103-6 (2002).

La preparación de varias formas de realización de fórmula I, por ejemplo, compuestos que tienen grados variables de esterificación, alquilación o acilación, o grupos ceto, se puede preparar según métodos conocidos de síntesis orgánica, usando materiales de partida naturales y/o comercialmente disponibles tal como cicloastragenol, con separación de productos según sea necesario. Se dan varios ejemplos en la sección experimental posteriormente.

#### IV. Determinación de la actividad biológica

##### A. Protocolo del ensayo TRAP

Se puede determinar la capacidad de un compuesto para aumentar la actividad telomerasa en una célula usando el ensayo TRAP (protocolo de amplificación de repeticiones teloméricas), que se conoce en la técnica (por ejemplo, Kim *et al.*, patente en EE UU No. 5.629.154; Harley *et al.*, patente en EE UU No. 5.891.639). Como se usa en el presente documento, "actividad telomerasa medida en un ensayo TRAP" se refiere a la actividad telomerasa medida en queratinocitos o fibroblastos según el siguiente protocolo. La actividad típicamente se compara a la actividad similarmente medida en un ensayo control de tales células (por ejemplo, una actividad telomerasa el 50% mayor que la observada en un control de solvente).

Las líneas celulares adecuadas para uso en el ensayo, células mononucleares de sangre periférica humana normales (CMSP) o queratinocitos epidérmicos humanos (neonatales (HEK), se pueden obtener de fuentes comerciales, tal como Cascade Biologics, Portland, OP, o 4C Biotech, Seneffe, Bélgica, o de la ATCC (Colección Americana de Cultivos Tipo). Las líneas celulares de fibroblastos humanos normales de la ATCC, que se pueden localizar en la página web de la ATCC, incluyen, por ejemplo, CCL135, CCL137 y CCL151.

Por ejemplo, los queratinocitos epidérmicos humanos neonatales (HEK) se siembran en una placa de microtitulación de 96 pocillos a aproximadamente 5000 células/pocillo, en medio de crecimiento (por ejemplo, medio Epi-Life + suplemento de crecimiento de queratinocitos suministrados por Cascade Biologics, Inc.) y se incuban durante un día. Se añaden las composiciones de prueba en un solvente adecuado, tal como etanol al 95% o DMSO, a pocillos seleccionados en un intervalo de concentraciones y se incuban durante 24 +/- 1 horas adicionales.

Los compuestos que se van a probar primero se formulan a una concentración final deseada de 10X en DMSO al 10%. El compuesto formulado se añade al cultivo de 96 pocillos junto con un control de DMSO para proporcionar varias concentraciones del compuesto. La concentración final de DMSO puede ser del 1% en todos los pocillos. Para otros tipos celulares o en otras situaciones, se pueden desear concentraciones mayores o menores de DMSO.

Se puede realizar un ensayo de citotoxicidad en paralelo con el ensayo TRAP de telomerasa preparando una placa de cultivo en duplicado tratada con los mismos compuestos y usando un colorante que responde a metabolismo tal como azul alamar para evaluar el número de células al principio y al final de las incubaciones con los compuestos de prueba.

Si la citotoxicidad de los compuestos de prueba no se mide objetivamente, la morfología de las células tratadas se puede observar primero con el microscopio, para verificar que no hay signos visuales de crecimiento irregular.

Para realizar el ensayo TRAP, el medio se elimina de los pocillos, y las células se enjuagan dos veces en PBS (sin Ca ni Mg). Las placas se enfrían en hielo, y se añade tampón de lisis de Nonidet P40 (aproximadamente 100 µl por pocillo) y se trituran pipeteando arriba y abajo varias veces. Las células se incuban después en hielo durante 1 hora.

Alternativamente, las células se pueden recoger a las 24 h +/- 1 h eliminando el medio de crecimiento y lavando una vez con PBS (solución salina tamponada en fosfato) eliminando tanto medio como sea posible. Las células se lisan después añadiendo 50 µl de tampón M-Per (Pierce Cat# 78503 & 78501) e incubando en hielo durante 1 h +/- 15 min. La placa se centrifuga, opcionalmente, a 2000 RPM, 5 min. El lisado se recoge cuidadosamente de cada pocillo de la placa y se transfiere a una placa de 96 pocillos de almacenamiento con fondo en V nueva, dejando las células de la monocapa intactas.

Alternativamente, la solución de lisis de células se puede preparar añadiendo 3,0 ml de Nonidet® P40, 1,0 ml de tampón de lisis de CHAPS (véase a continuación), y 1,0 ml de tampón de TRAP 10X (véase a continuación) a 5,0 ml de H<sub>2</sub>O sin DNasa ni RNasa (el agua sin DNasa ni RNasa se puede generar por tratamiento con DEPC (pirocarbonato de dietilo) o comprar de vendedores tales como Sigma).

5

<u>Solución madre</u>	<u>Para 1 ml</u>	<u>Concentración final</u>
Tris-HCl 1 M pH 7,5	10 µl	10 mM
MgCl <sub>2</sub> 1 M	1 µl	1 mM
EGTA 0,5 M	2 µl	1 mM
AEBSF 100 mM	1 µl	0,1 mM
CHAPS <sup>a</sup> al 10%	50 µl	0,5%
BSA	1 mg	1 mg/ml
Glicerol al 100%	100 µl	10%
H <sub>2</sub> O sin DNasa ni RNasa	936 µl (hasta 1 ml)	

<sup>a</sup> El detergente CHAPS se añade justo antes del uso del tampón de lisis. Además, AEBSF (fluoruro de 4-(2-aminoetil)-bencenosulfonilo HCl) se añade al tampón de lisis justo antes del paso de extracción.

10

El nivel de actividad telomerasa en los lisados celulares se mide usando un ensayo TRAP

<u>Solución madre</u>	<u>Concentración final</u>
Tris-HCl 1 M pH 8,3	200 mM
MgCl <sub>2</sub> 1 M	15 mM
KCl 1 M	650 mM
Tween 20 (Boehringer Mannheim)	0,5%
EGTA 0,1 M	10 mM
BSA 20 mg/ml	1 mg/ml

15 Se combinan los siguientes materiales para generar una muestra maestra de PCR

<u>Solución madre</u>	<u>Por reacción (45 µl)</u>	<u>Concentración final<sup>a</sup></u>
Tampón TRAP 10X	5,0 µl	1X
dNTP 2,5 mM	1,0 µl	50 µM
Cebador Cy5-TS (0,5 mg/ml)	0,1 µl	1 ng/ml
Cebador ACX (0,1 mg/ml)	1,0 µl	2 ng/ml
Taq polimerasa (5 U/µl)	0,4 µl	0,04 unidades/µl
Extracto celular	5-10 µl	
H <sub>2</sub> O sin DNasa ni RNasa	32,5-37,5 µl (hasta 45 µl totales)	

<sup>a</sup> Basado en un volumen final de mezcla de PCR de 40 µl más 10 µl de lisado celular = 50 µl.

20 La mezcla de PCR incluye los siguientes componentes: cebador Cy5-TS, un oligonucleótido marcado en 5' con Cy5 que tiene la secuencia 5'-AAT CCG TCG AGC AGA GTT-3' (SEQ ID NO:1), es un sustrato de telomerasa. Dependiendo de la actividad telomerasa en el medio, se añadirán repeticiones de telómero (que tienen la secuencia (AGGGTT)<sub>n</sub> al sustrato, para formar productos de telomerasa extendidos, también denominados productos de telomerasa. El cebador ACX, que tiene la secuencia 5'- GCG CGG CTT ACC CTT ACC CTT ACC CTA ACC-3' (SEQ ID NO: 2), es un cebador inverso anclado que hibrida con los productos extendidos de telomerasa.

25

Se añade una muestra de lisado celular (por ejemplo, 5 µl) a la mezcla de PCR en un tubo de reacción, y la extensión de telómeros y amplificación por PCR se hace en la máquina de PCR de mesa con los siguientes perfiles de ciclo: 30°C durante 30 minutos, repetir 28 ciclos de la siguiente reacción de 3 pasos: 94°C/30 s, 60°C/30 s, y 72°C/1 min, seguido por 72°C/4 minutos y mantener a 4°C.

30

Se añade colorante de carga que contiene, por ejemplo, azul de bromofenol y xileno cianol, y las muestras se someten a PAGE no desnaturalizante del 10-15% en TBE 1x, hasta que el azul de bromofenol se sale del gel. El producto de reacción TRAP se observa, por ejemplo, usando un fluorimager para la detección de productos de telomerasa marcados con CY5 (excitación máxima a 650 nm; emisión máxima a 670 nm).

35

La actividad telomerasa se puede medir por vol. de pixeles capturados total (bandas de la escalera de ADN) por encima del fondo para cada carril del gel. La actividad se puede normalizar midiendo el ARN total (ng/ml) usando el kit de cuantificación de ARN Ribogreen® de Molecular Probes, cat # R-11490 y según las condiciones comercialmente recomendadas con un intervalo de estándar de ARN de 0,8-200 ng/ml, dilución 1:200 del colorante RG, dilución de la muestra 100-250x.

40

Vol de pixeles totales/ARN = Actividad telomerasa relativa normalizada

El número de células (usado para evaluar la citotoxicidad) era directamente proporcional a la lectura de azul alamar.

5 Alternativamente, se puede añadir un conjunto de estándar interno y cebador para fines de cuantificación. El estándar interno TSU2 un oligonucleótido que tiene la secuencia 5'-AAT CCG TCG AGC AGA GTT AAA AGG CCG AGA AGC GAT-3'; SEQ ID NO:3), una extensión de la secuencia del cebador TS, se añade en una pequeña cantidad controlada. El cebador U2, que tiene la secuencia 5'-ATC GCT TCT CGG CCT TTT (SEQ ID NO:4), es un cebador inverso diseñado para hibridar con la región 3' del estándar interno.

10 La cantidad final del estándar interno TSU2 después de la amplificación generalmente es 5-10 pmol por mezcla de reacción de 50  $\mu$ l. Este control interno da un producto de amplificación por PCR 36-mero específico que aparece como una banda distinta en el gel por debajo del primer producto de adición de telómero (es decir, el producto de una adición de telómero al oligonucleótido TS, seguido por amplificación con el cebador de retorno ACX). Esta banda de control interno se puede usar para normalizar las amplificaciones de PCR de diferentes muestras.

15 El número relativo de moléculas de producto de telomerasa (TM) generadas en el ensayo se determina según la fórmula a continuación:

$$20 \quad TM = (T_{\text{productos TRAP}} - T_{\text{BDK1}}) / (T_{\text{est int}} - T_{\text{BDK2}})$$

25 donde:  $T_{\text{productos TRAP}}$  es la intensidad total medida en el gel para todos los productos de telomerasa,  $T_{\text{BDK1}}$  es la intensidad del fondo medida en un carril blanco para un área equivalente en tamaño a la abarcada por los productos de telomerasa,  $T_{\text{est int}}$  es la intensidad para la banda del estándar interno, y  $T_{\text{BDK2}}$  es la intensidad de fondo medida en un carril blanco para un área equivalente a la abarcada por la banda del estándar interno. El número resultante es el número de moléculas de productos de telomerasa generados para un tiempo de incubación determinado que, para los fines de determinar TM, se designa en el presente documento como 30 minutos.

30 Los compuestos de fórmula I como se describen anteriormente son capaces de producir, a una concentración de 1  $\mu$ M o menor, un nivel de actividad telomerasa en fibroblastos o queratinocitos al menos el 50% mayor que la vista en un control de solvente. Incluso actividades más potentes pueden ser apropiadas para algunas aplicaciones, tales como compuestos que producen actividades telomerasa al menos aproximadamente el 75%, el 100% o el 500% mayor que el nivel de tal actividad vista en un control de solvente, medida en el ensayo TRAP descrito, a concentraciones de 10  $\mu$ M o menores.

35 La eficacia en aumentar la actividad telomerasa se evaluó para compuestos de fórmula I anteriores en varias concentraciones. Los ensayos se llevaron a cabo en células HEKneoP (queratinocitos neonatales), según el protocolo descrito anteriormente. Las concentraciones típicamente variaron desde aproximadamente 0,001  $\mu$ M a 10  $\mu$ M en DMSO.

40 La capacidad de los compuestos para aumentar la actividad de telomerasa se muestra en la tabla 2.

#### B. Protocolo de ensayo de cicatrización

45 Los compuestos de fórmula I se pueden usar para fomentar la cicatrización de heridas, quemaduras, abrasiones u otras afecciones agudas o crónicas de la epidermis como se discute más adelante. Como se usa en el presente documento, "actividad de cicatrización medida en un ensayo de raspado" se refiere a la actividad medida en queratinocitos o fibroblastos según el siguiente protocolo, y expresada como el valor de WH mostrado en la fórmula posteriormente.

50 Las células se siembran en botellas ( $5 \times 10^5$  células por botella) y se cultivan durante 2 días en una cámara humidificada con  $\text{CO}_2$  al 5%, 37°C. Para crear la "herida", una pipeta de plástico de 2 ml se arrastra suavemente para "raspar" la superficie celular. La herida ideal es de aproximadamente 2-3 mm de anchura y 50 mm de longitud (a lo largo del eje largo de la botella de cultivo celular). Las células se vuelven a tratar con medio que contiene o bien vehículo (DMSO; muestra control) o composiciones de prueba en múltiples concentraciones. Se identifica un área de herida, la botella se marca, y el aspecto de las células se documenta fotográficamente durante 3-4 días de cultivo continuado de las células.

55 La cantidad de cierre de herida se determina midiendo la anchura de la herida a lo largo del tiempo para muestras tratadas con compuestos relativa a las células tratadas con vehículos u otras células control. Las medidas se hacen a partir de fotografías tomadas para cada una de las muestras los días 1 (inmediatamente después de raspar), 2, 3, y 4. Se calcula el porcentaje de cicatrización (también expresado como como "actividad de cicatrización") mediante la siguiente fórmula:

$$65 \quad WH = 100 - [100 \times W_n/W_0],$$

donde  $W_n$  es la anchura de la herida el día  $n$  y  $W_0$  es la anchura de la herida el día uno (es decir, inmediatamente después de raspar).

#### V. Indicaciones terapéuticas y tratamiento

La presente invención proporciona el uso de una formulación de un compuesto de fórmula I aislado como se ha divulgado en la sección II anteriormente, en una cantidad eficaz para aumentar la actividad telomerasa en la célula para aumentar la actividad telomerasa en una célula, poniendo en contacto una célula o tejido con dicha formulación. El método puede incluir el paso preliminar de identificar una célula o tejido en el que se desea un aumento de la actividad telomerasa. La célula puede estar en cultivo, es decir, *in vitro* o *ex vivo*, o en un sujeto o paciente *in vivo*.

Los beneficios que se van a llevar a cabo de un aumento en la actividad telomerasa en una célula o tejido incluyen, por ejemplo, aumento de la capacidad replicativa y/o tiempo de vida de las células puestas en contacto y capacidad funcional mejorada de las células (es decir, expresión mejorada de las funciones diferenciadas normales de las células). Esto puede comprender además diagnosticar una afección en un sujeto o paciente en donde se desea un aumento en la actividad telomerasa en las células o tejido del paciente; por ejemplo, diagnosticar una enfermedad objeto para tratamiento por un aumento en actividad telomerasa en células o tejido. Según esto, la invención proporciona el tratamiento de una afección en un paciente, aumentando la actividad telomerasa en células o tejido de dicho paciente, por lo cual se va a administrar una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula I como se ha divulgado en la sección II anteriormente a un sujeto en necesidad de tal tratamiento. Una "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad eficaz para aumentar la actividad telomerasa en las células o tejido del paciente, de modo que se alcance un resultado terapéutico.

Tales afecciones o enfermedades para tratamiento o prevención pueden incluir, por ejemplo, afecciones asociadas con senescencia celular o con una velocidad aumentada de proliferación de una célula en ausencia de telomerasa, lo que produce pérdida de repeticiones del telómero acelerada. Mediante "velocidad aumentada de proliferación" se quiere decir una velocidad mayor de división celular comparada con células normales de ese tipo celular, o comparada con células normales en otros individuos de ese tipo celular. La senescencia de esos grupos de células a una edad anómalamente temprana puede finalmente producir enfermedad (véase, West *et al.*, patente en EE UU No. 6.007.989).

Existen varios estados de enfermedad en los que un aumento en la actividad telomerasa en ciertos tipos de células puede ser beneficioso. Según esto, la invención proporciona el tratamiento de una afección o enfermedad en un paciente seleccionado de lo siguiente, aumentando la actividad telomerasa en las células del paciente, que comprende administrar a un sujeto en necesidad de tal tratamiento, una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula I como se ha descrito anteriormente. En algunos casos, la afección también se puede someter a tratamiento por terapia celular *ex vivo*, como se describe además posteriormente, empleando los tipos celulares asociados (indicados entre paréntesis).

- (a) enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, e ictus (células del sistema nervioso central incluyendo neuronas, células de glía, por ejemplo, astrocitos, células endoteliales, fibroblastos),
- (b) enfermedades seniles de la piel, tal como atrofia y adelgazamiento dérmico, elastolisis y arrugas en la piel, hiperplasia o hipoplasia de las glándulas sebáceas, lentigo senil y otras anomalías de la pigmentación, encanecimiento del pelo y pérdida o adelgazamiento del pelo, o úlceras de piel crónicas (fibroblastos, células de glándulas sebáceas, células de folículo piloso),
- (c) enfermedad articular degenerativa (células del cartílago articular, tal como condrocitos y fibroblastos lacunares y sinoviales),
- (d) osteoporosis y otras afecciones degenerativas del sistema esquelético (células del sistema esquelético, tal como osteoblastos, células estromales o mesenquimatosas de la médula ósea, células osteoprogenitoras),
- (e) enfermedades seniles y relacionadas con el estrés del sistema vascular incluyendo aterosclerosis, calcificación, trombosis y aneurismas (células del corazón y sistema vascular, incluyendo células endoteliales, células de músculo liso, y fibroblastos adventicios),
- (f) degeneración macular senil (células del ojo, tal como células del epitelio pigmentadas y vasculares endoteliales),
- (g) SIDA (células  $CD8^+$  restringidas por VIH),
- (h) alteración del sistema inmunitario senil y relacionado con el estrés, incluyendo alteración del recambio de tejidos, que se produce con el envejecimiento natural, cáncer, terapia contra el cáncer, infecciones agudas o crónicas, o con trastornos genéticos que producen recambio celular acelerado, y anemias relacionadas y otras afecciones degenerativas (otras células del sistema inmunitario, incluyendo células en los linajes linfocitoide, mielocitoide y eritocitoide, tal como linfocitos B y T, monocitos, macrófagos circulantes y especializados de tejido, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, células NK, y sus respectivos progenitores), y
- (i) fibrosis pulmonar o cirrosis hepática o fibrosis hepática;
- (j) enfermedades gastrointestinales inflamatorias crónicas tal como esófago de Barrett; y
- (k) síndrome de insuficiencia de la médula ósea, anemia aplásica, anemia mielodisplásica o síndrome mielodisplásico.



Además de los tipos celulares indicados anteriormente, tipos celulares adicionales en los que un aumento en la actividad telomerasa puede ser terapéuticamente beneficioso incluyen, pero no están limitados a, células del hígado, glándulas endocrinas y exocrinas, musculatura lisa, o musculatura esquelética.

5 Como ejemplo, en el caso de individuos infectados con VIH, el recambio de células CD8<sup>+</sup> está aumentado ya que estas células intentan controlar el nivel de células CD4<sup>+</sup> infectadas con VIH. En el SIDA (punto (g) anteriormente), se cree que la enfermedad está causada por la senescencia temprana de células CD8<sup>+</sup> restringidas por VIH. El envejecimiento de tales células se atribuye no solamente a la cantidad anormal de pérdida de secuencias de telómeros por duplicación celular, sino, además, a la velocidad replicativa aumentada de las células, de modo que el desgaste del telómero es mayor de lo normal para ese grupo de células. Por tanto, la invención proporciona una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula I como se ha divulgado en la sección II anteriormente para uso en tratar un sujeto infectado con VIH, y más particularmente de reducir la senescencia temprana de células CD8<sup>+</sup> restringidas por VIH en un sujeto infectado por VIH, por lo cual el compuesto se va administrar a un sujeto en necesidad de tal tratamiento.

Un aumento en la actividad telomerasa puede beneficiar a células que no se dividen, así como a células que proliferan, por ejemplo, en afecciones asociadas con susceptibilidad aumentada a muerte celular debido a estrés, tal como isquemia en insuficiencia cardíaca o en ictus (véase, por ejemplo, Oh y Schneider, *J Mol Cell Cardiol* 34(7):717-24; Mattson, *Exp Gerontol.* 35(4):489-502). Por tanto, la invención proporciona una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula I como se ha divulgado en la sección II anteriormente para uso en reducir la muerte celular inducida por estrés o daño al ADN en un sujeto, tal como un sujeto que experimenta estados isquémicos en tejido debido a insuficiencia cardíaca o ictus, aumentando la actividad telomerasa en células del sujeto, por lo cual dicho compuesto se va a administrar a un sujeto en necesidad de tal tratamiento. Como se ha indicado anteriormente, esto puede incluir el paso preliminar de diagnosticar en el sujeto la afección indicada.

En otro aspecto, las composiciones se pueden usar en el tratamiento de individuos en los que uno o más tipos celulares son limitantes en ese paciente, y cuya vida se puede extender extendiendo la capacidad de esas células para seguir la replicación o resistir la muerte celular inducida por estrés. Un ejemplo de tal grupo de células es linfocitos presentes en pacientes de síndrome de Down. Por tanto, la invención proporciona un método de aumentar la capacidad replicativa y/o tiempo de vida de linfocitos presentes en un paciente de síndrome de Down, aumentando la actividad telomerasa en dichas células del paciente, que comprende administrar a tal paciente una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula I como se ha divulgado en la sección II anteriormente. Las composiciones también se pueden usar para mejorar la resistencia a muerte celular inducida por estrés que se produce durante el envejecimiento normal.

En un aspecto adicional de la invención, aumentar la actividad telomerasa es eficaz para prevenir fibrosis pulmonar o para fomentar la curación de fibrosis pulmonar. Se ha determinado que los telómeros cortos son una firma de fibrosis pulmonar idiopática y de cirrosis hepática criptogénica (Alder et al., *PNAS* (2008) 105(35) 13051-13056). Los presentes compuestos se pueden usar para tratar fibrosis pulmonar o cirrosis hepática.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un compuesto aislado de fórmula I como se ha definido anteriormente para uso en aumentar el trasplante de un tejido de un donante vivo o cadáver a un paciente o sujeto vivo, por lo cual el tejido de trasplante se pone en contacto con dicho compuesto. En un aspecto adicional, la invención proporciona un compuesto aislado de fórmula I como se ha definido anteriormente para uso en aumentar el trasplante de un tejido a un paciente o sujeto vivo, por lo cual el compuesto se va a administrar al paciente bien antes, simultáneo con, o durante un periodo de tiempo después del trasplante del tejido en el paciente. El tejido trasplantado puede ser tejido sólido, tal como un riñón, corazón, pulmones, etc., o tejido hematopoyético tal como, sin limitación, células sanguíneas tal como leucocitos, linfocitos o células precursoras hematopoyéticas que pueden derivar de la médula ósea.

En un aspecto adicional de la invención, aumentar la actividad telomerasa es eficaz para fomentar la cicatrización de heridas, quemaduras, abrasiones u otras afecciones agudas o crónicas de la epidermis. Por tanto, la invención proporciona una cantidad eficaz de una formulación de un compuesto aislado de fórmula I como se ha divulgado anteriormente en la sección II para uso en tratar una afección aguda o crónica de la epidermis, por lo cual dicha formulación se va a administrar a un paciente en necesidad de tal tratamiento, por vía tópica al área afectada.

Como se usa en el presente documento, una "afección aguda o crónica de la epidermis" incluye afecciones agudas tal como lesiones padecidas en traumatismo, quemaduras, abrasiones, incisiones quirúrgicas, sitios donantes de injertos, y lesiones causadas por agentes infecciosos, y afecciones crónicas tal como úlcera venosa crónica, úlcera diabética, úlcera de compresión, llagas de presión, y úlceras o llagas de la superficie mucosa. También se incluyen lesiones de la piel o superficie epitelial causadas por una afección inflamatoria o infección persistente, o por un defecto genético (tal como formación de queloides y anomalías de coagulación). Véase, por ejemplo, la publicación PCT No. WO 02/91999.

Los efectos deseables de un aumento en la actividad telomerasa en tal tratamiento incluyen proliferación o migración celular en el sitio de tratamiento, epitelización de la superficie, cierre de una herida si está presente, o restablecimiento de función fisiológica normal. Mediante “epitelización” o “reepitelización” de un sitio de tratamiento se quiere decir un aumento en la densidad de células epiteliales en el sitio como resultado de la terapia aplicada.

Los compuestos y formulaciones también se pueden usar para aumentar el crecimiento de células injertadas. Los efectos deseables de un aumento en la actividad telomerasa en tal tratamiento incluye cobertura del sitio de tratamiento, supervivencia de las células injertadas, falta de rechazo inmunitario, cierre de una herida si está presente, o restablecimiento de la función fisiológica normal. Las células injertadas pueden participar en el cierre de la herida bien participando directamente en el proceso de cicatrización (por ejemplo, volviéndose parte del tejido cicatrizado) o cubriendo la herida y proporcionando de esta manera un entorno que fomenta la cicatrización por células huésped.

La invención también contempla la manipulación de la piel y la reparación de cualquier defecto percibido en la superficie de la piel.

En un aspecto adicional, los compuestos y composiciones de la invención se pueden usar para aumentar la capacidad replicativa y/o extender el tiempo de vida de células en cultivo, por ejemplo, en terapia celular *ex vivo* o *in vitro* o en la producción de anticuerpos monoclonales, aumentando la actividad telomerasa en las células. Aumentar la actividad telomerasa aumenta la capacidad replicativa de tales células ralentizando la pérdida de repeticiones teloméricas y/o mejorando la resistencia a muerte celular inducida por estrés durante la proliferación celular.

En el caso de aplicaciones *ex vivo*, se añade una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula I como se ha descrito anteriormente a células de explante obtenidas de un sujeto. Una “cantidad eficaz” se refiere a una cantidad eficaz para aumentar la actividad telomerasa en las células, aumentando de esta manera la capacidad replicativa y/o el tiempo de vida de las células.

Las células de explante pueden incluir, por ejemplo, células madre, tal como células madre de médula ósea (patente en EE UU No. 6.007.989), células estromales de médula ósea (Simonsen *et al.*, *Nat Biotechnol* 20(6):592-6, 2002), o células corticosuprarrenales (Thomas *et al.*, *Nat Biotechnol* 18(1):39-42, 2000). Los estados de enfermedad tal como los indicados en los puntos (a)-(g) anteriormente también se pueden someter a terapia celular *ex vivo*. Los ejemplos incluyen el uso de células satélite de músculo para el tratamiento de distrofia muscular, osteoblastos para tratar osteoporosis, células epiteliales pigmentadas de la retina para degeneración macular senil, condrocitos para artrosis, etcétera.

Por ejemplo, el reconocimiento de que células CD8<sup>+</sup> funcionales son limitantes en pacientes de SIDA para controlar la expansión de células CD4<sup>+</sup> infectadas permite que se idee un protocolo terapéutico en el que células CD8<sup>+</sup> restringidas por VIH se retiran de un individuo infectado por VIH en una fase temprana, al principio de detectar el SIDA, se almacenan en un banco y después se reintroducen en el individuo en una fase más tardía, cuando el individuo ya no tiene disponibles las células CD8<sup>+</sup> requeridas. Por tanto, la vida de un individuo se puede extender mediante un protocolo que implica la administración continuada de las células limitantes de ese individuo en puntos de tiempo apropiados. Estos puntos apropiados se pueden determinar siguiendo la senescencia de células CD8<sup>+</sup>, o determinando la longitud de los telómeros en tales células CD8<sup>+</sup>, como una indicación de cuando esas células se volverán senescentes. Según la invención, las células almacenadas se pueden expandir en número en presencia de un agente que ralentiza la pérdida de repeticiones de telómeros, es decir, compuesto de fórmula I como se ha divulgado en la sección II anteriormente.

Según esto, la invención proporciona métodos de terapia celular *ex vivo*, que incluyen obtener una población celular de un sujeto, y expandir la población celular *ex vivo*, en donde la población celular se trata con un compuesto de fórmula I como se ha divulgado en la sección II anteriormente, en una cantidad eficaz para aumentar la actividad telomerasa y aumentar de esta manera la capacidad replicativa y/o tiempo de vida de la población celular. El método generalmente incluye diagnosticar en un sujeto una afección objeto al tratamiento por terapia celular *ex vivo*, tal como las indicadas anteriormente.

En una forma de realización adicional, la invención proporciona un método de proliferación de células madre, en donde una población de células madre se trata con un compuesto de fórmula I como se ha divulgado en la sección II anteriormente, en una cantidad eficaz para aumentar la actividad telomerasa y aumentar de esta manera la capacidad replicativa y/o tiempo de vida de la población celular.

## VI. Formulaciones y métodos de administración

La invención abarca métodos de preparar composiciones farmacéuticas útiles para aumentar la actividad telomerasa en una célula y/o fomentar la cicatrización. Según esto, un compuesto de fórmula I aislado como se ha descrito en la sección II se combina con un excipiente farmacéutico, y opcionalmente con otros agentes medicinales, adyuvantes, y similares, que pueden incluir ingredientes activos e inactivos. Las composiciones pueden tomar la forma de formas farmacéuticas sólidas, semisólidas, polvo liofilizado, o líquidas, tal como, por ejemplo, comprimidos, cápsulas,

polvos, formulaciones de liberación sostenida, soluciones, suspensiones, emulsiones, supositorios, cremas, pomadas, lociones, aerosoles, o similares. Las formulaciones se pueden proporcionar en formas farmacéuticas unitarias adecuadas para la administración sencilla de dosis precisas.

5 También se puede formular un compuesto de fórmula I aislado para la administración oral. Para una administración farmacéutica oral, los excipientes adecuados incluyen grados farmacéuticos de soportes tal como manitol, lactosa, glucosa, sacarosa, almidón, celulosa, gelatina, estearato de magnesio, sacarina sódica y/o carbonato de magnesio. Para uso en formulaciones líquidas orales, la composición se puede preparar como una solución, suspensión, emulsión, o jarabe, que se suministra bien en forma sólida o líquida adecuada para hidratación en un soporte acuoso, tal como, por ejemplo, solución salina acuosa, dextrosa acuosa, glicerol, o etanol, polietilenglicol, dihidroxiestearato de macrogol-15 o, por ejemplo, agua o solución salina normal. Si se desea, la composición también puede contener cantidades minoritarias de sustancias auxiliares no tóxicas tal como agentes humectantes, agentes emulsionantes, o tampones.

15 Para uso en cicatrización o tratamiento de otras afecciones agudas o crónicas de la epidermis, un compuesto de fórmula I se formula para administración tópica. El vehículo para la aplicación tópica puede estar en una de varias formas, por ejemplo, una loción, crema, gel, pomada, barra, espray o pasta. Estas formas de producto se pueden formular según métodos conocidos. Pueden comprender varios tipos de soportes incluyendo, pero no limitado a, soluciones, aerosoles, emulsiones, geles, y liposomas. El soporte se puede formular, por ejemplo, como una emulsión que tiene una base de aceite en agua o agua en aceite. Los componentes hidrofóbicos (oleaginosos) adecuados empleados en emulsiones incluyen, por ejemplo, aceites vegetales, grasas y aceites animales, hidrocarburos sintéticos, y ésteres y alcoholes de los mismos, incluyendo poliésteres, así como aceites de organopolisiloxanos. Tales emulsiones también incluyen un emulsionante y/o tensioactivo, por ejemplo, un tensioactivo no iónico, tal como los que se conocen bien en la técnica, para dispersar y resuspender la fase discontinua en la fase continua.

La formulación tópica típicamente contiene uno o más componentes seleccionados de un agente estructurante, un espesante o agente gelificante, y un emoliente o lubricante. Los agentes estructurantes frecuentemente empleados incluyen alcoholes de cadena larga, tal como alcohol estearílico, y éteres o ésteres de glicerol y éteres o ésteres de oligo(óxido de etileno) de los mismos. Los espesantes y agentes gelificantes incluyen, por ejemplo, polímeros de ácido acrílico o metacrílico y ésteres de los mismos, poliacrilamidas, y espesantes naturales tal como agar, carragenano, gelatina, y goma guar. Los ejemplos de emolientes incluyen ésteres triglicéridos, ésteres y amidas de ácidos grasos, ceras, tal como cera de abeja, espermaceti o cera carnauba, fosfolípidos tal como lecitina, y esteroides y ésteres de ácidos grasos de los mismos. Las formulaciones tópicas pueden incluir además otros componentes como se sabe en la técnica, por ejemplo, astringentes, fragancias, pigmentos, agentes potenciadores de penetración en la piel, protectores solares, etc.

Las composiciones farmacéuticas también se pueden formular para la administración por vía parenteral, transdérmica, o por inhalación. Una composición inyectable para la administración parenteral típicamente contiene el principio activo en una solución IV adecuada, tal como solución salina fisiológica estéril. La formulación también se puede formular como una suspensión en un lípido o fosfolípido, en una suspensión liposómica, o en una emulsión acuosa.

Para la administración por inhalación, el principio activo se formula como partículas de aerosol sólidas o líquidas. La formulación también puede incluir un propelente y/o un dispersante tal como lactosa, para facilitar la formación de aerosol. Para la administración transdérmica, el principio activo se incluye en un parche transdérmico, que permite la administración lenta del compuesto a una región de la piel seleccionada, y que también puede incluir sustancias potenciadoras de la penetración, tal como alcoholes alifáticos o glicerol.

50 Los métodos para preparar tales formulaciones los conocen o serán aparentes para los expertos en la materia; por ejemplo, véase, *Remington's Pharmaceutical Sciences* (19ª Ed., Williams & Wilkins, 1995). La composición que se va a administrar contendrá una cantidad del compuesto seleccionado en una cantidad farmacéuticamente segura y eficaz para aumentar la actividad telomerasa en las células o tejido diana.

55 La composición farmacéutica contiene al menos el 0,1% (p/v) de un compuesto de fórmula I como se ha descrito anteriormente, mayor del 0,1%, hasta aproximadamente el 10%, hasta aproximadamente el 5%, y hasta aproximadamente el 1% (p/v). La elección de una concentración adecuada depende de factores tales como la dosis deseada, frecuencia y método de administración del principio activo.

60 Para el tratamiento de un sujeto o paciente, tal como un mamífero o un paciente humano, se determinan las dosis basándose en factores tales como el peso y la salud global del sujeto, la afección tratada, gravedad de los síntomas, etc. Se determinan las dosis y concentraciones para producir el beneficio deseado al tiempo que se evita cualquier efecto secundario no deseado. Las dosis típicas de los compuestos objeto están en el intervalo de 1-50 mg/kg/día, 1-25 mg/kg/día, 1-20 mg/kg/día, 4-15 mg/kg/día. Las dosis típicas de los compuestos objeto están en el intervalo de aproximadamente 1 a 1.500 mg/día para un paciente humano, aproximadamente 1-500 mg/día. En formas de

realización específicas, por ejemplo, el compuesto designado en el presente documento como **4** se administra a un nivel de al menos 1 mg/kg/día o al menos 5 mg/kg/día.

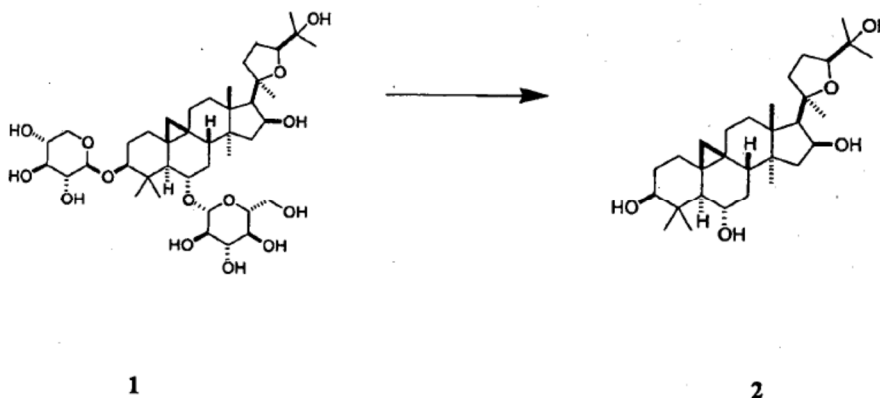
La administración de compuestos de fórmula I puede ser en días alternos, a diario, dos veces al día o con más frecuencia. La administración puede ser una vez, durante 1-20 días, durante 5-10 días, o continuamente durante tanto como sea necesario para prevenir o tratar la enfermedad o afección que se previene o trata.

Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración y no a modo de limitación.

## 10 Ejemplos

Los compuestos 1, 2, 5, 8, 16, 18, 20, 22 y 27 se divulgan en el presente documento como compuestos comparativos. Los compuestos 3, 6, 9, 10, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23-26, 28, 29, 31 y 33-35 son intermedios para la preparación de los compuestos de la invención.

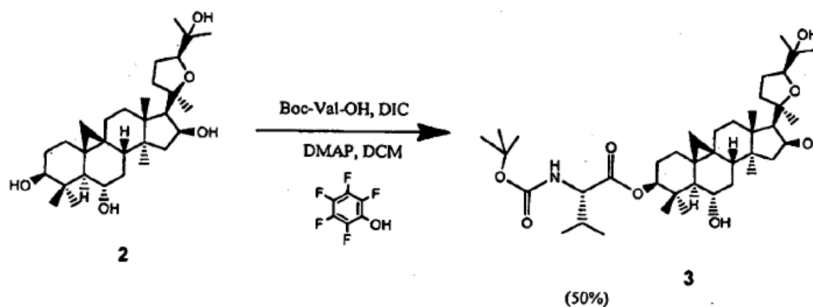
**Ejemplo 1.** Conversión de astragalósido IV (**1**) a 17-[5-(1-hidroxi-1-metil-etil)-2-metil-tetrahydro-furan-2-il]-4,4,13,14-tetrametil-tetradecahidro-ciclopropa[9,10]ciclopenta[a]fenantreno-3 $\beta$ ,6 $\alpha$ ,16 $\beta$ -triol [**cicloastragenol**] (**2**)



A astragalósido IV (**1**) (5,00 g, mmol) se añadió "HCl-MeOH 10" (TCI America) (500 ml) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 7 días. La mezcla de reacción se concentró hasta aproximadamente la mitad del volumen a presión reducida a 20°C (sin calentar). La mezcla se repartió en bicarbonato de sodio acuoso y acetato de etilo. La fase acuosa se extrajo con acetato de etilo de nuevo. Las fases orgánicas se combinaron, se lavaron con cloruro de sodio saturado, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, y se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna (cloroforno/metanol de 20:1 ~ 14:1). Para sustituir el solvente residual con etanol, el material purificado se disolvió en etanol y el solvente se eliminó a presión reducida para dar **2** (2,1 g, 64%).

$^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 0,34 (d,  $J = 4,7$  Hz, 1H), 0,48 (d,  $J = 4,3$  Hz, 1H), 0,92 (s, 3H), 0,93 (s, 3H), 1,0-1,8 (m, 13H), 1,11 (s, 3H), 1,19 (s, 3H), 1,22 (s, 6H), 1,27 (s, 3H), 1,9-2,0 (m, 4H), 2,30 (d,  $J = 7,8$  Hz, 1H), 2,54 (q,  $J = 11,8$  Hz, 1H), 3,27 (m, 1H), 3,50 (m, 1H), 3,72 (t,  $J = 7,4$  Hz, 1H), 4,65 (q,  $J = 7,4$  Hz, 1H), ESI-MS  $m/z$  Positivo 491 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ , Negativo 549 ( $\text{MA}-\text{AcO}$ ). TLC (Merck, Kieselgel 60)  $R_f = 0,33$  (cloroforno/metanol 6:1)

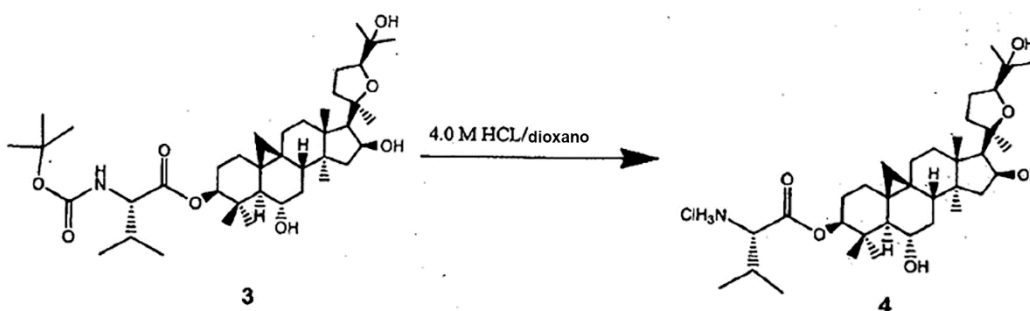
**Ejemplo 2.** Preparación del éster 6 $\alpha$ ,16 $\beta$ -dihidroxi-17-[5-(1-hidroxi-1-metil-etil)-2-metil-tetrahydro-furan-2-il]-4,4,13,14-tetrametil-tetradecahidro-ciclopropa[9,10]ciclopenta[a]fenantren-3 $\beta$ -ílico del ácido 2-(L)-amino-3-metil-butírico, sal clorhidrato [**C3-(L)-valil-cicloastragenol**] (**4**)



40

Preparación de **3**: Se disolvió Boc-(L)-valina-OH (18 g, 81,63 mmoles) (Bachem, Torrance, CA) en 150 ml de diclorometano (DCM). A esto se añadieron 15 g (81,63 mmol) de pentafluorofenol. La reacción se enfrió en un baño de hielo seguido por la adición lenta de 12,8 ml (81,63 mmol) de 1,3-diisopropilcarbodiimida (DIC). Después de la adición completa la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos tiempo en que la mezcla de reacción se volvió turbia (precipitación de diisopropilcarbodiimida-urea). A esta mezcla se añadieron después 10 g (20,41 mmol) de (**2**) seguido por 10 g (81,63 mmol) de dimetilaminopiridina (DMAP) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. La mezcla de reacción se transfirió a un embudo separador y se lavó con H<sub>2</sub>O (2x), HCl ac. al 1% (2x), NaOH ac. 0,1 N (2x), NaHCO<sub>3</sub> sat. (3x), H<sub>2</sub>O (1x) y salmuera (1x), la fase orgánica se separó, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y el solvente se evaporó al vacío. El residuo se purificó usando cromatografía rápida con gradiente de solvente de MeOH del 2%-5% en DCM para proporcionar 7,0 (50%) del producto diana **3** junto con 6,0 g (33%) del producto bis.

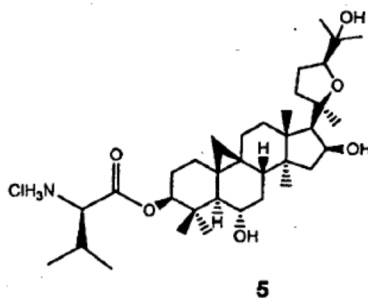
<sup>1</sup>H RMN para **3**: (CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 0,38 (1H, bs), 0,52 (1H, bs), 0,90-1,38 (m, 30H), 1,39-1,45(s,m 12H), 1,59-1,63 (m, 5H), 1,76-1,82(m, 2H), 1,96-2,01(m, 4H), 2,16-2,20 (m, 1H), 2,30-2,35 (d, 1H), 2,49-2,54 (q, 1H), 3,45-3,57 (t, 1H), 3,71-3,76(t, 1H), 4,19-4,21(m, 1H), 4,53-4,61(m, 1H), 4,69-4,71(q, 1H), 5,0-5,2(d, 1H). MS (M+H) 690.



Preparación de **4**: A 1 g (1,45 mmol) de **3** se añadieron 1,8 ml de HCl 4,0 M/dioxano y se agitó durante 4 h. Los solventes se evaporaron y el producto se precipitó en 10 ml de éter dietílico frío y los sólidos se filtraron. Los sólidos se secaron después a alto vacío durante la noche para dar 800 mg (88%) del producto diana **4** (éster 6 $\alpha$ ,16 $\beta$ -dihidroxi-17-[5-(1-hidroxi-1-metil-etil)-2-metil-tetrahydro-furan-2-il]-4,4,13,14-tetrametil-tetradecahidro-ciclopropa[9,10]ciclopenta[a]fenantren-3 $\beta$ -ílico del ácido 2-(L)-amino-3-metil-butírico, sal clorhidrato) como un polvo blanco.

<sup>1</sup>H RMN para **4**: (DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm: 0,36 (bs, 1H), 0,49 (bs, 1H), 0,80-1,39 (m, 29H), 1,44-1,60(m, 3H), 1,61-1,70 (m, 2H), 1,81-1,89(m, 4H), 2,19-2,30(m, 2H), 2,41-2,60 (m, 2H), 3,29-3,41(m, 2H), 3,58-3,61(t, 1H), 3,81-3,83(m, 1H), 4,18-4,39 (bs, 4H), 4,49-4,51(q, 2H), 4,54-4,59(m, 1H), 8,40-8,58(bs, 2H). MS (M+H) 590.

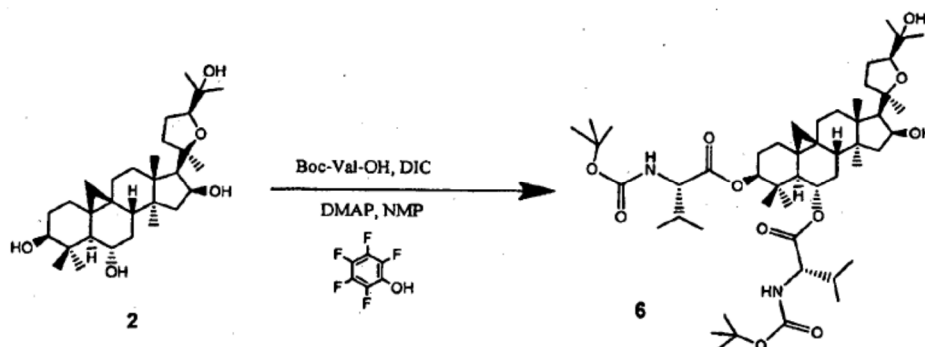
**Ejemplo 3.** Preparación del éster 6 $\alpha$ ,16 $\beta$ -dihidroxi-17-[5-(1-hidroxi-1-metil-etil)-2-metil-tetrahydro-furan-2-il]-4,4,13,14-tetrametil-tetradecahidro-ciclopropa[9,10]ciclopenta[a]fenantren-3 $\beta$ -ílico del ácido 2-(D)-amino-3-metil-butírico, sal clorhidrato [**C3-(D)-valil-cicloastragenol**] (**5**)



Usando el procedimiento del ejemplo 2 con Boc-(D) valina-OH (Bachem, Torrance, CA) (18 g, 81,63 mmol) se preparó el compuesto **5**.

<sup>1</sup>H RMN para **5**: (DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm: 0,30 (bs, H), 0,50 (bs, 1H), 0,80-1,39 (m, 29H), 1,46-1,58(m, 3H), 1,61-1,70 (m, 2H), 1,79-1,89(m, 4H), 2,16-2,32(m, 2H), 2,38-2,54 (m, 2H), 3,29-3,41(m, 2H), 3,58-3,61(t, 1H), 3,81-3,83(m, 1H), 4,13-4,24 (bs, 4H), 4,50-4,52(q, 2H), 4,54-4,59(m, 1H), 8,43-8,60(bs, 2H). MS (M+H) 590.

**Ejemplo 4:** Preparación del éster 6 $\alpha$ -(2-amino-3-metil-butiriloxi)-16 $\beta$ -hidroxi-17-[5-(1-hidroxi-1-metil-etil)-2-metil-tetrahydro-furan-2-il]-4,4,13,14-tetrametil-tetradecahidro-ciclopropa[9,10]ciclopenta[a]fenantren-3 $\beta$ -ílico del ácido 2-(L)-amino-3-metil-butírico, sal clorhidrato [**C3,C6-(L,L)-bisvalil-cicloastragenol**] **7**



5

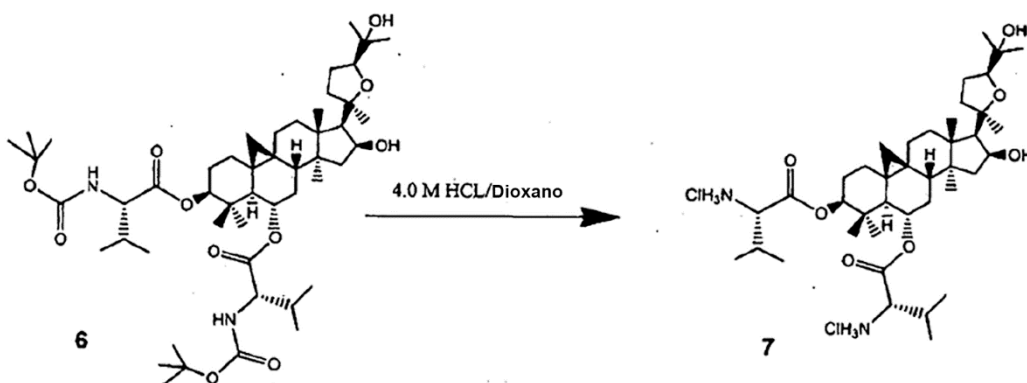
Preparación de **6**: Se disolvió Boc-(L) valina-OH (10 g, 46,08 mmol) en 80 ml de N-metilpirrolidona (NMP). A esto se añadieron 8,5 g (46,08 mmol) de pentafluorofenol. La reacción se enfrió en un baño de hielo seguido por la adición lenta de 7,2 ml (46,08 mmol) de DIC. Después de la adición completa la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos tiempo en que la mezcla de reacción se volvió turbia (precipitación de diisopropilcarbodiimida-urea). A esta mezcla se añadieron después 3,2 g (6,60 mmol) de **2** seguido por 5,5 g (45 mmol) de DMAP y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. La mezcla de reacción se transfirió a un embudo separador y se lavó sucesivamente con H<sub>2</sub>O (6x), HCl ac. al 1% (2x), NaOH ac. 0,1 N (2x), NaHCO<sub>3</sub> sat. (3x), H<sub>2</sub>O (1x) y salmuera (1x), la fase orgánica se separó, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y el solvente se evaporó al vacío. El residuo se purificó usando cromatografía rápida con gradiente de solvente de MeOH del 2%-5% en DCM para proporcionar 4,8 (83%) del producto diana **6**.

10

15

<sup>1</sup>H RMN para **6**: (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm: 0,38 (1H, bs), 0,60 (1H, bs), 0,80-1,0 (m, 24H), 1,15 (s,s 6H), 1,20 (s,s 6H), 1,31(s, 6H), 1,35 (s,s 4H) 1,41 (s,s 18H), 1,56-1,60(m, 4H), 1,79-1,83 (m, 3H), 3,71-3,76 (t, 1H), 4,08-4,21(m, 2H), 4,58-4,60(m, 1H), 4,61-4,70(q, 1H), 4,72-4,80 (m, 1H), 4,82-4,84 (d, 1H), 4,9-5,0 (d, 1H). MS (M+H) 889.

20



Preparación de **7**: A 4,5 g (5,06 mmol) de **6** se añadieron 13 ml de HCl 4,0 M/dioxano y se agitó durante 4 h. Los solventes se evaporaron y el producto se precipitó con 40 ml de éter dietílico frío y los sólidos se filtraron. Los sólidos se secaron después a alto vacío durante la noche para dar 3,1 g (91%) del producto diana **7** como un polvo blanco.

25

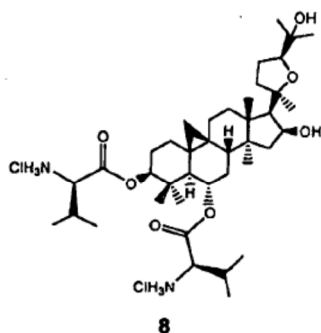
<sup>1</sup>H RMN para **7**: (DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  ppm: 0,24 (bs, 1H), 0,59 (bs, 1H), 0,80-1,20 (m, 35H), 1,41-1,85 (m, 12H), 2,10-2,22 (m, 2H), 2,32-2,42(m, 4H), 2,19-2,30(m, 2H), 3,59-3,62(m, 1H), 3,81-3,83(m, 2H), 4,40-4,53 (m, 1H), 4,60-4,71(m, 1H), 4,81-4,9(m, 1H), 8,40-8,70(d, 4H). MS (M+H) 689.

30

**Ejemplo 5:** Preparación del éster 6 $\alpha$ -(2-amino-3-metil-butiriloxi)-16 $\beta$ -hidroxi-17-[5-(1-hidroxi-1-metil-etil)-2-metil-tetrahydro-furan-2-il]-4,4,13,14-tetrametil-tetradecahidro-ciclopropa[9,10]ciclopenta[a]fenantren-3 $\beta$ -ílico del ácido 2-(D)-amino-3-metil-butírico, sal clorhidrato [**C3,C6-(D,D)-bisvalil-cicloastragenol**] **8**

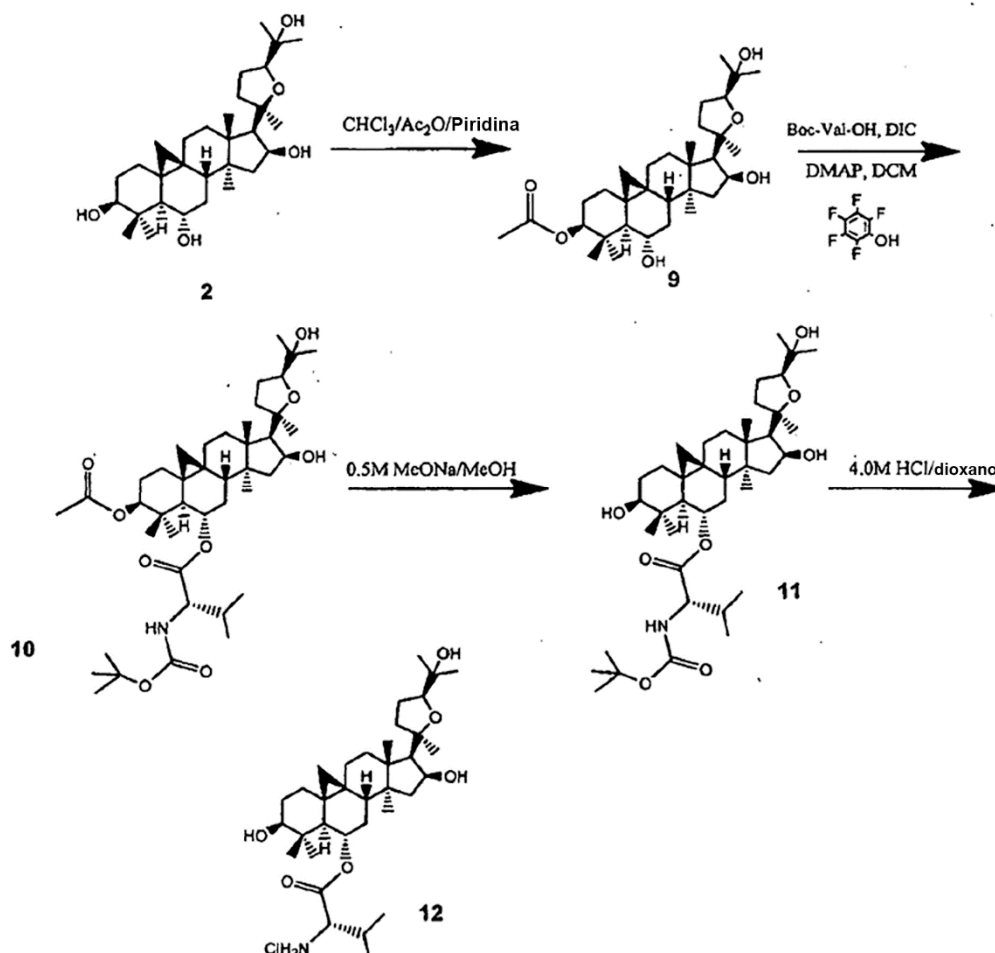
35

Usando el mismo procedimiento del ejemplo 4 y Boc-(D) valina-OH (Bachem, Torrance, CA), se preparó el compuesto **8**.



<sup>1</sup>H RMN para **8**: (DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm: 0,26 (bs, 1H), 0,60 (bs, 1H), 0,78-1,23 (m, 35H), 1,39-1,80 (m, 12H), 2,10-2,22 (m, 2H), 2,19-2,30(m, 2H) 2,35-2,40 (m, 4H), 3,60-3,62(m, 1H), 3,80-3,85(m, 2H), 4,42-4,53 (m, 1H), 4,58-4,70(m, 1H), 4,81-4,9(m, 1H), 8,40-8,70(d, 4H). MS (M+H) 689.

**Ejemplo 6:** Preparación del éster 3β,16β dihidroxi-17-[5-(1-hidroxi-1-metil-etil)-2-metil-tetrahydro-furan-2-il]-4,4,13,14-tetrametil-tetradecahidro-ciclopro[9,10]ciclopenta[a]fenantren-6α-ílico del ácido 2-(L)-amino-3-metil-butírico, sal clorhidrato [**C6-(L)-valil-cicloastragenol**] **12**



Preparación de **9**: A 5 g (10,22 mmol) de **2** se añadieron 40 ml de CHCl<sub>3</sub> y 2,1 ml (26 mmol) de piridina. La mezcla de reacción se enfrió en un baño de hielo y a esto se añadieron lentamente 2,5 ml (26 mmol) de anhídrido acético. Después de la adición completa la reacción se agitó a 4°C durante 24 h. La TLC mostró tres manchas correspondientes a los productos **9**, monoacetilado y bis acetilado. La mezcla de reacción se diluyó con 100 ml de DCM y se lavó sucesivamente con lo siguiente: NaHCO<sub>3</sub> ac. sat. (3x), HCl 1 M (1x), H<sub>2</sub>O (1x) y salmuera (1x). La fase orgánica se separó, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y se evaporó al vacío. El crudo se purificó usando cromatografía rápida con MeOH al 2% en DCM para proporcionar 2,3 g (42%) de **9** como sólidos blancos. <sup>1</sup>H RMN

para **9**: (CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 0,38 (1H, bs), 0,49 (1H, bs), 0,90-1,25 (m, 32H), 1,39-1,45(m 2H), 1,50-1,60 (m, 2H), 1,70-1,82(m, 2H), 1,96-2,01(m, 4H), 2,18-2,20 (s, 3H), 2,30-2,35 (d, 1H), 3,45-3,57 (m, 1H), 3,71-3,76(m, 1H), 4,49-4,59(m, 1H), 4,69-4,72(m, 1H). MS (M+H) 533.

5 Preparación de **10**: Se disolvieron 1,08 g (5,0 mmol) de Boc-(L)-valina en 5 ml de DCM. A esto se añadieron 920 mg (5,0 mmol) de pentafluorofenol. La reacción se enfrió en un baño de hielo seguido por la adición lenta de 0,78 ml (5,0 mmol) de DIC. Después de la adición completa la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. A esta mezcla se añadieron después 532 mg (1,0 mmol) de **9** seguido por 490 mg (4,0 mmol) de DMAP y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. La mezcla de reacción se transfirió a un embudo separador y se lavó sucesivamente con NaHCO<sub>3</sub> sat. (3x), HCl 0,1 N (1x), H<sub>2</sub>O (3x) y salmuera (1x), la fase orgánica se separó, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y el solvente se evaporó al vacío. Se añadieron 20 ml de Et<sub>2</sub>O al residuo y el precipitado blanco se filtró con succión. Esta operación se repitió una vez más y el filtrado se evaporó y el residuo se purificó usando cromatografía rápida con gradiente de solvente de MeOH del 2%-5% en DCM para proporcionar 590 mg (81%) de **10**.

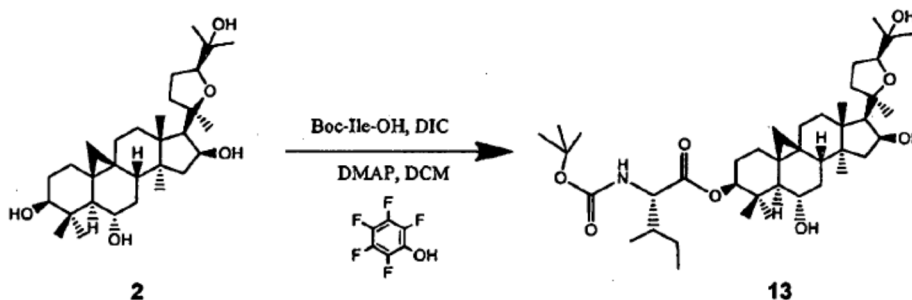
15 <sup>1</sup>H RMN para **10**: (CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 0,35 (1H, bs), 0,53 (1H, bs), 0,75-1,30 (m, 38H), 1,45(s 9H), 1,50-1,60 (m, 2H), 1,70-1,82(m, 2H), 1,96-2,01(m, 4H), 2,18-2,20 (s, 3H), 2,30-2,35 (d, 1H), 3,71-3,76(m, 1H), 4,13-4,19 (m, 1H), 4,40-4,41 (m, 1H), 4,51-4,53 (m, 1H), 4,60-4,63 (m, 1H), 4,69-4,72(m, 1H), 4,81-4,83(m, 1H). MS (M+H) 731.

20 Preparación de **11**: Se disolvieron 500 mg (0,68 mmol) de **10** en 5,0 ml de MeOH anhidro y se añadieron al mismo 2,8 ml de MeONa 0,5 M/MeOH. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. La reacción se neutralizó cuidadosamente (siguiendo con un pH metro) mediante la adición gota a gota de HCl 1M/MeOH y los solventes se evaporaron al vacío. El residuo se disolvió en 30 ml de DCM y se lavó sucesivamente con NaHCO<sub>3</sub> sat. (1x), H<sub>2</sub>O (1x) y salmuera (1x), se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y los solventes se evaporaron al vacío. El producto crudo se purificó usando cromatografía rápida para proporcionar 403 mg (86%) de **11** como sólidos blancos. El crudo se llevó al siguiente paso sin ninguna purificación. <sup>1</sup>H RMN para **11**: (CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 0,30 (1H, bs), 0,58 (1H, bs), 0,86-1,35 (m, 38H), 1,47(s 9H), 1,53-1,61 (m, 2H), 1,70-1,82(m, 2H), 1,96-2,01(m, 4H), 2,30-2,35 (d, 1H), 3,19-3,22 (m, 1H), 3,71-3,76(m, 1H), 4,13-4,19 (m, 1H), 4,40-4,41 (m, 1H), 4,60-4,63 (m, 1H), 4,69-4,72(m, 1H), 4,81-4,83(m, 1H). MS (M+H) 690.

30 Preparación de **12**: A 400 mg (0,58 mmol) de **10** se añadieron 0,73 ml de HCl 4,0 M/dioxano y se agitó durante 4 horas. Los solventes se evaporaron después al vacío y el residuo se lavó con 5 ml de éter dietílico frío. Los sólidos se filtraron y se secaron a alto vacío durante la noche para proporcionar 290 mg (80%) de **12** como sólidos blancos.

35 <sup>1</sup>H RMN para **12**: (DMSOd<sub>6</sub>) δ ppm: 0,30 (bs, 1H), 0,45 (bs, 1H), 0,80-1,19 (m, 29H), 1,47-1,58(m, 3H), 1,61-1,70 (m, 2H), 1,81-1,89(m, 4H), 2,19-2,30(m, 2H), 2,43-2,60 (m, 2H), 3,03-3,05 (m, 1H), 3,56-3,60 (t, 1H), 3,73-3,75 (m, 1H), 3,80-4,09 (bs, 4H), 4,40-4,51(m, 1H), 4,71-4,79(m, 1H), 8,40-8,58(bs, 2H). MS (M+H) 590.

40 **Ejemplo 7:** Preparación del éster 6α,16β-dihidroxi-17-[5-(1-hidroxi-1-metil-etil)-2-metil-tetrahydro-furan-2-il]-4,4,13,14-tetrametil-tetradecahidrociclopropa[9,10]ciclopenta[a]fenantren-3β-ílico del ácido 2-(L)-amino-3-metil-pentanoico, sal clorhidrato [**C3-(L)-isoleucil-cicloastragenol**] **14**

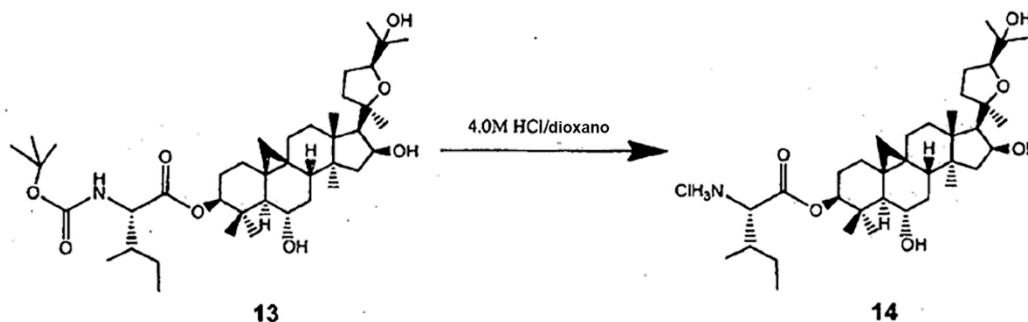


45 Preparación de **13**: Se disolvió Boc-(L) isoleucina-OH (Bachem, Torrance, CA) (1,9 g, 8,16 mmol) en 25 ml de DCM. A esto se añadieron 1,5 g (8,16 mmol) de pentafluorofenol. La reacción se enfrió en un baño de hielo seguido por la adición lenta de 1,3 ml (8,16 mmol) de DIC. Después de la adición completa la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos tiempo en que la mezcla de reacción se volvió turbia (precipitación de diisopropilcarbodiimida-urea). A esta mezcla se añadió después 1,0 g (2,04 mmol) de **2** seguido por 976 mg (8,0 mmol) de DMAP y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. La mezcla de reacción se transfirió a un embudo separador y se lavó con H<sub>2</sub>O (2x), HCl ac. al 1% (2x), NaOH ac. 0,1 N (2x), NaHCO<sub>3</sub> sat. (3x), H<sub>2</sub>O (1x) y salmuera (1x), la fase orgánica se separó, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y el solvente se evaporó al vacío. El residuo se purificó usando cromatografía rápida con gradiente de solvente de MeOH del 2%-5% en DCM para proporcionar 943 mg (67%) del producto diana **13** junto con 330 mg el bis producto.

55



<sup>1</sup>H RMN para **13**: (CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 0,38 (1H, bs), 0,52 (1H, bs), 0,93-1,28 (m, 33H), 1,39-1,45(s,m 12H), 1,59-1,63 (m, 5H), 1,76-1,82(m, 2H), 1,96-2,01(m, 4H), 2,16-2,20 (m, 1H), 2,30-2,35 (d, 1H), 2,49-2,54 (q, 1H), 3,45-3,57 (m, 1H), 3,71-3,76(t, 1H), 4,19-4,21(dd, 1H), 4,53-4,61(m, 1H), 4,69-4,71(q, 1H), 5,0-5,2(d, 1H). MS (M+H) 704.



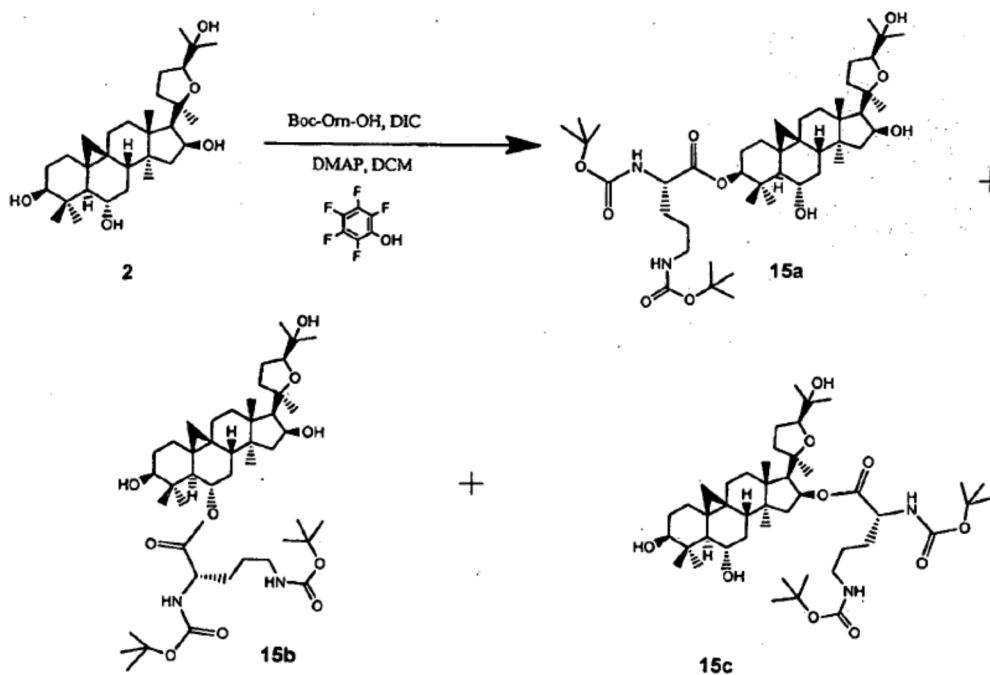
5

Preparación de **14**: A 700 mg (1,0 mmol) de **11** se añadieron 1,25 ml de HCl 4,0 M/dioxano y se agitó durante 4 horas. Los solventes se evaporaron y el producto se precipitó en 10 ml de éter dietílico y los sólidos se filtraron. Los sólidos se secaron después a alto vacío durante la noche para proporcionar 512 mg (80%) del producto diana **12** como un polvo blanco. <sup>1</sup>H RMN para **12**: (DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm: 0,36 (bs, 1H), 0,49 (bs, 1H), 0,80-1,39 (m, 32H), 1,44-1,60(m, 3H), 1,61-1,70 (m, 2H), 1,81-1,89(m, 4H), 2,19-2,30(m, 2H), 2,41-2,60 (m, 2H), 3,29-3,41(m, 1H), 3,58-3,61(t, 1H), 3,86-3,90(m, 1H), 4,18-4,39 (bs, 4H), 4,51-4,53(m, 2H), 4,54-4,59(m, 1H), 8,40-8,58(bs, 2H). MS (M+H) 604.

10

**Ejemplo 8**: Preparación de una mezcla del éster 6 $\alpha$ ,16 $\beta$ -dihidroxi-17-[5-(1-hidroxi-1-metil-etil)-2-metil-tetrahydrofuran-2-il]-4,4,13,14-tetrametil-tetradecahidro-ciclopropa[9,10]ciclopenta[a]fenantren-3 $\beta$ -ílico del ácido 2-(L)-amino-hexanoico, sal clorhidrato [**C3-(L)-ornitnil-cicloastragenol**] **16a**; el éster 3 $\beta$ ,16 $\beta$ -dihidroxi-17-[5-(1-hidroxi-1-metil-etil)-2-metil-tetrahydrofuran-2-il]-4,4,13,14-tetrametil-tetradecahidro-ciclopropa[9,10]ciclopenta[a]fenantren-6 $\alpha$ -ílico del ácido 2-(L)-5-diamino-pentanoico, sal clorhidrato [**C6-(L)-ornitnil-cicloastragenol**] **16b**; y el éster 3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -dihidroxi-17-[5-(1-hidroxi-1-metil-etil)-2-metil-tetrahydrofuran-2-il]-4,4,13,14-tetrametil-tetradecahidro-ciclopropa[9,10]ciclopenta[a]fenantren-16 $\beta$ -ílico del ácido 2-(L)-5-diamino-pentanoico, sal clorhidrato [**C16-(L)-ornitnil-cicloastragenol**] **16c**

20



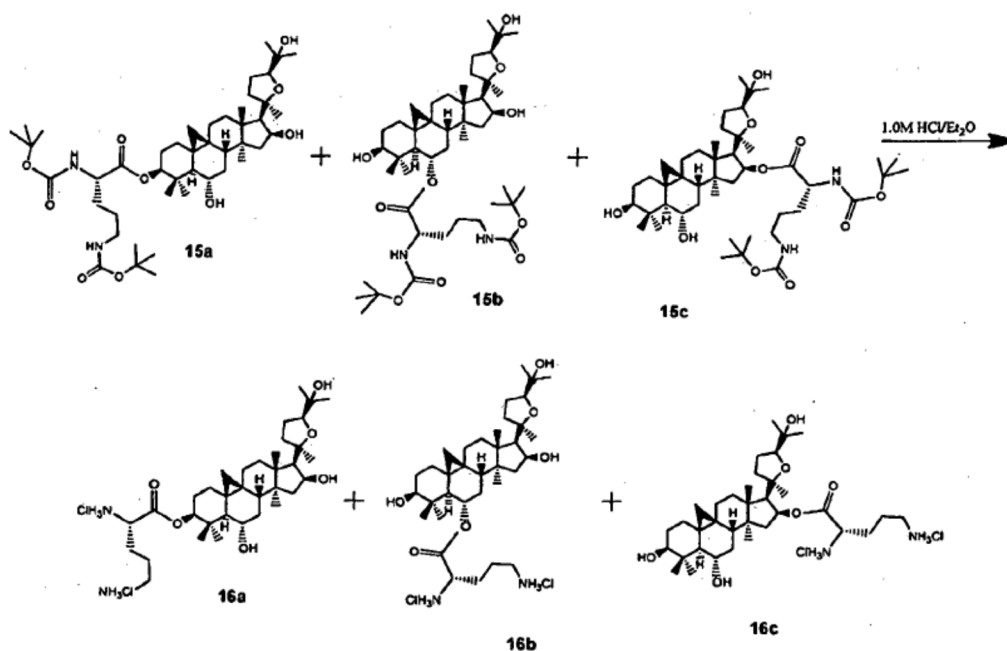
25

30

Preparación de **15a**, **15b** y **15c**: Se disolvió (Boc)<sub>2</sub>-(L) ornitina-OH (4,5 g, 13,6 mmol) (Bachem, Torrance, CA) en 15 ml de DCM. A esto se añadieron 2,5 g (13,6 mmol) de pentafluorofenol. La reacción se enfrió en un baño de hielo seguido por la adición lenta de 2,2 ml (13,6 mmol) de DIC. Después de la adición completa la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos tiempo en que la mezcla de reacción se volvió turbia (precipitación de diisopropilcarbodiimida-urea). A esta mezcla se añadieron después 700 mg (1,43 mmol) de **2** seguido por 1,6 g (13,6 mmol) de DMAP y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. La mezcla de reacción se

transfirió a un embudo separador y se lavó con H<sub>2</sub>O (2x), HCl ac. al 1% (2x), NaOH ac. 0,1 N (2x), NaHCO<sub>3</sub> sat. (3x), H<sub>2</sub>O (1x) y salmuera (1x), la fase orgánica se separó, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y el solvente se evaporó al vacío. Al residuo se añadieron entonces 25 ml de éter dietílico y la urea precipitó. El filtrado se evaporó y el residuo se purificó usando cromatografía rápida con gradiente de solvente de MeOH del 2%-5% en DCM para proporcionar 690 mg (60%) de una mezcla de productos **15a**, **15b** y **15c**, y 120 mg del bis producto C3, C6.

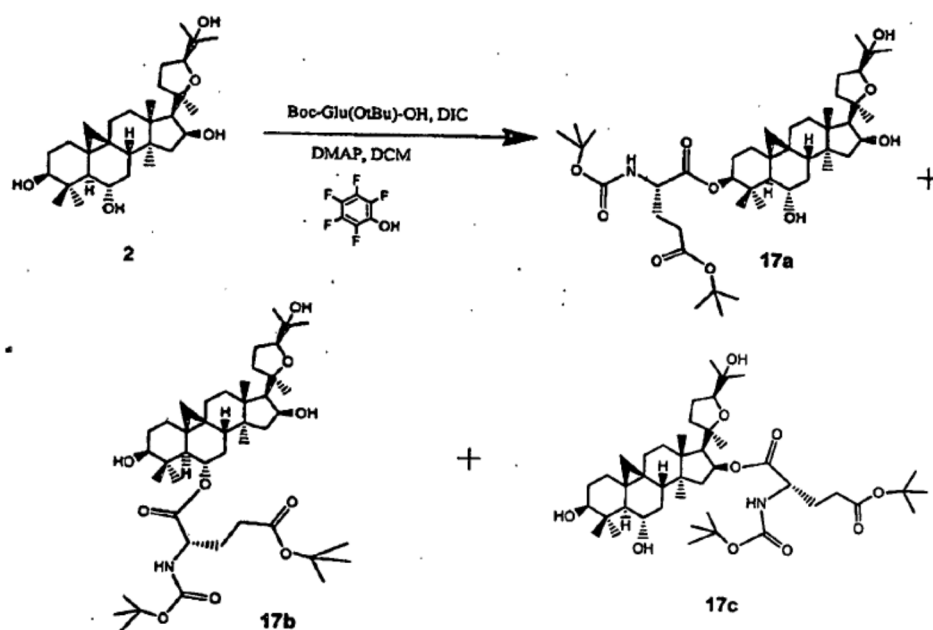
El <sup>1</sup>H RMN mostró cantidades mayoritarias de los productos **15a** y **15b** con el 2% del regioisómero **15c**. <sup>1</sup>H RMN de la mezcla (**15a**, **15b** y **15c**): (CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 0,38 (1H, bs), 0,52 (1H, bs), 0,90-1,38 (m, 26H), 1,39-1,45 (s, 27H), 1,59-1,63 (m, 5H), 1,76-1,82 (m, 2H), 1,96-2,01 (m, 4H), 2,16-2,20 (m, 1H), 2,30-2,35 (d, 1H), 2,49-2,54 (q, 1H), 3,10-3,19 (m, 6H), 3,19-3,22 (m, 1H), 3,45-3,57 (t, 1H), 3,71-3,76 (m, 1H), 4,19-4,21 (m, 1H), 4,22-4,30 (m, 1H), 4,52-4,60 (m, 1H), 4,61-4,65 (m, 1H), 4,79-4,81 (m, 1H), 4,95-5,01 (m, 1H), 5,13-5,21 (m, 1H), 5,38-5,41 (m, 1H). MS (M+H) 804



Preparación de **16a**, **16b** y **16c**: A 200 mg (0,25 mmol) de la mezcla de **15a**, **15b**, **15c**, se añadieron 10 ml de HCl 1,0 M/éter dietílico y se agitó durante 16 h. Los sólidos blancos se filtraron y se lavaron con 10 ml de Et<sub>2</sub>O (4x). los sólidos se secaron después a alto vacío durante la noche para proporcionar 160 mg (95%) de los productos diana **16a**, **16b**, **16c**, como un polvo blanco. El <sup>1</sup>H RMN mostró cantidades mayoritarias de los productos **16a** y **16b** con el 2% del regioisómero C-16 (**16c**).

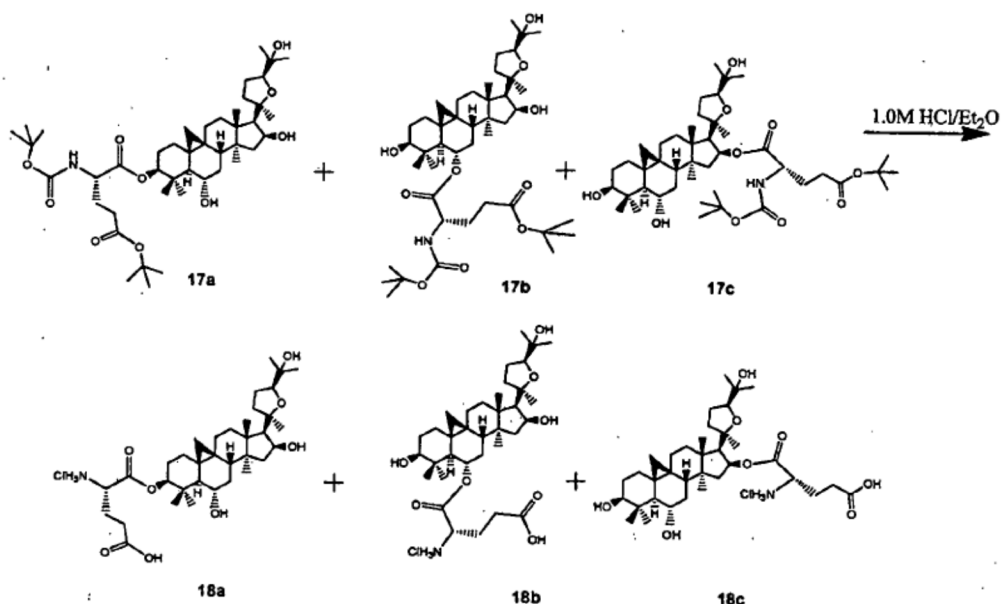
<sup>1</sup>H RMN de la mezcla (**16a**, **16b** y **16c**): (D<sub>2</sub>O) δ ppm: 0,26 (1H, bs), 0,52 (1H, bs), 0,90-1,18 (m, 26H), 1,49-1,74 (m, 5H), 1,83-2,10 (m, 2H), 2,20-2,31 (m, 4H), 2,81-2,92 (m, 2H), 3,19-3,20 (m, 1H), 3,39-3,42 (m, 1H), 3,62-3,71 (m, 1H), 3,88-4,00 (m, 1H), 4,08-4,12 (m, 1H), 4,52-4,57 (m, 1H), 4,61-4,65 (m, 1H), 4,79-4,81 (m, 1H). MS (M+H): 605.

**Ejemplo 9:** Preparación de una mezcla del éster 1-{6α,16β-dihidroxi-17-[5-(1-hidroxi-1-metil-etil)-2-metil-tetrahydrofuran-2-il]-4,4,13,14-tetrametil-tetradecahidro-ciclopropa[9,10]ciclopenta[a]fenantren-3β-ílico} del ácido 2-(L)-amino-pentanodioico, sal clorhidrato [**C3-(L)-glutamato-cicloastragenol**] **18a**; el éster 1-{3β,16β-dihidroxi-17-[5-(1-hidroxi-1-metil-etil)-2-metil-tetrahydrofuran-2-il]-4,4,13,14-tetrametil-tetradecahidro-ciclopropa[9,10]ciclopenta[a]fenantren-6α-ílico} del ácido 2-(L)-amino-pentanodioico, sal clorhidrato [**C6-(L)-glutamato-cicloastragenol**] **18b**; y el éster 1-{3β,6α-dihidroxi-17-[5-(1-hidroxi-1-metil-etil)-2-metil-tetrahydrofuran-2-il]-4,4,13,14-tetrametil-tetradecahidro-ciclopropa[9,10]ciclopenta[a]fenantren-16β-ílico} del ácido 2-(L)-amino-pentanodioico, sal clorhidrato [**C16-(L)-glutamato-cicloastragenol**] **18c**



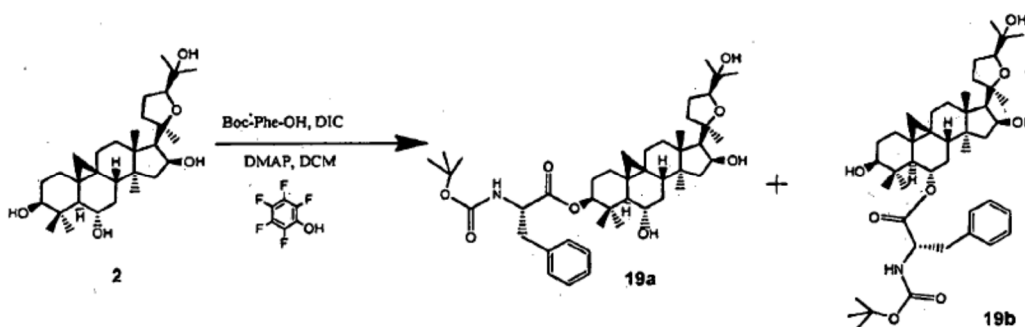
Preparación de **17a**, **17b** y **17c**: Se disolvió Boc-(L)-ácido glutámico (Bachem, Torrance, CA) (O-tBu)-OH (4,5 g, 14,82 mmol) en 15 ml de DCM. A esto se añadieron 2,73 g (14,82 mmol) de pentafluorofenol. La reacción se enfrió en un baño de hielo seguido por la adición lenta de 2,3 ml (14,82 mmol) de DIC. Después de la adición completa la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos tiempo en que la mezcla de reacción se volvió turbia (precipitación de diisopropilcarbodiimida-urea). A esta mezcla se añadieron después 765 mg (1,56 mmol) de cicloastragenol **2** seguido por 1,8 g (14,82 mmol) de DMAP y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. La mezcla de reacción se transfirió a un embudo separador y se lavó con H<sub>2</sub>O (2x), HCl ac. al 1% (2x), NaOH ac. 0,1 N (2x), NaHCO<sub>3</sub> sat. (3x), H<sub>2</sub>O (1x) y salmuera (1x), la fase orgánica se separó, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y el solvente se evaporó al vacío. Al residuo se añadieron entonces 50 ml de éter dietílico y la urea precipitó. El filtrado se evaporó y el residuo se purificó usando cromatografía rápida con gradiente de solvente de MeOH del 2%-5% en DCM para proporcionar 714 mg (60%) de una mezcla inseparable de productos **17a**, **17b** y **17c**, y 140 mg (9%) del bis producto (C3, C6). El <sup>1</sup>H RMN mostró cantidades mayoritarias de los productos **17a** y **17b** con el 2% del regioisómero (**17c**).

<sup>1</sup>H RMN de la mezcla (**17a**, **17b** y **17c**): (CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 0,29 (1H, bs), 0,56 (1H, bs), 0,90-1,20 (m, 26H), 1,30-1,40(s,m 25H), 1,48-1,65 (m, 3H), 1,82-1,92(m, 2H), 2,16-2,22 (m, 2H), 2,42-2,50 (m, 2H), 3,20-3,40 (m, 1H), 3,55-3,61 (m, 1H), 3,82-3,96(m, 1H), 4,42-4,50 (m, 1H), 4,62-4,71 (m, 1H), 4,79-4,81 (m, 1H), 4,95-5,01(m,1H), 5,13-5,21(m, 1H), 5,38-5,41 (m, 1H). MS (M+H) 776.



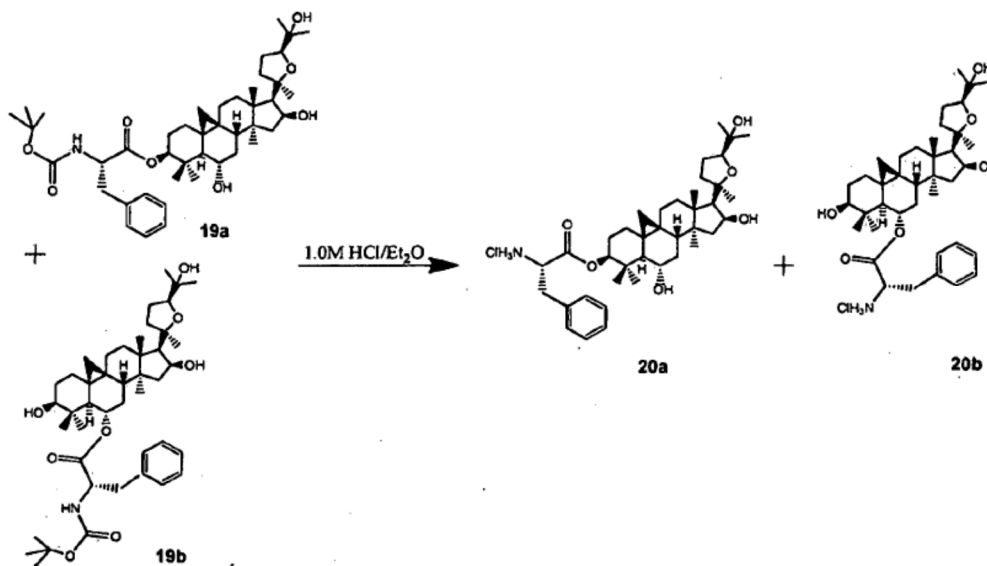
Preparación de **18a**, **18b** y **18c**: A 260 mg (0,34 mmol) de la mezcla de **17a**, **17b** y **17c**, se añadieron 10 ml de HCl 1,0 M/éter dietílico y se agitó durante 16 h. Los sólidos blancos se filtraron y se lavaron con 10 ml de Et<sub>2</sub>O (4x). Los sólidos se secaron después a alto vacío durante la noche para proporcionar 210 mg (95%) de los productos diana **18** como un polvo blanco. El <sup>1</sup>H RMN mostró cantidades mayoritarias de los productos C-3 (**18a**) y C-6 (**18b**) con menos del 2% del regioisómero C-16 (**18c**). <sup>1</sup>H RMN de la mezcla (**18a**, **18b** y **18c**): (D<sub>2</sub>O) δ ppm: 0,26 (1H, bs), 0,49 (1H, bs), 0,90-1,18 (m, 26H), 1,49-1,74 (m, 4H), 1,83-2,10(m, 2H), 2,20-2,31(m, 4H), 2,39-2,50 (m, 4H), 2,81-2,92 (m, 2H), 3,29-3,30 (m, 1H), 3,39-3,42 (m, 1H), 3,62-3,71 (m, 1H), 3,88-4,02(m, 3H), 4,524,57(m, 1H), 4,61-4,65(m, 1H), 4,79-4,81 (m, 1H). MS (M+H): 620.

**Ejemplo 10**: Preparación de una mezcla del éster 6α,16β-dihidroxi-17-[5-(1-hidroxi-1-metil-etil)-2-metil-tetrahydrofuran-2-il]-4,4,13,14-tetrametil-tetradecahidro-ciclopropa[9,10]ciclopenta[a]fenantren-3α-ílico del ácido 2-(L)-amino-3-fenilpropiónico, sal clorhidrato [**C3-(L)-fenilalanil-cicloastragenol**] **20a**; éster 3β,16β-dihidroxi-17-[5-(1-hidroxi-1-metil-etil)-2-metil-tetrahydrofuran-2-il]-4,4,13,14-tetrametil-tetradecahidro-ciclopropa[9,10]ciclopenta[a]fenantren-6α-ílico del ácido 2-(L)-amino-3-fenilpropiónico, sal clorhidrato [**C6-(L)-fenilalanil-cicloastragenol**] **20b**



Preparación de **19a**, **19b**: Se disolvió Boc-(L)-fenilalanina-OH (Bachem, Torrance, CA) (5,0 g, 18,84 mmol) en 30 ml de DCM. A esto se añadieron 3,5 g (18,84 mmol) de pentafluorofenol. La reacción se enfrió en un baño de hielo seguido por la adición lenta de 2,9 ml (1,9 mmol) de DIC. Después de la adición completa la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos tiempo en que la mezcla de reacción se volvió turbia (precipitación de diisopropilcarbodiimida-urea). A esta mezcla se añadió después 1,0 g (1,56 mmol) de cicloastragenol **2** seguido por 1,8 g (15 mmol) de DMAP y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. La mezcla de reacción se transfirió a un embudo separador y se lavó con H<sub>2</sub>O (2x), HCl ac. al 1% (2x), NaOH ac. 0,1 N (2x), NaHCO<sub>3</sub> sat. (3x), H<sub>2</sub>O (1x) y salmuera (1x), la fase orgánica se separó, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y el solvente se evaporó al vacío. Al residuo se añadieron entonces 50 ml de éter dietílico y la urea precipitó. El filtrado se evaporó y el residuo se purificó usando cromatografía rápida con gradiente de solvente de MeOH del 2%-5% en DCM para proporcionar 950 mg (68%) de una mezcla inseparable (C-3 y C-6) de productos y 290 mg (30%) del bis producto (C3 y C6). El <sup>1</sup>H RMN mostró cantidades mayoritarias de los productos C-3 (**19a**) y C-6 (**19b**).

<sup>1</sup>H RMN de la mezcla (**19a** y **19b**): (CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 0,32 (1H, bs), 0,60 (1H, bs), 0,70-1,20 (m, 14H), 1,30-1,40(s,m 12H), 1,48-1,65 (m, 2H), 1,76-1,92(m, 4H), 2,22-2,32 (m, 1H), 2,52-2,58 (m, 1H), 2,86-2,91(m, 1H), 3,0-3,18(m, 1H), 3,20-3,24 (m, 1H), 3,55-3,61 (m, 1H), 3,72-3,80(m, 1H), 4,0-4,10 (m, 1H), 4,42-4,58 (m, 2H), 4,61-4,63 (m, 1H), 4,77-4,78 (m,1H), 4,81-4,90 (m, 1H), 7,08-7,25 (m, 5H) . MS (M+H) 738.

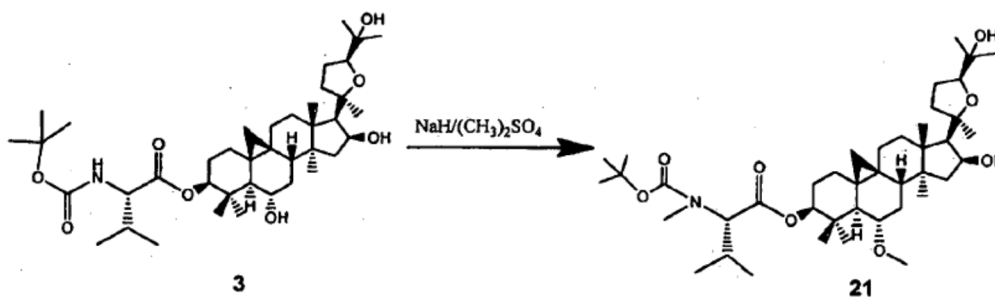


Preparación de la mezcla **20a**, **20b**: A 330 mg (0,45 mmol) de la mezcla de **19a** y **19b**, se añadieron 10 ml de HCl 1,0 M/éter dietílico y se agitó durante 8 h. Los sólidos blancos se filtraron y se lavaron con 10 ml de Et<sub>2</sub>O (3x). Los sólidos se secaron después a alto vacío durante la noche para proporcionar 260 mg (86%) de los productos diana **20a** y **20b** como un polvo blanco

<sup>1</sup>H RMN de la mezcla (**20a** y **20b**): (DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm: 0,22 (1H, bs), 0,55 (1H, bs), 0,70-1,10 (m, 24H), 1,20-1,30(m, 3H), 1,42-1,55 (m, 2H), 1,61-1,80(m, 2H), 1,87-1,89(m, 2H), 2,19-2,20 (d, 1H), 2,42-2,50 (m, 1H), 2,92-3,10 (m, 2H), 3,20-3,21 (m, 2H), 3,30-3,34 (m, 1H), 3,55-3,61 (m, 1H), 3,78-3,88 (m, 1H), 4,12-4,20 (m, 2H), 4,42-4,45 (m, 1H), 4,48-4,53 (m, 1H), 4,80-4,82 (m, 1H), 7,08-7,25 (m, 5H), 8,62-8,80(bs, 3H). MS (M+H) 638

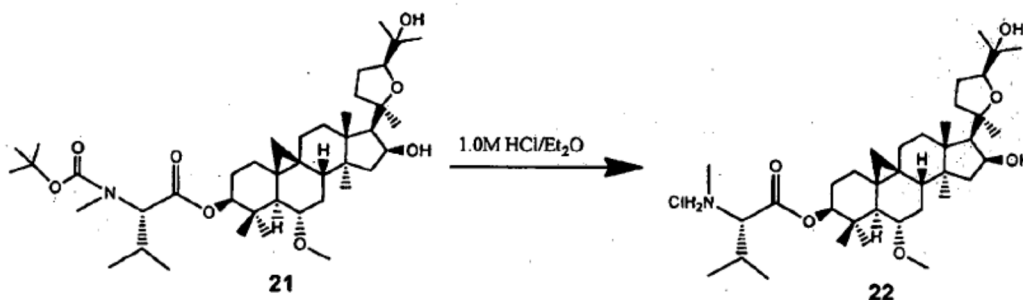
**Ejemplo 11:** Preparación del éster 16β-hidroxi-17-[5-(1-hidroxi-1-metil-etil)-2-metil-tetrahydro-furan-2-il]-6α-metoxi-4,4,13,14-tetrametil-tetradecahidro-ciclopropa[9,10]ciclopenta[a]fenantren-3β-ílico del ácido 3-metil-2-(L)-metiliminobutírico, sal clorhidrato [**C3-(L)-valil-C6-metoxi-cicloastragenol**] (**22**)

Este análogo se hizo empezando desde el intermedio **3** mediante el siguiente procedimiento



Preparación de **21**: Se disolvieron 280 mg (0,41 mmol) de **3** en 1,5 ml de NMP y se añadieron en el mismo 33 mg (0,82 mmol) de NaH (dispersión al 60% en aceite). La reacción se agitó durante 10 minutos seguido por la adición de 80 μl de sulfato de dimetilo y se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. La mezcla de reacción se diluyó con 25 ml de DCM y se lavó con H<sub>2</sub>O (4x 5 ml) y salmuera (1x 5 ml), se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se filtró. El filtrado se concentró a presión reducida. El crudo se purificó usando cromatografía rápida con gradiente de solvente de MeOH del 1%-3% en DCM para proporcionar 170 mg (58%) de **21**.

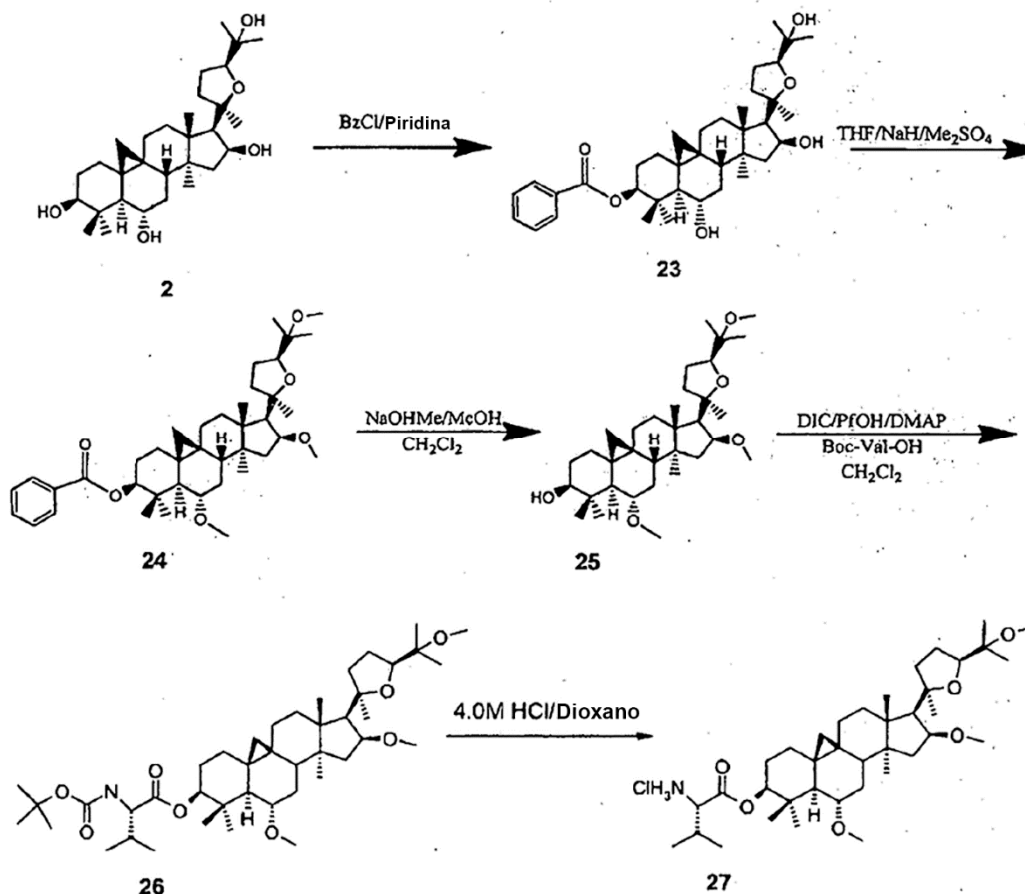
<sup>1</sup>H RMN para **21**: (CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 0,38 (1H, bs), 0,52 (1H, bs), 0,90-1,38 (m, 30H), 1,39-1,45(s,m 12H), 1,59-1,63 (m, 5H), 1,76-1,82(m, 2H), 1,96-2,01(m; 4H), 2,16-2,20 (m, 1H), 2,30-2,35 (d, 1H), 2,49-2,54 (q, 1H), 2,70-2,73 (s,s, 3H), 3,20-3,22 (s,s 3H), 3,26-3,28 (t, 1H), 3,70-3,75 (t, 1H), 4,19-4,21 (m, 1H), 4,53-4,61 (m, 1H), 4,70-4,73 (q, 1H). MS (M+H) 718.



Preparación de **22**: A 150 mg (0,21 mmol) de **21** se añadieron 8 ml de HCl 0,1M/éter dietílico y se agitó durante 24 h. Los sólidos blancos se filtraron y lavaron con éter dietílico (2 x 5 ml). Los sólidos se secaron después a alto vacío durante la noche para dar 115 mg (85%) del producto diana **22** como un polvo blanco.

$^1\text{H}$  RMN para **22**: (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm: 0,35 (bs, 1H), 0,48 (bs, 1H), 0,81-1,40 (m, 29H), 1,45-1,60(m, 3H), 1,61-1,70 (m, 2H), 1,81-1,89(m, 4H), 2,19-2,30(m, 2H), 2,41-2,70 (m, 5H), 3,0-3,18 (m, 3H) 3,20-3,28 (m, 2H), 3,58-3,61(t, 1H), 3,81-3,83(m, 1H), 4,0-4,12 (bs, 4H), 4,49-4,51(m, 1H), 4,62-4,70(m, 1H), 9,20-9,42 (bs, 2H). MS (M+H) 618.

**Ejemplo 12**: Preparación del éster 6 $\alpha$ ,16 $\beta$ -dimetoxi-17-[5-(1-metoxi-1-metil-etil)-2-metil-tetrahydro-furan-2-il]-4,4,13,14-tetrametil-tetradecahidro-ciclopropa[9,10]ciclopenta[a]fenantren-3 $\beta$ -ílico del ácido 2-(L)-amino-3-metil-butírico, sal clorhidrato [**C3-(L)-valil-C6,C16-dimetoxi-cicloastragenol**] (**27**)



Preparación de **23**: Se disolvieron 5,0 g (10,2 mmol) de **2** en piridina (50 ml) y se enfrió a 0°C. Se añadió cloruro de benzoilo (2,35 ml, 20,4 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 h. La mezcla de reacción se diluyó con 200 ml de éter dietílico y se lavó con NaHCO<sub>3</sub> sat. (2x), H<sub>2</sub>O (2x) y salmuera (1x). Se secó sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtró y los solventes se evaporaron al vacío. El crudo se purificó por cromatografía en columna usando MeOH al 1%-2% en DCM para proporcionar 1,6 g (26%) de **23** como sólidos blancos.

<sup>1</sup>H RMN para **23**: (CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 0,38 (bs, 1H), 0,55 (bs, 1H), 0,90-2,0 (m, 37H), 1,70-1,82(m, 2H), 2,30-2,35 (m, 1H), 2,50-2,6 (m, 1H), 3,45-3,57 (m, 1H), 3,71-3,76(m, 1H), 4,69-4,72(m, 1H), 4,79-4,81 (m, 1H), 7,41 (t, 2H), 7,52 (t, 1H), 8,03 (d, 2H). MS (M+H) 595.

5 Preparación de **24**: Se disolvieron 600 mg (1,01 mmol) de **23** en THF (10 ml) y se añadió NaH (323 mg, 8,08 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 20 minutos. Se añadió sulfato de dimetilo (509 mg, 4,04 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. La mezcla de reacción se diluyó con 100 ml de éter dietílico y se extinguió con H<sub>2</sub>O y se lavó sucesivamente con H<sub>2</sub>O (2x) y salmuera (1x), se secó sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtró y los solventes se evaporaron al vacío. El crudo se purificó por cromatografía en columna usando MeOH al 1%-2% en DCM para proporcionar 460 mg (72%) de **24** como sólidos blancos.

10 <sup>1</sup>H RMN para **24**: (CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 0,30 (bs, 1H), 0,53 (bs, 1H), 0,90-2,0 (m, 37H), 2,40-2,45 (m, 2H), 2,92-2,96 (m, 1H), 3,10-3,14 (s, 3H), 3,22-3,24(s, 3H), 3,80-3,82(m, 1H), 3,9-4,10 (m,1H), 4,69-4,79 (m, 1H), 7,43 (t, 2H), 7,52 (t, 1H), 8,04 (d, 2H). MS (M+H) 637.

15 Preparación de **25**: Se disolvieron 460 mg (0,72 mmol) de **24** en DCM (10 ml) y a esto se añadieron 10 ml de una solución 0,5 M de NaOMe en MeOH y la mezcla de reacción se agitó a 40°C durante 48 horas. La mezcla de reacción se extinguió con una solución de NaHCO<sub>3</sub> sat. y los solventes se evaporaron después a presión reducida. El crudo se purificó por cromatografía en columna usando MeOH al 1%-2% en DCM para proporcionar 210 mg (55%) de **25** como sólidos blancos.

20 <sup>1</sup>H RMN para **25**: (CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 0,24 (bs, 1H), 0,49 (bs, 1H), 0,90-2,0 (m, 37H), 2,40-2,45 (m, 2H), 2,92-2,96 (m, 1H), 3,10-3,14 (s, 3H), 3,22-3,24(s, 3H), 3,26-3,28 (m,1H), 3,80-3,82(m, 1H), 3,9-4,10 (m,1H). MS (M+H) 533.

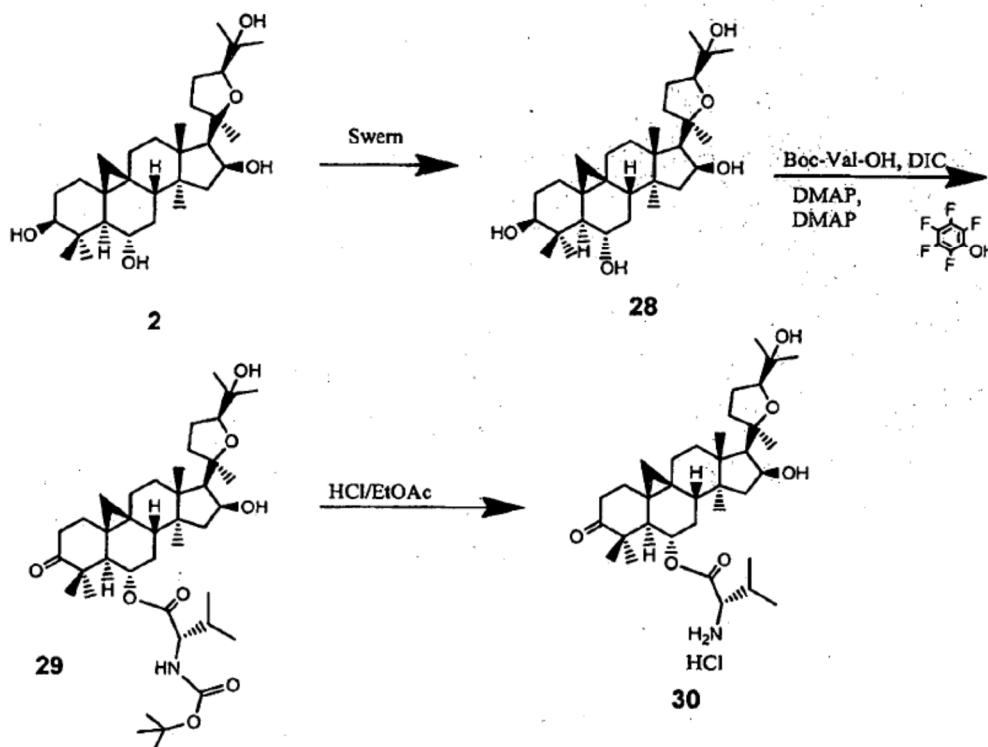
25 Preparación de **26**: Se disolvió Boc-Val-OH (685 mg, 3,16 mmol) en 3 ml de DCM. A esto se añadieron 581 mg (3,16 mmol) de pentafluorofenol. La reacción se enfrió en un baño de hielo seguido por la adición lenta de 0,49 ml (3,16 mmol) de DIC. Después de la adición completa la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos tiempo en que la mezcla de reacción se volvió turbia (precipitación de diisopropilcarbodiimida-urea). A esta mezcla se añadieron después 210 mg (0,395 mmol) de **25** seguido por 385 mg (3,16 mmol) de DMAP y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 48 horas. La mezcla de reacción se transfirió a un embudo separador y se lavó con H<sub>2</sub>O (2x), HCl ac. al 1% (2x), NaOH ac. 0,1 N (2x), NaHCO<sub>3</sub> sat. (3x), H<sub>2</sub>O (1x) y salmuera (1x), la fase orgánica se separó, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y el solvente se evaporó al vacío. Al residuo se añadieron entonces 10 ml de éter dietílico y la urea precipitó. El filtrado se evaporó y el residuo se purificó usando cromatografía rápida con gradiente de solvente de MeOH del 2%-5% en DCM para proporcionar 277 mg (96%) del producto diana **26**.

35 <sup>1</sup>H RMN para **26**: (CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 0,23 (bs, 1H), 0,49 (bs, 1H), 0,90-2,0 (m, 52H), 2,20-2,25 (m, 1H), 2,32-2,45 (m, 1H), 2,92-3,0 (m, 1H), 3,08-3,10 (s, 3H), 3,19-3,20 (s, 3H), 3,22-3,25(s, 3H), 3,82-3,84 (m, 1H), 3,90-3,92 (m, 1H), 4,10-4,21(m, 1H), 4,50-4,58(m, 1H), 4,91-5,01 (m, 1H). MS (M+H) 732.

40 Preparación de **27**: A 100 mg (0,14 mmol) de **26** se añadieron 8 ml de HCl 0,1M/éter dietílico y se agitó durante 8 h. Los sólidos blancos se filtraron y lavaron con éter dietílico (2 x 5 ml). Los sólidos se secaron después a alto vacío durante la noche para dar 65 mg (70%) del producto diana **27** como un polvo blanco.

45 <sup>1</sup>H RMN para **27**: (DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm: 0,20 (bs, 1H), 0,38 (bs, 1H), 0,75-1,90 (m, 43H), 2,10-2,15 (m, 1H), 2,20-2,25 (m, 1H), 2,82-2,88 (m, 1H), 2,93-3,03 (s, 3H), 3,19-3,20 (s, 3H), 3,22-3,25(s, 3H), 3,70-3,79 (m, 1H), 3,90-3,92 (m, 1H), 4,10-4,21(m, 1H), 4,50-4,58(m, 1H), 8,14-8,24 (bs, 3H). MS (M+H) 632.

50 **Ejemplo 13**: preparación del éster 16β-hidroxi-17-[5-(1-hidroxi-1-metil-etil)-2-metil-tetrahydro-furan-2-il]-4,4,13,14-tetrametil-3-oxo-tetradecahidro-ciclopropa[9,10]ciclopenta[a]fenantren-6α-ílico del ácido 2-(L)-amino-3-metil-butírico, sal clorhidrato [**C6-(L)-valil-cicloastragona**] (**30**): Preparación de 3-(L)-valil-cicloastragona



Preparación de **28**: A una solución agitada de DMSO (6,4 g, 4 equ, 100 ml de DCM) de -60 a -70°C, se añadió cloruro de oxalilo (5,2 g en 10 ml de DCM) y se agitó durante 10 minutos. Se añadió el compuesto **2** (10 g en 200 ml de DCM) durante un periodo de 10 minutos y la mezcla de reacción se agitó durante 30 minutos seguido por la adición de trietilamina (10,3 g durante 5 min). La reacción se agitó de -60 a -70°C durante 1-2 horas hasta que la reacción se completó. El producto crudo **28** se purificó por cromatografía en columna. Se eluyó con éter de petróleo:acetato de etilo = 4:1 para conseguir 8 g del producto de monooxidación.

<sup>1</sup>H RMN para **28**: (CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 0,38 (bs, 1H), 0,58 (bs, 1H), 0,80-1,32 (m, 25H), 1,50-2,20(m, 12H), 2,30-2,70 (m, 4H), 2,50-2,6 (m, 1H), 3,45-3,52 (m, 1H), 3,71-3,76(m, 1H), 4,69-4,72(m, 1H), MS (M+H) 489.

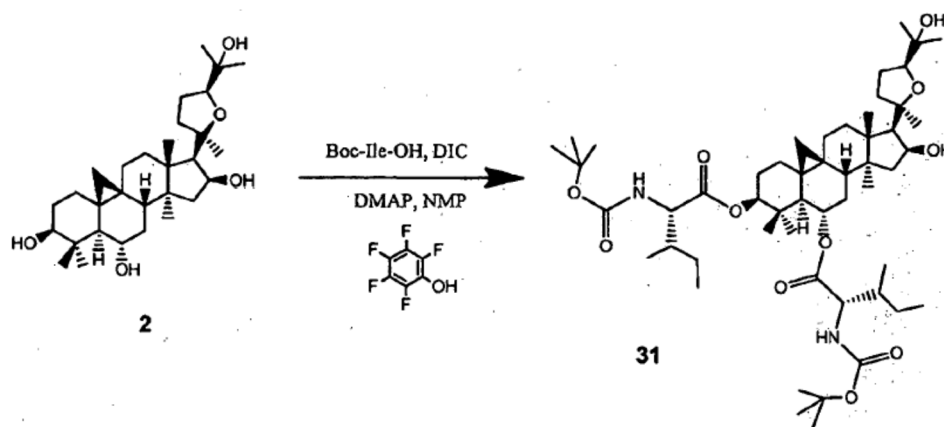
Preparación de **29**: Se disolvió Boc-(L) Val-OH (0,54 g) en 15 ml de DCM. A esta solución se añadieron 0,45 g de pentafluorofenol. La reacción se enfrió en un baño de hielo seguido por la adición lenta de 0,4 ml de DIC. Después de la adición completa la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos tiempo en que la mezcla de reacción se volvió turbia (precipitación de diisopropilcarbodiimida-urea). A esta mezcla se añadieron después 0,3 g del compuesto **28** seguido por 0,3 g de DMAP y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. La mezcla de reacción se transfirió a un embudo separador y se lavó con NaOH ac. 0,1 N (2x), H<sub>2</sub>O (3x) y salmuera (1x), la fase orgánica se separó, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y el solvente se evaporó al vacío. El residuo que incluye el compuesto **29** no se purificó, sino que se llevó al siguiente paso de desprotección.

Preparación de **30**: El producto anterior se trató con HCl en acetato de etilo durante 12 horas. El producto se aisló después por extracción con agua y tras secarlo proporcionó la sal de HCl cruda que se purificó por HPLC prep con mezcla de éter de petróleo y acetato de etilo. Las fracciones puras se juntaron para proporcionar 120 mg del producto final **30**.

<sup>1</sup>H RMN para **30**: (DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm: 0,40 (bs, 1H), 0,80 (bs, 1H), 0,80-1,32 (m, 29H), 1,50-2,20(m, 12H), 2,30-2,32 (m, 2H), 2,40-2,45 (m, 2H), 3,60-3,62 (m, 1H), 3,93-4,01 (m, 1H), 4,49-4,51(m, 1H), 4,79-4,81 (m, 1H). MS (M+H) 588.

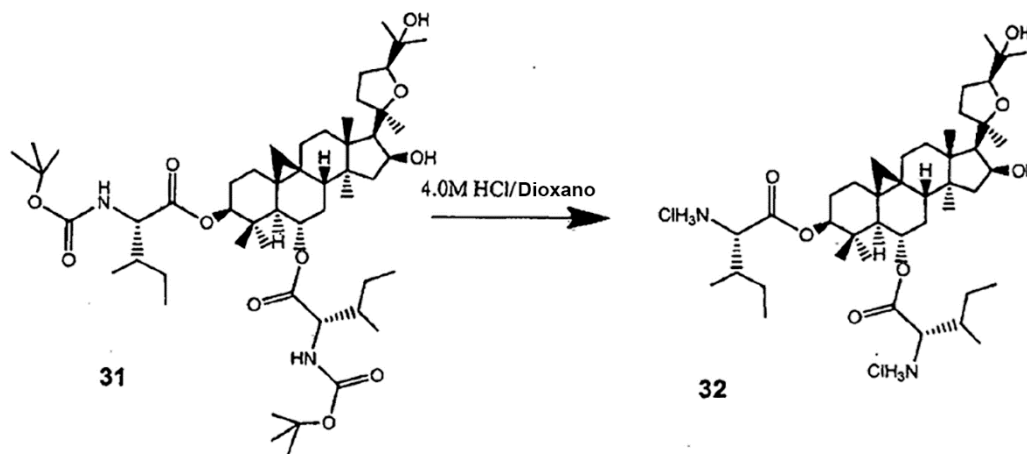
**Ejemplo 14**: Preparación del éster 6α-(2-amino-3-metil-pentanoiloxi)-16β-hidroxi-17-[5-(1-hidroxi-1-metil-etil)-2-metil-tetrahydro-furan-2-il]-4,4,13,14-tetrametil-tetradecahidro-ciclopropa[9,10]ciclopenta[a]fenantren-3β-ílico del ácido 2-(L)-amino-3-metil-pentanoico, sal clorhidrato [**C3,C6-(L,L)-bis-isoleucina-cicloastragenol**]-**32**





Preparación de **31**: Se disolvió Boc-(L)-Ile-OH (4,6 g, 20 mmol) en 25 ml de N-metilpirrolidona (NMP). A esto se añadieron 3,7 g (20 mmol) de pentafluorofenol. La reacción se enfrió en un baño de hielo seguido por la adición lenta de 3,1 ml (20 mmol) de DIC. Después de la adición completa la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos tiempo en que la mezcla de reacción se volvió turbia (precipitación de diisopropilcarbodiimida-  
 5 urea). A esta mezcla se añadió después 1,0 g (2,04 mmol) de **2** seguido por 1,7 g (14 mmol) de DMAP y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. La mezcla de reacción se transfirió a un embudo separador y se lavó sucesivamente con H<sub>2</sub>O (6x), HCl ac. al 1% (2x), NaOH ac. 0,1 N (2x), NaHCO<sub>3</sub> sat. (3x), H<sub>2</sub>O (1x) y salmuera (1x), la fase orgánica se separó, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y el solvente se evaporó al vacío. El residuo se purificó usando cromatografía rápida con gradiente de solvente de MeOH del 2%-5% en DCM para proporcionar 1,4 g (80%) del producto diana **31**.

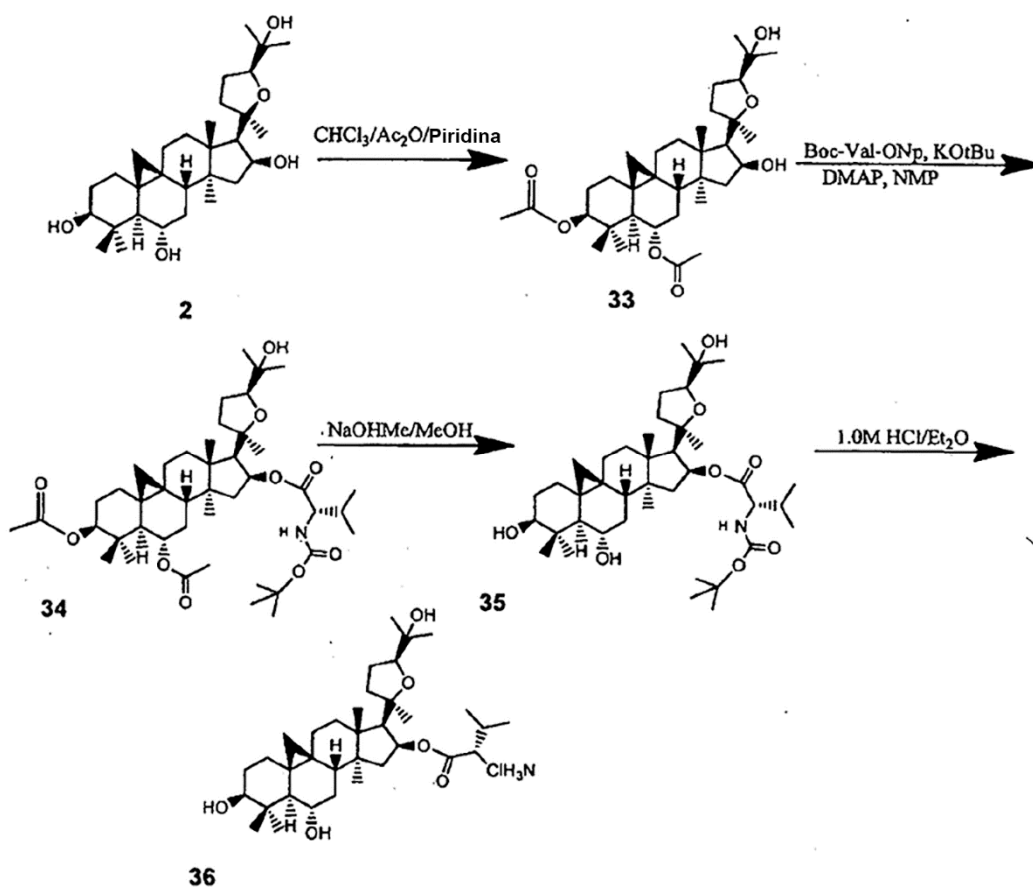
<sup>1</sup>H RMN para **31**: (CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 0,38 (1H, bs), 0,60 (1H, bs), 0,80-1,0 (m, 24H), 1,13 (s,s 6H), 1,20 (s,s 6H), 1,32(s, 6H), 1,35 (s,s 4H) 1,41 (s,s 18H), 1,55-1,60(m, 6H), 1,79-1,83 (m, 3H), 3,71-3,75 (t, 1H), 4,08-4,20 (m, 2H), 4,58-4,60 (m, 1H), 4,61-4,71 (q, 1H), 4,72-4,80 (m, 1H), 4,82-4,84 (d, 1H), 4,9-5,0 (d, 1H). MS (M+H) 915.



Preparación de **32**: A 1,5 g (1,6 mmol) de **31** en 4 ml de Et<sub>2</sub>O anhidro se añadieron 3,5 ml de HCl 4,0 M/dioxano y se agitó durante 4 horas. Los solventes se evaporaron y el producto se precipitó con tres veces de 40 ml de éter dietílico frío y los sólidos se filtraron. Los sólidos se secaron después a alto vacío durante la noche para dar 3,1 g (91%) del producto diana **32** como un polvo blanco. <sup>1</sup>H RMN para **32**: (DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm: 0,22 (bs, 1H), 0,57 (bs, 1H), 0,80-1,20 (m, 35H), 1,41-1,80 (m, 14H), 2,10-2,21 (m, 2H), 2,34-2,42 (m, 4H), 2,20-2,30 (m, 2H), 3,59-3,62 (m, 1H), 3,81-3,83 (m, 2H), 4,42-4,53 (m, 1H), 4,61-4,71(m, 1H), 4,81-4,9 (m, 1H), 8,40-8,70(d, 4H). MS (M+H) 717.

**Ejemplo 15:** Preparación del éster 3β,6α-dihidroxi-17-[5-(1-hidroxi-1-metil-etil)-2-metil-tetrahidro-furan-2-il]-4,4,13,14-tetrametil-tetradecahidrociclopropano[9,10]ciclopenta[a]fenantren-16β-ílico del ácido 2-(L)-amino-3-metil-butírico, sal clorhidrato [**C16-(L)-valil-cicloastragenol**]-**36**

30



Preparación de **33**: A 4 g (8,2 mmol) de **2** se añadieron 100 ml de piridina y se enfrió en un baño de hielo. A esto se añadieron lentamente 77 ml (820 mmol) de anhídrido acético seguido por 100 mg (0,81 mmol) de DMAP. La mezcla de reacción se agitó durante 16 horas. La mezcla de reacción se enfrió en un baño de hielo y se extinguió con HCl ac. al 3% y se diluyó con 200 ml de DCM y se lavó sucesivamente con lo siguiente: NaHCO<sub>3</sub> ac. sat. (2x), H<sub>2</sub>O (3x) y salmuera (1x). La fase orgánica se separó, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y se evaporó al vacío. El crudo se purificó por cromatografía rápida con MeOH al 1% en DCM para proporcionar 4,2 g (89%) de **33** como sólidos blancos. <sup>1</sup>H RMN para **33**: (CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 0,38 (1H, bs), 0,49 (1H, bs), 0,90-1,25 (m, 32H), 1,39-1,45(m 2H), 1,50-1,60 (m, 2H), 1,70-1,82(m, 2H), 1,96-2,01(m, 4H), 2,18-2,20 (s,s 6H), 2,30-2,35 (d, 1H), 3,71-3,76(m, 1H), 4,49-4,59(m, 1H), 4,69-4,72(m, 2H),. MS (M+H) 575.

Preparación de **34**: Se disolvieron 1,54 g (2,7 mmol) de **33** en 8,0 ml de NMP. A la solución transparente se añadieron 800 mg (8,3 mmol) de tert-butoxido de potasio y se agitó durante 45 min. A esto se añadieron 3,0 g (8,9 mmol) de Boc-Val-ONp seguido por 245 mg (2 mmol) de DMAP y se agitó durante 24 h. La mezcla de reacción se diluyó con 100 ml de DCM y se lavó sucesivamente con lo siguiente: H<sub>2</sub>O (4x), HCl ac. al 1% (1x), NaHCO<sub>3</sub> ac. sat. (2x), H<sub>2</sub>O (3x) y salmuera (1x). La fase orgánica se separó, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y se evaporó al vacío. El crudo se purificó por cromatografía rápida con éter de petróleo/acetato de etilo para proporcionar 1,0 g (48%) de **34** como sólidos blancos. <sup>1</sup>H RMN para **34**: (CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 0,38 (1H, bs), 0,49 (1H, bs), 0,90-1,25 (m, 38H), 1,39-1,45(m,s 11H), 1,50-1,60 (m, 2H), 1,70-1,82(m, 2H), 1,96-2,01(m, 4H), 2,18-2,20 (s,s 6H), 2,30-2,35 (d, 1H), 3,71-3,76(m, 1H), 4,13-4,18 (m, 1H), 4,49-4,59(m, 1H), 4,62-4,72 (m, 1H), 5,12-5,17 (m, 1H), 5,38-5,42 (m, 1H). MS (M+Na<sup>+</sup>) 796

Preparación de **35**: A 700 mg (0,91 mmol) de **34** se añadieron 20 ml de solución 0,5 M de MeOH/MeONa y se agitó durante 16 h. La reacción se enfrió en un baño de hielo y se extinguió con una solución de HCl ac. al 1% hasta un pH de 5. El metanol se evaporó a presión reducida y a la fase acuosa se añadió una solución de NaHCO<sub>3</sub> ac. sat. y se extrajo con DCM (4x), la fase orgánica combinada se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y se evaporó al vacío. El crudo se purificó por cromatografía rápida con un gradiente del 2% al 3% de MeOH/DCM para proporcionar 360 mg (58%) de **35** como sólidos blancos. <sup>1</sup>H RMN para **35**: (CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 0,38 (1H, bs), 0,49 (1H, bs), 0,90-1,25 (m, 38H), 1,39-1,45(m,s 11H), 1,50-1,60 (m, 2H), 1,70-1,82(m, 2H), 2,10-2,20 (m, 2H), 2,30-2,35 (d, 1H), 3,20-3,25 (m, 1H), 3,41-3,50 (m, 1H), 3,71-3,76(m, 1H), 4,13-4,18 (m, 1H), 5,12-5,17 (m, 1H), 5,38-5,42 (m, 1H). MS (M+Na<sup>+</sup>) 712

Preparación de **36**: A 350 mg (0,51 mmol) de **35** se añadieron 10 ml de solución 1,0 M de HCl/Et<sub>2</sub>O y se agitó durante 5 h. Los solventes se evaporaron a presión reducida y el residuo se lavó con 10 ml de Et<sub>2</sub>O anhidro (3x) y se

filtró al vacío. Los sólidos blancos se secaron a alto vacío para proporcionar 250 mg (78%) de **36** como sólidos blancos. <sup>1</sup>H RMN para **36**: (DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm: 0,38 (1H, bs), 0,49 (1H, bs), 0,801,25 (m, 29H), 1,39-1,83 (m,4H), 2,10-2,20 (m, 2H), 2,30-2,40 (m, 4H), 3,18-3,21 (m, 1H), 3,38-3,40 (m, 1H), 3,71-3,76 (m, 1H), 4,13-4,17 (m, 1H), 5,40-5,42 (m, 1H), 8,38-8,53 (bs, 3H). MS (M+H) 590

5 **Ejemplo biológico 1: Queratinocitos / Ensayo de protocolo de amplificación de repeticiones de telomerasa (TRAP)**

10 Se puede determinar la capacidad de un compuesto para aumentar la actividad telomerasa en una célula usando el ensayo TRAP (protocolo de amplificación de repetición telomérica), que se conoce en la técnica (por ejemplo, Kim *et al.*, patente en EE UU No. 5.629.154; Harley *et al.*, patente en EE UU No. 5.891.639). La actividad típicamente se compara con la actividad medida similarmente en un ensayo control de tales células (por ejemplo, una actividad telomerasa el 50% mayor que la observada en un solvente control).

15 Las líneas celulares adecuadas para uso en el ensayo, fibroblastos humanos normales (NHF) o queratinocitos humanos normales (NHK), se pueden obtener de fuentes comerciales, tal como Cascade Biologics, Portland, OR, o 4C Biotech, Seneffe, Bélgica, o de la ATCC (Colección Americana de Cultivos Tipo). Las líneas celulares de fibroblastos humanos normales de la ATCC, que se pueden localizar en la página web de la ATCC incluyen, por ejemplo, CCL135, CCL137 y CCL151.

20 Se juntaron queratinocitos epidérmicos humanos (HEK neonatales) de tres donantes individuales (Cascade Biologics, Portland, OR) y se generó un banco de células de trabajo. Las células se cultivaron en medio EpiLife (Cascade Biologics, Cat.# M-EPI-500, Portland, OR) suplementado con HKGS (suplemento de crecimiento de queratinocitos humanos) (Cascade, Cat.# S-001-5). Se sembraron células HEKneo-P en placa de 96 pocillos durante 24 h antes del tratamiento tripsinizando las células y neutralizando la digestión por tampón de neutralización TN® (Cascade Biologics, Portland, OR) para hacer una suspensión celular. Las células se sembraron a 5000  
25 células/100 µl/pocillo en medio de crecimiento y la placa se incubó a 37°C, CO<sub>2</sub> al 5%/aire al 95%, en un incubador de cultivo celular humidificado. Cuando las células alcanzan una confluencia del 75-80%, la densidad de siembra debe ser aproximadamente 2,5x10<sup>3</sup>/cm<sup>2</sup>.

30 Se formularon los compuestos que se van a probar en DMSO al 10% con las concentraciones deseadas. Se añadieron 11 µl del compuesto formulado en una concentración de 0,01 a 10 µM al cultivo de 96 pocillos junto con un control de 11 µl de DMSO al 10%. También se incluyó un control no tratado (NT). Las células se recogieron a las 24 h +/- 1 h eliminando el medio de crecimiento y lavando una vez con PBS (solución salina tamponada con fosfato) eliminando tanto medio como fue posible. Las células se lisaron añadiendo 50 µl de tampón M-Per (Pierce Cat#  
35 78503 & 78501) e incubando en hielo durante 1 h +/- 15 min. La placa opcionalmente se centrifugó a 2000 RPM, 5 min. El lisado se recogió cuidadosamente de cada pocillo de la placa y se transfirió a una placa de 96 pocillos de almacenamiento con fondo en V nueva, dejando las células de la monocapa intactas.

40 Se realizó un ensayo de citotoxicidad en paralelo con la lisis celular preparando una placa de cultivo celular en duplicado tratada con los mismos compuestos. Después de 24 horas +/- 1 hora de incubación con compuestos, se añadieron 11 µl de azul alamar 1x a la placa duplicada y la placa se incubó a 37°C. La placa se leyó 1 y 3 h con un lector de placas de fluorescencia con longitud de onda de excitación a 530 nm y longitud de onda de emisión a 590 nm. La viabilidad celular (citotoxicidad) era directamente proporcional a la lectura de azul alamar.

45 Tampón TRAP 10 X:

Tris-HCl pH 8,3 200 mM  
MagCl<sub>2</sub> 15 mM  
KCl 650 mM  
50 Tween 20 0,5%  
EGTA 10 mM  
BSA 1 mg/ml

55 Cebadores:

cebador Cy5-TS (AAT CCG TCG AGC AGA GTT) extremo 5' marcado (SEQ ID NO:1) cebador ACX (GCGCGGCTTACCCTTACCCTTACCCTAACC) (SEQ ID NO:2) la Taq polimerasa era AmpliTaq ADN Polimerasa, (Applied Biosystems, cat. # N8080171) y dNTP (Invitrogen, cat. # R72501).

60 Tabla 1. Marco del ensayo TRAP

	Concentración madre	Por reacción (µl)	Concentración final
Tampón TRAP 10X con BSA		5	1x
dNTP	2,5 mM	1	50 uM
Cebador Cy5-TS	0,5 mg/ml, 83 µM	0,1	1 ng/µl

ACX	0,1 mg/ml, 11 µM	1	2 ng/µl
Taq polimerasa	5 U/ml	0,4	0,04 U/µl
extracto celular		5-10	
H <sub>2</sub> O		32,5-37,5	
Total		45	

La mezcla de PCR incluye los siguientes componentes: cebador Cy5-TS, un oligonucleótido marcado en 5' con Cy5 que tiene la secuencia 5'-AAT CCG TCG AGC AGA GTT-3' (SEQ ID NO:1), es un sustrato de telomerasa. Dependiendo de la actividad telomerasa en el medio, se añadirán repeticiones de telómero (que tienen la secuencia ..AGGGTT..) al sustrato, para formar productos extendidos de telomerasa, también denominados productos de telomerasa o productos TRAP. El cebador ACX, que tiene la secuencia 5'- GCG CGG CTT ACC CTT ACC CTT ACC CTA ACC-3' (SEQ ID NO: 2), es un cebador inverso anclado que hibrida con los productos extendidos de telomerasa.

Se añade una muestra de lisado celular (5-10 µl) a la mezcla de PCR en un tubo de reacción, y se lleva a cabo la extensión/amplificación de telómeros incubando la muestra a las siguientes temperaturas y tiempos indicados 30°C durante 30 minutos, después 28 ciclos de la reacción de PCR en 3 pasos: 94°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos, y 72°C durante 1 minuto, seguido por 72°C durante 4 minutos y mantener a 4°C. Los productos de reacción de PCR están listos para someterlos a carrera en electroforesis en gel de poliacrilamida.

Se añadió colorante de carga que contiene, por ejemplo, azul de bromofenol y xileno cianol a la mezcla de reacción, y las muestras se someten a electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) no desnaturalizante del 10-15% en TBE 1x. Los productos de reacción TRAP se observan, por ejemplo, usando un fluoroiager para la detección de productos de telomerasa marcados con CY5 (excitación máxima a 650 nm; emisión máxima a 670 nm).

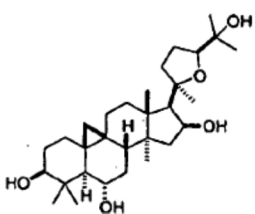
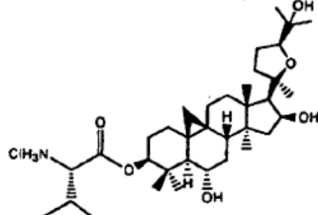
La actividad telomerasa se midió por vol. de pixeles capturados total (bandas de la escalera de ADN) por encima del fondo para cada carril del gel. La actividad se normalizó midiendo el ARN total (ng/ml) usando el kit de cuantificación de ARN Ribogreen® de Molecular Probes, cat. # R-11490 y según las condiciones comercialmente recomendadas con un intervalo de estándar de ARN de 0,8-200 ng/ml, dilución 1:200 del colorante RG, dilución de la muestra 100-250x.

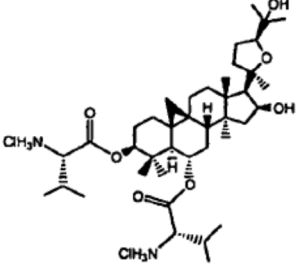
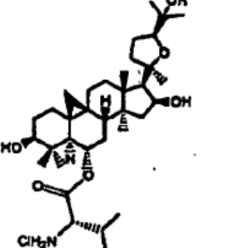
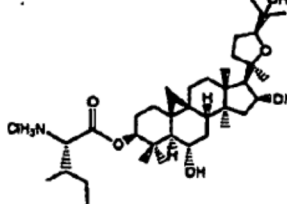
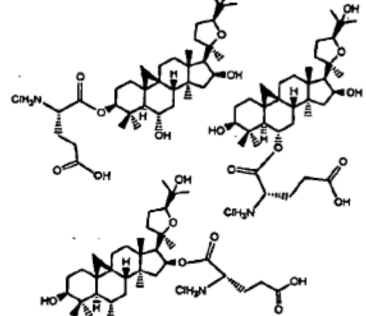
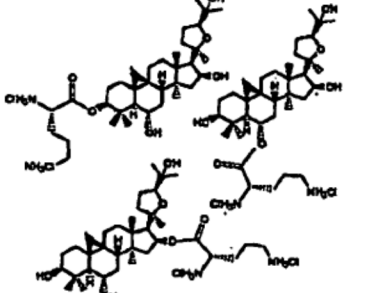
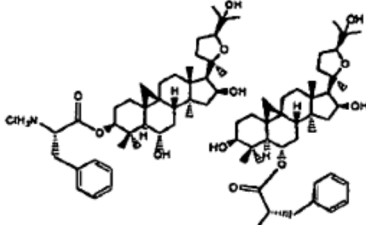
Vol de pixeles totales/ARN = Actividad telomerasa relativa normalizada

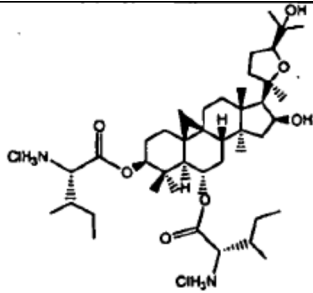
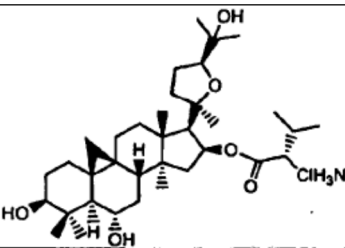
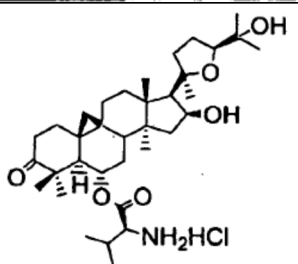
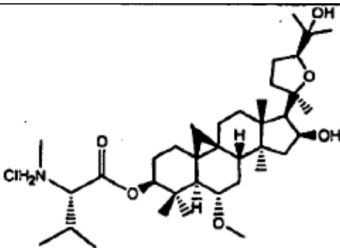
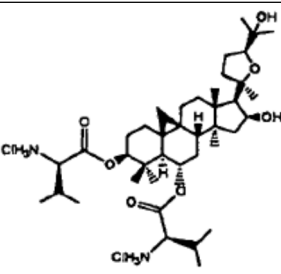
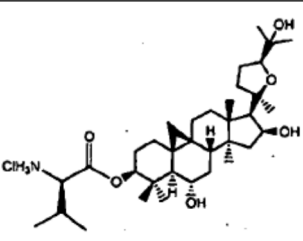
La viabilidad celular (citotoxicidad) era directamente proporcional a la lectura de AA.

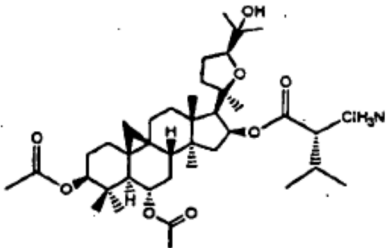
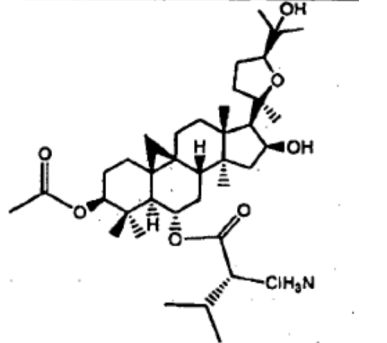
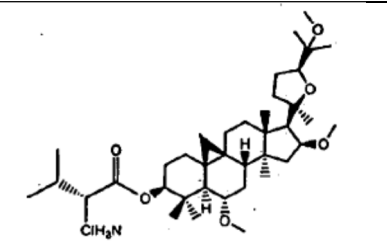
Los resultados se muestran en la tabla 2.

Tabla 2

Compuesto #	Nombre	Estructura	Actividad en ensayo HEK in vitro	CE <sub>50</sub> y veces de aumento de actividad
2	cicloastragenol		+	CE <sub>50</sub> 30 nM, Max: 3,3 veces
4	C3-(L)-valil-cicloastragenol MW=624,5		+	CE <sub>50</sub> 6-22 nM, Max: 4,5 veces

7	C3,C(6)-(L,L)-bisvalil-cicloastragenol MW=761		+	CE <sub>50</sub> 41-50 nM, Max: 4,8 veces
12	C6-(L)-valil-cicloastragenol MW=624,5		+	CE <sub>50</sub> 28-32 nM, Max: 4,1 veces
14	C3-(L)-isoleucil-cicloastragenol MW=639		+	CE <sub>50</sub> 9-21 nM, Max: 4,0 veces
18a, 18b, 18c	C3-(L)-glutamato-cicloastragenol, C6-(L)-glutamato-cicloastragenol, L-glutamato-C16-cicloastragenol MW=654,5		Activo en CMSP	
16a, 16b, 16c	C3-(L)-ornitnil-cicloastragenol, C6-(L)-ornitnil-cicloastragenol, C16-(L)-ornitnil-cicloastragenol MW=677		-	
20a, 20b,	C3-(L)-fenilalanil-cicloastragenol, C6-(L)-fenilalanil-cicloastragenol, MW=637,5		Activo en CMSP	

32	C3,6-(L)-isoleucil-cicloastragenol		+	Max 3 veces a 0,37-1,1 $\mu$ M
36	C16-(L)-valil-cicloastragenol MW=624,5		+	Max 3,0 veces a 0,01-0,12 $\mu$ M
30	C6-(L)-valil-C3-cicloastragenona		+	CE <sub>50</sub> 31 $\mu$ M, Max: 3,5
22	C3-(L)-N-metil valil-C6 metoxi-cicloastragenol MW=652,5		-	
8	C3,C6-(D,D9-bisvalil-cicloastragenol MW=761		-	
5	C3-(D)-valil-cicloastragenol MW=624,5		-	

	C16-(L)-valil-C3,6-diacil-cicloastragenol MW=710,5			
	C6-(L)-valil-C3-acil-cicloastragenol MW=667,5			
27	C3-(L)-valil-C6,16,25-trimetoxi-cicloastragenol MW=652,5			

+ la activación de telomerasa es 2 veces o más en comparación con el vehículo control en el pico de la curva de dosis completa.

5 **Ejemplo biológico 2:** Célula monocítica de sangre periférica / Ensayo de protocolo de amplificación de repeticiones de telomerasa (TRAP)

10 **Aislamiento de CMSP.** Se recogió sangre en vacutainers con heparina sódica y se juntó en único tubo de polipropileno de 50 ml. La sangre se diluyó 1:1 con PBS 1X y se mezcló por completo por inversión. 25 ml de la sangre diluida se echaron encima de 12 ml de Lympholyte-H (Cedarlane Laboratories) y se centrifugó a temperatura ambiente durante 20 min a 800 g. Usando una pipeta, la capa de linfocitos en la interfase de Lympholyte-H se retiró cuidadosamente y se transfirió a un tubo nuevo de 50 ml. Las células transferidas se diluyeron 1:1 con PBS 1X y se centrifugaron a 800 g durante 10 min para precipitar los linfocitos. Los linfocitos se lavaron 2 veces con medio "completo", que consiste en RPMI (Sigma, No. de catálogo R8758) que se había suplementado con SBF inactivado por calor al 10% y Hepes 10 mM.

15 **Condiciones de cultivo.** Las células se contaron usando exclusión de azul de tripán y se resuspendieron en medio completo que está suplementado con 50 unidades de hIL-2/ml de modo que la concentración final de células sea  $1 \times 10^6$ /ml. A la suspensión celular, se añadieron bolas recubiertas de Ac CD2/3/28 del kit de activación/expansión de células T (Miltenyi, No. catálogo 130-441) en una proporción de 1:2 (bola:célula). Las células se hicieron crecer en una botella y la mitad del medio se cambia cada 2-3 días (junto con 20 unidades de hIL-2/ml). Al menos una vez a la semana las células se cuentan y se ajusta el nivel de medio para mantener las células aproximadamente  $5 \times 10^5$ /ml.

25 **Formulación de análogos.** Los análogos se formularon en DMSO de grado cultivo puro a una concentración de 1 mM. De esta solución madre, los análogos se diluyen a 100  $\mu$ M en medio RPMI completo. Una parte de la formulación 100  $\mu$ M se diluyó a 10  $\mu$ M en medio RPMI completo que contenía DMSO al 10%. Además, se formuló el vehículo control diluyendo DMSO en medio RPMI completo para obtener una solución al 10% (esto es equivalente a la cantidad de DMSO en las diluciones de análogos).

30 **Tratamiento con análogos.** Después de 10-14 días en cultivo, las células se contaron y resuspendieron en medio acondicionado a una concentración de  $1 \times 10^6$ /ml. Se sembraron 0,5 ml de esta suspensión celular en los pocillos de una placa de 24 pocillos. El análogo se diluyó en medio RPMI completo fresco para obtener concentraciones de 2  $\mu$ M (de la solución madre 100  $\mu$ M) y 0,2  $\mu$ M (de la solución madre 10  $\mu$ M). Además, se diluye en vehículo control (DMSO al 10% en medio RPMI) 1:50 en medio RPMI completo fresco. Cada pocillo que contiene 0,5 ml de la suspensión celular (deben ser  $5 \times 10^5$  por pocillo) recibe 0,5 ml de análogo diluido o vehículo control DMSO. Las

concentraciones finales de los análogos eran por tanto 1 µM y 0,1 µM y la concentración final de DMSO en todos los pocillos (incluyendo el vehículo control) es del 0,1%.

5 **Recogida de células y preparación de lisado celular.** 24 horas después de la adición de los análogos y vehículo control DMSO al cultivo, las células se retiraron de los pocillos y se añadieron a tubos de microcentrifuga. Las células se centrifugaron a 14.000 rpm durante 2 minutos y el medio se aspiró, seguido por resuspensión en 0,5 ml de PBS 1X frío. Las células se centrifugaron otra vez durante 2 minutos y el PBS se aspiró. El precipitado celular se resuspendió en 100 µl de M-PER (reactivo de extracción de proteína de mamífero) y se incubó en hielo durante 30 minutos. Después de la incubación, la suspensión se centrifugó a 14.000 rpm durante 20 minutos a 4°C. Después de la centrifugación, 80 µl de lisado se transfirieron a un tubo de microcentrifuga prehelado, teniendo cuidado de no transferir restos celulares. La concentración final del lisado celular era 5000 células/µl.

15 **Reacción TRAP y gel.** Las muestras se analizaron usando una reacción TRAP PCR de 1 paso. Antes de realizar la reacción, las muestras se diluyeron 1:5 en tampón M-PER (1000 células/µl). Para cada reacción se usó la siguiente mezcla: 37,5 µl de H<sub>2</sub>O, 5 µl de tampón TRAP 10x con BSA, 1 µl de dNTP 2,5 mM, 1 µl de cebador ACX 0,1 mg/ml, 0,1 µl de cebador TS marcado con Cy5 0,5 mg/ml, 0,4 µl de Taq polimerasa 5 U/µl, y 5 µl de muestra diluida (reacción total 50 µl). la reacción de PCR fue como sigue: 30°C durante 30 minutos, 28 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto, seguido por 72°C durante 4 minutos. Los productos de PCR se separaron en un gel de poliacrilamida al 12,5% y se analizaron usando un fosfoimager STORM.

20

Compuesto	Nombre	Actividad en CMSP	Veces de aumento a 1 µM
2	cicloastragenol	++	1,6-20,7
4	C3-(L)-valil-cicloastragenol MW=624,5	++	1,4-19,4
mezcla 16a, 16b, 16c	C3-(L)-ornitil-cicloastragenol, C6-(L)-ornitil-cicloastragenol, C16-(L)-ornitil-cicloastragenol MW=677	+	1,2-8,1
mezcla 18a, 18b, 18c	C3-(L)-glutamato-cicloastragenol, C6-(L)-glutamato-cicloastragenol, L-glutamato-C16-cicloastragenol MW=654,5	+	0,9-6,8
mezcla 20a, 20b,	C3-(L)-fenilalanil-cicloastragenol, C6-(L)-fenilalanil-cicloastragenol, MW=637,5	-/+	2,0-4,1

**Ejemplo biológico 3:** Administración de compuestos a ratones y análisis de los niveles en plasma y actividad telomerasa en tejidos

25 Se determinaron los niveles en plasma de un compuesto después de una única administración intravenosa, oral, intraperitoneal o subcutánea en ratones C57BL/6 macho. Se recogieron muestras de plasma y se usaron para determinar la concentración en plasma del compuesto y metabolitos. Además, se recogieron muestras de tejido, incluyendo muestras de bigotes, y células mononucleares de sangre periférica (CMSP) para análisis de la actividad telomerasa.

30 Los ratones C57BL/6 se dividieron en grupos de tratamiento. A los ratones se les suministró SLAC-MO1 # W080208 (Shanghai Laboratories Animal Center, Shanghái, China) a voluntad a lo largo de la parte del estudio en vida con la excepción del periodo de ayuno durante la noche antes de la dosificación oral. El agua estaba disponible a voluntad.

35 Se ajustaron controles medioambientales para la sala de animales para mantener una temperatura de 23±2°C, humedad del 50-70%, y un ciclo de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad. El ciclo de 12 horas de oscuridad se puede interrumpir temporalmente para acomodar los procedimientos de estudio. Los animales se aclimataron a los procedimientos de estudio durante 1-7 días antes de la administración de la dosis inicial.

40 Los animales usados en este estudio se seleccionaron basándose en pesos corporales que están en el ±20% del peso corporal medio, salud general y aclimatación a estar enjaulados. Los animales tuvieron acceso libre tanto a alimento como agua durante el curso entero del estudio con la excepción del periodo de ayuno durante la noche antes de la dosificación oral.

45 Las dosis se administraron por vía intravenosa a través de la vena de la cola, por vía oral, subcutánea o por vía intraperitoneal como se indica en la tabla 3. Se tomaron los pesos corporales el día de la administración de la dosis. El volumen de dosis se determinó en base al peso corporal individual tomado el día de la dosificación.



Se recogieron muestras de sangre (aproximadamente 300 µl) mediante punción cardiaca o mediante punción retroorbital después de anestesia en tubos que contenían anticoagulante K<sub>2</sub>-EDTA y NaF 1 mg/ml en varios puntos de tiempo después de la dosificación. La sangre se almacenó en hielo y después el plasma se separó mediante centrifugación (8000 rpm x 6 minutos). El plasma se almacenó a 20°C hasta el análisis por LC-MS/MS.

Se realizó la eutanasia por inhalación de dióxido de carbono seguido por desangrado. Se recogieron bigotes y células mononucleares de sangre periférica (CMSP) en algunos animales a las 30 horas y se almacenaron a -80°C después del procesamiento.

Las CMSP se recogieron de la sangre usando K<sub>2</sub>-EDTA como el anticoagulante. Después de la recogida, el tubo se invirtió suavemente 8-10 veces para mezclar. El tubo se centrifugó a 12000 rpm durante 30 s para precipitar las células, el sobrenadante se retiró y los precipitados de CMSP se congelaron rápidamente en nieve carbónica/metanol y se almacenaron a -80°C. Las células se procesaron como se indica en el ejemplo biológico 2. La figura 1 muestra la actividad telomerasa en CMSP durante el tiempo después del tratamiento con el compuesto 4.

Se arrancó una única o un grupo de vibrisas y se colocaron 10-20 vibrisas/animal en 200 µl de tampón M-Per (Pierce catálogo #: 78503/78501/78505, sumergiendo los folículos). Las muestras se congelaron en nieve carbónica/metanol en 1 hora del arrancado. La figura 2 muestra la actividad telomerasa en bigotes durante el tiempo después del tratamiento con el compuesto 4.

Se determinó que los compuestos de fórmula I monosustituidos con aminoácidos cuando se administran a ratones muestran alguna conversión a cicloastragenol y los compuestos disustituidos con aminoácidos pueden mostrar una cantidad menor de conversión a compuestos monosustituidos.

Las mezclas de isómeros posicionales, C3-(L)-ornitil-cicloastragenol, C6-(L)-ornitil-cicloastragenol y C16-(L)-ornitil-cicloastragenol (**mezcla 16a, 16b, 16c**) y C3-(L)-glutamato-cicloastragenol, C6-(L)-glutamato-cicloastragenol y L-glutamato-C6-cicloastragenol (**mezcla 18a, 18b, 18c**) no estaban biodisponibles en ratones.

La biodisponibilidad de los compuestos se muestra en la tabla 3.

**Tabla 3. Estudio y biodisponibilidad en ratones**

Compuesto de prueba	Nivel de dosis (mg/kg)	Vehículo	Ruta de dosificación	Biodisponibilidad %F
4	10	EtOH al 2%/agua al 98%	PO	48
4	10	EtOH al 2%/agua al 98%	SC	66
7	10	EtOH al 2%/agua al 98%	PO	25
7	10	EtOH al 2%/agua al 98%	SC	61
12	5	EtOH al 2%/agua al 98%	PO	8
12	5	EtOH al 2%/agua al 98%	IP	42
14	10	PEG400 al 5%/solutol HS-15 al 5%/agua al 90%	PO	42

**Ejemplo biológico 4:** Administración de compuestos a ratas macho y análisis de niveles en plasma y actividad telomerasa en tejidos

Se determinaron los niveles en plasma de un compuesto después de una única administración intravenosa y oral en ratas Sprague Dawley macho canuladas en la arteria carótida. Se recogieron muestras de sangre y se usaron para determinar la concentración en plasma del compuesto y metabolitos. Además, se recogieron muestras de tejido, incluyendo muestras de bigotes, y CMSP para análisis de la actividad telomerasa.

Las ratas Sprague Dawley macho canuladas en la arteria carótida se dividieron en grupos de tratamiento según la tabla 6. A las ratas se les suministró SLAC-MO1 # YY080208 (Shanghai Laboratories Animal Center, Shanghai, China) a voluntad a lo largo de la parte del estudio en vida con la excepción del periodo de ayuno durante la noche antes de la dosificación oral. El agua estaba disponible a voluntad.

Se ajustaron controles medioambientales para la sala de animales para mantener una temperatura de 23±2°C, humedad del 50-70%, y un ciclo de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad. El ciclo de 12 horas de oscuridad se puede interrumpir temporalmente para acomodar los procedimientos de estudio. Los animales se aclimataron a los procedimientos de estudio durante 1-7 días antes de la administración de la dosis inicial.

Los animales usados en este estudio se seleccionaron basándose en pesos corporales que están en el ±20% del peso corporal medio, salud general y aclimatación a estar enjaulados. Los animales tuvieron acceso libre tanto a alimento como agua durante el curso entero del estudio con la excepción del periodo de ayuno durante la noche antes de la dosificación oral.

Los compuestos se disolvieron en EtOH al 2%/agua al 98% para dar una concentración final de 2,5 mg/ml y 1 mg/ml tanto para administración intravenosa como oral, respectivamente. La concentración de cada compuesto se confirmó por análisis de HPLC.

5 Las dosis se administraron por vía intravenosa a través de la vena de la cola y por vía oral, como se indica en la tabla 4. Se tomaron los pesos corporales el día de la administración de la dosis. El volumen de dosis se determinó en base al peso corporal individual tomado el día de la dosificación.

10 Se recogieron muestras de sangre (aproximadamente 250 µl) a través de las cánulas de la arteria en tubos que contenían anticoagulante K<sub>2</sub>-EDTA y NaF 1 mg/ml en los puntos de tiempo apropiados. La sangre se almacenó en hielo y después el plasma se separó mediante centrifugación (8000 rpm x 6 minutos). El plasma se almacenó a 20°C hasta el análisis por LC-MS/MS.

15 Muestras de tejido: Se recogieron muestras de bigotes en algunos animales 30 h después de la dosificación mediante pinzas hemostáticas y se colocaron 10-20 vibrisas/animal en un tubo eppendorf de 1,5 ml que contenía 200 µl de tampón M-Per (Pierce catálogo #: 78503/78501/78505). Las muestras se congelaron en nieve carbónica/metanol en 1 hora del arrancado.

20 Se determinó que los compuestos de fórmula I monosustituidos con aminoácidos cuando se administran a ratas muestran alguna conversión a cicloastragenol y los compuestos disustituidos con aminoácidos pueden mostrar una cantidad menor de conversión a compuestos monosustituidos.

Se calculó el porcentaje de biodisponibilidad.

25 **Tabla 4. Estudio y biodisponibilidad en ratas**

Compuesto de prueba	Nivel de dosis (mg/kg)	Vehículo	Ruta de dosificación	Biodisponibilidad %F
2	10	EtOH al 2%/agua al 98%	PO	22,6
4	10	EtOH al 2%/agua al 98%	PO	36
7	10	EtOH al 2%/agua al 98%	PO	44
12	10	EtOH al 2%/agua al 98%	PO	27
14	10	PEG400 al 5%/solutol HS-15 al 5%/agua al 90%	PO	93
20a, 20b	10	EtOH al 2%/agua al 98%	PO	0,68

**Ejemplo biológico 5:** Administración de compuestos a perros Beagle macho y análisis de niveles en plasma y actividad telomerasa en tejidos

30 Se determinaron los niveles en plasma de un compuesto después de una única administración intravenosa y oral en perros Beagle macho. Se recogieron muestras de sangre y se usaron para determinar la concentración en plasma del compuesto y metabolitos. Además, se recogieron muestras de tejido, incluyendo muestras de bigotes, y células CMSP para análisis de la actividad telomerasa.

35 Los perros Beagle macho se dividieron en grupos de tratamiento según la tabla 5. A los perros se les suministró SLAC-MO1 # 080701 (Shanghai Laboratories Animal Center, Shanghái, China) a voluntad a lo largo de la parte del estudio en vida con la excepción del periodo de ayuno durante la noche antes de la dosificación oral. El agua estaba disponible a voluntad.

40 Se ajustaron controles medioambientales para la sala de animales para mantener una temperatura de 23±2°C, humedad del 50-70%, y un ciclo de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad. El ciclo de 12 horas de oscuridad se puede interrumpir temporalmente para acomodar los procedimientos de estudio. Los animales se aclimataron a los procedimientos de estudio durante 1-7 días antes de la administración de la dosis inicial.

45 Los animales usados en este estudio se seleccionaron basándose en pesos corporales que están en el ±20% del peso corporal medio, salud general y aclimatación a estar enjaulados. Los animales tuvieron acceso libre tanto a alimento como agua durante el curso entero del estudio con la excepción del periodo de ayuno durante la noche antes de la dosificación oral.

50 Los compuestos se disolvieron en EtOH al 2%/agua al 98% o una solución de PEG400 al 5%, solutol HS-15 (BASF, TX) al 5%, agua al 90%, para dar una concentración final de 2,5 mg/ml y 1 mg/ml tanto para administración intravenosa como oral, respectivamente. La concentración de cada compuesto se confirmó por análisis de HPLC.

55 Las dosis se administraron por vía intravenosa a través de la vena femoral izquierda y después por dosificación oral una semana más tarde. Se tomaron los pesos corporales el día de la administración de la dosis. El volumen de dosis se determinó en base al peso corporal individual tomado el día de la dosificación.

5 Se recogieron muestras de sangre (aproximadamente 250 µl) a través de la vena femoral derecha en tubos que contenían anticoagulante K<sub>2</sub>-EDTA y NaF 1 mg/ml en los puntos de tiempo apropiados. La sangre se almacenó en hielo y después el plasma se separó mediante centrifugación (8000 rpm x 6 minutos). El plasma se almacenó a 20°C hasta el análisis por LC-MS/MS.

Se calculó el porcentaje de biodisponibilidad y se muestra en la tabla 5.

**Tabla 5. Estudio y biodisponibilidad en perros**

Compuesto de prueba	Nivel de dosis (mg/kg)	Vehículo	Ruta de dosificación	Biodisponibilidad %F
2	10	EtOH al 2%/agua al 98%	PO	3
4	10	EtOH al 2%/agua al 98%	PO	47
14	10	PEG400 al 5%/solutol HS-15 al 5%/agua al 90%	PO	55

10 **Ejemplo biológico 6:** Aumento de telomerasa y proliferación celular en células madre/progenitoras hematopoyéticas de médula ósea

15 Se obtuvieron células progenitoras hematopoyéticas CD34+ derivadas de médula ósea humanas de un donante sano de 47 años de edad.

i) Activación de telomerasa por el compuesto **4** en cultivo líquido de células humanas a corto plazo

20 Se hicieron crecer las células progenitoras hematopoyéticas CD34+ derivadas de médula ósea humanas en medio de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM) (Invitrogen, CA) + suero bovino fetal (SBF) al 10% durante 3 días en presencia del compuesto **4** (1 µM, 100 nM, 10 nM), vehículo (DMSO al 1%) o nada. La actividad telomerasa aumentó en ~60-70% en la muestra de compuesto **4** 100 nM relativa al vehículo control (evaluado por ensayo TRAP en gel tradicional).

25 **Tabla 6. Actividad telomerasa de células huCD34+: (veces de vehículo control)**

	Aumento de actividad telomerasa
compuesto <b>4</b> 1 µM	1,3 veces
compuesto <b>4</b> 100 nM	1,8 veces
compuesto <b>4</b> 10 nM	1,4 veces

ii) Aumento en el número de unidades formadoras de colonias en cultivos de células humanas tratados con compuesto **4** (14 días de tratamiento)

30 Se sembraron las células progenitoras CD34+ humanas (donante sano de 47 años de edad) en un ensayo de formación de colonias estándar en presencia del compuesto **4** (100 nM), vehículo (DMSO al 0,1%) o nada. Después de 14 días, las colonias hematopoyéticas se enumeraron (CFU-E, BFU-E, CFU-GM y CFU-GEMM). Las placas que contenían el compuesto **4** tenían un 17% más de unidades formadoras de colonias que el vehículo solo. (El recuento total de colonias fue: sin tratar 106,5; tratadas con vehículo, 103,5, tratadas con el compuesto **4**, 121,5).

35 **Tabla 7. Formación de colonias en células huCD34+**

	CFU-E	BFU-E	CFU-GM	CFU-GEMM	Total
DMSO al 0,1% vehículo	5,5	16	79,5	2,5	103,5
compuesto <b>4</b> 100 nM	11	25,5	80	5	121,5

40 Se obtuvieron células de linaje empobrecido derivadas de médula ósea de ratón (enriquecidas para células madre y progenitoras hematopoyéticas, pero no una población pura).

i) Aumento en el número de unidades formadoras de colonias en cultivos de células derivadas de médula ósea de ratón tratados con compuesto **4** de ratones HSC de tipo salvaje normales (12 días de tratamiento).

45 Se sembraron células de médula ósea de linaje empobrecido de ratón de tipo salvaje de dos ratones separados en un ensayo de formación de colonias estándar en presencia del compuesto **4** (100 nM y 500 nM), vehículo (DMSO al 0,1%) o nada. Después de 12 días, las colonias hematopoyéticas se enumeraron (BFU-E, CFU-GM y CFU-GEMM).

En el ratón 1, el recuento total de colonias era: sin tratar, 136; tratado con vehículo, 122; compuesto **4** 100 nM, 161; compuesto **4** 500 nM, 162.

50 En el ratón 2, el recuento total de colonias era: sin tratar, 107; tratado con vehículo, 117; compuesto **4** 100 nM, 121; compuesto **4** 500 nM, 129.

**Tabla 8. Formación de colonias de células de ratón**

		BFU-E	CFU-GM	CFU-GEMM	Total
Ratón 1	DMSO al 0,1% vehículo	41	80	1	122
Ratón 1	compuesto <b>4</b> 100 nM	50	111	0	161
Ratón 1	compuesto <b>4</b> 500 nM	38	124	1	162
Ratón 2	DMSO al 0,1% vehículo	26	89	2	117
Ratón 2	compuesto <b>4</b> 100 nM	31	90	1	121
Ratón 2	compuesto <b>4</b> 500 nM	29	98	2	129

Se observó un aumento en el recuento total de colonias con la administración del compuesto **4**.

5 ii) Activación de telomerasa por el compuesto **4** en cultivo líquido a corto plazo en células de linaje empobrecido derivadas de médula ósea de ratón de ratones mTERT heterocigotos y control de tipo salvaje (de los mismos padres)

10 Se hicieron crecer células de médula ósea de linaje empobrecido de ratones mTERT heterocigotos y de tipo salvaje en IMDM + SBF al 15% que contenía factor de células madre (Kit1), IL-3 e IL-11 durante tres días en presencia del compuesto **4** (1  $\mu$ M, 100 nM, 10 nM), vehículo (DMSO al 0,1%) o nada. La actividad telomerasa de las células de tipo salvaje aumentó en el 40-50% cuando se trataron con el compuesto **4** 100 nM y 1  $\mu$ M, relativa a las tratadas con vehículo control.

15 La actividad telomerasa en las células mTERT heterocigotas aumentó en el 50% cuando se trataron con el compuesto **4** 1  $\mu$ M, relativa a las tratadas con vehículo control.

20 iii) Aumento en el número de unidades formadoras de colonias en cultivos tratados con el compuesto **4** de células de ratón mTERT heterocigotos (12 días de tratamiento)

25 Se sembraron células de médula ósea de linaje empobrecido de ratón mTERT heterocigoto en un ensayo de formación de colonias estándar en presencia del compuesto **4** (100 nM y 500 nM), vehículo (DMSO al 0,1%) o nada. Después de 12 días, las colonias hematopoyéticas se enumeraron (BFU-E, CFU-GM y CFU-GEMM). El recuento total de colonias fue: sin tratar: 67; tratadas con vehículo: 64; compuesto **4** 100 nM: 68; y compuesto **4** 500 nM: 77.

**Tabla 9. El compuesto 4 fomenta las unidades formadoras de colonias en células de médula ósea de linaje empobrecido de ratones mTERT +/-**

	BFU-E	CFU-E	CFU-GEMM	Total
DMSO al 0,1%	26	37	1	64
compuesto <b>4</b> 100 nM	22	43	3	69
compuesto <b>4</b> 500 nM	27	48	1	77

30 **Ejemplo biológico 7:** Efecto de la administración del compuesto **4** a ratones BALB/c sobre la actividad telomerasa y densidad capilar en tapones de Matrigel y actividad telomerasa en células madre/progenitoras de médula ósea

35 Se dosificaron ratones BALB/c (2-3 meses) con el compuesto **4** en etanol al 2% a 10 mg/kg/día PO (dos veces al día). Los ratones se predosificaron durante 1 día (día -1). Se inyectó Matrigel™ (BDBiosciences, California) por vía subcutánea en el abdomen el día 0, y los tapones de Matrigel™ se recogieron el día 12.

40 La mitad del tapón se analizó para actividad telomerasa (extracción con tampón de células RBC, seguido por extracción en M-PER) usando el ensayo TRAP. Se observó un aumento de 1,9 veces ( $p < 0,2$ )  $n=5$ /grupo en la actividad telomerasa en el tapón de Matrigel™ después de tratamiento con el compuesto **4**.

El ARN total, que refleja el número de células, aumentó 1,6 veces ( $p < 0,2$ )  $n=5$ /grupo en los tapones de Matrigel™ después de tratamiento con el compuesto **4**.

45 La otra mitad del tapón de Matrigel™ se usó para histología e inmunotinción de CD31 para analizar la densidad capilar (CD31 es un marcador para células endoteliales, que recubren los capilares). Se observó un aumento de 1,3 veces en la densidad de capilares (inmunotinción de CD31) ( $p < 0,5$ )  $n=5$ /grupo después de tratamiento con el compuesto **4**.

## ii) Células de médula ósea recogidas

Se purificaron células madre y progenitoras de médula ósea de los ratones tratados usando tecnología de separación magnética de empobrecimiento de linaje (columnas Miltenyi MACS). Se observó un aumento de 1,3 a 1,5 veces en la actividad telomerasa determinado mediante el ensayo TRAP en células madre y progenitoras de médula ósea ( $p < 0,1$ )  $n=3$ /grupo que habían sido tratadas con el compuesto **4** comparado con el control.

**Ejemplo biológico 8:** Efecto de la administración del compuesto **4** a ratones C57BL/6 TERT (+/-) que envejecen sobre la actividad y densidad capilar en tapones de Matrigel™ y número de células madre/progenitoras de médula ósea

Se dosificaron ratones Tert (+/-) que envejecen con antecedentes C57BL/6 (8-9 meses) con el compuesto **4** a 10 mg/kg/día PO (dos veces al día) en etanol al 2%. Los ratones se predosificaron durante 1 día (día -1). Se inyectó Matrigel™ por vía subcutánea en el abdomen el día 0, y los tapones de Matrigel™ se recogieron el día 12.

La mitad del tapón se analizó para actividad telomerasa y contenido de hemoglobina que es indicativo de la formación de vasos sanguíneos (extracción con tampón de células RBC, seguido por extracción en M-PER). La otra mitad del tapón se procesó para histología.

El tapón de Matrigel™ tuvo un aumento de 1,8 veces ( $p < 0,02$ ) o un aumento de 2,6 veces ( $p < 0,01$ ), en la actividad telomerasa determinada por 2 experimentos TRAP repetidos,  $n=15$ /grupo para ratones tratados con el compuesto **4**.

El tapón de Matrigel™ tuvo un aumento de 1,2 veces en los niveles de hemoglobina ( $p < 0,2$ )  $n=15$ /grupo para ratones tratados con el compuesto **4**.

El ARN total, que refleja el número de células, aumentó 1,5 veces ( $p < 0,1$ )  $n=15$ /grupo en los tapones de Matrigel™ después de tratamiento con el compuesto **4**.

Se purificaron células madre y progenitoras de médula ósea usando tecnología de separación magnética de empobrecimiento de linaje (columnas Miltenyi MACS). La médula ósea mostró un aumento de 1,3 veces ( $p < 0,18$ ) o un aumento de 1,9 veces ( $p < 0,03$ ) en actividad telomerasa determinada por 2 experimentos TRAP repetidos.  $n=6$ /grupo en ratones tratados con el compuesto **4**.

El número de células madre/progenitoras de médula ósea purificadas aumentó 1,5 veces ( $p < 0,1$ )  $n=6$ /grupo en ratones tratados con el compuesto **4**.

**Ejemplo biológico 9:** Efecto de la administración del compuesto **4** y el compuesto **7** en pericitos cerebrales humanos

Se cultivaron pericitos cerebrales humanos (donante mujer de 27 años) a PD 10 durante un total de 30 h en compuesto **7** 0,5  $\mu\text{M}$  disuelto en agua. Se analizaron la actividad telomerasa y la formación de tubo.

Los pericitos cerebrales se cultivaron primero durante 24 h en una botella T-75 en compuesto **7** 0,5  $\mu\text{M}$ , y después se separaron en una placa de 24 pocillos recubierta con Matrigel para fomentar la formación de tubo (hecho en triplicado). Se incluyó otra vez compuesto **7** 0,5  $\mu\text{M}$  en el medio. Después de 6 h las muestras se fijaron y se contaron los puntos de ramificación usando un microscopio, 5 campos/pocillos, con 3 pocillos/condición. Los pericitos tratados con el compuesto **7** tuvieron 1,9 veces más puntos de ramificación que el control ( $p < 0,15$ ).

Se prepararon y trataron células como antes, pero la placa de 24 pocillos no se recubrió con Matrigel. Después de 6 h las células se recogieron para análisis TRAP (extracto en M-PER). Se observó un aumento de 2,8 veces en actividad telomerasa en pericitos tratados con el compuesto **7**.

Se sembraron pericitos cerebrales humanos (donante mujer de 27 años) a PD 10 y se trataron con compuesto **4** 0,1 y 0,5  $\mu\text{M}$  en DMSO al 0,1% 24 horas después de sembrar. Las células se incubaron con el fármaco durante 30 horas y se recogieron para análisis TRAP (extracto en M-PER). Se observó un aumento de 1,8 y 1,9 veces en actividad telomerasa con tratamiento de compuesto **4** 0,1 y 0,5  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Se probaron muestras en duplicado.

**Ejemplo biológico 10:** Efecto de la administración de los compuestos **4** y **12** en células epiteliales en vías respiratorias pequeñas humanas

Se usaron células epiteliales de vías respiratorias pequeñas humanas (SAEC) y fibroblastos derivados de vías respiratorias (incluyendo la línea celular de fibroblastos pulmonares fetales IMR-90) para los experimentos *in vitro* para probar el efecto de compuestos sobre la actividad telomerasa.

Se sembraron SAEC y la línea celular de fibroblastos derivados de vías respiratorias IMR-90 en placas de 24 pocillos. Se trataron con 1  $\mu\text{M}$  o 0,1  $\mu\text{M}$  de compuesto **12** durante 48 horas en una concentración final de etanol al

0,2% en el medio. Las células se lavaron con PBS y se lisaron con tampón de lisis M-Per. Se realizó un ensayo TRAP en gel para evaluar la actividad telomerasa. Se encontró que el compuesto **12** aumentó selectivamente la actividad telomerasa 2-4 veces en células derivadas de epitelio (SAEC) pero no en las células derivadas de fibroblastos IRM-90. Experimentos replicados confirmaron estos descubrimientos. En estudios similares el compuesto **4** tenía propiedades y potencia similares al compuesto **12**.

Se trataron SAEC continuamente con 0,1 µM de compuesto **4** en una concentración final de etanol del 0,004% durante 60 días en cultivo continuo. El compuesto **4** aumentó la capacidad replicativa a largo plazo de SAEC en aproximadamente 2 duplicaciones de población (aumento 4X en número de células calculado). No se vio efecto en fibroblastos de pulmón en el cultivo a largo plazo con el compuesto **4**.

Se hicieron crecer SAEC humanas o fibroblastos humanos en presencia de diferentes concentraciones del compuesto **4** en una concentración final de DMSO del 1% en el medio. Después de 3 días las células se recogieron y se midió la proliferación usando el ensayo de proliferación de azul alamar. Las SAEC mostraron proliferación aumentada en aproximadamente el 50% en experimentos de cultivo a corto plazo. No se vio efecto con tratamiento con el compuesto **4** en fibroblastos de pulmón en proliferación a corto plazo. Los marcadores de senescencia p16 y p21 se redujeron significativamente en SAEC que se trataron con el compuesto **4** durante solo 3 días, y la reducción de estos marcadores en fibroblastos fue muy pequeña.

Se sembraron SAEC en una placa de 24 pocillos y se trataron con compuesto **12** a 1 µM y 0,1 µM en una concentración final de etanol del 0,2% en el medio. Después de 24 horas, el medio se cambió y las células se trataron de nuevo con compuesto **12**. Además, una parte de las células se trataron con bleomicina (10 µg/ml) y TGFβ (10 ng/ml). Cuarenta y ocho horas después del segundo tratamiento, las células se lavaron y lisaron con tampón de lisis M-Per. Se corrió un ensayo TRAP en gel para evaluar la actividad telomerasa en las células. En un modelo *in vitro* de fibrosis usando SAEC tratadas con TGFβ y bleomicina, el marcador de miofibroblastos/fibrosis actina de músculo liso alfa (αSMA) aumentó y la expresión del biomarcador epitelial E-cadherina (E-CAD) disminuyó. Tanto TGFβ como bleomicina suprimieron la actividad telomerasa de SAEC y la adición del compuesto **4** parcialmente restableció o protegió la actividad telomerasa contra los efectos de estos compuestos en cultivo.

Aunque la invención se ha descrito con respecto a formas de realización y aplicaciones particulares, los expertos en la materia apreciarán la gama de aplicaciones y métodos de la invención divulgados en el presente documento.

**Lista de secuencias**

<110> Geron Corporation

<120> Composiciones y métodos para aumentar la actividad telomerasa

<130> T3204 EP s3

<140> EP 10 77 8210.4  
<141> 17-05-2010

<150> US 61/179.305  
<151> 18-05-2009

<160> 4

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador CY5-TS

<400> 1  
**aatccgtcga gcagagtt**

<210> 2  
<211> 30  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador ACX

5 <400> 2  
**gcgcggtta cccttaccct taccctaacc** **30**

<210> 3  
 <211> 36  
 10 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido estándar interno TSU2

15 <400>3  
**aatccgtcga gcagagttaa aaggccgaga agcgat** **36**

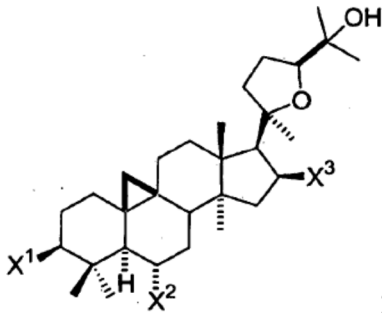
<210> 4  
 20 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 25 <223> Cebador U2

<400> 4  
**atcgcttctc ggcctttt** **18**

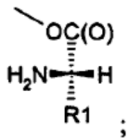
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula I:



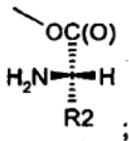
5

en donde  $X^1$ , se selecciona de ceto, hidroxi, y



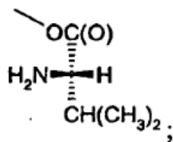
10

en donde  $X^2$ , se selecciona de ceto, hidroxi, y



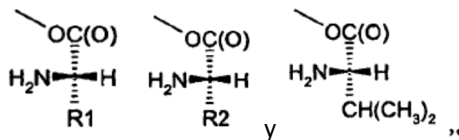
15

en donde  $X^3$ , se selecciona de ceto, hidroxi, y



20

en donde al menos uno de  $X^1$ ,  $X^2$  y  $X^3$  son



respectivamente;

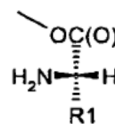
25

en donde  $R^1$  o  $R^2$  se seleccionan independientemente de  $-\text{CH(CH}_3)_2$ , y  $-\text{CH(CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$ ;

y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

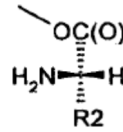
30

2. El compuesto de la reivindicación 1, en donde  $X^1$  es un  $-\text{OC(O)CH(NH}_2)\text{CH(CH}_3)_2$  y  $X^2$  y  $X^3$  son OH.

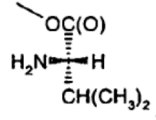


3. El compuesto de la reivindicación 1, en donde  $X^1$  es  $\begin{array}{c} \diagup \text{OC(O)} \\ | \\ \text{H}_2\text{N} \cdots \text{H} \\ | \\ \text{R1} \end{array}$  en donde  $R^1$  se selecciona del grupo que consiste en  $-\text{CH(CH}_3)_2$ , o  $-\text{CH(CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$ .

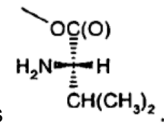




4. El compuesto de la reivindicación 1, en donde  $X^2$  es  $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ , o  $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$ .



5. El compuesto de la reivindicación 1, en donde  $X^3$  es

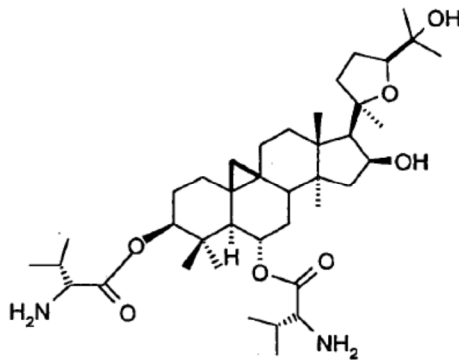
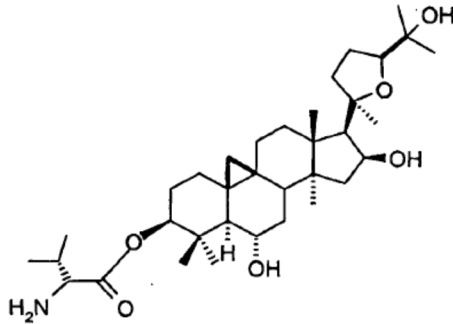


6. El compuesto de la reivindicación 1, en donde al menos uno de  $X^1$ ,  $X^2$  o  $X^3$  es

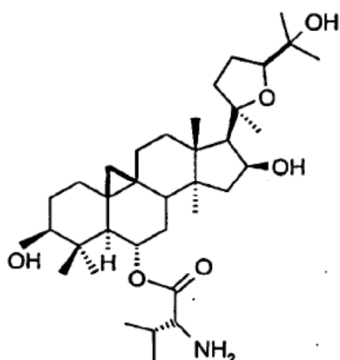
7. El compuesto de la reivindicación 1, en donde al menos uno de  $X^1$  o  $X^2$  es  $-\text{OC}(\text{O})\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$ .

8. El compuesto de la reivindicación 1, en donde  $X^1$  es un  $-\text{OC}(\text{O})\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$  y  $X^2$  y  $X^3$  son  $-\text{OH}$ ,  $X^2$  es un  $-\text{OC}(\text{O})\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CH}(\text{CH}_3)_2$  y  $X^1$  y  $X^3$  son  $\text{OH}$ .

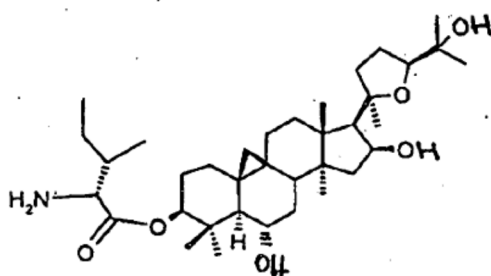
9. Un compuesto según la reivindicación 1 seleccionado del grupo que consiste en:



20



y



5

y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

10. Un compuesto según la reivindicación 1 seleccionado del grupo que consiste en:

- 10 éster 6 $\alpha$ , 16 $\beta$ -dihidroxi-17-[5-(1-hidroxi-1-metil-etil)-2-metil-tetrahydro-furan-2-il]-4,4,13,14-tetrametil-tetradecahidro-ciclopropa[9,10]ciclopenta[a]fenantren-3 $\beta$ -ílico del ácido 2-(L)-amino-3-metil-butírico;  
 éster 6 $\alpha$ -(2-amino-3-metil-butiriloxi)-16 $\beta$ -hidroxi-17-[5-(1-hidroxi-1-metil-etil)-2-metil-tetrahydro-furan-2-il]-4,4,13,14-tetrametil-tetradecahidro-ciclopropa[9,10]ciclopenta[a]fenantren-3 $\beta$ -ílico del ácido 2-(L)-amino-3-metil-butírico;  
 15 éster 3 $\beta$ , 16 $\beta$  dihidroxi-17-[5-(1-hidroxi-1-metil-etil)-2-metil-tetrahydro-furan-2-il]-4,4,13,14-tetrametil-tetradecahidrociclopropa[9,10]ciclopenta[a]fenantren-6 $\alpha$ -ílico del ácido 2-(L)-amino-3-metil-butírico;  
 éster 6 $\alpha$ , 16 $\beta$ -dihidroxi-17-[5-(1-hidroxi-1-metil-etil)-2-metil-tetrahydro-furan-2-il]-4,4,13,14-tetrametil-tetradecahidrociclopropa[9,10]ciclopenta[a]fenantren-3 $\beta$ -ílico del ácido 2-(L)-amino-3-metil-pentanoico;  
 20 éster 16 $\beta$ -hidroxi-17-[5-(1-hidroxi-1-metil-etil)-2-metil-tetrahydro-furan-2-il]-4,4,13,14-tetrametil-3-oxo-tetradecahidro-ciclopropa[9,10]ciclopenta[a]fenantren-6 $\alpha$ -ílico del ácido 2-(L)-amino-3-metil-butírico;  
 éster 6 $\alpha$ -(2-amino-3-metil-pentanoiloxi)-16 $\beta$ -hidroxi-17-[5-(1-hidroxi-1-metil-etil)-2-metil-tetrahydro-furan-2-il]-4,4,13,14-tetrametil-tetradecahidro-ciclopropa[9,10]ciclopenta[a]fenantren-3 $\beta$ -ílico del ácido 2-(L)-amino-3-metil-pentanoico;  
 25 éster 3 $\beta$ , 6 $\alpha$ -dihidroxi-17-[5-(1-hidroxi-1-metil-etil)-2-metil-tetrahydro-furan-2-il]-4,4,13,14-tetrametil-tetradecahidrociclopropa[9,10]ciclopenta[a]fenantren-16 $\beta$ -ílico del ácido 2-(L)-amino-3-metil-butírico,

y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

- 30 11. Un compuesto de las reivindicaciones 1-10 para uso en aumentar la actividad telomerasa en una célula o tejido.  
 12. El compuesto para uso según la reivindicación 11 en donde la célula o tejido se identifica como que requiere actividad telomerasa aumentada.  
 35 13. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto de las reivindicaciones 1-10 en un vehículo farmacéuticamente aceptable.  
 14. La composición farmacéutica que comprende una formulación tópica del compuesto de las reivindicaciones 1-10.  
 40 15. Un método de aumentar la capacidad replicativa de células *ex vivo*, que comprende poner en contacto dichas células con un compuesto de las reivindicaciones 1-10, en una cantidad eficaz para aumentar la actividad telomerasa en dichas células.

- 5
16. El método de la reivindicación 15, en donde dichas células son células de explante obtenidas de un paciente.
  17. Un compuesto de las reivindicaciones 1-10 para uso en aumentar la capacidad replicativa de células.
  18. Un compuesto de las reivindicaciones 1-10 para uso en el tratamiento de una enfermedad.

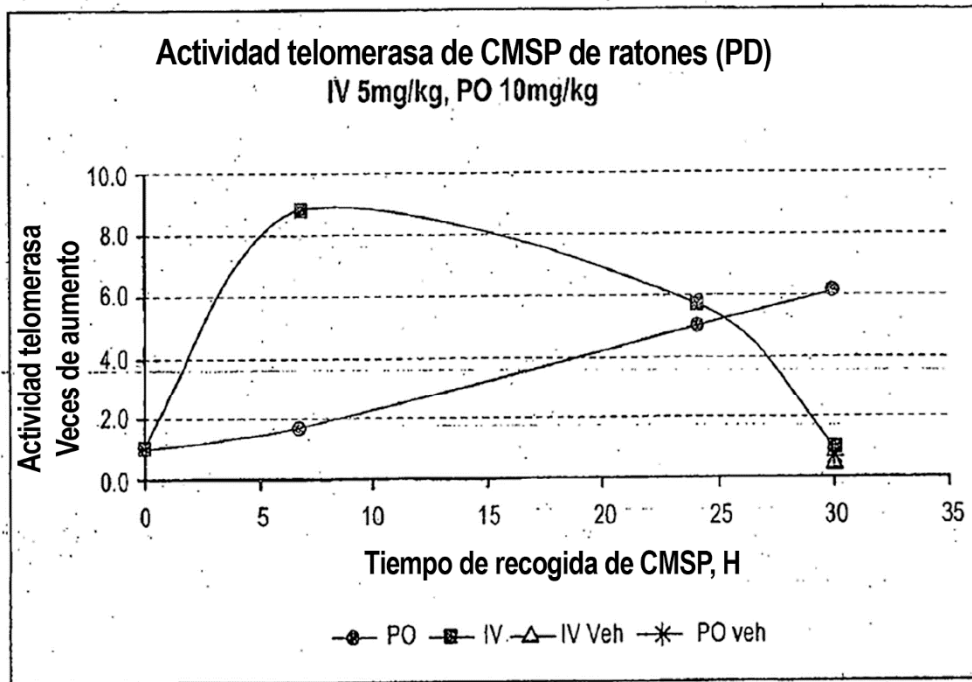


FIG. 1

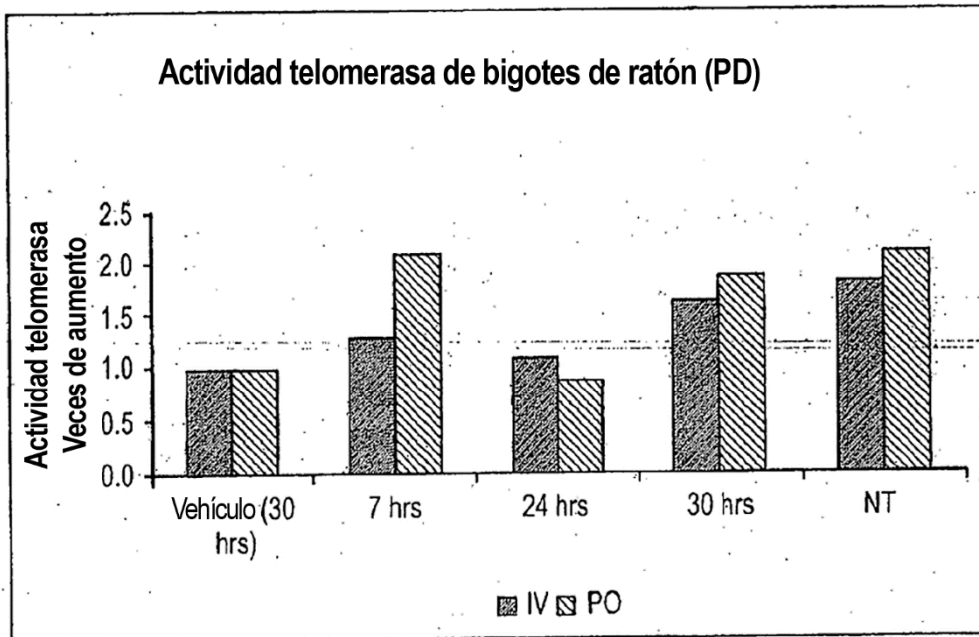


FIG. 2