

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 685 947**

51 Int. Cl.:

<b>A61K 35/74</b>	(2015.01)	<b>A61K 31/105</b>	(2006.01)	<b>A61K 31/122</b>	(2006.01)
<b>G01N 33/53</b>	(2006.01)	<b>A61K 31/155</b>	(2006.01)		
<b>A61K 31/436</b>	(2006.01)	<b>A61K 31/4375</b>	(2006.01)		
<b>A61K 31/352</b>	(2006.01)	<b>A61K 38/22</b>	(2006.01)		
<b>A61K 31/047</b>	(2006.01)	<b>A61K 31/573</b>	(2006.01)		
<b>A61K 31/01</b>	(2006.01)	<b>A61K 31/4709</b>	(2006.01)		
<b>A61K 36/45</b>	(2006.01)	<b>A61K 31/375</b>	(2006.01)		
<b>A61K 36/87</b>	(2006.01)	<b>A61K 31/355</b>	(2006.01)		
<b>A61K 33/06</b>	(2006.01)	<b>A61K 31/015</b>	(2006.01)		
<b>A61K 31/26</b>	(2006.01)	<b>A61K 31/385</b>	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.04.2010 E 15166498 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.06.2018 EP 2965763**

54 Título: **Agentes antienvjecimiento**

30 Prioridad:

**10.04.2009 US 168335 P**  
**10.04.2009 US 168311 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**15.10.2018**

73 Titular/es:

**QI, HAIYAN (100.0%)**  
**5 Thomsen Court, Stony Point**  
**New York, 10980, US**

72 Inventor/es:

**QI, HAIYAN**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

**ES 2 685 947 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

Agentes antienvjecimiento

## 5 Campo de la invención

La presente descripción se refiere a nuevos agentes antienvjecimiento, nuevos métodos para detectar o identificar estos agentes, y el uso de los agentes antienvjecimiento identificados de esta manera para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades o trastornos asociados con la edad. La presente descripción se refiere además a un nuevo método para medir la concentración biológica antienvjecimiento de los agentes antienvjecimiento en muestras biológicas. En particular, la invención introduce el uso de bajas dosis de rapamicina o sus análogos, entre otros inhibidores de la diana de rapamicina (TOR), como agentes antienvjecimiento que mimetizan la restricción calórica para prevenir o tratar diversas enfermedades o trastornos relacionados con la edad.

## 15 Antecedentes de la invención

El estudio de los procesos de envejecimiento humano es importante, en parte porque muchas enfermedades o afecciones se tornan más prominentes entre las personas mayores, por ejemplo, cánceres, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, apoplejía, insuficiencia cardíaca y ataque cardíaco, por nombrar algunos, entre los que muchos aún carecen de métodos eficaces de prevención o tratamiento. Por lo tanto, en la última década la búsqueda de métodos de prevención o tratamiento más eficaces para las enfermedades o trastornos relacionados con la edad a través de estudios de los procesos de envejecimiento animal se ha convertido en uno de los esfuerzos más importantes emprendidos por la comunidad científica. Aunque la abundante literatura ha contribuido con la comprensión de los procesos de envejecimiento, la comprensión plena de los procesos sigue siendo un gran desafío científico que enfrenta la humanidad. Dada la creciente población de personas ancianas en todo el mundo y, por consiguiente, el aumento de la carga de atención médica y los costos asociados, se realizan estudios sistemáticos cada vez más importantes de los procesos de envejecimiento que conducen al descubrimiento efectivo de agentes antienvjecimiento para la prevención o el tratamiento de enfermedades o trastornos relacionados con la edad. Esta invención representa un enfoque sistemático de este tipo que pretende proporcionar métodos eficaces para el descubrimiento de agentes antienvjecimiento que pueden desarrollarse para la prevención y/o el tratamiento eficaz de enfermedades o trastornos relacionados con la edad.

Entre varias teorías sobre los procesos de envejecimiento y los métodos derivados de las teorías que pueden ser útiles para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la edad, son prominentes la vía de señalización de nutrientes (restricción calórica), la vía mitocondrial (especies reactivas de oxígeno o ROS) y la teoría de la disfunción de los telómeros. *Vía de señalización de nutrientes (restricción calórica) y envejecimiento.* La restricción calórica (CR) se ha reconocido como el método más práctico para retrasar la tasa de envejecimiento de la levadura en los mamíferos. Además, se ha demostrado que CR reduce la incidencia o retarda la aparición de enfermedades relacionadas con la edad, como la enfermedad de Parkinson, en un modelo de primates (Maswood, N., y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101:18171-6 (2004)), la enfermedad de Alzheimer (Qin, W., y otros, J. Alzheimer's Dis., 10:417-422 (2006)), la hipertensión y los problemas cardíacos en el modelo de rata Dahl-SS (Seymour, E.M., y otros, J. Mol. Cell Cardiol., 41:661-668 (2006)), la fibrosis (Castello, L., y otros, FASEB J., 19:1863-1865 (2005)), y la enfermedad renal (Yu, B.P., y otros, J. Gerontol., 37:130-141 (1982)). Además, CR inhibe una variedad de neoplasias espontáneas y disminuye la incidencia de los cánceres humanos de mama, colon y próstata (revisado en Platz, E.A., J. Nutr., 132:3471S-81S (2002); Steinbach, G., y otros, Cancer Res., 54:1194-1197 (1994); Michels, K.B., y otros, JAMA, 291:1226-30 (2004)).

La bien conservada TOR quinasa (objetivo de la rapamicina) integra señales de nutrientes, factores de crecimiento mitogénicos, energía y estrés para regular los procesos catabólicos y anabólicos (Fingar, D. C., y otros, Oncogene, 23:3151-3171 (2004)). En respuesta a factores de crecimiento y nutrientes óptimos, TOR de mamífero (mTOR) estimula las capacidades sintéticas de la célula (como la biogénesis de ribosomas y el inicio de la traducción de proteínas), lo que aumenta la masa y el tamaño celular y acelera la proliferación (Kim, E., y otros, Hum. Gene Ther., 14: 1415-1428 (2003)). Por el contrario, la inhibición de TOR por la extracción del factor de crecimiento, la inanición de nutrientes o estrés conduce a la regulación negativa de los procesos de alto consumo de energía y la inhibición de la proliferación.

La vía TOR puede jugar un papel importante en la extensión de la esperanza de vida inducida por CR en la levadura en ciernes *Caenorhabditis elegans* y *Drosophila* (Kaerberlein, M., y otros, Science, 310:1193-1196 (2005); Powers, R.W., y otros, Genes Dev., 20: 174-84 (2006); Vellai, T., y otros, Nature, 426:620 (2003); Kapahi, P., y otros, Curr. Biol., 14:885-890 (2004); Jia, K., y otros, Development, 131:3897-3906 (2004)). Como la función de TOR está bien conservada, su papel en el envejecimiento puede aplicarse también a los humanos.

*El mitocondrion/ROS y el envejecimiento.* Las mitocondrias son orgánulos celulares responsables de convertir combustibles metabólicos (por ejemplo, glucosa y ácidos grasos) en una forma utilizable de energía, adenosina 5'-trifosfato (ATP), a través del proceso de fosforilación oxidativa. Las mitocondrias se involucran además en otros procesos que son importantes para la función celular adecuada, que incluye la homeostasis del calcio, la transducción de señales intracelulares y la regulación de la apoptosis.

65

El proceso de fosforilación oxidativa para la generación de ATP en las mitocondrias es además la principal fuente de especies de oxígeno reactivo (ROS) dentro de la célula (aproximadamente el 90% del total de ROS en las células) (Balaban, R.S., y otros, *Cell*, 120:483-495 (2005)). En condiciones fisiológicas normales, se estima que las ROS perdidas durante la fosforilación oxidativa representan 1-5% del oxígeno consumido durante este proceso (Chance, B., y otros, *Physiol. Rev.*, 59:527-605 (1979)). Debido a la capacidad de reparación limitada del ADN mitocondrial (ADNmt) y la proximidad a los oxidantes, las mitocondrias son particularmente vulnerables a la acumulación de daños. Las mutaciones en ADNmt resultan después en una función alterada de la fosforilación oxidativa, que conduce a mayor producción de ROS y la posterior acumulación de más mutaciones. Como las ROS son moléculas altamente reactivas y pueden generar diversos daños en las células, se cree que el círculo vicioso de ROS explica un aumento exponencial del daño oxidativo durante el envejecimiento, lo que resulta en un deterioro funcional gradual que caracteriza el proceso de envejecimiento.

Las ROS pueden asociarse con muchas enfermedades relacionadas con la edad, por ejemplo, diabetes, enfermedad cardiovascular, cáncer y enfermedad de Parkinson (Kovacic, P., y otros, *Curr. Med. Chem.*, 8:773-796 (2001); Aviram, M., y otros, *Am. J. Clin. Nutr.*, 71:1062-1076 (2000); Maassen, J.A., y otros, *J. Endocrinol. Invest.*, 25:477-484 (2002)). El hecho de que los eucariontes desarrollan un sistema de defensa de antioxidantes en el huésped apoya también el importante papel de la producción de ROS endógena (Mates, J.M., *Toxicology*, 153:83-104 (2000)) y la sobreexpresión de la superóxido dismutasa y la catalasa extiende la esperanza de vida en *Drosophila melanogaster* (Orr, W.C., y otros, *Science*, 263:1128-1130 (1994)).

Estudios anteriores indican que la integridad mitocondrial declina en función de la edad según se ha monitoreado mediante la disminución del potencial de membrana mitocondrial, número mitocondrial, y generación de ATP/consumo de O<sub>2</sub> (Hagen, T.M., y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:3064-3069, 1997; Greco, M., y otros, *FASEB J.*, 17:1706-1708 (2003)). Las mutaciones en la función mitocondrial causan una serie de enfermedades genéticas con manifestaciones clínicas que incluyen la ceguera, sordera, trastornos del movimiento, demencias, enfermedad cardiovascular, debilidad muscular, disfunción renal, y trastornos endocrinos. Además, se ha informado que los ratones con un aumento dramático en las mutaciones del ADN mitocondrial (debido a una mutación de error de lectura en la polimerasa del ADNmt PolgA) exhibieron una esperanza de vida más corta, acompañado de ciertos fenotipos de envejecimiento prematuro (Trifunovic, A., y otros, *Nature*, 429:417-423 (2004)). Además, se ha informado que la extensión de la esperanza de vida en la levadura (esperanza de vida cronológica) mediante la supresión de TOR1 y en *C. Elegans* por restricción de la glucosa, es a través de la respiración mitocondrial (Bonawitz, N.D., y otros, *Cell Metab.*, 5:233-235 (2007); Schulz, T.J., y otros, *Cell Metab.*, 6:280-293 (2007)). Estos resultados sugieren el importante papel de la función mitocondrial en el envejecimiento y las enfermedades relacionadas con la edad en los mamíferos. Sin embargo, se han informado también resultados contradictorios. Por ejemplo, se informó que la extensión de la esperanza de vida inducida por CR en la levadura en gemación es independiente de la función mitocondrial (Kaerberlein, M., y otros, *PloS Genet.*, 1, e69 (2005)). Por lo tanto, el papel de las mitocondrias en el proceso de envejecimiento sigue siendo confuso.

**Telómeros, Senescencia, Envejecimiento y Cáncer.** Los telómeros son extremos de cromosomas que consisten en secuencias repetidas de una cadena de ADN ricas en G. Los telómeros se unen por proteínas de unión de telómeros para protegerlos de ser reconocidos como rupturas de ADN bicatenario de origen natural (DSB).

Los telómeros disfuncionales pueden ser causados por el acortamiento progresivo de los telómeros debido al problema interno de la replicación del ADN por la ADN polimerasa y la falta de actividad de la telomerasa en la mayoría de las células somáticas en humanos. Eventualmente, los telómeros críticamente acortados no pueden unirse a las proteínas de los telómeros y, por lo tanto, se exponen como DSB naturales, que activan las respuestas al daño del ADN e inducen la detención del ciclo celular dependiente de RB y p53. Este proceso se denomina senescencia replicativa. Además, la senescencia puede inducirse por la activación de oncogenes a través de las mismas respuestas de daño al ADN, dando como resultado la supresión tumoral (Di Micco, R., y otros, *Nature*, 444:638-642 (2006); Bartkova, J., y otros, *Nature*, 444:633-637 (2006)). Además, se ha informado además que los agentes de daño al ADN desencadenan la senescencia.

La disfunción de los telómeros ocurre además cuando hay un defecto en la proteína de unión a los telómeros. Por ejemplo, la expresión de un factor de unión 2 a repetición TTAGGG dominante negativa (TRF2), así como la eliminación de la protección de los telómeros 1 (POT1) producen disfunción de los telómeros y señales de daño del ADN (Karslender, J., y otros, *Science*, 283:1321-1325 (1999); Denchi, E.L., y otros, *Nature*, 448: 1068-1071 (2007); Guo, X., y otros, *EMBO J.*, 26:4709-4719 (2007)).

Los telómeros largos se han asociado con la longevidad en humanos, mientras que los telómeros cortos se han asociado con cánceres, fibrosis pulmonar idiopática y una variedad de trastornos proliferativos del tejido. Por ejemplo, la mutación de la telomerasa en humanos causa disqueratosis congénita y los pacientes suelen morir al principio de la falla de la médula ósea.

Se ha demostrado que la senescencia de la replicación puede ser una barrera para la progresión tumoral, ya que las células cancerosas requieren un potencial de replicación ilimitado. De hecho, los marcadores senescentes son prominentes en lesiones premalignas pero indetectables en cánceres avanzados en modelos de ratón y en cánceres humanos (Braig, M., y otros, *Nature*, 436:660-665 (2005); Collado, M., y otros, *Nature*, 436:642 (2005); Michaloglou, C., y otros, *Nature*, 436:720-724 (2005)). Todos los cánceres eluden la senescencia activando la telomerasa o el alargamiento alternativo de los telómeros por recombinación (Shay, J.W., y otros, *Exp. Cell. Res.*, 209:45-52 (1993); Shay, J.W., y otros,

Eur. J. Cancer, 33:787-791 (1997); Kim, N.W., y otros, Science, 266:2011-2015 (1994); Bryan, T.M., y otros, Nat. Med., 3:271-274 (1997)). La progresión del cáncer de próstata en estadio temprano a la malignidad está bloqueada por la senescencia (Chen, Z., y otros, Nature, 436:725-730 (2005)). Además, la tumorigénesis espontánea inducida por la disfunción telomérica en ratones mutantes de telomerasa *Terc*<sup>-/-</sup> se mostró inhibida por la senescencia mediada por p53 (Cosme-Blanco, W., y otros, EMBO Rep. 8:497-503 (2007)). Se asume que la senescencia detiene el ciclo celular y facilita la reparación, bloqueando así el desarrollo posterior de las lesiones iniciales.

La senescencia se considera además un importante contribuyente al envejecimiento (Campisi, J., Nat. Rev. Cancer., 3:339-49; Faragher, R.G., Biochem. Soc. Trans., 28:221-226 (2000)). Por ejemplo, las células senescentes aumentan con la edad en tejidos de mamíferos (Campisi, J., Cell, 120:1-10 (2005)). Se han encontrado células senescentes en sitios de patologías relacionadas con la edad tales como osteoartritis y aterosclerosis (Price, J.S., y otros, Aging Cell, 1:57-65 (2002); Vasile E., y otros, FASEB J., 15:458-466 (2001); Matthews, C, y otros, Cir. Res., 99: 156-164 (2006)). Además, la p53 crónicamente activa promueve la senescencia celular y acelera los fenotipos de envejecimiento en ratones (Maier, B., y otros, Genes Dev., 18: 306-319 (2004); Tyner y otros, Nature, 415:45-53 (2002)). Además, se ha demostrado que las células senescentes secretan proteínas que facilitan la progresión tumoral y la respuesta inflamatoria (Coppe, J.P., y otros, PlosBiology, 6:2853-2868 (2008)). Se ha propuesto que la senescencia programada conduce a enfermedades relacionadas con la edad y limita nuestra esperanza de vida (Blagosklonny, M. V., Cell Cycle, 5:2087-2102 (2006)). Por lo tanto, la investigación anti-envejecimiento desde el ángulo de los telómeros se centra actualmente en la prevención de la senescencia.

A pesar de todos los estudios, el papel de los telómeros en el proceso de envejecimiento sigue siendo confuso. Por ejemplo, no puede explicarse por qué un ratón tiene telómeros más largos, pero una vida más corta que un humano. No está claro si los telómeros funcionan o cómo funcionan en el proceso de envejecimiento de las células posmitóticas.

Se han propuesto además otras teorías del envejecimiento, por ejemplo, la teoría de la acumulación de daños a proteínas, la teoría de acumulación de mutaciones del ADN y la teoría de agotamiento de células madre. Entre las anteriores, las teorías que representan la verdadera naturaleza de los procesos de envejecimiento y si y/o cómo se relacionan entre sí aún siguen confusas. Por lo tanto, al menos hasta cierto punto, los procesos de envejecimiento humano continúan siendo un misterio.

Los documentos de patente núms.US 2008/181927 A1, WO 2008/109163 A1 y EP 0 532 862 A1 enseñan que la rapamicina provoca la detención de G1 en las células en proliferación y, por lo tanto, tiene efectos antihiperplasia, anticanceroso y antiinflamatorio, respectivamente. Ninguno de estos documentos, sin embargo, menciona la senescencia o la fase G0 de las células que no se dividen.

El documento de patente núm. WO 2008/022256 A2 y el artículo "Targeting mammalian target of rapamycin (mTOR) for health and diseases" de Tsang Chi Kwan y otros, Drug Discovery Today, volumen 12, núm. 3-4, 112-124 (2007) mencionan la rapamicina para su uso en el anti-envejecimiento a dosis terapéuticas.

Las enfermedades o trastornos relacionados con la edad, como el cáncer, las enfermedades cardiovasculares y las enfermedades degenerativas neuronales, son las principales causas de muerte en humanos. Los agentes farmacéuticos para el tratamiento de estas enfermedades o trastornos relacionados con la edad se están buscando de acuerdo con la comprensión actual de las enfermedades específicas, debido a la limitada comprensión sobre los procesos de envejecimiento. Como resultado, hasta la fecha, estas enfermedades se han estudiado independientemente unas de otras y se han desconectado de los procesos de envejecimiento. Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar un enfoque sistémico basado en los procesos de envejecimiento para el descubrimiento de nuevos agentes anti-envejecimiento para la prevención y el tratamiento de enfermedades o trastornos relacionados con la edad.

#### Resumen de la invención

La presente invención proporciona la necesidad anterior al describir nuevos mecanismos en los procesos de envejecimiento y nuevos métodos basados en mecanismos novedosos para identificar o detectar agentes anti-envejecimiento útiles para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades o trastornos relacionados con la edad. Los nuevos métodos descritos en la presente invención pueden usarse para identificar nuevos agentes anti-envejecimiento rápidamente mediante el tamizaje de alto rendimiento con el uso de varios modelos de mutantes de levadura bien conocidos. En particular, la presente invención describe el uso de bajas dosis de rapamicina o sus análogos, entre una serie de otros agentes anti-envejecimiento identificados mediante el uso de los métodos descritos, para la prevención y/o el tratamiento eficaz de diversas enfermedades o trastornos relacionados con la edad.

La presente invención describe una composición que comprende un inhibidor del objetivo de la rapamicina (TOR) o una sal, solvato o profármaco farmacéuticamente aceptable de esta, para su uso en el tratamiento de enfermedades y trastornos relacionados con la edad, en donde el inhibidor de TOR (a) extiende el potencial de replicación, (b) mantiene la senescencia o el estado del ciclo celular detenido en las células post-mitóticas, o (c) previene el deterioro o muerte celular de las mitocondrias seguido del deterioro por senescencia. De acuerdo con la invención, dicho inhibidor de TOR es una dosis baja de rapamicina o un análogo de esta.

En un aspecto, la presente descripción proporciona un método para identificar o detectar un agente para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la edad, el método que comprende seleccionar uno o más compuestos o composiciones contra un sistema modelo de senescencia y controlar su actividad antienviejimiento.

5 En otro aspecto, la presente descripción proporciona un método para identificar o detectar un agente para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la edad, el método que comprende seleccionar uno o más compuestos o composiciones y medir su actividad contra al menos uno de los componentes de la ruta TOR/AMPK/Mitocondria/Senescencia.

10 En otro aspecto, la presente descripción proporciona un método para identificar o detectar un agente para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la edad, el método que comprende seleccionar uno o más compuestos o composiciones y detectar su actividad contra al menos uno de los componentes de la ruta de biogénesis mitocondrial.

15 En otro aspecto, la presente descripción proporciona un método para identificar o detectar un agente para prevenir o tratar el envejecimiento o una enfermedad o trastorno relacionado con la edad, el método que comprende seleccionar uno o más compuestos o composiciones y detectar su actividad contra al menos uno de componentes de la ruta AMPK.

20 En otro aspecto, la presente descripción proporciona un método para identificar o detectar un agente para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la edad, el método que comprende seleccionar uno o más compuestos o composiciones y detectar su actividad contra al menos uno de los componentes de la ruta de senescencia, en donde el agente mantiene la senescencia o el estado detenido de ciclo celular en células postmitóticas o previene el deterioro o la muerte celular de la mitocondria después del deterioro de la senescencia.

25 En otro aspecto, la presente descripción proporciona un método para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la edad, el método que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una composición que comprende un agente identificado de acuerdo con cualquiera de las modalidades descritas en cualquiera de los otros aspectos de la presente invención, o una sal, solvato o profármaco farmacéuticamente aceptables de éste.

30 En otro aspecto, la presente descripción proporciona un método para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la edad asociado con el deterioro de los telómeros y/o mitocondrias, el método que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una composición que comprende un activador de la proteína quinasa activada por 5'-adenosina monofosfato (AMPK), o una sal, solvato o profármaco farmacéuticamente aceptables de éste, que activa directa o indirectamente AMPK, aumenta la biogénesis mitocondrial y mantiene un estado de detención del ciclo celular en las células senescentes o posmitóticas del sujeto.

35 En otro aspecto, la presente descripción proporciona un método para detectar un agente de antienviejimiento en una muestra biológica, el método que comprende usar un modelo de senescencia de levadura.

40 En otro aspecto, la presente descripción proporciona un método para determinar la concentración biológica de un agente de antienviejimiento en una muestra biológica, el método que comprende usar un modelo de senescencia de levadura y una ecuación o curva estándar preestablecida del agente de antienviejimiento.

45 En otro aspecto, la presente descripción describe que la función mitocondrial juega un papel importante en el mantenimiento de la senescencia inducida por la disfunción de los telómeros, y la restricción calórica (CR) previene el deterioro del estado senescente a través de la ruta TOR/AMPK/mitocondrial. Este mecanismo se conserva tanto en modelos de disfunción de los telómeros de levaduras como en los humanos. El mecanismo conservado permite el uso de modelos de disfunción de telómeros en levaduras y en humanos para buscar productos farmacéuticos que puedan promover la función mitocondrial y así prevenir o tratar el deterioro de la senescencia. Dado que muchas enfermedades relacionadas con la edad están relacionadas con la disfunción mitocondrial y/o la disfunción de los telómeros, los agentes identificados mediante este método pueden potencialmente usarse para prevenir enfermedades o trastornos relacionados con la edad. Por lo tanto, en contraste con las estrategias antienviejimiento actualmente predominantes, que se centran principalmente en inhibir la senescencia tomando la senescencia como el principal contribuyente al proceso de envejecimiento, la presente invención introduce una nueva estrategia para prevenir o tratar enfermedades o trastornos relacionados con la edad a través del mantenimiento de la senescencia.

55 Otros aspectos y modalidades preferidas específicas de la presente invención se describen con más detalle en las modalidades y reivindicaciones siguientes.

Breve descripción de los dibujos

60 La Fig. 1 muestra que la limitación de la señalización de nutrientes inhibe la muerte celular inducida por la inactivación de *cdc13-1p*. (A) La restricción de la glucosa y el tratamiento con 2-desoxiglucosa inhiben la pérdida celular inducida por la inactivación de *Cdc13p* como se ensayó mediante el ensayo de formación de colonias. Para inducir la disfunción de los telómeros, se diluyeron durante toda la noche cultivos frescos de *cdc13*-en el medio YEPD con las concentraciones indicadas de glucosa o 2-desoxiglucosa y se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Para el ensayo de formación de colonias, las células tratadas se diluyeron 10 veces en serie en H<sub>2</sub>O y se colocaron 5 µl en placas YEPD regulares. Las placas se

incubaron a 24 °C para la supervivencia de las que forman colonias. El número inicial de células vivas se contó también por el ensayo de formación de colonias. (B) La restricción de nitrógeno inhibe la muerte celular inducida por inactivación de *cdc13-1p* como se controla mediante un ensayo de formación de colonias. Las células se incubaron en medio sintético (SC) o SC-N (SC sin aminoácidos y  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  como fuentes de nitrógeno) a 37 °C durante 24 horas. Se contó el número de células supervivientes con el uso del ensayo de formación de colonias como se describe en 1A. (C-D) La inhibición de las TOR mediante dosis bajas de rapamicina (marcada como Rapa) (por debajo de la concentración de inhibición del crecimiento) puede prevenir la muerte celular inducida por la inactivación de *cdc13-1p*. Las células se incubaron con las concentraciones indicadas de rapamicina en medio YEPD a 37 °C durante 24 horas. El número de células supervivientes se midió mediante el ensayo de formación de colonias como en 1A. Para la curva de crecimiento, el cultivo fresco de una noche se diluyó en medio YEPD y se incubó a 24 °C en presencia de las concentraciones indicadas de rapamicina. La densidad óptica ( $\text{OD}_{595}$ ) se midió en los intervalos de tiempo indicados y se representó frente al tiempo. (E) El deterioro del crecimiento de las células *cdc13-1* detenidas puede retrasarse mediante dosis bajas de rapamicina (1 nM) y restricción de glucosa (0,5%) como se midió mediante el conteo de células supervivientes con el uso del ensayo de formación de colonias. Los datos representan un promedio de tres experimentos.

La Fig. 2 muestra que la señalización de nutrientes no interfiere con la detención del ciclo celular en G2/M, pero mantiene el estado de detención G2/M e impide la muerte celular inducida por inactivación de *cdc13-1p*. (A) Las células se incubaron a 37 °C para inactivar *cdc13-1p*, en medio YEPD, YEPD+1 nM de rapamicina o YEPD con glucosa al 0,5%. En los intervalos indicados, se extrajo una alícuota de células y se fijaron con etanol al 50% a -20 °C durante aproximadamente 4 horas, y después se digirieron con ARNasa A 0,2 mg/ml en Tris 50 mM, pH 7,6 a 37 °C durante toda la noche. Las células se lavaron a continuación con Tris 50 mM, pH 7,6, y se trataron con proteinasa K 40 µg/ml a 55 °C durante 2 horas. Después de lavarse nuevamente, las células se tiñeron con yoduro de propidio 100 µg/ml durante 20 minutos en la oscuridad antes del análisis FACS (clasificador de células activadas por fluorescencia). (B) El ensayo de supervivencia celular muestra que la muerte de las células G2/M inducida por la inactivación de *cdc13-1p* durante 2 horas todavía puede prevenirse con rapamicina y restricción de glucosa. Las células se incubaron primero a 37 °C durante 2 horas, después se diluyeron con un medio YEPD a 37 °C, YEPD con rapamicina para hacer una concentración final de 1 nM, o con un medio a 37 °C sin glucosa para obtener glucosa final al 0,5%. Las células se incubaron continuamente a 37 °C durante 22 horas. Las células supervivientes se contaron con el uso del ensayo de formación de colonias.

La Fig. 3 muestra que la rapamicina (1 nM) y la glucosa reducida (0,5%) disminuyen la producción de ROS por inactivación de *cdc13-1p* medida por tinción con dihidrorrodamina 123 (Invitrogene) seguida por análisis FACS (A) y disminuyen un marcador apoptótico de traslocación de PS mediante la unión anexina V-FITC seguido por el análisis FACS (B). Las células se trataron en condiciones como se describieron en la Fig. 1A y la Fig. 1C. Para medir los niveles de ROS, las células tratadas se incubaron con dihidrorrodamina 123 5 µg/ml en YEPD durante 1 hora antes del análisis por FACS. Se analizaron 10.000 células para cada muestra. Para medir la traslocación de PS, las células tratadas se resuspendieron en un tampón de PBS que contenía sorbitol 1,1 M y Zimoliasa 2 mg/ml, y se incubaron a 37 °C durante 20 min. Las células se tiñeron después con anexina V-FITC y yoduro de propidio (PI) (BD Biosciences Pharmingen) en PBS (solución salina regulada con fosfato) que contenía sorbitol 1,1 M, seguido de análisis por FACS. Se analizaron 10.000 células para cada muestra. En estas condiciones, la población PI-negativa representa las células intactas, las células PI-negativas-FITC-positivas representan la población apoptótica, y las células PI-positivas-FITC positivas representan la población de apoptosis o necrosis tardía.

La Fig. 4 muestra que la restricción de rapamicina y glucosa previene la muerte celular inducida por inactivación de *cdc13-1p* a través de AMPK. (A) La supresión de la subunidad reguladora de AMPK Sip2p elimina el efecto preventivo de la restricción de glucosa. (B) La delección de la subunidad catalítica de AMPK Snf1p y la subunidad reguladora Snf4p disminuye significativamente el efecto preventivo de la rapamicina (1 nM). Las cepas doble mutantes *cdc13-1sip2::Kan*, *cdc13-1snf1::Kan* y *cdc13-1snf4::Kan* se generaron mediante el apareamiento del mutante de delección simple de la genoteca de delección (de Invitrogen, Carlsbad, CA) con *cdc13-1*, seguido de la esporulación del diploide y seleccionando colonias a la sensibles a la temperatura y resistentes a G418 (200 µg/ml). Las células se trataron como en la Fig. 1A y la Fig. 1C. Las células supervivientes se controlaron con el uso del ensayo de formación de colonias.

La Fig. 5 muestra que las mitocondrias juegan un papel importante en el efecto preventivo de la limitación de nutrientes en la muerte celular de *cdc13-1*. (A) La deficiencia de mitocondrias inhibe significativamente el efecto preventivo de la rapamicina y la restricción de glucosa. El p° mutante deficiente en mitocondrias se generó en *cdc13-1* cultivando células en un medio YC que contiene etidio hasta la fase logarítmica durante dos días como describió (Qi, H., y otros, J. Biol. Chem., 278: 15136-15141 (2003)). Las células se trataron como se indica y como se describe en la Fig. 1A y la Fig. 1C. Las células supervivientes se controlaron mediante ensayo de formación de colonias. (B-C) La restricción de la glucosa y el tratamiento con rapamicina aumentan la masa mitocondrial. Cultivos frescos durante toda la noche diluidos en YEPD, YEPD+rapamicina (B) o YEPD, YEPD glucosa al 0,5% (C) se incubaron a 24 °C durante 4 horas para la fase logarítmica. La masa mitocondrial se midió tiñendo las células fijadas con etanol al 60% con el uso de MitoTracker Green FM, seguido del análisis por FACS.

La Fig. 6 muestra el mecanismo de señalización de nutrientes a través de TOR, AMPK y mitocondrias para mantener el estado de detención del ciclo celular y prevenir la muerte celular inducida por la disfunción de los telómeros en el modelo de *cdc13-1*.

La Fig. 7 muestra que la pérdida de las células WI-38 senescentes (fibroblastos primarios humanos) se previene mediante el tratamiento de rapamicina 50 pM, AICAR 250 µM, EGCG 20 µg/ml, GSE 1,6 µg/ml, glucosa reducida (desde 0,4% a 0,2%), extracto de arándano (BE) 20 µg/ml, AITC 1 µM y 2-desoxiglucosa 12,5 µM. AICAR y el tratamiento con glucosa reducida se incubaron con las células en un ciclo de 2 días/8 días de descanso, mientras que el resto de los agentes se sometieron a un ciclo de 3 días/7 días de descanso. El tratamiento se inició en el pasaje 29. El medio se recambió cada 3 días. Después de 56 días del pasaje 31 (senescencia), las células se fijaron brevemente en formaldehído al 2%/glutaraldehído al 0,2% y se tiñeron con 5-bromo-4-cloro-3-indolil β-D-galactósido (X-gal) 1 mg/mL (en tampón que contiene ácido cítrico/fosfato de sodio 40 mM, pH 6,0, ferrocianuro de potasio 5 mM, ferricianuro de potasio 5 mM, NaCl 150 mM y MgCl<sub>2</sub>) 2 mM a 37 °C durante 18 horas para el marcador de senescencia, actividad de β-galactosidasa celular (imagen en color azul y gris oscuro en imagen en blanco y negro). Las células senescentes supervivientes se observaron bajo un microscopio.

La Fig. 8 muestra que dosis bajas de rapamicina aumentan la masa mitocondrial, mejoran el potencial de la membrana mitocondrial y disminuyen los niveles de ROS en los fibroblastos humanos. (A) Se trataron células WI-38 en el pasaje 24 con diversas dosis de rapamicina en medio de cultivo durante 2 días. Para las mediciones de la masa mitocondrial, las células se fijaron con etanol al 60% a -20 °C, y se tiñeron después con MitoTracker Green FM (Invitrogene) durante 30 minutos antes del análisis por FACS. (B) Se trataron las células linfoblastoides L40 humanas con diversas dosis de rapamicina durante dos días. Para la medición del potencial de membrana mitocondrial, las células tratadas se tiñeron con JC-1 5 µg/ml (Invitrogen) en la oscuridad durante 15 minutos. Después, las células se lavaron una vez con PBS, seguido del análisis por FACS. Los ajustes del fotomultiplicador se ajustaron para detectar fluorescencia verde ( $\lambda_{em}=525$  nm) del monómero JC-1 con el uso del filtro 1 (detector FL-1) y la fluorescencia roja ( $\lambda_{em}=590$  nm) de los agregados JC-1 con el uso del filtro 2 (detector FL2). La relación del agregado/monómero JC-1 (rojo/verde o FL2/FL1) es indicativa del potencial de membrana. Se recogieron los datos de las poblaciones de células normales para cada muestra, que se clasificó de acuerdo con los controles sin tratamiento basados en las dispersiones directas y laterales. (C) Para la medición de ROS, las células tratadas con L40 se tiñeron con deshidrodamina 123 2 µg/ml de durante 30 minutos antes del análisis por FACS. En cada experimento anterior, se analizaron al menos 10.000 eventos. Los datos representan el promedio de un experimento duplicado.

La Fig. 9 muestra que solo dosis bajas de rapamicina (por debajo de las dosis de inhibición del crecimiento) previene la pérdida de células WI-38 senescentes. (A) Se trataron células WI-38 con las concentraciones indicadas de rapamicina como en la Fig. 7. El tratamiento se inició en el pasaje 29. Las células entraron en senescencia en el pasaje 31. Después de 65 días en la senescencia, las células supervivientes se midieron mediante la tinción con MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, un tetrazol). El color púrpura del MTT generado por la reductasa mitocondrial se leyó en 570 nm mediante un lector de microplacas. Los datos representan la media de tres experimentos independientes realizados por duplicado. (B) El efecto de la rapamicina en el crecimiento de células WI-38. Se cultivaron las células como en la Fig. 7. Las flechas indican el intervalo de tiempo cuando se añadió la rapamicina. 25 pM de rapamicina tiene poco efecto sobre la tasa de crecimiento, pero aumenta la duplicación de la población (PD) de 5,18 a 6,82. Las duplicaciones de la población se calcularon con el uso de la siguiente fórmula:  $PD = \log(N_f/N_0)/\log 2$ , donde  $N_f$  es el número de célula final y  $N_0$  es el número de células inicialmente sembradas. Los datos son representativos de dos experimentos independientes realizados por duplicado. (C) Las bajas dosis de rapamicina aumentan los niveles de proteína de p53, p21 y pRB. Las células WI-38 se trataron en el día 20<sup>mo</sup> después de la última división (senescencia) con rapamicina durante 18 horas. Los lisados celulares se analizaron después mediante transferencia de membranas de tipo Western con el uso de anticuerpos específicamente contra p53, p21 o pRB.

La Fig. 10 muestra que la masa mitocondrial aumenta en los linfoblastos humanos L40 mediante un tratamiento de 2 días con (A) LY294002 10 µM (un inhibidor de PI3K), disulfuro de dialilo (DATS) 2 µM, isotiocianato de bencilo (BITC) 1 µM, isotiocianato de fenilo (PITC) 1 µM, resveratrol (RSV) 2 µg/ml y licopeno 0,03 µM, y (B) con PEITC 6,7 µM, silibinina 5 mM, selenito 1,25 mM, genisteína 2,5 mM, extracto de semilla de uva (GSE) 250 µg/ml, EGCG 50 µg/ml, extracto de arándano (BE) 3 mg/ml, AITC 1 µM, rapamicina 50 pM, AICAR 250 µM, y glucosa reducida (de 0,4% a 0,2%). La masa mitocondrial se controló mediante la tinción de las células fijadas con etanol al 60% con MitoTracker Green FM antes del análisis por FACS.

La Fig. 11 muestra que una serie de agentes quimiopreventivos o agentes antienvjecimiento inhibieron la muerte celular desencadenada por la inactivación de cdc13-1p. El PEITC 6,7 µM, silibinina 5 mM, selenito 1,25 mM, genisteína 2,5 mM, extracto de semilla de uva (GSE) 250 µg/ml, EGCG 50 µg/ml y extracto de arándano (BE) 3 mg/ml se incubaron con las células a 37 °C durante aproximadamente 30 horas. La supervivencia celular se midió mediante el ensayo de formación de colonias a una temperatura permisiva de 24 °C.

La Fig. 12 muestra que las bajas dosis de rapamicina y AICAR revierten la disminución de la masa mitocondrial inducida por 12-O-tetradecanoilforbol 13-acetato (TPA). Se incubaron las células NIH3T3 en medio DMEM (DMEM con FCS al 10%, penicilina 100 unidades/mL, estreptomycin 100 µg/ml y glutamina 2 mM) en presencia de DMSO control, TPA 10 µM, rapamicina 1 nM, TPA 10 µM + rapamicina 1nM, AICAR 40 µM o TPA 10 µM + AICAR 40 µM a 37 °C en una atmósfera humidificada que consiste en aire al 95% y CO<sub>2</sub> al 5% durante dos días. Las células se recogieron después mediante tripsina y se fijaron con etanol al 60%. Las células se tiñeron con MitoTracker Green FM en la oscuridad durante 30 minutos antes del análisis por FACS. Los datos representan el promedio de un experimento realizado por triplicado.

La Fig. 13 muestra que las dosis bajas de rapamicina y AICAR previenen la transformación del tumor NIH3T3 inducida por TPA. (A) TPA (10  $\mu$ M) se incubó con células NIH3T3 en agar blando al 0,39% en presencia de DMSO, rapamicina 1 nM o AICAR 250 nM, y se cultivaron durante 7 días antes de contar las colonias bajo un microscopio. (B) Los datos representan el promedio de cuatro experimentos.

La Fig. 14 muestra que la rapamicina en dosis bajas, 0,2 y 2 pM, extiende la esperanza de vida de las células CGN cultivadas (A) y reduce los niveles de ROS en las células CGN (B). Se prepararon los cultivos de neuronas granulares cerebelosas (CGN) a partir de crías de rata de 7 días de edad. Brevemente, el cerebelo se extrajo del cerebro, se trocó en trozos finos, se tripsinizó a 37 °C durante 15 minutos, se filtró a través de una malla de 40  $\mu$ m y se sedimentó mediante centrifugación. Los sedimentos que contienen neuronas cerebelosas granulares se resuspendieron en medio neurobasal suplementado con B27 que contenía KCl 25 mM. Para su esperanza de vida en el cultivo, las células se sembraron en una placa de 24 pocillos (1 placa/cerebelo) y se cultivaron en medio Neurobasal (Invitrogen) suplementado con B27, KCl 20 mM, Glutamina 0,5 mM, penicilina 100 unidades/mL, estreptomina 100  $\mu$ g/ml). La rapamicina se añadió 7 días después en la placa. 31 días más tarde, se determinó la supervivencia de las células neuronales con el uso de un ensayo de MTT (A). Para el análisis de las ROS, se sembraron las células CGN aisladas frescas del cultivo en suspensión en medio completo Neurobasal en tubos de 12x75 mm a una densidad de 1 millón de células/mL/tubo. Las células se trataron con rapamicina durante 20 horas y se tiñeron después con deshidrodamina 123 2  $\mu$ g/mL durante 30 minutos antes del análisis por FACS (B).

La Fig. 15 muestra que las bajas dosis de rapamicina reducen el volumen de infarto cerebral en un modelo de accidente cerebrovascular en ratas. (A) La rapamicina (10  $\mu$ g/kg) redujo el daño cerebral. Se usó el modelo de oclusión de la arteria cerebral media (ACM) del accidente cerebrovascular isquémico. Las ratas SHR-SP se dividieron aleatoriamente en dos grupos (n=8 en cada grupo): un grupo control de DMSO emparejado y un grupo de rapamicina. La rapamicina y el control DMSO se administraron 10 minutos después de la oclusión de MCA. Las muestras de cerebro se cosecharon 24 h después de la oclusión de MCA. Las secciones coronales (2 mm de espesor) se tiñeron inmediatamente con cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC) al 2%. La región del infarto que contiene células muertas no puede teñirse de color pálido, mientras que la región normal con células vivas es de color rojo. El área de infarto y las áreas hemisféricas de cada sección (ambos lados) se rastrearon y cuantificaron mediante un sistema de análisis de imágenes (Microsystems Type DM LB2, Leica, Alemania). La posible interferencia de un edema cerebral en la evaluación del volumen del infarto se corrigió con un método estándar de restar el volumen del hemisferio ipsilateral no isquémico del volumen del hemisferio contralateral. El área de infarto se expresó como un porcentaje del hemisferio contralateral. (B) Las bajas dosis de rapamicina previenen los daños cerebrales inducidos por el infarto isquémico. Se administró rapamicina a 0, 0,3, 1, 3 y 10  $\mu$ g/kg a ratas SHR-SP (n=8 en cada grupo) durante 20 días antes de la oclusión de MCA.

La Fig. 16 muestra que bajas dosis de rapamicina disminuyen los niveles de ROS inducidas por MPP<sup>+</sup> en las células WI-38 de fibroblastos primarios humanos (se usó 200  $\mu$ M MPP<sup>+</sup>). MPP<sup>+</sup> con diversas concentraciones de rapamicina se incubó con las células WI-38 durante 3 días. Las células se tiñeron con deshidrodamina 123 en la oscuridad durante 30 minutos antes del análisis por FACS.

La Fig. 17 muestra que la dosis baja de rapamicina a 10  $\mu$ g/kg, pero no a 100  $\mu$ g/kg, reduce el volumen de infarto de miocardio (MI) en un modelo de rata. Se usaron ratas macho Sprague-Dawley (SD) de 200 a 250 g (n=10-12 para cada grupo). La rapamicina en dosis de 0, 10 y 100  $\mu$ g/kg/día se administró durante 3 días antes del experimento de MI. Bajo anestesia con éter, el corazón se exteriorizó y las arterias descendentes izquierdas anteriores se ligaron entre el tracto de salida pulmonar y la aurícula izquierda. Después, el corazón palpitante volvió rápidamente a su posición normal, se cerró el tórax y se retiró el aire. Las ratas se devolvieron a las jaulas. Cinco horas después de la ligadura de la arteria coronaria, las ratas se sacrificaron. El ventrículo izquierdo se aisló y se cortó en 4 a 5 cortes perpendiculares al eje cardíaco largo. Los cortes se tiñeron en tampón fosfato de nitrógeno azul tetrazolio. El tejido normal se tiñó de azul, mientras que el tejido necrótico permaneció sin teñir. Los tejidos teñidos y no teñidos se aislaron y pesaron por separado. El tamaño de MI se expresó como una fracción del peso total del ventrículo izquierdo.

La Fig. 18 muestra un modelo de glucosa o TOR que regula los procesos de envejecimiento a través de la ruta AMPK/ROS/mitocondrias en diversos tejidos, lo que conduce a trastornos relacionados con la edad.

La Fig. 19 ilustra un método para la selección de alto rendimiento que identifica y detecta candidatos antienvjecimiento con el uso de ensayos de supervivencia celular en levadura.

La Fig. 20 ilustra un método para la selección de alto rendimiento que identifica y detecta candidatos antienvjecimiento con el uso del ensayo de ROS en levadura.

La Fig. 21 muestra ejemplos de detección de un agente de antienvjecimiento con el uso del mutante de levadura *cdc17-1*, o *cdc17-2*. Las células mutantes se diluyeron en un medio YEPD fresco que contenía rapamicina de 0, 1 y 3 nM, o medio de YEPD de glucosa al 0,5% y se incubaron a aproximadamente 37 °C durante 22 horas. Las células se diluyeron después 10 veces en serie y se colocaron en una placa YEPD. La placa se incubó a una temperatura permisiva de 24 °C para la formación de colonias a partir de las células supervivientes.

Descripción detallada de la invención

La presente invención describe nuevos métodos para identificar, detectar y purificar agentes antienviejecimiento y el uso de agentes para la prevención y el tratamiento de enfermedades o trastornos relacionados con la edad. La invención se basa, *entre otros*, en los siguientes descubrimientos: (1) que la inhibición de las señales de nutrientes prolonga el estado de detención del ciclo celular inducido por la disfunción de los telómeros en la levadura a través de la AMPK y la subsiguiente ruta mitocondrial; (2) que bajas dosis de rapamicina, restricción de glucosa y activadores de AMPK estimulan la función mitocondrial y prolongan la senescencia en fibroblastos humanos primarios; (3) que varios agentes antienviejecimiento y quimiopreventivos de cáncer estimulan la función mitocondrial e inhiben la pérdida de células senescentes tanto en células de levadura como en células humanas; (4) que muchas enfermedades o trastornos relacionados con la edad se asocian con la disfunción de las mitocondrias y/o los telómeros; y (5) que dosis bajas de rapamicina previenen el infarto cerebeloso e isquémico miocárdico, reducen las ROS desencadenadas por MPP+, aumentan la esperanza de vida de las células neuronales primarias cultivadas e inhiben la transformación de las células tumorales.

De acuerdo con la reivindicación 1, la presente invención proporciona una composición para su uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno relacionado con la edad, que comprende un inhibidor del objetivo de la rapamicina (TOR) o una sal, solvato o profármaco farmacéuticamente aceptable de éste, en donde el inhibidor TOR (a) amplía el potencial de replicación, (b) mantiene la senescencia o el estado de detención del ciclo celular en las células postmitóticas, o (c) previene el deterioro de la mitocondria o la muerte celular seguido del deterioro por senescencia. Este aspecto de la invención abarca, por lo tanto, el uso de un inhibidor de TOR, o una sal, solvato o profármaco farmacéuticamente aceptable de éste, para la preparación o fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de una enfermedad o trastorno relacionado con la edad que se incluye en esta descripción. Este aspecto se relaciona con el sexto aspecto de la presente descripción (ver más abajo) en donde dicho agente es un inhibidor de TOR.

La presente descripción proporciona además un método para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la edad, en donde la enfermedad o trastorno relacionado con la edad se asocia con la pérdida de la función mitocondrial, disfunción de los telómeros, deterioro de la senescencia y pérdida celular dependiente de la edad o deterioro mitocondrial o estado de detención del ciclo celular en las células postmitóticas. La presente descripción proporciona además un método para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la edad, en donde dicho inhibidor de TOR es una dosis baja de rapamicina o un análogo de éste.

En especial, la presente invención proporciona una composición de inhibidor de TOR para su uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno relacionado con la edad, en donde dicho inhibidor de TOR es una dosis baja de la rapamicina o un análogo seleccionado de deforolimus, AP-23675, AP-23841, Zotarolimus, CCI779/Temsirolimus, RAD-001/Everolimus, 7-epi-rapamicina, 7-tiometil-rapamicina, 7-epi-trimetoxi-rapamicina, 2-desmetil-rapamicina y 42-O-(2-hidroxi)etil-rapamicina, o una sal, solvato o profármaco farmacéuticamente aceptable de éstos.

En otra modalidad, la rapamicina inhibidora de TOR se usa a dosis bajas de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10000 pM en medio sérico, o de 0,1 a aproximadamente 10000 ng/kg/día en animal. Es un descubrimiento sorprendente que la rapamicina a bajas dosis exhibe una función novedosa en lugar de inhibir el crecimiento de la proteína celular, aunque tradicionalmente se conoce que la rapamicina es un inmunosupresor a dosis terapéuticas (1 mg/día a 5 mg/día) que inhiben el crecimiento celular en la fase G1 del ciclo celular y pueden dirigirse a otros complejos proteicos funcionales. Como resultado, las dosis terapéuticas de rapamicina muestran varios efectos secundarios, que incluyen aumentos en el colesterol y triglicéridos séricos, deficiencia de función renal, anemia, cicatrización de heridas, diarrea, astenia, hipotensión, dolor, progresión de neoplasia maligna, neoplasia maligna hepática, ascitis, retraso en el crecimiento, cambios en el estado mental, infarto esplénico y colitis, etc. Estos efectos secundarios pueden evitarse cuando se usan dosis bajas de rapamicina de acuerdo con la presente invención.

La dosificación efectiva de rapamicina o sus análogos puede variar dependiendo del compuesto particular utilizado, el modo de administración, los trastornos específicos que se tratan, así como los diversos factores físicos relacionados con el individuo que se trata. Como se usa de acuerdo con esta invención, pueden obtenerse resultados satisfactorios cuando se administra rapamicina a una dosis oral diaria de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 50 µg /día dependiendo de la enfermedad o trastorno de tejido específico tratado, que se estima que es aproximadamente 0,001 % hasta aproximadamente el 5% de las dosis terapéuticas (1 mg/día a 5 mg/día). Como se usa de acuerdo con esta invención, el esquema de administración de dos a cuatro días con rapamicina seguido de dos a cinco días sin rapamicina puede producir mejores resultados con los menores efectos adversos.

En otra modalidad, la presente invención proporciona dicho uso para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la edad, donde dichas dosis bajas de rapamicina, o un análogo de ésta, están por debajo de aproximadamente 10%, por debajo de aproximadamente 8%, por debajo de aproximadamente 6%, por debajo de aproximadamente 4%, por debajo de aproximadamente 2%, por debajo de aproximadamente 1%, por debajo de aproximadamente 0,1%, por debajo de aproximadamente 0,01%, o por debajo de aproximadamente 0,001% de una dosis terapéutica aprobada.

En una modalidad preferida, la presente invención proporciona dicho uso para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la edad, en donde la rapamicina, o un análogo de ésta, se administra a una dosis en el intervalo de aproximadamente 8% a aproximadamente 10% de una dosis terapéutica aprobada.

- 5 En otra modalidad preferida, la presente invención proporciona dicho uso para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la edad, en donde la rapamicina, o un análogo de ésta, se administra a una dosis en el intervalo de aproximadamente 6% a aproximadamente 8% de una dosis terapéutica aprobada.
- 10 En otra modalidad preferida, la presente invención proporciona dicho uso para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la edad, en donde la rapamicina, o un análogo de ésta, se administra a una dosis en el intervalo de aproximadamente 4% a aproximadamente 6% de una dosis terapéutica aprobada.
- 15 En otra modalidad preferida, la presente invención proporciona dicho uso para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la edad, en donde la rapamicina, o un análogo de ésta, se administra a una dosis en el intervalo de aproximadamente 2% a aproximadamente 4% de una dosis terapéutica aprobada.
- 20 En otra modalidad preferida, la presente invención proporciona dicho uso para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la edad, en donde la rapamicina, o un análogo de ésta, se administra a una dosis en el intervalo de aproximadamente 1% a aproximadamente 2% de una dosis terapéutica aprobada.
- 25 En otra modalidad preferida, la presente invención proporciona dicho uso para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la edad, en donde la rapamicina, o un análogo de ésta, se administra a una dosis en el intervalo de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 0,1% de una dosis terapéutica aprobada.
- 30 En otra modalidad preferida, la presente invención proporciona dicho uso para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la edad, en donde la rapamicina, o un análogo de ésta, se administra a una dosis en el intervalo de aproximadamente 0,001% a aproximadamente 0,1% de una dosis terapéutica aprobada.
- 35 En otra modalidad preferida, la presente invención proporciona dicho uso para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la edad, en donde la rapamicina, o un análogo de ésta, se administra a una dosis en el intervalo de aproximadamente 0,0001% a aproximadamente 0,001% de una dosis terapéutica aprobada.
- 40 En otra modalidad, la presente invención proporciona dicho uso para la prevención o tratamiento de una enfermedad o trastorno relacionado con la edad, en donde la dosis baja de rapamicina se administra como un compuesto aislado.
- 45 En otra modalidad, la presente invención proporciona dicho uso para la prevención o tratamiento de una enfermedad o trastorno relacionado con la edad, en donde la baja dosis de rapamicina se administra como un extracto bruto.
- 50 En otra modalidad, la presente invención proporciona dicho uso para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la edad, en donde la dosis baja de rapamicina se administra como un microorganismo no purificado de *Streptomyces hygroscopicus*, que comprende rapamicina.
- 55 En otra modalidad, la presente invención proporciona dicho uso para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la edad, en donde la composición comprende además un segundo agente seleccionado de un antioxidante, un agente antihipertensivo, un agente hipolipemiente, un agente antiapopléjico, un agente contra el cáncer y un agente de antienvjecimiento diferente.
- 60 En otra modalidad, la presente invención proporciona dicho uso para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la edad, en donde la composición comprende además un antioxidante para controlar las ROS tanto a nivel celular como a nivel mitocondrial.
- 65 En otra modalidad, la presente invención proporciona dicho uso para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la edad, en donde la composición comprende además un antioxidante seleccionado de vitamina C, vitamina E, betacaroteno y otros carotenoides, selenio, ácido lipoico, licopina, luteína, zeaxantina, coenzima Q10, glutatión, N-acetilcisteína, melatonina, genisteína, estradiol, extracto de té y extracto de semilla de uva.
- La composición de acuerdo con la presente invención se administra por vía oral.

- 5 En otra modalidad, la presente invención proporciona dicho uso para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la edad, en donde la enfermedad o trastorno relacionado con la edad es una enfermedad proliferativa anormal, una enfermedad degenerativa o un trastorno funcional decreciente.
- 10 En otra modalidad, la presente invención proporciona dicho uso de prevenir o tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la edad, en donde la enfermedad o trastorno relacionado con la edad se selecciona de tumorigénesis y desarrollo de cáncer maligno, enfermedad neurodegenerativa, infarto de miocardio (ataque cardíaco), insuficiencia cardíaca, aterosclerosis, hipertensión, osteoartritis, osteoporosis, sarcopenia, pérdida de médula ósea, cataratas, esclerosis múltiple, Sjogren, artritis reumatoide, función inmune degradada, diabetes, fibrosis pulmonar idiopática y degeneración macular relacionada con la edad, infarto cerebeloso, apoplejía, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington y trastornos causados por la disminución de la testosterona, el estrógeno, la hormona del crecimiento, IGF-I o la producción de energía.
- 15 En una modalidad preferida, la presente invención proporciona dicho uso para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la edad, en donde dicho agente es una dosis baja de rapamicina o un análogo de ésta, y en donde la enfermedad o trastorno relacionado con la edad se selecciona de tumorigénesis y desarrollo de cáncer maligno, enfermedad neurodegenerativa, infarto de miocardio (ataque cardíaco), insuficiencia cardíaca, aterosclerosis, hipertensión, osteoartritis, osteoporosis, sarcopenia, pérdida de médula ósea, cataratas, esclerosis múltiple, Sjogren, artritis reumatoide, función inmune degradada, diabetes, fibrosis pulmonar idiopática y degeneración macular relacionada con la edad, infarto cerebeloso, apoplejía, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington y trastornos causados por la disminución de la producción de la testosterona, el estrógeno, la hormona de crecimiento, IGF-I o la producción de energía.
- 20 En otra modalidad preferida, la presente invención proporciona dicho uso para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la edad, en donde dicho agente es una dosis baja de rapamicina o un análogo de ésta, y en donde la enfermedad o trastorno relacionado con la edad se selecciona de tumorigénesis o progresión maligna de un cáncer, enfermedad de Parkinson, apoplejía, infarto cerebeloso e infarto de miocardio.
- 25 En otra modalidad preferida, la presente invención proporciona el uso de rapamicina a bajas concentraciones para prolongar la senescencia inducida por disfunción de telómeros dependiente de la edad, activación de oncogenes o agentes que dañan el ADN (*por ejemplo*, ROS, fármacos anticancerígenos, radiación UV o ionizante), ya que el mismo mecanismo de senescencia está involucrado en estos procesos, a través de la respuesta de daño del ADN. Por lo tanto, los métodos de la presente invención pueden usarse para tratar diversos tumores benignos y evitar su progresión maligna. Los métodos de la presente invención pueden usarse por lo tanto en poblaciones que tienen un alto riesgo de cánceres, tales como poblaciones envejecidas, y personas que a menudo están en contacto con mutágenos, o están sujetas a radiación UV o ionizante. Los métodos de la presente invención pueden usarse además en pacientes que toman medicamentos con alto riesgo de inducir cánceres, tales como mujeres que están tomando reemplazos de hormonas. Además, los métodos de la presente invención pueden usarse además en pacientes con cáncer que se someten a una quimioterapia que podría inducir cánceres secundarios.
- 30 En otra modalidad preferida, la presente invención proporciona el uso de rapamicina a bajas concentraciones para prevenir el daño cerebral inducido por la apoplejía. Por lo tanto, puede usarse una dosis baja de rapamicina como fármaco de emergencia para tratar la apoplejía, que incluye tanto los accidentes cerebrovasculares isquémicos como hemorrágicos. Para obtener el mejor resultado, la presente invención proporciona además el uso de una dosis baja de rapamicina en combinación con la medicina de emergencia para tratar la apoplejía isquémica tal como el activador del plasminógeno tisular (t-PA), una medicina que disuelve coágulos.
- 35 En otra modalidad preferida, la presente invención proporciona el uso de rapamicina a bajas concentraciones para prevenir apoplejías y accidentes cerebrovasculares recurrentes. Para tener los mejores resultados de prevención, en otra modalidad del método, la presente invención proporciona además el uso de dosis bajas de rapamicina en combinación con medicamentos de diferentes mecanismos que reducen el riesgo de apoplejía. Estos medicamentos incluyen, entre otros, medicamentos antiplaquetarios (*por ejemplo*, clopidogrel, Agrrenox), anticoagulantes (*por ejemplo*, warfarina, heparina), hipolipemiantes (*por ejemplo*, estatinas) y medicamentos para la presión arterial (*por ejemplo*, inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (ACE), los bloqueadores del receptor de la angiotensina II (ARB), betabloqueadores, diuréticos y bloqueadores del canal de calcio).
- 40 En otra modalidad preferida, la presente invención proporciona el uso de rapamicina a bajas concentraciones para prevenir enfermedades degenerativas de las neuronas, que incluyen, pero no se limitan a, enfermedades de Alzheimer, Parkinson, Huntington.
- 45 En otra modalidad preferida, la presente invención proporciona el uso de rapamicina a bajas concentraciones para prevenir daños en el corazón inducidos por el infarto de miocardio. Por tanto, la invención proporciona el uso de rapamicina a una baja dosis para prevenir el infarto de miocardio o el ataque cardíaco. Para obtener el mejor resultado, la rapamicina puede usarse además en combinación con medicamentos de diferentes mecanismos para prevenir el riesgo de ataque cardíaco. Estos medicamentos incluyen, entre otros, medicamentos antiplaquetarios (*por ejemplo*, clopidogrel, Agrrenox),
- 50
- 55
- 60
- 65

anticoagulantes (*por ejemplo*, warfarina, heparina), hipolipemiantes *por ejemplo*, estatinas), medicamentos para la presión arterial (*por ejemplo*, inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (ACE), los bloqueadores del receptor de la angiotensina II (ARB), betabloqueadores, diuréticos y bloqueadores de los canales de calcio), y medicamentos para el control del azúcar en la sangre (*por ejemplo*, metformina y pioglitazona).

5

Una persona con experiencia en la técnica entendería que la distribución de rapamicina es uniforme en diferentes tejidos o tipos de células, y cada compuesto o composición identificada a partir del tamizaje de antienvjecimiento puede tener un patrón de distribución específico en diferentes tejidos o tipos de células. En un aspecto del método, la invención proporciona el uso de rapamicina a una dosis baja en combinación con al menos otro agente de antienvjecimiento, que incluye, pero no se limita a AICAR, 2-desoxiglucosa, LY294002, metformina, EGCG, GSE, senelita, genisteína, silibinina, isotiocianato de alilo, isotiocianato de fenetilo, extractos de arándano, trisulfuro de dialilo, isotiocianato de bencilo, resveratrol y licopeno.

10

En un primer aspecto no reivindicado, la presente descripción proporciona un método para identificar o detectar un agente para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la edad, el método que comprende seleccionar uno o más compuestos o composiciones contra un sistema modelo de senescencia y controlar su actividad antienvjecimiento.

15

En una modalidad del primer aspecto, la presente invención proporciona un método para identificar o detectar un agente para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la edad, en donde la actividad antienvjecimiento impide el deterioro de un estado de ciclo celular detenido en las células senescentes o postmitóticas.

20

En otra modalidad del primer aspecto, la presente invención proporciona un método para identificar o detectar un agente para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la edad, en donde la actividad antienvjecimiento es estimular, mejorar o mantener la función mitocondrial.

25

En otra modalidad del primer aspecto, la presente invención proporciona un método para identificar o detectar un agente para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la edad, en donde la actividad antienvjecimiento es prevenir una enfermedad o trastorno relacionado con la edad que está asociado con la pérdida de la función mitocondrial o telomérica.

30

En otra modalidad del primer aspecto, la presente invención proporciona un método para identificar o detectar un agente para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la edad, en donde la actividad antienvjecimiento impide el aumento de las especies reactivas de oxígeno (ROS) o muerte apoptótica inducida por la disfunción de los telómeros.

35

En otra modalidad del primer aspecto, la presente invención proporciona un método para identificar o detectar un agente para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la edad, en donde el sistema modelo de senescencia es un mutante de levadura que comprende un telómero disfuncional.

40

En otra modalidad del primer aspecto, la presente invención proporciona un método para identificar o detectar un agente para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la edad, en donde el sistema modelo de senescencia es una línea celular humana primaria que exhibe una actividad de telomerasa insuficiente.

45

En otra modalidad del primer aspecto, la presente invención proporciona un método para identificar o detectar un agente para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la edad, en donde el sistema modelo de senescencia es una línea celular humana que exhibe disfunción telomérica causada por una mutación o defecto en una proteína de unión a los telómeros o telomerasa.

50

En otra modalidad del primer aspecto, la presente invención proporciona un método para identificar o detectar un agente para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la edad, en donde el sistema modelo de senescencia es un modelo de disfunción de telómero causado por un agente químico.

55

En otra modalidad del primer aspecto, la presente invención proporciona un método para identificar o detectar un agente para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la edad, en donde el sistema modelo de senescencia es un modelo creado por la activación de oncogén y/o activación de la respuesta al daño del ADN.

En otra modalidad del primer aspecto, la presente invención proporciona un método para identificar o detectar un agente para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la edad, en donde el sistema modelo de senescencia es una línea celular de ratón, rata o *S. Pombe* que exhibe la disfunción de telómeros.

60

En otra modalidad del primer aspecto, la presente invención proporciona un método para identificar o detectar un agente para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la edad, el método que comprende las etapas de:

(i) incubar un compuesto o composición con células de levadura en condiciones en las que un ciclo celular se detiene por la disfunción de los telómeros o daño del ADN;

65

(ii) medir la población de células de levadura muertas con el uso de un ensayo apoptótico, o alternativamente;

(iii) eliminar las condiciones bajo las cuales se detiene el ciclo celular y medir el número de células supervivientes; y

- (iv) comparar la población de células muertas obtenidas en la etapa (ii) o el número de células sobrevivientes obtenidas en la etapa (iii) con la población de células muertas o el número de células supervivientes, respectivamente, obtenidas en un experimento de control bajo las mismas condiciones que en la etapa (i) pero en ausencia de dicho compuesto o composición,
- 5 en donde una población disminuida de las células de levadura muertas obtenidas en la etapa (ii) o un número aumentado de las células supervivientes obtenidas en la etapa (iii) en comparación con las del experimento de control puede indicar que el compuesto o composición incubada es un candidato de agente de antienvjecimiento.
- 10 En otra modalidad del primer aspecto, la presente invención proporciona un método para identificar o detectar un agente para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la edad, el método que comprende las etapas de:
- (i) incubar un compuesto o composición con células senescentes de mamíferos durante un período de tiempo;
- (ii) medir la población de células senescentes supervivientes; y
- 15 (iii) comparar la población de las células senescentes de mamífero sobrevivientes de la etapa (vi) con la población de células senescentes supervivientes obtenidas en un experimento de control, en donde una población incrementada de células senescentes supervivientes en comparación con el experimento de control puede indicar que el compuesto o la composición incubada con las células es candidata de agente de antienvjecimiento.
- 20 En otra modalidad del primer aspecto, la presente invención proporciona un método para identificar o detectar un agente para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la edad, el método que comprende las etapas de:
- (i) incubar un compuesto o composición con las células humanas de crecimiento normal durante un período de tiempo;
- (ii) medir la biogénesis mitocondrial de las células humanas midiendo la masa mitocondrial, el contenido de ADN mitocondrial o la expresión de factores de transcripción mitocondriales; y
- 25 (iii) comparar el resultado de la etapa (ix) con el de un experimento de control,
- en donde una biogénesis mitocondrial mejorada obtenida en la etapa (ix) en comparación con el experimento de control puede indicar que el compuesto o composición identificado es un candidato de agente de antienvjecimiento.
- 30 En otra modalidad del primer aspecto, la presente invención proporciona un método para identificar o detectar un agente para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la edad, el método que comprende cualquier combinación de las etapas descritas en las tres modalidades anteriores.
- 35 En otra modalidad del primer aspecto, la presente invención proporciona un método para identificar o detectar un agente para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la edad, en donde el sistema modelo de senescencia es un mutante de levadura que comprende un telómero disfuncional seleccionado de *cdc13-1*, *cdc13-2*, *stn1-1*, *cdc17-1*, *cdc17-2*, *hdf1*, *hdf2*, *est1*, *est2*, y *est3*.
- 40 En otra modalidad del primer aspecto, la presente invención proporciona un método para identificar o detectar un agente para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la edad, en donde el sistema modelo de senescencia es una línea celular humana primaria que comprende al menos uno de los fibroblastos, células endoteliales y células epiteliales, que exhiben una actividad de telomerasa insuficiente.
- 45 En otra modalidad del primer aspecto, la presente invención proporciona un método para identificar o detectar un agente para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la edad, en donde el sistema modelo de senescencia es una línea celular humana que comprende una mutación en TRF2, POT1, TERT, TERC o WRN, que muestra disfunción de los telómeros.
- 50 En otra modalidad del primer aspecto, la presente invención proporciona un método para identificar o detectar un agente para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la edad, en donde el sistema modelo de senescencia es un modelo de disfunción de telómero causado por un agente químico seleccionado del grupo que consiste en bleomicina, adriamicina y ligandos G-cuádruple.
- 55 En otra modalidad del primer aspecto, la presente invención proporciona un método para identificar o detectar un agente para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la edad, en donde la enfermedad o trastorno relacionado con la edad es una enfermedad proliferativa anormal, una enfermedad degenerativa o un trastorno funcional decreciente.
- 60 En otra modalidad del primer aspecto, la presente invención proporciona un método para identificar o detectar un agente para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la edad, en donde dicho uno o más compuestos o composiciones pertenecen cada uno a una genoteca de compuestos y/o composiciones. Por lo tanto, una modalidad preferida de esta invención abarca una selección de alto rendimiento de una pluralidad de compuestos o composiciones.
- 65 En un segundo aspecto no reivindicado, la presente invención proporciona un método para identificar o detectar un agente para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la edad, el método que comprende seleccionar uno o más compuestos o composiciones y medir su actividad contra al menos uno de los componentes de la ruta

5 TOR/AMPK/mitocondrias/senescencia, en donde el agente (a) amplía el potencial de replicación, (b) mantiene la senescencia o el estado de detención celular en las células postmitóticas, o (c) previene el deterioro de las mitocondrias o muerte celular después del deterioro de la senescencia o del estado de detención del ciclo celular. Este aspecto se refiere al primer aspecto de la presente invención en el que dicha actividad antienvjecimiento se encuentra en cualquiera de los componentes de la ruta TOR/AMPK/mitocondrias/senescencia con un efecto de mantener la senescencia.

10 En una modalidad del segundo aspecto, la presente invención proporciona un método para identificar o detectar un agente para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la edad, en donde la enfermedad o trastorno relacionado con la edad se asocia con deterioro de la senescencia, muerte celular seguida del deterioro de un estado de detención del ciclo celular en las células senescentes y posmitóticas, deterioro mitocondrial acelerado y aumento del estrés oxidativo o disfunción de los telómeros.

15 En otra modalidad del segundo aspecto, la presente invención proporciona un método para identificar o detectar un agente para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la edad, en donde dichos componentes de la vía TOR/AMPK/mitocondrias/senescencia comprenden insulina/IGF, receptores de insulina/IGF, PI3K, PDK1, PTEN, TSC1, TSC2, AKT, Rheb, raptor, GβL, S6K, TOR, AMPK, STRAD, MO25, LKB1, captación de glucosa, captación de aminoácidos, CaMKKβ, PGC-1α, PGC-1β, NRF-1, NRF-2, TFAM, TFB1M, TFB2M, ERR (por ejemplo, ERRα, ERRβ y ERRγ), PPARs (por ejemplo, PP ARα, PPARδ y PPAPγ), SIRT1, RIP140, PRC, POLRMT, ATM, p53, p21, p19<sup>ARF</sup>, WAF1, P16<sup>IN43</sup>, pRB, E2F, PTEN, y p27<sup>KIP1</sup>.

20 En otra modalidad del segundo aspecto, la presente invención proporciona un método para identificar o detectar un agente para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la edad, en donde la enfermedad o trastorno relacionado con la edad es una enfermedad proliferativa anormal, una enfermedad degenerativa o un trastorno funcional decreciente.

25 En otra modalidad del segundo aspecto, la presente invención proporciona un método para identificar o detectar un agente para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la edad, en donde dicho uno o más compuestos o composiciones pertenecen cada uno a una genoteca de compuestos y/o composiciones.

30 En un tercer aspecto no reivindicado, la presente invención proporciona un método para identificar o detectar un agente para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la edad, el método que comprende seleccionar uno o más compuestos o composiciones y detectar su actividad contra al menos uno de los componentes de la ruta de biogénesis mitocondrial, en donde el agente (a) amplía el potencial de replicación, (b) mantiene la senescencia o el estado de detención del ciclo celular en las células postmitóticas, o (c) evita el deterioro de las mitocondrias o la muerte celular después el deterioro de la senescencia. Este aspecto se refiere al primer aspecto de la presente invención en el que dicha actividad antienvjecimiento está en contra de cualquiera de los componentes de la ruta de biogénesis mitocondrial con un efecto de mantenimiento de la senescencia.

35 En una modalidad del tercer aspecto, la presente invención proporciona un método para identificar o detectar un agente para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la edad, en donde la enfermedad o el trastorno relacionado con la edad se asocia con la muerte celular tras el deterioro de un estado de detención del ciclo celular en las células senescentes y postmitóticas, deterioro de la senescencia, deterioro mitocondrial acelerado y aumento del estrés oxidativo o disfunción de los telómeros, y.

40 En otra modalidad del tercer aspecto, la presente invención proporciona un método para identificar o detectar un agente para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la edad, en donde los componentes de la ruta de biogénesis mitocondrial comprenden AMPK, STRAD, MO25, LKB1, CaMKKβ, PGC-1α, PGC-1β, NRF-1, NRF-2, TFAM, TFB1M, TFB2M, ERRs (por ejemplo, ERRα, ERRβ y ERRγ), PPARs (por ejemplo, PPARα, PPAPδ y PPAPγ), SIRT1, RIP140, PRC, y POLRMT.

45 En otra modalidad del tercer aspecto, la presente invención proporciona un método para identificar o detectar un agente para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la edad, en donde la enfermedad o trastorno relacionado con la edad es una enfermedad proliferativa anormal, una enfermedad degenerativa o un trastorno funcional decreciente.

50 En otra modalidad del tercer aspecto, la presente invención proporciona un método para identificar o detectar un agente para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la edad, en donde dicho uno o más compuestos o composiciones pertenecen cada uno a una genoteca de compuestos y/o composiciones.

55 En un cuarto aspecto no reivindicado, la presente invención proporciona un método para identificar o detectar un agente para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la edad, el método que comprende seleccionar uno o más compuestos o composiciones y detectar su actividad contra al menos uno de los componentes de la ruta de AMPK, en donde el agente (a) amplía el potencial de replicación, (b) mantiene la senescencia o el estado de detención del ciclo celular en las células postmitóticas, o (c) evita el deterioro de las mitocondrias o la muerte celular después del deterioro de la senescencia. Este aspecto se refiere al primer aspecto de la presente invención en el que dicha actividad antienvjecimiento está en contra de cualquiera de los componentes de la ruta de AMPK con un efecto de mantenimiento de la senescencia.

- 5 En una modalidad del cuarto aspecto, la presente invención proporciona un método para identificar o detectar un agente para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la edad, en donde la enfermedad o trastorno relacionado con la edad está asociado con el deterioro de la senescencia, pérdida de células relacionada con la edad, o tumorigénesis y progresión maligna de cánceres.
- 10 En otra modalidad del cuarto aspecto, la presente invención proporciona un método para identificar o detectar un agente para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la edad, en donde los componentes de la ruta AMPK comprenden AMPK, ATM, LKB1, STRAD, MO25, y CaMKK $\beta$ .
- 15 En otra modalidad del cuarto aspecto, la presente invención proporciona un método para identificar o detectar un agente para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la edad, en donde la enfermedad o trastorno relacionado con la edad es una enfermedad proliferativa anormal, una enfermedad degenerativa o un trastorno funcional decreciente.
- 20 En otra modalidad del cuarto aspecto, la presente invención proporciona un método para identificar o detectar un agente para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la edad, en donde dicho uno o más compuestos o composiciones pertenecen cada uno a una genoteca de compuestos y/o composiciones.
- 25 En un quinto aspecto no reivindicado, la presente invención proporciona un método para identificar o detectar un agente para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la edad, el método que comprende seleccionar uno o más compuestos o composiciones y detectar su actividad contra al menos uno de los componentes de la ruta de senescencia, en donde el agente mantiene la senescencia o el estado de detención en el ciclo celular de las células postmitóticas o previene el deterioro de las mitocondrias o la muerte celular después del deterioro de la senescencia. Este aspecto se refiere al primer aspecto de la presente invención en el que dicha actividad antienvjecimiento está en contra de cualquiera de los componentes de la ruta de senescencia con un efecto de mantenimiento de la senescencia.
- 30 En una modalidad del quinto aspecto, la presente invención proporciona un método para identificar o detectar un agente para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la edad, en donde la enfermedad o trastorno relacionado con la edad se asocia con deterioro de la senescencia, muerte celular seguida del deterioro de un estado de detención del ciclo celular en las células senescentes y postmitóticas, deterioro mitocondrial acelerado y aumento del estrés oxidativo o disfunción de los telómeros.
- 35 En otra modalidad del quinto aspecto, la presente invención proporciona un método para identificar o detectar un agente para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la edad, en donde los componentes de la ruta de senescencia comprenden ATM, p53, p21, p19<sup>ARF</sup>, WAF1, p16<sup>INK4a</sup>, pRB, E2F, PTEN, y p27<sup>KIP1</sup>.
- 40 En otra modalidad del quinto aspecto, la presente invención proporciona un método para identificar o detectar un agente para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la edad, en donde la enfermedad o trastorno relacionado con la edad es una enfermedad proliferativa anormal, una enfermedad degenerativa o un trastorno funcional decreciente.
- 45 En otra modalidad del quinto aspecto, la presente invención proporciona un método para identificar o detectar un agente para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la edad, en donde dicho uno o más compuestos o composiciones pertenecen cada uno a una genoteca de compuestos y/o composiciones.
- 50 En un sexto aspecto no reivindicado, la presente invención proporciona un método para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la edad, el método que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una composición que comprende un agente identificado de acuerdo con cualquiera de las modalidades de la primera al quinto aspecto de la presente invención como se describió anteriormente, o una sal, solvato o profármaco farmacéuticamente aceptable de éstos. Este aspecto abarca por tanto el uso de cualquiera de los compuestos antienvjecimiento o composiciones identificadas por los métodos descritos en este documento para la preparación o fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de una enfermedad o trastorno relacionado con la edad como se abarca en esta descripción.
- 55 En una modalidad del sexto aspecto, la presente invención proporciona un método para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la edad, en donde la enfermedad o trastorno relacionado con la edad se asocia con el deterioro de un estado de detención de ciclo celular en las células senescentes o posmitóticas, disfunción mitocondrial o disfunción de los telómeros.
- 60 En otra modalidad del sexto aspecto, la presente invención proporciona un método para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la edad, en donde el agente se selecciona de moléculas orgánicas, moléculas inorgánicas, productos naturales, péptidos, proteínas, ADN, ARN, y productos intermedios metabólicos de éste.
- 65 En otra modalidad del sexto aspecto, la presente invención proporciona un método para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la edad, en donde el agente se selecciona de AICAR, dosis baja de rapamicina o análogos de ésta, EGCG, extracto de semilla de uva, extracto de arándano, selenito, genisteína, trisulfuro de dialilo, isotiocianato de bencilo, isotiocianato de fenilo, isotiocianato de fenetilo, resveratrol, licopeno e isotiocianato de alilo.

- 5 En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la edad, en donde la composición comprende además un segundo agente seleccionado de un antioxidante, un agente antihipertensivo, un agente hipolipemiante, un agente antiapopléjico, un agente contra el cáncer y un agente antienvjecimiento diferente.
- 10 En otra modalidad del sexto aspecto, la presente invención proporciona un método para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la edad, en donde la composición comprende además un antioxidante seleccionado de vitamina C, vitamina E, betacaroteno y otros carotenoides, selenio, ácido lipoico, licopina, luteína, zeaxantina, coenzima Q10, glutatión, N-acetilcisteína, melatonina, genisteína, estradiol, extracto de té y extracto de semilla de uva.
- 15 En otra modalidad del sexto aspecto, la presente invención proporciona un método para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la edad, en donde la composición comprende además un portador farmacéuticamente aceptable.
- 20 En otra modalidad del sexto aspecto, la presente invención proporciona un método para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la edad, en donde la composición se administra por vía oral, parenteral, tópica, transdérmica o en forma de supositorio o aerosol.
- 25 En otra modalidad del sexto aspecto, la presente invención proporciona un método para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la edad, en donde la enfermedad o trastorno relacionado con la edad es una enfermedad proliferativa anormal, una enfermedad degenerativa o un trastorno funcional decreciente.
- 30 En otra modalidad del sexto aspecto, la presente invención proporciona un método para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la edad, en donde la enfermedad o trastorno relacionado con la edad se selecciona de tumorigénesis y desarrollo de cáncer maligno, enfermedad neurodegenerativa, infarto de miocardio (ataque cardíaco), insuficiencia cardíaca, aterosclerosis, hipertensión, osteoartritis, osteoporosis, sarcopenia, pérdida de médula ósea, cataratas, esclerosis múltiple, Sjogren, artritis reumatoide, función inmune degradada, diabetes, fibrosis pulmonar idiopática y degeneración macular relacionada con la edad, infarto cerebeloso, apoplejía, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington y trastornos causados por la disminución de la testosterona, el estrógeno, la hormona del crecimiento, IGF-I o la producción de energía.
- 35 En otra modalidad del sexto aspecto, la presente invención proporciona un método para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la edad, en donde dicho sujeto es un mamífero.
- 40 En otra modalidad del sexto aspecto, la presente invención proporciona un método para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la edad, en donde dicho sujeto es un ser humano.
- 45 En un séptimo aspecto no reivindicado, la presente invención proporciona un método para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la edad, el método que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una composición que comprende un activador de AMPK, o una sal farmacéuticamente aceptable, solvato, o profármaco de éste, que activa directa o indirectamente AMPK, aumenta la biogénesis mitocondrial y mantiene un estado de detención del ciclo celular en las células senescentes o posmitóticas del sujeto. Este aspecto de la invención abarca por lo tanto el uso de un activador de AMPK para la preparación o fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de una enfermedad o trastorno relacionado con la edad abarcado por esta descripción. Este aspecto se refiere al sexto aspecto de la presente invención en el que dicho agente es un activador de AMPK.
- 50 En una modalidad del séptimo aspecto, la presente invención proporciona un método para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la edad, en donde la enfermedad o trastorno relacionado con la edad se asocia con la pérdida de función mitocondrial, disfunción de los telómeros, deterioro de la senescencia y pérdida celular dependiente de la edad, o deterioro mitocondrial o estado de detención del ciclo celular en las células postmitóticas.
- 55 En una modalidad del séptimo aspecto, la presente invención proporciona un método para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la edad, en donde dicho activador de AMPK se selecciona de AICAR, metformina, 2-desoxiglucosa, 3-O-metilglucosa, LY294002, berberina, fenformina, A-769662, tiazolidindionas, dexametasona, estatinas, leptina, adiponectina, cilostazol, EGCG, senelito, isotiocianato de ajo e isotiocianato de fenitilo.
- 60 En otra modalidad del séptimo aspecto, la presente invención proporciona un método para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la edad, en donde la composición comprende además un segundo agente seleccionado de un antioxidante, un agente antihipertensivo, un agente hipolipemiante, un agente antiapopléjico, un agente contra el cáncer y un agente antienvjecimiento diferente.
- 65 En otra modalidad del séptimo aspecto, la presente invención proporciona un método para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la edad, en donde la composición comprende además un portador farmacéuticamente aceptable.

En otra modalidad del séptimo aspecto, la presente invención proporciona un método para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la edad, en donde la composición se administra por vía oral, parenteral, tópica, transdérmica o en forma de supositorio o aerosol.

5 En otra modalidad del séptimo aspecto, la presente invención proporciona un método para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la edad, en donde la enfermedad o trastorno relacionado con la edad es una enfermedad proliferativa anormal, una enfermedad degenerativa o un trastorno funcional decreciente.

10 En otra modalidad del séptimo aspecto, la presente invención proporciona un método para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la edad, en donde la enfermedad o trastorno relacionado con la edad se selecciona de tumorigénesis y desarrollo de cáncer maligno, enfermedad neurodegenerativa, infarto de miocardio (ataque cardíaco), insuficiencia cardíaca, aterosclerosis, hipertensión, osteoartritis, osteoporosis, sarcopenia, pérdida de médula ósea, cataratas, esclerosis múltiple, Sjogren, artritis reumatoide, función inmune degradada, diabetes, fibrosis pulmonar idiopática y degeneración macular relacionada con la edad, infarto cerebeloso, apoplejía, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington y trastornos causados por la disminución de la testosterona, el estrógeno, la hormona del crecimiento, IGF-I o la producción de energía.

20 En otra modalidad del séptimo aspecto, la presente invención proporciona un método para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la edad, en donde dicho sujeto es un animal mamífero.

En otra modalidad del séptimo aspecto, la presente invención proporciona un método para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la edad, en donde dicho sujeto es un ser humano.

25 En un octavo aspecto no reivindicado, la presente invención proporciona un método para detectar un agente de antienvjecimiento en una muestra biológica, el método que comprende las etapas de:

- (i) diluir opcionalmente la muestra biológica con un disolvente;
- (ii) incubar la muestra diluida con las células de mutante de levadura en condiciones en las que el ciclo celular de las células de levadura se detiene por la disfunción de los telómeros o daño del ADN;
- 30 (iii) eliminar las condiciones bajo las cuales se detiene el ciclo celular y medir el número de células de levadura supervivientes; y
- (iv) comparar el número de células supervivientes obtenidas en la etapa (iii) con el número de células supervivientes en un experimento de control en las mismas condiciones que las de la etapa de incubación (ii) excepto por la ausencia de la muestra biológica sujeto,

35 en donde el número aumentado de células supervivientes obtenidas en la etapa (iii) en comparación con el número de células supervivientes en el experimento de control indica que la muestra biológica comprende un agente de antienvjecimiento.

40 En un noveno aspecto no reivindicado, la presente invención proporciona un método para determinar la concentración biológica de un agente de antienvjecimiento en una muestra biológica, el método que comprende las etapas de:

- (i) opcionalmente diluir una muestra biológica objetivo con un disolvente;
- (ii) incubar la muestra biológica diluida con las células de mutante de levadura en condiciones en las que el ciclo celular de las células de levadura se detiene por la disfunción de los telómeros o daño del ADN;
- 45 (iii) eliminar las condiciones bajo las cuales se detiene el ciclo celular y medir el número de células de levadura supervivientes;
- (iv) comparar opcionalmente el número de células supervivientes obtenidas en la etapa (iii) con el número de células supervivientes en un experimento de control en las mismas condiciones que las de la etapa de incubación (ii) excepto por la ausencia de la muestra biológica sujeto; y
- 50 (v) calcular la concentración biológica del agente de antienvjecimiento aplicando el número de células de levadura supervivientes a una ecuación o curva estándar preestablecida entre la concentración del agente de antienvjecimiento y el número de células de levadura supervivientes.

55 En una modalidad del noveno aspecto, la presente invención proporciona un método para preparar una ecuación o curva estándar que se usa para el cálculo de la concentración biológica de un agente de antienvjecimiento en una muestra biológica, el método que comprende las etapas de:

- (vi) preparar una pluralidad de soluciones patrón que tienen diferentes concentraciones conocidas de un agente de antienvjecimiento purificado con el uso de un disolvente que se usa para incubar la muestra biológica objetivo;
- 60 (vii) incubar las soluciones estándar con las células mutantes de levadura en condiciones en las que el ciclo celular se detiene por disfunción de los telómeros o daño del ADN;
- (viii) eliminar las condiciones bajo las cuales se detiene el ciclo celular y medir el número de células de levadura supervivientes en cada solución estándar incubada; y

(ix) representar el número de células supervivientes obtenidas en la etapa (viii) frente a las concentraciones correspondientes del agente de antienvjecimiento para obtener una curva estándar y/o para obtener una ecuación estándar.

5 Este aspecto se refiere al octavo aspecto de la presente invención en el que se involucra un análisis cuantitativo mediante el cálculo de la concentración biológica de un agente de antienvjecimiento con el uso de una ecuación o curva preestablecida descrita anteriormente. Por lo tanto, la presente invención abarca métodos que comprenden cualquier combinación razonable de las etapas descritas en los dos aspectos.

10 En otra modalidad del noveno aspecto, la presente invención proporciona un método para determinar la concentración biológica de un agente de antienvjecimiento en una muestra biológica, en donde el agente de antienvjecimiento es un compuesto o composición identificada o usada de acuerdo con cualquiera de las modalidades en cualquier aspecto de la presente invención como se describió anteriormente.

15 En otra modalidad del noveno aspecto, la presente invención proporciona un método para determinar la concentración biológica de un agente de antienvjecimiento en una muestra biológica, en donde el agente de antienvjecimiento es rapamicina o un análogo de ésta. En una modalidad preferida, la rapamicina o análogo está en una dosis baja.

20 En otra modalidad del noveno aspecto, la presente invención proporciona un método para determinar la concentración biológica de un agente de antienvjecimiento en una muestra biológica, en donde el mutante de levadura se selecciona de *cdc13-1*, *cdc13-2*, *stn1-1*, *cdc17-1*, *cdc17-2*, *hdf1*, *hdf2*, *est1*, *est2*, y *est3*.

25 Otros aspectos o modalidades preferidas de la presente invención pueden incluir cualquier combinación adecuada de las modalidades descritas en la presente descripción. Aún otros aspectos y modalidades pueden encontrarse en otras partes de la descripción proporcionada en la presente descripción.

#### Definiciones

30 Como se usa en la presente descripción, las formas singulares "un", "uno/una" y "el/la" incluyen los referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

35 Como se usa en la presente, los términos "opcional" u "opcionalmente" significa que el evento o circunstancia posteriormente descrito puede o no ocurrir, y que la descripción incluye ejemplos donde dicho evento o circunstancia ocurre y ejemplos donde no.

40 Como se usa en la presente descripción, el término "trastorno relacionado con la edad" o "enfermedad relacionada con la edad" se refiere a los trastornos o enfermedades en los que el envejecimiento es un factor de riesgo importante. Basado en el tipo de enfermedades, las enfermedades o trastornos relacionados con la edad incluyen tres tipos principales: (1) enfermedades proliferativas anormales, tales como cáncer; (2) enfermedades degenerativas, que incluyen la enfermedad neuronal degenerativa (Alzheimer, Parkinson, apoplejía), infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca, aterosclerosis, hipertensión, osteoartritis, osteoporosis, sarcopenia, pérdida de médula ósea, artritis reumatoide, función inmune degradada, diabetes, fibrosis pulmonar idiopática, degeneración macular relacionada con la edad; y (3) trastornos funcionales decrecientes, que incluyen disminución de testosterona, estrógeno, hormona del crecimiento, IGF-I, producción de energía reducida, y otros. Basado en el tipo de células involucradas, las enfermedades o trastornos relacionados con la edad pueden clasificarse además como dos clases principales: (1) en células postmitóticas: degeneración neuronal (Alzheimer, Parkinson, apoplejía), sarcopenia (pérdida de músculo), enfermedades cardiovasculares (insuficiencia cardíaca, infarto de miocardio); y (2) en células mitóticas: pérdida de médula ósea, función inmune degradada, diabetes, fibrosis pulmonar idiopática, degeneración macular relacionada con la edad, artritis reumatoide, osteoartritis, osteoporosis, aterosclerosis e hipertensión. Más específicamente, las enfermedades o los trastornos relacionados con la edad asociados con la disfunción mitocondrial o/y la disfunción de los telómeros incluyen, entre otros, cáncer, osteoartritis, degeneración macular relacionada con la edad, fibrosis pulmonar idiopática, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, envejecimiento de la piel, cataratas, esclerosis múltiple, Sjogren, artritis reumatoide, aterosclerosis, infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca, hipertensión, apoplejía, diabetes mellitus, osteoporosis, obesidad, canas, pérdida de audición, y otros. Todas las enfermedades o trastornos mencionados anteriormente están abarcados por la presente invención.

60 En algunas modalidades preferidas, el término "enfermedad o trastorno relacionado con la edad" se refiere a una enfermedad o trastorno seleccionado entre tumorigénesis y desarrollo de cáncer maligno, infarto de miocardio (ataque cardíaco), infarto cerebeloso, apoplejía, enfermedad de Parkinson, insuficiencia cardíaca, aterosclerosis, hipertensión, catarata, degeneración macular relacionada con la edad, sarcopenia, osteoartritis, osteoporosis, pérdida de médula ósea, esclerosis múltiple, Sjogren, artritis reumatoide, función inmune degradada, diabetes, fibrosis pulmonar idiopática y enfermedades neurodegenerativas, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, y trastornos causados por la disminución de la testosterona, el estrógeno, la hormona de crecimiento, el IGF-I o la producción de energía.

65 Como el término "efecto antienvjecimiento" se refiere a los fenotipos que comprenden una biogénesis y función mitocondrial aumentada, niveles reducidos de ROS, esperanza de vida prolongada de las células senescentes y células

postmitóticas, tal como células neuronales, trastornos relacionados con la edad prevenidos, tales como tumorigénesis, progresión maligna de cánceres, infarto cerebeloso e infarto de miocardio.

5 Como se usa en la presente descripción, el término "prevenir enfermedades o trastornos relacionados con la edad" significa reducir las incidencias, retrasar o revertir las enfermedades relacionadas con el envejecimiento.

10 Como el término "senescencia" se refiere a un estado de detención del ciclo celular en las células mitóticas, que puede inducirse por disfunción de los telómeros, daño en el ADN o activación de los oncogenes. En la levadura en gemación, las células senescentes causadas por la disfunción de los telómeros se detienen en la fase G2/M del ciclo celular. En las células de mamífero, las células senescentes se detienen en la fase G0, que es una fase que no se divide fuera del ciclo celular. La senescencia en los fibroblastos WI-38 significa que las células no muestran un aumento en número bajo el microscopio durante 10 días después del pasaje y muestran tinción positiva para la  $\beta$ -galactosidasa.

15 Como se usa en la presente descripción, el término "células postmitóticas" se refiere a un grupo de células que se encuentran en estado de detención en G0, que es una fase que no se divide fuera del ciclo celular, pero continúa realizando sus funciones principales por el resto de la vida del organismo. Las células postmitóticas incluyen las células neuronales, células del músculo cardíaco y células musculares. Algunos tipos de células en los organismos maduros, tales como las células parenquimatosas del hígado y el riñón, entran en la fase G0 de forma semipermanente y solo pueden inducirse para que comiencen a dividirse nuevamente en circunstancias muy específicas. Estos tipos de células pueden considerarse además como células postmitóticas cuando se encuentran en la fase G0.

20 Como se usa en la presente descripción, el término "*cdc13-1*" se refiere a las células mutantes de levadura que contienen una mutación puntual en el gen *CDC13*. El término "*cdc13-1*" además se refiere al gen mutante puntual, mientras que *cdc13-1p* se refiere a la proteína producida por el gen mutante puntual *cdc13-1*, y *Cdc13p* se refiere a la proteína silvestre.

25 Como se usa en la presente descripción, los términos "*cdc13-2*", "*stn-1*", "*cdc17-1*", y "*cdc17-2*" se refieren a células mutantes de levadura, o los genes mutantes correspondientes. Los términos "*est1*", "*est2*", "*est3*", "*hdf1*", y "*hdf2*" se refieren a células mutantes de levadura que contienen una delección del gen *EST1*, *EST2*, *EST3*, *HDF1* o *HDF2*, respectivamente, o se refieren al correspondientes delecciones génicas, respectivamente. Una persona con experiencia ordinaria en la técnica entendería fácilmente el uso de estos términos dentro del contexto.

30 Como se usa en la presente descripción, el término "inhibidor de TOR" se refiere a una clase de compuestos inmunosupresores que contienen el núcleo básico de rapamicina, que incluye rapamicina y sus derivados modificados química o biológicamente, que retienen la capacidad de mantener la senescencia. Como consecuencia, el término "inhibidor de TOR" puede estar en forma de derivados de éster, éter, hidrazona, hidroxilamina u oxima de la rapamicina. El término además puede incluir análogos de rapamicina a través de la modificación de los grupos funcionales en el núcleo de rapamicina, por ejemplo, a través de reacciones de reducción o de oxidación. Así, el término "inhibidor de TOR" incluye, pero no se limita a rapamicina y análogos tales como AP23573 (Deforolimus), AP-23675, AP-23841, ABT-578 (Zotarolimus), CC1779 (Temsirrolimus), RAD-001 (Everolimus), 7-epi-rapamicina, 7-tiometil-rapamicina, 7-epi-trimetoxifenil-rapamicina, 7-epi-tiometil-rapamicina, y 7-demetoxi-rapamicina, 32-demetoxi-rapamicina, 2-desmetil-rapamicina, y 42-0-(2-hidroxi)etil rapamicina.

35 Como se usa en la presente descripción, el término "dosis terapéuticas de rapamicina" significa el intervalo de dosis de rapamicina de aproximadamente 1 mg/día a aproximadamente 5 mg/día, que puede ampliarse de aproximadamente 0,1 mg/día a aproximadamente 15 mg/día, pero no excede los 40 mg día en la clínica. Bajo estas dosis, la rapamicina inhibe la traducción de proteínas y el progreso del ciclo celular en la fase G1, así como induce la autofagia. En animales y cultivos de tejidos, las dosis terapéuticas significan por encima de 0,1 mg/kg/día en modelos murinos, por encima de 10 ng/ml para células humanas y por encima de 100 ng/ml para células murinas, respectivamente. Es comprensible para un experto en la técnica que la dosis terapéutica exacta puede variar para una línea celular o animal específico.

40 Como se usa en la presente descripción, el término "dosis bajas de rapamicina" significa dosis por debajo de "las dosis terapéuticas". Por ejemplo, la dosis baja puede ser de 0,1 a 1000 pM en medio de suero para células, de 0,01 a 100  $\mu$ g/kg/día en modelos murinos, o de 0,01 a 100  $\mu$ g/día en humanos. La concentración específica depende del tipo específico de células o enfermedades que se tratan y la vía de administración. Estas bajas dosis además pueden presentarse como de aproximadamente 0,001% a aproximadamente 10% de las dosis terapéuticas de rapamicina.

45 Como se usa en la presente descripción, el término "concentración biológica antienvjecimiento" de un compuesto o composición significa la concentración de un compuesto o composición biológicamente activos antienvjecimiento, a diferencia de la concentración de un compuesto o composición. La actividad biológica antienvjecimiento puede medirse por la prolongación de la senescencia en células *cdc13-1*.

50 Como se usa en la presente descripción, el término "cáncer" describe un estado de enfermedad en el cual una célula normal se convierte primero en una célula anormal con lesiones iniciales tales como daños en el ADN, activación de oncogenes, disfunción de los telómeros y después se vuelve invasiva a los tejidos adyacentes, a los ganglios linfáticos regionales y a sitios distantes. El cáncer puede ser cáncer relacionado con la edad, cánceres inducidos por mutágenos, cánceres secundarios inducidos por terapias contra el cáncer o terapias contra un trastorno o enfermedad independiente

tales como el reemplazo hormonal o inducidos por ambientes tales como los rayos UV, irradiación con hierro y el tabaquismo.

5 Como se usa en la presente descripción, el término "prevenir la tumorigénesis" significa inhibir la transformación de una célula normal en una célula anormal o inhibir la formación de tumores benignos. El término "prevenir la progresión maligna" significa inhibir el desarrollo de tumores benignos en tumores malignos o cánceres. El término "prevenir el cáncer" o "prevención del cáncer" significa prevenir la tumorigénesis y/o inhibir la progresión maligna.

10 Como se usa en la presente descripción, el término "agente quimiopreventivo del cáncer" se refiere a una sustancia natural o fabricada en laboratorio que puede usarse para inhibir el crecimiento tumoral.

15 Como se usa en la presente descripción, el término "portador farmacéuticamente aceptable" se refiere un medio portador generalmente aceptado en la técnica para el suministro de agentes biológicamente activos a animales, en particular, mamíferos, que incluyen, por ejemplo, adyuvantes, excipientes o vehículos, tales como diluyentes agentes conservantes, cargas, agentes reguladores de flujo, agentes desintegrantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes de suspensión, agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, agentes perfumantes, agentes antibacterianos, agentes antimicóticos, agentes lubricantes, y agentes de dispensación, dependiendo de la naturaleza del modo de administración y de las formas de dosificación. Los portadores farmacéuticamente aceptables incluyen tanto medios líquidos acuosos como no acuosos, así como una variedad de formas de dosificaciones sólidas y semisólidas. Tales portadores pueden incluir varios ingredientes y aditivos diferentes además del agente activo, tales ingredientes adicionales que se incluyen en la formulación por una variedad de razones, por ejemplo, estabilización del agente activo, aglutinantes, etc., como bien se conoce por las personas con conocimiento ordinario en la técnica.

25 Como se usa en la presente descripción, el término "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal o una forma zwitteriónica de un compuesto, que es soluble o dispersable en agua o aceite y, dentro del alcance de un juicio médico sólido, adecuado para su uso en contacto con los tejidos de un paciente sin toxicidad excesiva, irritación, respuesta alérgica, u otro problema o complicación acorde con una relación beneficio/riesgo razonable, y es efectivo para su uso previsto. Las sales de adición de ácido representativas incluyen acetato, adipato, alginato, citrato, aspartato, benzoato, bencenosulfonato, bisulfato, butirato, canforsulfonato; hemisulfato, heptanoato, hexanoato, formiato, fumarato, 30 hidrocloreuro, hidrobromuro, hidroyoduro, lactato, maleato, mesitilensulfonato, metanosulfonato, naftalenosulfonato, nicotinato, 2-naftalenosulfonato, oxalato, palmitato, pectinato, persulfato, pivalato, propionato, succinato, tartrato, tricloroacetato, trifluoroacetato, fosfato, glutamato, bicarbonato, p-toluenosulfonato. Los ejemplos de ácidos que pueden emplearse para formar sales de adición farmacéuticamente aceptables incluyen ácidos inorgánicos tales como clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, y fosfórico, y ácidos orgánicos tales como oxálico, maleico, succínico, y cítrico.

35 Los cationes de sales farmacéuticamente aceptables incluyen litio, sodio, potasio, calcio, magnesio, y aluminio, así como cationes de amina cuaternaria no tóxicos tales como amonio, tetrametilamonio, tetraetilamonio, tetrabutilamonio, metilamina, dimetilamina, trimetilamina, trietilamina, dietilamina, etilamina, tributilamina, piridina, N,N-dimetilanilina, N-metilpiperidina, N-metilmorfolina, dicitclohexilamina. Otras aminas orgánicas representativas útiles para la formación de sales de adición básicas incluyen etilenodiamina, etanolamina, dietanolamina, piperidina, y piperazina.

45 Como se usa en la presente descripción, el término "solvato" significa una asociación física de un compuesto identificado de acuerdo con esta invención con una o más, preferentemente de una a tres, moléculas de disolvente, ya sean orgánicas o inorgánicas. Esta asociación física incluye enlace hidrógeno. En ciertos casos el solvato podrá ser capaz de aislarse, por ejemplo, cuando se incorporan una o más, preferentemente una a tres, moléculas de disolventes en la estructura reticular cristalina del sólido cristalino. Las moléculas de disolvente en el solvato pueden estar presentes en una disposición regular y/o en una disposición no ordenada. El solvato puede comprender ya sea una cantidad estequiométrica o no estequiométrica de las moléculas de disolvente. 'Solvato' abarca los solvatos en fase de solución y los aislables. Los solvatos ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, hidratos, etanolatos, metanolatos, e isopropanolatos. Los métodos de solvatación generalmente se conocen en la técnica.

50 Además, los compuestos abarcados por la presente invención pueden tener formas de profármacos. Cualquier compuesto que se convertirá *in vivo* para proporcionar el agente bioactivo es un profármaco dentro del alcance de la invención. Diversas formas de profármacos son bien conocidas en la técnica. Para ejemplos de tales derivados de profármacos, ver Design of Prodrugs, editado por H. Bundgaard (Elsevier, 1985), y Methods in Enzymology, Vol. 112, en las págs. 309-396, editado por K. Widder, y otros. (Academic Press, 1985); y A Textbook of Drug Design and Development, editado por Krogsgaard-Larsen y H. Bundgaard, Capítulo 5 "Design and Application of Pro-drugs", de H. Bundgaard, en las págs. 113-191 (1991).

60 Como un ejemplo ilustrativo, los compuestos que contienen un grupo hidroxilo, tal como rapamicina y sus análogos, pueden formar ésteres fisiológicamente hidrolizables, carbonatos, o carbomatos que sirven como profármacos al ser hidrolizados en el cuerpo para producir los compuestos originales. Así, la presente invención abarca el uso de rapamicina y análogos o sus derivados de éster, carbonato o carbomatos correspondientes como agentes antienvjecimiento. Estos profármacos pueden sintetizarse por un experto en la técnica mediante el uso de métodos sintéticos convencionales conocidos en la técnica. Solo para ilustrar, los ésteres incluyen, pero no se limitan a, los derivados de la acilación del grupo (s) hidroxilo con un agente acilante conocido por un experto en la técnica, por ejemplo, anhídrido acético, cloruro

5 de acetilo, ácido acético, cloruro de propionilo, cloruro de benzoilo, cloruro de butirilo, anhídrido succínico, etc. Los carbonatos incluyen, pero no se limitan a, los derivados de la reacción del grupo (s) hidroxilo con un compuesto que tiene una estructura de fórmula X-C(O)OR, en donde X es un haluro y R puede ser cualquier grupo que tiene un carbono unido al átomo de oxígeno, por ejemplo, alquilo, arilo, arilalquilo, etc. Los carbomatos además pueden sintetizarse de manera similar.

10 Además, los profármacos de rapamicina también pueden presentarse en otras formas como se describe en la patente de los Estados Unidos núm. 4,650,803 y patente de los Estados Unidos núm. 5,151,413, o en cualquier otra literatura publicada. La mayoría de los profármacos descritos en la presente descripción se administran preferentemente por vía oral ya que la hidrólisis en muchos casos se produce principalmente bajo la influencia de las enzimas digestivas. La administración parenteral puede usarse cuando un profármaco en sí mismo está activo, o en aquellos casos en que se produce la hidrólisis en la sangre.

15 Las formulaciones de la presente invención pueden administrarse en cualquier ruta adecuada conocida en la técnica, por ejemplo, por vía oral, tópica, parenteral (que incluye subcutánea, intramuscular, intravenosa e intradérmica), y pulmonar. En algunas modalidades, las formulaciones pueden presentarse convenientemente en forma de dosis unitarias y pueden prepararse por cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de farmacia. Generalmente, las formulaciones se preparan mediante la asociación íntima y uniforme del ingrediente activo (por ejemplo, rapamicina o sus análogos) con portadores líquidos o portadores sólidos finamente divididos o ambos.

20 Las formulaciones orales que contienen los compuestos activos de esta invención pueden comprender cualquier forma oral usada convencionalmente, que incluyen tabletas, cápsulas, trociscos, formas bucales, pastillas y líquidos orales, suspensiones o soluciones, o como un polvo o gránulos, una solución o suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, una emulsión líquida de aceite en agua o una emulsión líquida de agua en aceite. Las cápsulas pueden contener mezclas del (de los) compuesto(s) activo(s) con cargas y/o diluyentes inertes. Las formulaciones de tabletas útiles pueden prepararse por compresión convencional, métodos de granulación húmedos o secos, y pueden utilizar diluyentes, agentes aglutinantes, disgregantes, lubricantes, agentes modificadores de la superficie (que incluyen surfactantes), o agentes de suspensión o estabilizantes farmacéuticamente aceptables. Las formulaciones orales pueden usar formulaciones estándar de liberación retardada o de tiempo para alterar la absorción del(de los) compuesto(s) activo(s).

30 En algunos casos, puede ser deseable administrar los compuestos en forma de un aerosol directamente a las vías respiratorias, oídos, piel o garganta.

35 La rapamicina a una dosis baja puede administrarse también por vía tópica (no reivindicada). Las formas tópicas incluyen, pero no se limitan a, cremas, ungüentos, emulsiones, geles, lociones y aerosoles. En una modalidad de las formulaciones tópicas de la invención, la formulación tópica comprende materiales inertes (tales como aceite). En una modalidad de las formulaciones tópicas de la invención, los ingredientes de la formulación tópica se proporcionan en una base de crema hidratante. Pueden proporcionarse además conservantes en las formulaciones tópicas de la invención para aumentar la vida útil de la formulación. Los expertos en la técnica sabrán cómo modificar las formulaciones tópicas de la invención mediante la adición de ingredientes activos adicionales o materiales inertes. Las formulaciones tópicas de la invención pueden usarse para prevenir el envejecimiento de la piel y para tratar etapas tempranas de trastornos tales como cánceres.

45 En algunas modalidades, las tabletas comprenden al menos un ingrediente activo y opcionalmente uno o más portadores farmacéuticamente aceptables fabricados mediante la compresión o moldeo de los respectivos agentes. En modalidades preferidas, las tabletas comprimidas se preparan mediante la compresión del ingrediente activo en una máquina adecuada en forma de flujo libre tal como un polvo o gránulos, opcionalmente mezclado con un aglutinante (*por ejemplo*, povidona, gelatina, hidroxipropilmetilcelulosa), lubricante, diluyente inerte, conservante, desintegrante (*por ejemplo*, glicolato de almidón sódico, povidona reticulada, carboximetilcelulosa sódica reticulada) agente tensoactivo o dispersante.

50 Los compuestos o composiciones de la presente invención pueden administrarse solos o en combinación con uno o más, preferentemente de uno a tres agentes terapéuticos adicionales. Por "administrado en combinación" o "terapia de combinación" se entiende que el compuesto o composición de la presente invención y uno o más, preferentemente de uno a tres, agentes terapéuticos adicionales se administran concurrentemente al mamífero que se está tratando. Cuando se administran en combinación, cada componente puede administrarse al mismo tiempo o secuencialmente en cualquier orden en diferentes momentos. Así, cada componente puede administrarse por separado, pero suficientemente a tiempo para proporcionar el efecto terapéutico deseado.

60 Los intervalos se pueden expresar en la presente como de "aproximadamente" un valor particular, y/o a "aproximadamente" otro valor particular. Cuando se expresa un intervalo de este tipo, otro aspecto incluye desde el valor particular y/o hasta el otro valor particular. Similarmente, cuando los valores se expresan como aproximaciones, mediante el uso del antecedente "aproximadamente", se entenderá que el valor particular forma otro aspecto. Se entenderá más aún que los puntos finales de cada uno de los intervalos son significativos tanto en relación con el otro punto final, e independientemente del otro punto final. Además, se entiende que hay un número de valores descritos en la presente, y que cada valor se describe además en la presente como "aproximadamente" ese valor particular además del propio valor. Por ejemplo, si se describe el valor "10", entonces "aproximadamente 10" también se describe. Además, se entiende que

los datos de toda la solicitud se proporcionan en un número de formatos diferentes y que estos datos representan puntos finales y puntos de partida e intervalos para cualquier combinación de los puntos de datos. Por ejemplo, si se describen un punto de datos particular "2%" y un punto de datos particular "4%", se entiende que mayor que, mayor que o igual a, menor que, menor que o igual a, e igual a 2% y 4% se consideran descritos, así como entre 2% y 4%. Se entiende además que cada unidad entre dos unidades particulares también está descrita. Cuando el término "aproximadamente" aparece delante de un número que denota dosis, significa que el valor puede variar al menos  $\pm 30\%$ , preferentemente dentro de  $\pm 20\%$ , y con mayor preferencia dentro de  $\pm 10\%$ ; cuando el término aparece delante de un número que denota temperatura, significa que el valor puede variar al menos  $\pm 2^\circ\text{C}$ , y con mayor preferencia dentro de  $\pm 1^\circ\text{C}$ ; cuando denota tiempo, significa que el valor puede variar al menos 15%, preferentemente 10%, y con mayor preferencia dentro de 5%.

Métodos para identificar, detectar y purificar agentes antienviejamiento

Esta invención se basa en varios descubrimientos discutidos más abajo.

A. La inhibición de las señales de nutrientes prolonga el estado de detención del ciclo celular inducido por la disfunción de los telómeros en la levadura a través de la AMPK y la ruta mitocondrial posterior.

A-1. La inhibición de las señales de nutrientes mantiene el estado de detención del ciclo celular y, así, previene la posterior muerte celular inducida por la disfunción de los telómeros.

La levadura en gemación *cdc13-1* es un modelo importante de disfunción de los telómeros basado en varias razones. Por ejemplo, primero, la disfunción de los telómeros inducida por la inactivación de *cdc13-1p* conduce a la misma ruta corriente abajo que la inactivación de la telomerasa: La detención del ciclo celular dependiente Mec1 (ATM y homólogo ATR) en G2/M se siguió por la muerte celular masiva, que se acompaña de un aumento de tamaño celular, aumento drástico de la producción de ROS, marcadores apoptóticos y más del contenido 2N de ADN en células haploides. La inhibición de los TOR por la rapamicina previene la muerte celular inducida por la inactivación de *cdc13-1p* o por la inactivación de la telomerasa. Curiosamente, la rapamicina no afecta la detención G2/M desencadenado por la inactivación de *cdc13-1p*, pero mantiene el estado de detención por G2/M y así evita la aparición de contenido  $>2\text{N}$  de ADN, un indicador de deterioro de la senescencia y muerte celular (Qi, H., y otros, PLoS ONE, 3, e3520 (2008)). En segundo lugar, la estructura y la función de los telómeros se conservan desde levadura a los humanos. En las células humanas, la disfunción de los telómeros además conduce a la detención del ciclo celular dependiente de ATM/ATR seguido de muerte celular masiva manifestada por tamaño celular aumentado, marcadores apoptóticos y poliploidía (Denchi, E.L., y otros, Nature, 448:1068-71 (2007); Shay, J.W., y otros, Carcinogenesis, 26:867-74 (2005)), similar a ese en *cdc13-1*. Así, *cdc13-1* puede usarse para estudiar la cascada corriente abajo inducida por la disfunción de los telómeros.

Esta invención describe que, similar a un tratamiento con rapamicina, la restricción de glucosa mediante la reducción de la glucosa en el medio de cultivo de levadura o mediante la adición de 200  $\mu\text{M}$  de 2-desoxiglucosa (un análogo de glucosa) al medio, y la limitación de nitrógeno además previno la muerte celular inducida por la inactivación de *cdc13-1p* según se controla mediante el ensayo de formación de colonias. Como se muestra en la Fig. 1A, la incubación de células *cdc13-1* (haploides) a la temperatura no permisiva ( $37^\circ\text{C}$ ) durante 22 horas en medio regular YEPD (peptona 1%, extracto de levadura 2% y glucosa 2%) resultó en una pérdida masiva de células viables según lo medido por el ensayo de formación de colonias. Sin embargo, la reducción de glucosa en medio YEPD (de 2% a 1%, 0,5% y 0%) y la adición de 2-deoxiglucosa 200  $\mu\text{M}$  a YEPD con glucosa 2% previnieron la muerte celular de manera efectiva: menos glucosa, más células supervivientes. Además, limitación de nitrógeno por medio de SC-N (que contiene base nitrogenada de levadura 0,67% en ausencia de aminoácidos y  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , glucosa al 2%, más una mezcla de 100 mg/L de histidina, leucina, triptófano y uracilo para esta cepa de levadura) previno la muerte celular (Fig. 1B). Además, la muerte celular de *cdc13-1* se previno mediante rapamicina de una manera dependiente de la dosis cuando las concentraciones estaban entre 0,3 a 1 nM (Fig. 1C). 0,5 y 1 nM de rapamicina que previno la muerte celular no inhibieron, pero promovieron ligeramente, el crecimiento celular de forma consistente (Fig. 1D), lo que indica una nueva función de la rapamicina en una dosis baja. La Fig. 1E muestra que la restricción de rapamicina y glucosa retarda la muerte celular de *cdc13-1*. A diferencia de la dramática pérdida celular después de 20 horas a  $37^\circ\text{C}$ , dosis bajas de rapamicina y restricción de glucosa resultaron en una pérdida lenta de células. Después de 60 horas de incubación a  $37^\circ\text{C}$ , la supervivencia celular fue al menos 100 veces más que aquellas sin tratamiento.

Los resultados demuestran, además, que la restricción de glucosa, similar al tratamiento con rapamicina, mantiene el estado detenido G2/M y previene la posterior muerte celular inducida por la inactivación de *cdc13-1p*. Como se muestra en la Fig. 2A, después de incubar células *cdc13-1* a la temperatura no permisiva ( $37^\circ\text{C}$ ) durante 2 horas, más del 95% de las células entraron en la fase G2/M del ciclo celular en restricción de glucosa (glucosa 0,5%) y rapamicina (1 nM) que contiene medio YEPD, similar a la del control. La reducción de glucosa del 2% al 0,5% en medio YEPD inhibió el aumento del contenido de ADN  $> 2\text{N}$ , sugiriendo el mantenimiento del estado detenido por el ciclo celular, igual que el tratamiento con rapamicina (1 nM). Como se muestra en la Fig. 2B, la preincubación de células *cdc13-1* a  $37^\circ\text{C}$  durante dos horas, lo que permite que más del 95% de las células entren en la fase G2/M del ciclo celular, no afectó el efecto preventivo de la restricción de glucosa y la rapamicina en la supervivencia celular. Así, la limitación de nutrientes, similar a la inhibición de TOR por la rapamicina, mantiene el estado de detención del ciclo celular (el estado senescente), y así previene el deterioro de la senescencia y la muerte celular resultante en la disfunción de los telómeros.

A-2. La restricción de glucosa, al igual que la inhibición de TOR por la rapamicina, previene la inducción de ROS e inhibe la aparición de marcadores apoptóticos en la muerte celular de *cdc13-1*.

La Fig. 3A muestra que la muerte celular de *cdc13-1* se asocia con un aumento dramático en la liberación de ROS. Similar al tratamiento con rapamicina (1 nM), la reducción de glucosa de 2% a 0,5% (Glc 0,5%), el ROS efectivamente reducido aumenta a un nivel comparable al silvestre (WT) a la misma temperatura. La Fig. 3B muestra que la muerte celular inducida por inactivación de *cdc13-1p* además se asocia con un aumento de la apoptosis monitorizada por la traslocación de la fosfatidilserina (PS) y la reducción de la glucosa (Glc 0,5%) o rapamicina (1 nM) inhibe eficazmente esta muerte apoptótica.

A-3. AMPK y la función mitocondrial juegan un papel importante en los efectos preventivos de la rapamicina y la restricción de glucosa en la muerte celular de *cdc13-1*.

Esta invención describe además el importante papel de AMPK para los efectos preventivos sobre la muerte celular de *cdc13-1*. La Fig. 4A muestra que la delección de *Sip2p*, la subunidad beta reguladora de AMPK de levadura, inhibió significativamente el efecto de prevención de la restricción de glucosa. Además, la delección de *Snf1p* y *Snf4p*, la subunidad alfa catalítica y la subunidad gamma reguladora, respectivamente, redujeron en gran medida el efecto preventivo de la rapamicina (Fig. 4B).

Esta invención describe además que las mitocondrias, cuya función puede mejorarse mediante la activación de AMPK y la biogénesis mitocondrial corriente abajo, juegan un papel importante en los efectos preventivos sobre la muerte celular de *cdc13-1*. La mutación deficiente mitocondrial se realizó en células *cdc13-1* mediante la incubación de las células en medio que contiene bromuro de etidio como se describe en un documento publicado previamente (Qi, H., J. Biol. Chem., 278:15136-15141 (2003)). La Fig. 5A muestra que la deficiencia mitocondrial anuló significativamente el efecto preventivo mediante la reducción de la glucosa y la rapamicina (a 1 nM y 5 nM). Además, se demostró la regulación positiva de la biogénesis mitocondrial por la reducción de glucosa (glucosa 0,5%) y rapamicina (1 nM) mediante la medición del aumento de la masa mitocondrial (Fig. 5B y Fig. 5C).

La Fig. 6 muestra el resumen de los resultados anteriores. Las mitocondrias desempeñan un papel importante en el mantenimiento del estado de detención del crecimiento inducido por la disfunción telomérica, y la restricción de la glucosa y la inhibición de la TOR por rapamicina estimulan la función mitocondrial a través de la activación de AMPK, evitando así el deterioro de la senescencia y la posterior muerte celular.

B. Dosis bajas de rapamicina, restricción de glucosa y un activador de AMPK, de manera similar, estimulan la función mitocondrial y prolongan la senescencia en fibroblastos humanos primarios.

Esta invención describe que CR o rapamicina además prolonga la senescencia y previene la muerte celular inducida por la disfunción de los telómeros en células humanas. Se usaron fibroblastos de pulmón embrionario humano primario WI-38. Estas células carecen de actividad de telomerasa y exhiben disfunción telomérica al alcanzar el potencial de replicación, normalmente en el pase 31 en condiciones de cultivo rutinarias. Las células en el pase 29 se trataron con 50 pM de rapamicina. El tratamiento fue en un ciclo de 10 días de 3 días con y 7 días sin rapamicina (además denominado como ciclo de 3 días de trabajo/7 días de descanso). Las células dejaron de dividirse en el pase 31 (examinadas bajo un microscopio) y exhibieron senescencia en presencia o ausencia de rapamicina midiendo la actividad del citosol  $\beta$ -galactosidasa con el uso de 5-bromo-4-cloro-3-indolil  $\beta$ -D-galactósido (X-gal) en tampón que contiene X-gal 1 mg/mL, ácido cítrico 40 mM/fosfato de sodio, pH 6,0, ferrocianuro de potasio 5 mM, ferricianuro de potasio 5 mM, NaCl 150 mM y  $MgCl_2$  2mM. Debido al aumento de la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa del citosol, las células senescentes se tiñen de un color azul (se muestra como gris oscuro en la imagen en blanco y negro). La Fig. 7 muestra que después de 56 días en la senescencia, se produjo una pérdida celular masiva en el control de DMSO. La pérdida de células fue fuertemente inhibida por 50 pM de rapamicina. La rapamicina no transformó las células ya que el marcador de senescencia todavía estaba presente y no se observó crecimiento celular. Además, la reducción de la glucosa en el medio de cultivo (de 0,4% a 0,2%) o la adición de 2-desoxiglucosa (12,5  $\mu$ M) además previno la pérdida de células senescentes (Fig. 7).

Similar a la observación en levadura, AMPK además juega un papel importante en la prevención mediada por la restricción de la rapamicina o la glucosa de la muerte de los telómeros en las células humanas. Como se muestra en la Fig. 7, el tratamiento con activador específico de AMPK 5-aminoimidazol-4-carboxamida-1-beta-D-ribofuranosida (AICAR, 250  $\mu$ M) (en un ciclo de 10 días con 2 días con y 8 días sin AICAR para evitar la toxicidad) previno la pérdida de células WI-38 senescentes. Además, la actividad de AMPK cinasa activada por rapamicina (50 pM) se monitoreó mediante inmunoelectrotransferencia, que se usó para detectar la AMPK fosforilada en Thr172 (datos no mostrados). Además, la rapamicina, glucosa reducida, 2-desoxiglucosa y AICAR aumentaron la masa mitocondrial y estimularon la función mitocondrial en humanos (Fig. 8 y Fig. 10). Dosis bajas de rapamicina aumentaron la masa mitocondrial en fibroblastos humanos (Fig. 8A), así como en células linfoblastoides L40 (datos no mostrados). La rapamicina en dosis bajas además aumentó el potencial de membrana mitocondrial y redujo las ROS en los fibroblastos y en las células L40 (Fig. 8B, Fig. 8C, y datos no mostrados).

Sorprendentemente, solo dosis bajas de rapamicina (de 10 a 100 pM) previnieron la pérdida de células WI-38 senescentes como se muestra en la Fig. 9A. Más bien, la rapamicina a una concentración superior a 500 pM promovió la pérdida

celular. Por ejemplo, la rapamicina 25 pM previno la pérdida celular (Fig. 9A), pero no inhibió el crecimiento celular (Fig. 9B). En cambio, aumentó el potencial de replicación medido por duplicación de población de 5,12 a 6,8. Además, la rapamicina en dosis bajas (50 pM y 100 pM) aumentó los niveles de las proteínas clave de la senescencia p53, p21 y pRB, pero no a una dosis alta (2000 pM) (Fig. 9C). Además, solo dosis bajas de rapamicina aumentaron la masa mitocondrial y el potencial de membrana y redujeron los niveles de ROS en células humanas, mientras que una cantidad mayor de 10 nM de rapamicina parece perder este efecto (Fig. 8). Así, la rapamicina a dosis bajas funciona de forma diferente a la de las dosis terapéuticas, estimula la función mitocondrial y previene el deterioro de la senescencia, en lugar de inhibir la traducción de proteínas y el crecimiento celular en la fase G1 del ciclo celular.

En resumen, 1) el mantenimiento del estado detenido por el ciclo celular en las células senescentes se conserva de levadura a humano; 2) CR, la restricción de glucosa o una dosis baja de rapamicina estimula la función mitocondrial a través de AMPK, prolonga la senescencia y así inhibe la posterior muerte celular; y 3) solo dosis bajas de rapamicina imitan la restricción calórica en términos de mantener el estado senescente en las células humanas.

C. Varios agentes quimiopreventivos de cáncer y antienvjecimiento estimulan la función mitocondrial e inhiben la pérdida de células senescentes en levaduras y células humanas.

Esta invención describe que dos agentes conocidos por prevenir una serie de enfermedades relacionadas con la edad, EGCG de extracto de té verde (GTE) y extracto de semilla de uva (GSE), pueden aumentar la masa mitocondrial y prolongar la senescencia.

GTE se ha informado que previene varios tipos de cáncer Patentes de los Estados Unidos núms. 7.192.612 y 7.384.655, y publicaciones de Solicitud de Patente de los Estados Unidos núms. 20040142048 y 20040047921, y Shimizu, M., y otros, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 17:3020-3025 (2008); Nakachi, K., y otros, *Jpn. J. Cancer Res.*, 89:254-261 (1998)). El galato de epigallocatequina (EGCG) es el componente más eficaz de GTE. Se ha informado que EGCG extienden la vida útil en *C. elegans* (Abbas, S. and Wink, M., *Planta. Med.*, 75:216-221 (2009)). Además, se ha informado que modula la escisión de la proteína precursora amiloide y reduce la amiloidosis cerebral en ratones transgénicos con Alzheimer (Rezai-Zadeh, K., y otros, *J. Neurosci.*, 25(38):8807-8814 (2005)), previenen daño cerebral después de oclusión transitoria de la arteria cerebral media en ratas (Choi, Y.B., y otros, *Brain Res.*, 1019:47-54 (2003)), protege los miocitos cardíacos de la apoptosis inducida por isquemia/reperusión y limita el tamaño del infarto a través de la activación del canal K mitocondrial(ATP) en corazones de rata aislados (Townsend, P.A., y otros, *FASEB J.*, 18:1621-1623 (2004); Song, D.K., y otros, *J. Korean Med. Sci.*, 25(3):380-386 (2010)). Además, se ha demostrado que previene la apoptosis en islotes aislados (Hara, Y., y otros, *J. Hepatobiliary Pancreat. Surg.*, 14:493-497 (2007)), previene la diabetes autoinmune inducida por múltiples dosis bajas de estreptozotocina en ratones (Song, E.K, y otros, *Arch. Pharm. Res.*, 26:559-563 (2003)), reduce los síntomas autoinmunes en un modelo murino de síndrome de Sjogren humano (Hsu, S.D., y otros, *Autoimmunity*, 40:138-147 (2007)), y previene la cataractogénesis inducida por selenito en un modelo de rata (Gupta, S.K., y otros, *Ophthalmic Res.*, 34:258-263 (2002)). Curiosamente, EGCG además activa AMPK (Huang, C.H., y otros, *Mol. Nutr. Food Res.*, 53(9):1156-1165 (2009)).

GSE además ha demostrado tener actividades de prevención del cáncer (publicaciones de la patente de los Estados Unidos núms. 20040047921 y 20050013880). Por ejemplo, el ácido gálico, un constituyente principal de GSE, reduce la progresión del cáncer de próstata a etapas avanzadas en el modelo de ratón TRAMP (Raina, K., y otros, *Cancer Res.*, 67:5976-5982 (2007)) y GSE además previene la carcinogénesis de la célula epitelial de mama humana precancerosa MCF10A inducida por NNK (Siriwardhana, N, y otros, *Breast Cancer Res. Treat.*, 109:427-441 (2008)). Además, se ha demostrado que la GSE reduce la presión arterial y la hipertensión sensible a la sal en modelos animales con estrógeno agotado (ver revisión de Carlson, S., y otros, *Gend. Med.*, 5 Suppl. A, S76-90 (2008)). Además, puede prevenir eficazmente el daño cutáneo inducido por UVB en un modelo de cultivo tridimensional de tejido de la epidermis humana (Tomaino, A., y otros, *Toxicol. In Vitro.*, 20:1395-1402 (2006)), prevenir la oligomerización de A $\beta$  y atenuar el deterioro cognitivo en un modelo de ratón de la enfermedad de Alzheimer (Wang, J., y otros, *J. Neurosci.*, 28:6388-6392 (2008)), prevenir la obesidad inducida por la dieta alta en grasas en ratones y hámsteres (Park, S.H., y otros, *Nutr. Res. Pract.*, 2:227-233 (2008); Décordé, K., y otros, *Mol. Nutr. Food Res.*, 53:659-666 (2009)), inhibir la acumulación de ADN dañado oxidativamente debido al envejecimiento en la médula espinal y el cerebro en un modelo de rata (Balu, M., y otros, *Brain Res. Bull.*, 68:469-473 (2006)), y mantener la integridad de la membrana de eritrocitos durante el envejecimiento (Sangeetha, P., y otros, *Exp. Gerontol.*, 40:820-828 (2005)).

Como se muestra en la Fig. 10, ambos 250  $\mu$ g/mL, GSE y 50  $\mu$ g/mL de EGCG de GTE aumentaron la masa mitocondrial en células humanas, por ejemplo, en células linfoblastoides L40. Además, previnieron la muerte de telómeros en levaduras y fibroblastos humanos primarios WI-38 (Fig. 11 y Fig. 7)

La Fig. 10 muestra que una serie de agentes quimiopreventivos del cáncer aumentan la masa mitocondrial en células linfoblastoides humanas, por ejemplo, LY294002 10  $\mu$ M (un inhibidor de PI3K), trisulfuro de dialilo 2  $\mu$ M (DATS), isotiocianato de bencilo 1  $\mu$ M (BITC), isotiocianato de fenilo 1  $\mu$ M (PITC), resveratrol 2  $\mu$ g/mL (RSV) y licopeno 0,03  $\mu$ M, fenetil isotiocianato 6,7  $\mu$ M (PEITC), isotiocianato de alilo 1  $\mu$ M, silibinina 5 mM, selenito ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ) 1,25 mM, genisteína 2,5 mM y extracto de arándano 3 mg/ml. Las Figs. 7 y 11 muestran que varios agentes quimiopreventivos contra el cáncer, que incluyen fenetil isotiocianato (PEITC), silibinina, selenito ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ), genisteína y extracto de arándano, exhibieron diversos grados de efectos protectores sobre la muerte de los telómeros en levaduras y/o en células humanas.

D. Varias enfermedades o trastornos relacionados con la edad se asocian con la disfunción de las mitocondrias y/o los telómeros, y dosis bajas de rapamicina previenen varias enfermedades o trastornos relacionados con la edad en modelos animales o modelos de cultivo de tejidos.

**Cánceres.** Casi todas las células cancerosas exhiben una función mitocondrial comprometida. Este fenómeno se denomina efecto Warburg, lo que significa que tanto como 60% de ATP se produce a través de la glucólisis en condiciones aeróbicas en las células cancerosas, mientras que en las células normales, la mayoría del ATP se genera a través de la fosforilación oxidativa mitocondrial. Se ha demostrado que la transformación oncogénica resulta en la supresión de la fosforilación oxidativa y un aumento en la glucólisis, mientras que la proteína de supresión tumoral p53 regula positivamente la respiración y suprime la glucólisis. Sin embargo, no está claro si la función mitocondrial comprometida es la causa o el resultado de cánceres.

Se conoce que la disfunción de los telómeros depende de la edad debido al acortamiento progresivo de los telómeros, y el mantenimiento de la senescencia inducida por la disfunción de los telómeros es un mecanismo clave para prevenir el desarrollo del cáncer relacionado con la edad. Como la senescencia inducida por la activación del oncogén y los mutágenos es además a través de la respuesta al daño del ADN, igual que la disfunción de los telómeros, el mantenimiento de la senescencia puede ser un mecanismo intrínseco para prevenir diversos cánceres.

Esta invención describe que la función mitocondrial juega un papel clave en el mantenimiento de la senescencia. Así, la función mitocondrial es importante en la prevención del cáncer mediante el mantenimiento de la senescencia y la función mitocondrial comprometida es una primera etapa para promover el deterioro de la senescencia y el desarrollo del cáncer. Por lo tanto, el modelo de disfunción telomérica puede utilizarse para identificar candidatos para estimular la función mitocondrial, prolongar la senescencia y prevenir el cáncer. De hecho, se ha demostrado que una serie de agentes conocidos de quimioprevención del cáncer prolongan la senescencia y aumentan la masa mitocondrial (Figs. 7, 10 y 11). Además, la baja dosis de rapamicina y AICAR, que prolonga la senescencia como se muestra en la Fig. 7, invirtió la disminución de la masa mitocondrial y evitó la tumorigénesis inducida por mutágeno TPA (12-O-tetradecanoilforbol 13-acetato) (Fig. 12 y Fig. 13) en células NIH3T3 (ver Ejemplo 15).

**Enfermedades neurodegenerativas.** A pesar de los extensos estudios, los mecanismos de las enfermedades neuronales degenerativas no están claros. La disfunción mitocondrial puede desempeñar un papel en las enfermedades, ya que Pakin (relacionado con la enfermedad de Parkinson), Huntintin (relacionado con la enfermedad de Huntington y amiloide- $\beta$  (causa placas seniles en la enfermedad de Alzheimer) se involucran en la función mitocondrial. Estudios recientes además sugieren que la autofagia (degradación de proteínas) desempeña un papel en estas enfermedades.

Esta invención describe que las bajas dosis de rapamicina, pero no dosis más altas de rapamicina, reducen los niveles de ROS, aumentan la vida útil de las células de neuronas cerebrales de gránulos de rata (CGN) en cultivo (Fig. 14A y Fig. 14B) y previenen daño cerebral debido a infarto de cerebelo en un modelo de apoplejía de rata (Fig. 15A y Fig. 15B) (ver Ejemplos 16-18). La rapamicina en dosis bajas además reduce los niveles de ROS inducida por 200  $\mu$ M MPP<sup>+</sup>, la toxina dopaneurica usada para inducir el Parkinson en modelos marinos (Fig. 16). Además, EGCG, que se ha informado que previene o trata las enfermedades neuronales degenerativas, además puede prolongar la senescencia (Fig. 7 y Fig. 11). Así, las bajas dosis de rapamicina y EGCG pueden prolongar la vida útil de las células postmitóticas y senescentes, lo que sugiere que el mantenimiento de las células neuronales postmitóticas G0 comparten mecanismos similares a los de las células senescentes en fase G0. Por lo tanto, en un aspecto, la presente invención se basa en el descubrimiento de que el modelo senescente puede usarse para identificar y detectar fármacos candidatos que previenen enfermedades o trastornos neuronales degenerativos, que incluyen, entre otros, apoplejía, enfermedades de Parkinson, Alzheimer y Huntington.

**Insuficiencia cardíaca, aterosclerosis e infarto de miocardio.** Se ha demostrado que la disfunción de los telómeros juega un papel importante en la insuficiencia cardíaca crónica. Se ha demostrado que en los cardiomiocitos cultivados, la interferencia con la función de TRF2 desencadenó el desgaste de los telómeros y la apoptosis. Por el contrario, TRF2 exógeno confirió protección contra el estrés oxidativo, lo que indica que la muerte celular puede ocurrir a través de la disfunción de los telómeros incluso en células postmitóticas que no se reciclan (Oh, H., y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100:5378-5383 (2003)). *In vivo*, los ratones deficientes en TERC de 5ta generación envejecidos (G5TERC-KO) (un modelo de telomerasa mutante debido a la deficiencia en ARN de telomerasa codificado por el gen TERC) exhibieron telómeros significativamente más cortos en cardiomiocitos, dilatación ventricular, adelgazamiento del miocardio, insuficiencia cardíaca disfunción y muerte súbita. Las secciones del corazón de los ratones G5TERC-KO revelaron una expresión aumentada de la proteína de respuesta al daño del ADN p53 y apoptosis aumentada, así como una reducción del 50% en el número de miocitos del ventrículo izquierdo en comparación con ratones (Leri, A., y otros, EMBO J., 22:131-139 (2003)).

La aterosclerosis se denomina comúnmente como un endurecimiento u oclusión de las arterias. Se causa la formación de placas múltiples dentro de las arterias. La disfunción de las células endoteliales vasculares (EC) desencadenada por estímulos aterogénicos es de importancia central en la patogénesis de la aterosclerosis. Se ha observado desgaste telomérico acelerado y senescencia prematura en lesiones ateroscleróticas humanas (Ogami, M., y otros, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 24:546-550 (2004); Minamino, T., y otros, Circulation, 105:1541-1544 (2002)), lo que sugiere que la

disfunción o la pérdida de CE debido al desgaste de los telómeros dependiente de la edad puede ser una etapa temprana de la formación de placa.

La aterosclerosis coronaria conduce al bloqueo de la circulación coronaria que causa el infarto del miocardio (MI, comúnmente conocido como ataque al corazón). El MI conduce a la pérdida de los cardiomiocitos postmitóticos, la remodelación desadaptativa, la disfunción contráctil cardíaca y, finalmente, la insuficiencia cardíaca congestiva.

Esta invención describe que la baja dosis de rapamicina a 10 µg/kg, pero no a 100 µg/kg, redujo significativamente el infarto isquémico del miocardio en un modelo de rata (Fig. 17 y Ejemplo 19). Además, se ha informado que el activador de AMPK metformina además puede reducir el infarto de miocardio en modelos marinos y proteger las células de miocardio de la muerte celular mediada por mitocondrias (Calvert, J.W., Diabetes, 57:696-705 (2008)). Estos resultados demuestran la importancia de la ruta TOR/AMPK/mitocondrias en el mantenimiento de las células del miocardio postmitótico, similar al de las células senescentes. Así, el modelo de senescencia inducido por la disfunción de los telómeros puede usarse para seleccionar fármacos candidatos para la prevención o el tratamiento del infarto de miocardio.

*Degeneración macular relacionada con la edad.* La degeneración macular relacionada con la edad (AMD) es una causa importante de ceguera en los ancianos (> 50 años). Se inicia a partir de la degeneración de las células del epitelio pigmentario de la retina (RPE) y produce una pérdida de visión en el centro del campo visual (la mácula). Se ha informado que el desgaste de los telómeros, la pérdida de la función mitocondrial y la pérdida celular se asocian con esta enfermedad (Matsunaga, H., Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 40:197-202 (1999); Liang, F.Q., y otros, Exp. Eye Res., 76:397-403 (2003)). Así, la mejora de la función mitocondrial para prevenir la pérdida celular inducida por el desgaste de los telómeros puede prevenir o estabilizar las primeras etapas de la enfermedad. Curiosamente, se ha patentado una dosis baja de rapamicina a 50 pM para tratar esta enfermedad (patente de los Estados Unidos núm. 7.083.802). Así, el modelo de senescencia inducido por la disfunción de los telómeros puede usarse para seleccionar fármacos candidatos para prevenir o tratar la AMD.

*Osteoartritis.* La osteoartritis (OA), una pérdida progresiva de cartílago articular, es la enfermedad articular crónica más común en la población de personas mayores, que causa dolor y discapacidad significativos. La función de los condrocitos es esencial para el mantenimiento de una matriz de cartílago adecuada. Se ha demostrado que la disfunción de los telómeros, las mutaciones mitocondriales y la muerte celular apoptótica en los condrocitos se asocian con OA (Martin, J.A., y otros, J. Bone Joint Surg. Am., 85-A Suppl. 2:106-110 (2003); Ruiz-Romero, C., y otros, Mol. Cell Proteomics., 8:172-189 (2009); Dave, M., y otros, Arthritis Rheum., 58:2786-2797 (2008)), sugiriendo que la pérdida de células inducida por la disfunción de los telómeros en los condrocitos es un mecanismo subyacente para el inicio de la enfermedad. Así, mejorar la función mitocondrial para prevenir la pérdida celular inducida por la disfunción de los telómeros puede prevenir o estabilizar las primeras etapas de la enfermedad. Así, el modelo de senescencia inducido por la disfunción de los telómeros puede usarse para seleccionar fármacos candidatos para prevenir o tratar la OA.

*Fibrosis pulmonar idiopática.* La fibrosis pulmonar idiopática (IPF) es una enfermedad pulmonar intersticial crónica progresiva, caracterizada por una deposición anormal y excesiva de tejido fibrótico en el intersticio pulmonar. Normalmente se produce en pacientes mayores de 50 años. Recientemente, se ha demostrado que las mutaciones en la telomerasa pueden conducir a fibrosis pulmonar de aparición en adultos (Tsakiri, K.D., y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 104:7552-7557 (2007)) y los telómeros cortos se asocian con IPF (Alder, J.K., y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 105:13051-13056 (2008); Armanios, M.Y., y otros, N. Engl. J. Med., 356:1317-1326 (2007)). La implicación de mitocondrias y apoptosis en células epiteliales de pulmón además se ha demostrado en IPF (Kuwano, P., Intern. Med., 47:345-353 (2008)). Estos resultados sugieren que la pérdida de células epiteliales pulmonares inducida por la disfunción de los telómeros puede ser un desencadenante inicial de la FPI relacionada con la edad. Así, la mejora de la función mitocondrial para prevenir la pérdida celular inducida por el desgaste de los telómeros en las células epiteliales del pulmón puede prevenir o estabilizar las primeras etapas de la enfermedad. Así, el modelo de senescencia inducido por la disfunción de los telómeros puede usarse para seleccionar fármacos candidatos para prevenir o tratar la AMD.

*Envejecimiento de la piel.* El envejecimiento de los fibroblastos juega un papel importante en los signos del envejecimiento de la piel tal como las arrugas. El acortamiento progresivo de los telómeros y la acumulación de daños en el ADN por ROS o UV provocan el envejecimiento de los fibroblastos, que incluyen la senescencia de los fibroblastos y la posterior pérdida de células. El envejecimiento del fibroblasto resulta después en pérdida funcional, que incluye la pérdida del potencial proliferativa (Mine, S., y otros, PLoS ONE, 3(12):e4066 (2008); Hayflick, L., J. Invest. Dermatol., 73:8-14 (1979)), cambios en la morfología y el metabolismo celular, disminución en la producción de proteínas de matriz extracelular tales como colágenos de tipo I y III (Varani, J., y otros, Am. J. Pathol., 168:1861-1868 (2006)), y la sobreexpresión de proteasas implicadas en la degradación de la matriz extracelular (West, M.D., y otros, Exp. Cell Res., 184:138-147 (1989)). Estos cambios *in vitro* pueden todos participar más o menos en los cambios de la piel *in vivo* relacionados con la edad. El mantenimiento de la población funcional mitocondrial no solo baja el acortamiento de los telómeros (Fig. 9B), sino que además previene la pérdida de los fibroblastos senescentes que aún son funcionales (Fig. 7 y Fig. 9A). y, consecuentemente, retrasa el envejecimiento de la piel y previene el cáncer de piel.

*Artritis reumatoide (RA).* Los telómeros disfuncionales y las mutaciones mitocondriales son un factor patógeno potencial en la RA. Se ha demostrado que las células precursoras hematopoyéticas (HPC) y las células madre mesenquimales de médula ósea (MSC) de pacientes con RA presentan un acortamiento prematuro de los telómeros y un potencial de

replicación reducido (Colmegna, I., y otros, *Arthritis Rheum.*, 58:990-1000 (2008); Kastrinaki, M.C., y otros, *Ann. Rheum. Dis.*, 67:741-749 (2008)). Además, se ha demostrado que los alelos HLA-DRB1\*04, los principales genes susceptibles a esta enfermedad regulan el proceso de acortamiento de los telómeros (Schönland, S.O., y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100:13471-13476 (2003)). Varios estudios además han demostrado que algunos cambios característicos en la composición y estructura de la membrana sinovial inflamada en la RA se relacionan con una respuesta apoptótica alterada de las células sinoviales (Korb, A., y otros, *Apoptosis*, 14:447-454 (2009)). Además, las mutaciones de ADNmt de sinoviocito de RA aumentan mucho en comparación con los controles (Da Sylva, T.R., y otros, *Arthritis Res. Ther.*, 7:R844-851 (2005)). Así, los fármacos candidatos que mejoran la función mitocondrial y previenen la muerte celular inducida por el acortamiento de los telómeros pueden desarrollarse para tratar esta enfermedad.

*Diabetes Mellitus.* La diabetes mellitus se refiere a un grupo de enfermedades que conducen a niveles altos de glucosa en sangre debido a una producción disminuida de insulina (en el *tipo 1*) o resistencia a sus efectos (en el *tipo 2* y *gestacional*). La pérdida prematura de la función de las células  $\beta$  debido a la disfunción de los telómeros o la disfunción mitocondrial puede ser una etapa inicial en la diabetes y la diabetes mellitus. Está bien aceptado que los defectos del ADNmt son un factor común en la etiología de la diabetes y la reordenación del ADN mitocondrial (Ballinger, S.W., y otros, *Nat. Genet.*, 7:458-459 (2004); Ballinger, S.W. y otros, *Nat. Genet.*, 1:11-15 (1992)) y las mutaciones de ARNt (van den Ouweland, J.M., y otros, *Diabetes*, 43:746-751 (1994)) se relacionan con la diabetes. Además, la inactivación del factor de transcripción mitocondrial TEAM, una de las proteínas clave en la biogénesis mitocondrial, en las células  $\beta$  pancreáticas en ratones, conduce a una disminución progresiva de la masa de células  $\beta$  por apoptosis, lo que resulta en una reducción severa de la insulina sérica y aumento de la glucosa en sangre tanto en estados de ayuno como de no ayuno (Koster, J.C., y otros, *Cell*, 100:645-654 (2000); Wallace, D.C., *Am. J. Med. Genet.*, 106:71-93 (2001)). Además, se ha demostrado que las células  $\beta$  en islotes pancreáticos humanos sufren desgaste de telómeros y senescencia inducida por telómeros *in vitro* (Halvorsen, T.L., *J. Endocrinol.*, 166:103-109 (2000)). Por lo tanto, los fármacos candidatos que mejoran la función mitocondrial y previenen la pérdida celular inducida por el desgaste de los telómeros pueden prevenir la enfermedad.

Las enfermedades relacionadas con las edades mencionadas anteriormente son algunos ejemplos que se asocian con el deterioro mitocondrial y/o la disfunción de los telómeros. Existen muchas otras enfermedades que entrarían en esta categoría, que incluyen, pero no se limitan a, obesidad, osteoporosis, hipertensión, sarcopenia, cataratas, esclerosis múltiple, síndrome de Sjogren, pérdida de audición relacionada con la edad, encanecimiento, desregulación inmune relacionada con la edad, y trastornos causados por la disminución de la testosterona, el estrógeno, la hormona de crecimiento, el IGF-I o la producción de energía. Así, la presente invención además abarca cualquier enfermedad o trastorno relacionado con la edad descubierto en el futuro.

En resumen, esta invención describe que las mitocondrias juegan un papel vital en el mantenimiento del estado de detención del crecimiento en células senescentes y postmitóticas tales como neuronas y cardiomiocitos y se asocian con una serie de enfermedades relacionadas con la edad. Además, la disfunción mitocondrial y la disfunción de los telómeros además se han relacionado con enfermedades relacionadas con la edad. Estos principios son la base para usar las células senescentes para buscar fármacos candidatos contra la enfermedad relacionada con la edad.

La Fig. 18 resume el mecanismo de las enfermedades relacionadas con la edad e ilustra cómo la inhibición de la vía de nutrientes/TOR previene las enfermedades relacionadas con la edad. En resumen, las mitocondrias juegan un papel vital en las enfermedades relacionadas con la edad en diversas células y tejidos. En las células postmitóticas, tales como las células neuronales, las células musculares y los cardiomiocitos, las mitocondrias sirven para mantener el estado postmitótico, así, previenen que las células vuelvan a entrar en el ciclo celular y la posterior muerte celular. En los tejidos proliferativos, la mejora de la función mitocondrial puede resultar en una reducción del estrés oxidativo y aumentar su potencial de replicación. Al entrar en la senescencia, las mitocondrias además mantienen el estado senescente y evitan la posterior pérdida de células, como en las células postmitóticas. La pérdida de células podría desencadenar la reparación de cascadas, tales como la respuesta inflamatoria en la RA y la fibrosis en la enfermedad de IPF. La pérdida de células además podría conducir a la pérdida funcional de los tejidos y las enfermedades degenerativas, tales como la insuficiencia de la médula ósea, la degeneración de las neuronas y la insuficiencia cardíaca. En otra situación, el deterioro de la senescencia podría conducir a la tumorigénesis y la progresión del cáncer. La restricción calórica, que incluye la restricción de glucosa, y las dosis bajas de rapamicina estimulan la función mitocondrial y previenen diversas enfermedades o trastornos relacionados con la edad.

En resumen, esta invención ha descrito, *entre otros*: (i) que el estado senescente se mantiene por la función mitocondrial; (ii) el mantenimiento del estado postmitótico es similar al de la senescencia; (iii) CR a través de la función mitocondrial mantiene las células senescentes y postmitóticas, y así los modelos de senescencia pueden usarse para identificar candidatos que estimulan la función mitocondrial y prevenir diversos trastornos relacionados con la edad; (iv) una serie de agentes de quimioprevención contra el cáncer, inhibidores de la ingesta de glucosa y activadores de AMPK pueden prolongar la senescencia y, así, pueden desarrollarse como fármacos candidatos para enfermedades relacionadas con la edad; y (v) una dosis baja de rapamicina, como imitación de CR, puede mantener células senescentes y postmitóticas y prevenir el cáncer, daño cerebral en accidentes cerebrovasculares, infarto de miocardio isquémico y otras enfermedades o fenotipos relacionados con la edad.

Muy recientemente, después de las solicitudes provisionales a las que esta solicitud reivindica prioridad, se presentaron varios investigadores que informaron que las dosis terapéuticas de rapamicina además pueden tener algún efecto sobre

el envejecimiento y las enfermedades relacionadas con la edad a través de la inhibición de la traducción de proteínas y la estimulación de la degradación (autofagia). Por ejemplo, se informa que una dosis terapéutica de rapamicina (7,5 mg/kg) es efectiva para la enfermedad de Parkinson en un modelo de ratones mediante la inhibición de la traducción de proteínas particularmente en RTP801/REDD1/Ddit4, una proteína inducida en las neuronas afectadas de pacientes con Parkinson y causa muerte neuronal (Malagelada, C., y otros, *J. Neurosci.*, 30(3):1166-1175 (2010)). Otro informe demostró que una dosis terapéutica de rapamicina (2,24 mg/kg) rescata los déficits cognitivos y mejora la patología A $\beta$  y tau en un modelo de ratón de enfermedad de Alzheimer mediante el aumento de la autofagia (Caccamo, A., y otros, *J. Biol. Chem.*, Feb. 23, 2010). Además, se demostró un efecto modesto en la extensión de la esperanza de vida (~10%) en el ratón y la mosca de la fruta que fue inducido por rapamicina en la dosis terapéutica (Harrison, D.E., y otros, *Nature*, 460(7253):392-395 (2009)), en comparación con el efecto sobre la vida extendida por CR (~30-40%). Curiosamente, una extensión de la vida de ese tipo por la rapamicina en la mosca de la fruta no es a través de la ruta AMPK/mitocondrial, sino a través de la inhibición de la traducción de proteínas y/o estimulación autofagia (Bejdov. I., y otros, *Cell Metab.*, 11(1):35-46 (2010)).

Estos resultados sugieren que las dosis terapéuticas de rapamicina podrían tener un efecto moderado sobre algunas enfermedades relacionadas con la edad y la extensión de la vida a través de la traducción de proteínas/inhibición del crecimiento y la estimulación de la autofagia. Sin embargo, debido a diversos efectos adversos, las dosis terapéuticas de rapamicina no son adecuadas para el uso a largo plazo para prevenir enfermedades o trastornos relacionados con la edad. Por otro lado, dosis bajas de rapamicina, como una imitación de CR (de hecho, mejor que CR debido a su mínimo efecto adverso) como se describe en la presente, pueden usarse para prevenir el envejecimiento y las enfermedades relacionadas con la edad a través de la ruta AMPK/mitocondrial, que tiene varias ventajas aparentes sobre el uso de dosis terapéuticas de rapamicina discutidas anteriormente, por ejemplo, mayor eficacia y menores efectos adversos.

## EJEMPLOS

A. El uso del modelo de disfunción de telómeros para el tamizaje de alto rendimiento para identificar y detectar candidatos antienvjecimiento para prevenir o tratar enfermedades o trastornos relacionados con la edad.

En un aspecto de la presente invención, el modelo de disfunción de telómero de levadura *cdc13-1* se usa para el tamizaje de alto rendimiento para el descubrimiento de agentes antienvjecimiento útiles para la prevención o el tratamiento de enfermedades o trastornos relacionados con la edad. El modelo *cdc13-1* se ha estudiado bien y la detención del ciclo celular se produce en la fase G2/M inmediatamente después de la inactivación de *cdc13-1p*, seguida de la muerte celular. Al usar este modelo, la presente invención proporciona una forma rápida de identificar candidatos que pueden prevenir la muerte celular inducida por la disfunción de los telómeros. Otros modelos asociados con la disfunción de los telómeros que exhiben este tipo de detención rápida del crecimiento y posterior muerte celular además pueden usarse, por ejemplo, mutantes sensibles a la temperatura *stn1-1*, *cdc17-1* y *cdc17-2* en *Stn1p* (tapando los telómeros en la levadura) y *Cde17p* (la subunidad catalítica de levadura del complejo de ADN-polimerasa alfa-primasa), respectivamente. Además, pueden usarse células de levadura que exhiben disfunción telomérica y apoptosis, que incluyen, pero no se limitan a, mutaciones en mutantes *Est1p*, *Est2p*, *Est3p*, *Hdf1p*, *Hdf2p*, o *cdc13-2*. Los fibroblastos humanos WI38 humanos pueden usarse como el modelo de disfunción telomérica humana para confirmar o detectar candidatos a fármacos. Los siguientes (Ejemplos 1-6) usan el modelo *cdc13-1*.

Ejemplo 1:

Identificación de agentes que previenen la muerte celular en el modelo *cdc13-1* con el uso de ensayos de supervivencia de las células (como se muestra en la Fig. 19)

Para el tamizaje de alto rendimiento de compuestos o composiciones que mejoran la función mitocondrial, prolongan el estado de detención del ciclo celular y previenen la muerte celular en el modelo *cdc13-1*, las células *cdc13-1* se activan primero a partir de -80 °C estriéndolas en un nuevo YEPD o placa con medio completo de levadura (YC) y después incubándolas a la temperatura permisiva (aproximadamente 24 °C) durante 3 a 5 días hasta que se forman las colonias individuales. Se recogen unas pocas colonias de levadura y se cultivan durante toda la noche en el mismo medio líquido a una temperatura permisiva de 24 °C. Los cultivos de toda la noche se diluyen en medio fresco de 1:2 a 1:20 (optimizado a aproximadamente 1:10 para la cepa *cdc13-1*).

Se transfieren las células de levadura a placas de 96 pocillos o a cualquier formato adecuado de placas. Compuestos o composiciones prospectivos, por ejemplo, fármacos diluidos en serie, compuestos, bibliotecas de péptidos u otras bibliotecas mediante H<sub>2</sub>O, DMSO (dimetilsulfóxido) u otros disolventes orgánicos, se añaden a las células con un volumen inferior al 5% del volumen total de la mezcla de células. En las mezclas, el disolvente correspondiente se incluye como control negativo, y se incluye una solución de rapamicina 1 nM en el mismo disolvente como control positivo. Después se incuban las células de levadura a una temperatura no permisiva (aproximadamente 37 °C) durante dos días, o hasta que no se detectan células supervivientes en el control negativo.

Se transfiere un pequeño volumen de células (por ejemplo, 5  $\mu$ l) a placas YEPD agar preparadas en otra placa de 96 pocillos o cualquier otro formato (las células además pueden diluirse primero antes de transferirlas). Las placas se incuban a una temperatura permisiva (aproximadamente 24 °C) durante al menos 3 días o hasta que las colonias se forman en control positivo. Los productos químicos que promueven la formación de colonias se considerarán como candidatos

principales. Alternativamente, unos pocos microlitros ( $\mu\text{l}$ ) de células se transfieren al medio líquido YEPD en otra placa de 96 pocillos o en cualquier formato adecuado de placas. Las placas se incuban a una temperatura permisiva (aproximadamente  $24\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), y  $\text{OD}_{595}$  (densidad óptica a 595 nm) se lee periódicamente, *por ejemplo*, una vez al día. Los productos químicos que aumentan la densidad celular más que el control negativo se consideran candidatos principales. Este método se ilustra en la Fig. 19.

Los candidatos principales se confirman mediante un ensayo apoptótico y un ensayo ROS como se describe en los Ejemplos 2 y 3, respectivamente. Los candidatos primarios pueden analizarse además para ver si inhiben el crecimiento celular en G1 al controlar la curva de crecimiento a una temperatura permisiva como en la Fig. 1D y midiendo la distribución del contenido de ADN con el uso del análisis FACS como en la Fig. 2A. Para eliminar la posibilidad de que el candidato genere una célula mutante y, así, forme colonias a la temperatura no permisiva, las células *cdc13-1* pueden incubarse con el candidato a aproximadamente  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  para la formación de colonias. En un aspecto importante, se examinará a los candidatos para determinar si pueden mejorar la función mitocondrial e inhibir la pérdida celular en células de mamífero senescentes tales como fibroblastos WI38. Se investigará más a fondo si son efectivos para prevenir una enfermedad específica relacionada con la edad en modelos específicos de enfermedades. Por ejemplo, pueden probarse para inhibir la tumorigénesis y/o disminuir los tamaños de infarto cerebral en modelos animales.

Otros tipos de placas adecuadas para el tamizaje de alto rendimiento incluyen, pero no se limitan a, placas de 384 pocillos. Además, este método puede adaptarse a otros tipos de placas para detectar y confirmar los candidatos, tales como placas de 6 pocillos, 12 pocillos y etc.

#### Ejemplo 2:

Identificación de agentes que previenen la muerte celular de *cdc13-1* con el uso de un ensayo apoptótico

La muerte celular en *cdc13-1* exhibe marcadores apoptóticos. Esta característica puede emplearse para el tamizaje de alto rendimiento ya que lleva menos tiempo que el ensayo de supervivencia celular mencionado en el Ejemplo 1. Además, puede usarse para confirmar los positivos identificados del tamizaje de alto rendimiento en el Ejemplo 1. Además, este ensayo también puede usarse para tamizar los agentes que inhiben la apoptosis.

Después de incubar a una temperatura no permisiva (aproximadamente  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) durante un día (aproximadamente 18-24 horas), las células *cdc13-1* con compuestos se tiñen con z-VAD-FMK conjugado con FITC (un sustrato suicida que solo se une a la caspasa activada), u otros agentes detectores de apoptosis adecuados, durante 20 minutos en la oscuridad. Las células pueden lavarse una vez con solución salina tamponada con fosfato (PBS). Las placas se leen mediante un lector de microplacas fluorescente. El control negativo (células en ausencia de los compuestos o composiciones tamizadas) tendría una alta señal de FITC debido a la muerte celular. Los compuestos o composiciones que reducen las señales de FITC se consideran positivos o candidatos primarios. Se confirman mediante ensayo con las células supervivientes como en el Ejemplo 1, y se prueban adicionalmente para determinar su capacidad para reducir ROS y mejorar la función mitocondrial. Estas actividades además se probarán en modelos de disfunción de los telómeros humanos, tales como las células senescentes WI-38. Su actividad en la prevención del cáncer y otras enfermedades o trastornos relacionados con la edad se prueba adicionalmente en modelos adecuados.

El ensayo de unión de anexina V para medir la traslocación de la fosfatidilserina se ha descrito en la Fig. 313 como un marcador apoptótico. Además, puede usarse para el tamizaje de alto rendimiento.

#### Ejemplo 3

Identificación de agentes que previenen la muerte celular de *cdc13-1* mediante medición de ROS (como se muestra en la Fig. 20)

La muerte celular en *cdc13-1* exhibe niveles de ROS dramáticamente elevados. Esta característica puede usarse para buscar moléculas que inhiban la muerte de *cdc13-1*. El ensayo de ROS tarda menos tiempo que el ensayo de supervivencia celular descrito en el Ejemplo 1, y puede usarse en el tamizaje de alto rendimiento, así como en la confirmación de los candidatos primarios identificados a partir de tamizaje de alto rendimiento de los Ejemplos 1 y 2. Además, este ensayo también puede usarse para tamizar antioxidantes.

La Fig. 20 ilustra el procedimiento. Después de incubar a una temperatura no permisiva ( $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) durante un día, las células tratadas se tiñen con deshidrorodamina 123 (u otros agentes de detección de ROS adecuados) durante aproximadamente una hora en la oscuridad. Las placas se leen mediante un lector de microplacas fluorescente. El control negativo (*es decir*, células en ausencia de los compuestos o composiciones tamizadas) debería tener altos niveles de ROS liberados durante la muerte celular. Los compuestos o composiciones que reducen las ROS se consideran candidatos primarios, que se prueban adicionalmente para la prevención de la muerte celular y la mejora de la función mitocondrial en modelos de levadura y humanos. Su actividad en la prevención del cáncer, la degeneración de las neuronas y otras enfermedades o trastornos relacionados con la edad se prueba después en modelos adecuados.

#### Ejemplo 4

Identificación de agentes que previenen el deterioro de las células senescentes en los modelos de disfunción telomérica al medir la masa mitocondrial

5 La muerte celular en *cdc13-1* se acompaña con un aumento dramático en la masa mitocondrial ("masa mito"). Esta característica puede usarse para buscar moléculas que inhiban la muerte celular de *cdc13-1*. El ensayo de la masa mitocondrial lleva menos tiempo que el ensayo de supervivencia celular descrito en el Ejemplo 1, y puede usarse en el tamizaje de alto rendimiento, así como en la confirmación de los positivos del tamizaje de alto rendimiento descrito en los Ejemplos 1, 2 y 3.

10

Después de incubar a una temperatura no permisiva (aproximadamente 37 °C) durante un día, las células *cdc13-1* tratadas se tiñen con MitoTracker Green (o cualquier agente de tinción de la masa mitocondrial adecuado) durante 20 minutos en la oscuridad. Las placas se leen mediante un lector de microplacas fluorescente. Dado que las células muertas contienen mitocondrias más deterioradas que han perdido el potencial de membrana, mostrarían un aumento dramático en la tinción de la masa mitocondrial. Los compuestos o composiciones que mejoran la función mitocondrial y previenen la muerte celular podrían reducir el deterioro mitocondrial, disminuir las señales de la masa mitocondrial y, así, se consideran positivos. Los positivos se probarán además por su capacidad de prolongar la senescencia en levaduras y modelos humanos.

15

20 Ejemplo 5

Identificación de moléculas biológicas de bibliotecas de ADN y ácido nucleico que previenen la muerte de células senescentes.

25

Un método de transfección Li-PEG se describe como un ejemplo. Sin embargo, además pueden usarse otros métodos de transfección. Las células de levadura nuevas (*cdc13-1*) en fase logarítmica se lavan con H<sub>2</sub>O destilada extensivamente. Las células se incuban después con un tampón de transfección (tris 2 mM, pH 7,5, LiAC 100 mM, MgAC<sub>2</sub> 0,5 mM, CaAC<sub>2</sub> 0,1 mM, glicerol 15%, PEG-4000 40%, ADN mc 24µg/mL) y una biblioteca de ADN a 24 °C durante 1-4 horas. Las mezclas se someten a un choque térmico a aproximadamente 42 °C durante 15 minutos. Después se añaden tres volúmenes de medio YEPD rico a la mezcla y se incuban durante una hora a temperatura ambiente (aproximadamente 24 °C). Después de la centrifugación para eliminar el líquido, las células se resuspenden en H<sub>2</sub>O destilada y se siembran en placas de medio de selección para la biblioteca particular. Después de la incubación a la temperatura permisiva de 24 °C durante al menos 4 días, los transformantes se cosechan y se cultivan en un medio de selección líquido a una temperatura permisiva (aproximadamente 24 °C). Las células en fase logarítmica se cambian a una temperatura no permisiva (aproximadamente 37 °C) y se incuban durante 2 días para permitir la muerte celular inducida por inactivación de *cdc13-1p*. Las células se diluyen después adecuadamente, se siembran en placas en el medio YEPD y se incuban a aproximadamente 24 °C durante más de 4 días, o hasta que las células supervivientes formen colonias. Las colonias se recogen y el ADN se aísla individualmente de cada colonia, se amplifica mediante PCR (reacción en cadena de la ADN polimerasa) y se secuencian para identificar la secuencia de ADN. El ADN que puede prevenir la muerte celular inducida por la inactivación de *cdc13-1p* se confirma después mediante la introducción de nuevo del ADN purificado en células *cdc13-1*. Los positivos se prueban después para la prevención del deterioro de los fibroblastos humanos senescentes y la regulación de la función mitocondrial y el estrés oxidativo.

30

35

40

Ejemplo 6:

45

Identificación de proteínas que pueden promover la muerte celular a partir de disrupción o bibliotecas de delección de genes

50

Para seleccionar o identificar proteínas cuya función es promover la muerte celular inducida por la disfunción de los telómeros, las bibliotecas de interrupción de genes, *por ejemplo*, las bibliotecas de inserción de transposones de levadura pueden introducirse en la cepa *cdc13-1*. Alternativamente, *cdc13-1* puede introducirse en bibliotecas de cepas de levadura con delección, en las que cada cepa tiene una delección de gen específica. Se considera que es un candidato una proteína cuya delección o interrupción puede prevenir la muerte celular inducida por inactivación de *cdc13-1p*.

55

Ejemplo 7

Identificación de agentes que estimulan la biogénesis mitocondrial en células de mamíferos

60

Este experimento puede realizarse en células humanas directamente. Las líneas celulares se eligen de acuerdo con una enfermedad o trastorno particular estudiado relacionado con la edad. Las células en placas de 96 pocillos se tratan durante aproximadamente un día y se fijan con etanol (aproximadamente 60%) para eliminar el efecto del potencial de membrana mitocondrial y se tiñen con un colorante MitoTracker (Invitrogen). Las señales fluorescentes se leen en un lector de placas fluorescentes. Se considera como positivo un aumento de más del 20% en la señal fluorescente de las mitocondrias en comparación con las células sin tratamiento, los cuales se evalúan además por sus efectos sobre la prevención de la pérdida celular inducida por la disfunción del telómero en modelos *cdc13-1* y WI-38, y después sobre el potencial de membrana mitocondrial y niveles de ROS.

65

Un método alternativo para tamizar los candidatos que estimulan la biogénesis mitocondrial es usar la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativa con transcripción inversa (donada frecuentemente como qRT-PCR) para probar si los ARNm de los factores de transcripción de la biogénesis mitocondrial se regulan positivamente. Los factores de transcripción para la biogénesis mitocondrial comprenden TFAM, NRF-1, NRF-2, PGC-1 $\alpha$ , PGC- $\beta$ , TFB1M, TFB2M, ERRs (ERR $\alpha$ , ERR $\beta$ , ERR $\gamma$ ), PRC, POLRMT, PPAPs (PPAP $\alpha$ , PPAP $\gamma$ , PPAP $\delta$ ), y RIP140. Aquí se usa TFAM como un ejemplo y preferentemente se usan células humanas primarias. Las células WI-38 sembradas en placas de 96 pocillos (u otros formatos de placa) se incuban con una biblioteca de compuestos durante un período deseado (*por ejemplo*, aproximadamente 18 horas). Las células se lavan con PBS y se lisan en placas con el kit TaqMan Gene Expression Cells-to-CT de Applied Biosystems, que elimina el ADN y prepara los lisados celulares listos para RT-PCR. Los lisados celulares se diluyen en un nuevo conjunto de placas de 96 pocillos con reactivos de los kits qRT-PCR de una sola etapa de Qiagen y los kits QuantiFast Multiplex RT-PCR. Conjunto de iniciadores ACAGCTAACTCCAAGTCAGATTATGTC-3' y 5'-GTAGACACTTGAGACTAACAACCGT-3' para TFAM, y 5'CAAAGACCTGTACGCCAACACAGT3' y 5'-TTCCTGATCCACATCTGCTGGAAG-3' para  $\beta$ -Actina (control), que se han usado con éxito para detectar el aumento del ARNm de TFAM por 50 pM de rapamicina y otros agentes (datos no mostrados, y como se describe en Fu X, y otros, PLoS ONE, 3(4): e2009, 2008), además pueden usarse. Los compuestos o composiciones que aumentan el ARNm de TFAM más de aproximadamente 2 veces se podrían considerar positivos, los cuales se ensayan adicionalmente para el mantenimiento de la senescencia en el modelo de disfunción de los telómeros *cdc13-1* o WI-38.

#### 20 Ejemplo 8:

Prueba de la actividad de un compuesto o composición para prevenir la pérdida de senescencia en los fibroblastos WI-38

Existen situaciones en las que un compuesto o composición tal como un fármaco conocido, un extracto natural o un producto natural, un péptido conocido o un candidato obtenido de un tamizaje de la biblioteca en un modelo de levadura, necesita que se pruebe para determinar si tiene un efecto antienvjecimiento en las células humanas. La prueba deseada puede hacerse como se describe en Fig. 7 usando fibroblastos WI-38.

#### 30 Ejemplo 9:

Determinación de las concentraciones biológicas antienvjecimiento de la rapamicina y sus derivados usando células de levadura *cdc13-1*

Existen situaciones en las que la cantidad o concentración de rapamicina antienvjecimiento biológicamente activa necesita que se determine, por ejemplo, en diferentes lotes de rapamicina purificada, muestras durante el proceso de purificación, extractos crudos, plasma sanguíneo después de la administración de rapamicina, o en un derivado de rapamicina químicamente modificado, etc. Para determinar la rapamicina antienvjecimiento biológicamente activa de varias fuentes, los materiales que contienen rapamicina se diluyen primero en un disolvente apropiado con las diluciones en serie deseadas (*por ejemplo*, diluciones en serie de 3 o 10 veces). Aproximadamente 5% (en volumen, o menos) de dichos materiales diluidos se añaden después a células *cdc13-1* recién diluidas 10 veces en medio YEPD. Después de aproximadamente 24 a 36 horas de incubación a la temperatura no permisiva (aproximadamente 37 °C) para inducir la muerte celular, el número de células supervivientes se mide mediante el ensayo de formación de colonias como se describe en Fig. 1. Para preparar una concentración estándar de rapamicina activa, la rapamicina purificada se diluye con DMSO a 1  $\mu$ M. El cultivo fresco de *cdc13-1* durante toda la noche se diluye 10 veces en el medio YEPD. La rapamicina 1  $\mu$ M se diluye en serie 3 veces o 2 veces con el medio que contiene células a aproximadamente 10 pM. La mezcla se incubaba después a aproximadamente 37 °C durante aproximadamente 24-36 horas para la muerte celular inducida por *cdc13-1p* inactivado. El número de células supervivientes en presencia de varias concentraciones de soluciones estándar de rapamicina se determina mediante la formación de colonias y los números se representan frente a las concentraciones para obtener una curva estándar. Después se comparan los números de células supervivientes en presencia de varias fuentes de rapamicina con la curva estándar, y así se determina la concentración de rapamicina activa. Para un derivado de rapamicina, la curva estándar se podría crear primero para el mismo derivado. Además de la formación de colonias, los ensayos apoptóticos y la liberación de ROS por muerte celular de *cdc13-1* además pueden usarse para determinar las concentraciones biológicas antienvjecimiento o rapamicina.

Este método además puede usarse para determinar las concentraciones biológicas antienvjecimiento de otros compuestos o composiciones antienvjecimiento, por ejemplo, EGCG. Además, este método puede usarse como un ensayo para detectar la actividad antienvjecimiento de una muestra biológica.

#### 60 Ejemplo 10

Detección de un agente de antienvjecimiento usando el mutante de levadura *cdc17-1* y *cdr17-2*

La rapamicina (1 y 3 nM) y la glucosa reducida se usan como ejemplos de agentes antienvjecimiento. Las células de levadura *cdc17-1* y *cdc17-2* se activaron a partir de una reserva de -80 °C primero estriándolas sobre una placa con YEPD fresco y después incubando a una temperatura permisiva (aproximadamente 24 °C) durante 5 días hasta que se formaron las colonias individuales. Se recogieron unas pocas colonias de levadura y se cultivaron durante toda la noche en el medio

líquido YEPD a una temperatura permisiva de aproximadamente 24 °C. Los cultivos de toda la noche se diluyeron (dilución 10 veces) en medio YEPD fresco que contenía rapamicina de 0, 1 y 3 nM, o YEPD con glucosa 0,5%. Las mezclas se incubaron después a una temperatura no permisiva (aproximadamente 37 °C) durante 22 horas para inducir la muerte celular después de la detención del crecimiento desencadenada por la inactivación de la ADN polimerasa alfa. Se midió el número de células supervivientes mediante el ensayo de formación de colonias. En resumen, las mezclas se diluyeron después en serie (10 veces), y se observó una pequeña cantidad de células (5 µl) en una placa con YEPD. La placa se incubó a la temperatura permisiva (aproximadamente 24 °C) durante al menos 4 días para permitir la formación de colonias a partir de las células supervivientes. Como se muestra en la Fig. 21A, la rapamicina previno las células inducidas por la inactivación de la ADN polimerasa alfa en mutantes de levadura *cdc17-1* y *cdc17-2*.

#### Ejemplo 11

Detección de un agente de antienvjecimiento usando el mutante *est1<sup>-ts</sup>* de levadura

La rapamicina se usa como un ejemplo de agentes antienvjecimiento en este modelo. La rapamicina puede prevenir la inducción de ROS y la muerte celular similar a la apoptosis inducida por la inactivación de la telomerasa en las células de levadura *est1<sup>-ts</sup>* (*est1<sup>-ts</sup> rad52::URA3*) como se describió en mi artículo anterior (Qi, H., y otros, PlosOne, 2008). El ensayo se realizó cultivando células en las placas que contienen rapamicina. Este ensayo puede modificarse mediante el cultivo de células en el medio líquido para facilitar la adopción de un tamizaje de alto rendimiento. En resumen, las células *est1<sup>-ts</sup>* se activan a partir de la reserva de -80 °C primero estriando sobre una placa con YEPD fresco y después incubando a una temperatura permisiva (aproximadamente 24 °C) durante 5 días hasta que se forman las colonias individuales. Se recogen unas pocas colonias de levadura y se cultivan durante toda la noche en el medio líquido YEPD a una temperatura permisiva de aproximadamente 24 °C. Los cultivos de toda la noche se diluyen aproximadamente de 100 a 300 veces en medio YEPD fresco que contiene 0, o 1 nM de rapamicina. Las mezclas se incuban a una temperatura no permisiva de aproximadamente 37 °C durante aproximadamente dos días. Las células se diluyen de nuevo aproximadamente 100-300 veces en medio YEPD fresco que contiene rapamicina 1 nM o el disolvente de control y después se incuban a una temperatura no permisiva de aproximadamente 37 °C durante aproximadamente dos días. La inactivación de la telomerasa a la temperatura no permisiva resulta en un acortamiento progresivo de los telómeros y finalmente una disfunción de los telómeros, que conduce a la inducción de ROS y la muerte celular por apoptosis. La muerte celular puede medirse usando un ensayo apoptótico o un ensayo de ROS. La inducción de ROS se mide incubando las células con una solución de deshidrorodamina 123 (aproximadamente 5 µg/ml en un tampón PBS) en oscuridad seguido de análisis FACS. La muerte celular se mide por actividad de caspasa como en el Ejemplo 2.

B. Direccionamiento de la ruta Nutriente/TOR/AMPK/Mitocondria/Senescencia para prevenir y tratar enfermedades o trastornos relacionados con la edad

#### Ejemplo 12

Medición de los componentes de la ruta de senescencia en un sistema modelo de mamífero.

Este ejemplo usó inmunoelectrotransferencia para determinar el aumento de proteínas clave en la ruta de senescencia en células de mamífero inducidas por un agente de antienvjecimiento. Se usó rapamicina como un ejemplo. Las células WI-38 en el día 20 después de la última división (senescencia) se trataron con rapamicina de las dosis indicadas durante 18 horas. Los lisados celulares se analizaron después por inmunoelectrotransferencia. Las proteínas clave en la ruta de senescencia, p53, p21 y pRB, se aumentaron con las dosis bajas de rapamicina (50 y 100 pM), pero no con la dosis más alta de 2000 pM (Fig. 9C).

#### Ejemplo 13:

Los agentes que exhiben actividades contra las enfermedades relacionadas con la edad o en la quimioprevención del cáncer estimulan la función mitocondrial y prolongan la senescencia

Los experimentos se realizaron como se describe en las Figs. 7, 10 y 11. Como se muestra en la Fig. 10, rapamicina 50 pM, AICAR 250 µM, EGCG 20 µg/ml, GSE 1,6 µg/ml, glucosa reducida (de 0,4% a 0,2%), extracto de arándano (BE) 20 µg/ml, AITC 1 µM y 2-desoxiglucosa 12,5 µM aumentó la masa mitocondrial, un indicador del aumento de la biogénesis mitocondrial, además previno la pérdida de células en fibroblastos WI-38 senescentes (Fig. 7). Además, fenetil isotiocianato (PEITC), silibinina, selenito (Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>), y genisteína que aumentaron la masa mitocondrial, además exhibieron varios grados de los efectos protectores sobre la muerte de los telómeros en células de levadura (Fig. 10 y Fig. 11).

#### Ejemplo 14

El activador AMPK inhibe la transformación inducida por TPA de células NIH3T3.

El experimento se realizó como en el Ejemplo 19. En resumen, 1500 células NIH3T3 se mezclaron con 50 µL de agarosa 0,4% en medio de cultivo (medio basal con suero de bovino 10%), se colocaron capas en placas de 96 pocillos

precubiertas con 50  $\mu$ L de agarosa 0,8% en medio de cultivo. Después, se añadieron en los pocillos 100  $\mu$ L, de medio de cultivo que contenía fármacos para preparar el DMSO, TPA 10  $\mu$ M, AICAR 40  $\mu$ M, o TPA 10  $\mu$ M+AICAR40  $\mu$ M final. Las células se incubaron en una incubadora a 37 °C con CO<sub>2</sub> 5% durante más de 7 días. Se añadieron 50  $\mu$ L de medio fresco cada 5 días. Las colonias se contaron después bajo un microscopio. Como se muestra en la Fig. 12, TPA disminuyó drásticamente la masa mitocondrial en las células NIH 3T3. El activador de AMPK AICAR revirtió esta disminución (Fig. 12). Además, AICAR también redujo la transformación de células NIH 3T3 inducidas por TPA (Fig. 13A y Fig. 13B).

C. Uso de un inhibidor de TOR como la imitación de CR para prevenir y tratar enfermedades o trastornos relacionados con la edad

*Inhibidores de TOR y Rapamicina.* El inhibidor de TOR específico rapamicina (Sirolimus) es el miembro original de una clase de moléculas de trieno macrocíclico, que comprende CCI779 (Temsirolimus), RAD-001 (Everolimus), AP-23573 (Deforolimus), AP-23675, AP-23841, ABT-578 (Zotarolimus), 7-epi-rapamicina, 7-tiometil-rapamicina, 7-epi-trimetoxifenil-rapamicina, 7-epi-tiometil-rapamicina, 7-demetoxi-rapamicina, 32-demetoxi-rapamicina, 2-desmetil-rapamicina y 42-O-(2-hidroxi)etil rapamicina. Se descubrió que la rapamicina originalmente tiene actividad antifúngica (Vezina, C., y otros, J. Antibiot., 28:721 (1975); Sehgal, S.N., y otros, J. Antibiot., 28:727 (1975); Baker, H.A., y otros, J. Antibiot., 31 :539 (1978); Patentes de los Estados Unidos núm. 3,929,992, y Patente de los Estados Unidos núm. 3,993,749).

La rapamicina se usa como inmunosupresor (Santos, E. y Nebreda, A.R., FASEB, 3:2151-2163 (1989)): prevención o tratamiento del lupus eritematoso sistémico (Patente de los Estados Unidos núm. 5,078,999), inflamación pulmonar (Patente de los Estados Unidos núm. 5,080,899), rechazo en trasplante de órganos, artritis (Carlson, y otros, J. Pharmacol. Exp. Ther., 266:1125-1138 (1993); Foronczewicz y otros, Transpl. Int., 18:366-368 (2005)), inflamación ocular (Patente de los Estados Unidos núm. 5,387,589), y enfermedad inflamatoria cardíaca (Patente de los Estados Unidos núm. 5,496,832), que previene la proliferación de células del músculo liso y engrosamiento intimal después de una lesión vascular (Patente de los Estados Unidos núms. 5,288,711 y 5,516,781) y se utiliza en el stent para prevenir la restenosis (Patente de los Estados Unidos núm. 6,585,764). Además, se patenta para tratar afecciones oculares (Patente de los Estados Unidos núm. 7.083.802), incluida la degeneración macular relacionada con la edad (AMD) (Publicaciones de la solicitud de Patente de los Estados Unidos núms. 20060182771, 20060247265, 20060263409, y 20070105761, 20060264453), neovascularización coroidea (NVC) y DMAE húmeda (Publicación de la solicitud de patente de los Estados Unidos núm. 20050187241).

Se ha demostrado que la rapamicina tiene actividad antiproliferativa y antitumoral. Se ha demostrado que la rapamicina sola, o en combinación con otros fármacos, tiene actividad antitumoral contra la leucemia/linfoma de células T adultas (Patente de los Estados Unidos núms. 4,885,171 y 4,401,653; Solicitud de patente Europea núm. 525,960 A1), carcinomas malignos (Patente de los Estados Unidos núm. 5,206,018), y anemia (Patente de los Estados Unidos núm. 5,561,138). Puede usarse para tratar el cáncer de mama metastásico (Publicación de la solicitud de patente de los Estados Unidos núm. 20070104721), neoplasmas (Publicaciones de solicitud de patente de los Estados Unidos núms. 20040176339 y 20060035904), y leucemia linfoblástica aguda derivada de células B tempranas (Patente de los Estados Unidos núm. 7,026,330). Además se patentó para tratar la esclerosis tuberosa (Publicación de la solicitud de patente de los Estados Unidos núm. 20050070567) e inhibir el crecimiento anormal de células en mamíferos (Publicación de la solicitud de patente de los Estados Unidos núm. 20060035907), reducir la proliferación y la potenciación de la apoptosis de las células neoplásicas (Publicación de la solicitud de patente de los Estados Unidos núm. 20060094674), y tratar los trastornos proliferativos e inflamatorios (Publicación de la solicitud de patente de los Estados Unidos núm. 20060135549), e infección viral crónica (Publicación de la solicitud de patente de los Estados Unidos núm. 20070099844).

El uso de inhibidores de rapamicina/mTOR solo o en combinación con otros agentes además se ha notificado para tratar otras diversas enfermedades o afecciones, tales como la diabetes mellitus (Patente de los Estados Unidos núm. 5,321,009), trastornos de la piel (Patente de los Estados Unidos núm. 5.286.730), trastornos intestinales (Patente de los Estados Unidos núm. 5,286,731), trastornos neurológicos, enfermedades neurodegenerativas (Patente de los Estados Unidos núm. 6,187,756), pérdida ósea (Publicación de la solicitud de patente de los Estados Unidos núm. 20060173033), implantes intraoculares de liberación prolongada antiangiogénicos (Publicación de la solicitud de patente de los Estados Unidos núm. 20070059336), y trastornos conformacionales de proteínas por inducción de autofagia (Publicación de la solicitud de patente de los Estados Unidos núm. 20070155771).

Se encontró que forma complejos entre TOR y FKBP12 e inhibe la formación compleja entre TOR y sus proteínas de sustrato normales tal como el complejo TOR-raptor (TORC1), la inhibición de la formación de TORC1 resulta en la inhibición de la traducción de proteínas y la biogénesis ribosómica, inhibiendo así el ciclo celular en la fase G1. La inhibición de TORC1 además conduce a autofagia aumentada para la degradación de proteínas y orgánulos de nutrientes. Hasta la fecha, los usos informados de la rapamicina en las dosis terapéuticas en varias enfermedades se basan principalmente en la interrupción de TORC1 y la posterior inhibición de G1 en el ciclo celular y autofagia. Por el contrario, en la presente invención, la rapamicina y sus análogos se usan en dosis bajas como imitación de la restricción calórica para la prevención o el tratamiento de enfermedades relacionadas con la edad a través de la ruta AMPK/mitocondria/senescencia.

Ejemplo 15

## Dosis bajas de rapamicina inhiben la transformación inducida por TPA de células NIH3T3

La transformación de células NIH 3T3 es un buen ensayo de tumorigénesis *in vitro*, que mide la formación de colonias en agar blando (denominado crecimiento independiente del anclaje). Se conoce que el TPA mutágeno (12-O-tetradecanoilforbol 13-acetato) estimula la proteína quinasa C (PKC), activa los oncogenes y transforma las células NIH3T3 de fibroblastos embrionarios de ratón. El crecimiento independiente de anclaje inducido por TPA de células NIH3T3 se empleó como un ensayo de tumorigénesis. Curiosamente, el TPA 10  $\mu\text{M}$  disminuyó drásticamente la masa mitocondrial en células NIH 3T3, y la rapamicina 1 nM revirtió esta disminución como se muestra en Fig. 12. Además, la rapamicina 1 nM también eliminó la transformación de células NIH 3T3 inducidas por TPA 10  $\mu\text{M}$  (Fig. 13). Se mezclaron 1500 células NIH3T3 con 50  $\mu\text{L}$  de agarosa 0,4% en medio de cultivo (medio basal con suero bovino 10%), se colocaron en placas de 96 pocillos precubiertas con 50  $\mu\text{L}$  de agarosa 0,8% en medio de cultivo. Después se añadieron 100  $\mu\text{l}$  de medio de cultivo que contenía fármacos para preparar DMSO, TPA 10  $\mu\text{M}$ , rapamicina 1 nM o TPA 10  $\mu\text{M}$ +rapamicina 1 nM final en los pocillos. Las células se incubaron en una incubadora a 37 °C con CO<sub>2</sub> 5% durante más de 7 días. Se añadieron 50  $\mu\text{L}$  de medio fresco cada 5 días. Las colonias se contaron después bajo un microscopio. Como se muestra en la Fig. 13A y la Fig. 13B, 1 nM de rapamicina bloquearon totalmente este proceso. Como la rapamicina 1 nM disminuyó ligeramente la velocidad de crecimiento de NIH3T3, las colonias además se contaron después de la incubación de 21 días para esperar la disminución de las colonias en crecimiento. Sin embargo, se obtuvieron los mismos resultados. Por lo tanto, el crecimiento lento por 1 nM rapamicina no es la causa de la eliminación de la formación de colonias. Más bien apoya el papel de la función mitocondrial en la prevención del crecimiento independiente del anclaje o tumorigénesis a través del mantenimiento de la senescencia. Por el contrario, se informó que las dosis terapéuticas de rapamicina promueven la tumorigénesis y, así, aumentan el riesgo de linfoma, cáncer de piel y otros cánceres en humanos. La actividad antiproliferación de la rapamicina a dosis terapéuticas descubiertas recientemente es limitar el crecimiento de tumores existentes, asumidos por su inhibición en G1 de ciclo celular y en la síntesis de proteínas

Además, AICAR (40  $\mu\text{M}$ ) que activa AMPK y prolonga la vida útil de fibroblastos primarios senescentes de humano (Fig. 7) además invierte la disminución de la masa mitocondrial provocada por TPA (Fig. 12), así como inhibe el crecimiento independiente de anclaje (Fig. 13A y Fig. 13B). Estos datos respaldan además el papel de la función mitocondrial en la prevención del crecimiento independiente del anclaje o la tumorigénesis. En conclusión, dosis bajas de rapamicina y AICAR previenen la tumorigénesis, al menos en el caso inducido por un TPA mutágeno.

## Ejemplo 16

## Dosis bajas de rapamicina reducen ROS y extienden la vida útil de las células cultivadas de neuronas GCN

Se prepararon los cultivos de neuronas granulares cerebelosas (CGN) a partir de crías de rata de 7 días de edad. En resumen, el cerebelo se extrajo del cerebro y se colocó en una placa de Petri que contenía BMEM en tampón HEPES 20 mM (BMEM-HEPES). Los cerebelos fueron meninges y se descartaron los vasos sanguíneos para asegurar una contaminación mínima de las células endoteliales. Los cerebelos/cortezas cerebrales se cortaron en trozos finos con cuchillas de disección y se tripsinizaron a 37 °C durante 15 minutos. La tripsinización se inhibió añadiendo 1 mL de BME que contenía inhibidor de tripsina de soja 0,025% y ADNasa I 0,05%. El tejido se trituró suavemente a través de una pipeta Pasteur pulida al fuego hasta que se dispersó en una suspensión homogénea. La suspensión se filtró a través de una malla de 40  $\mu\text{m}$  esterilizada con etanol y se sedimentó mediante centrifugación. Los sedimentos que contienen neuronas cerebelares granulares se resuspendieron en medio neurobasal suplementado con B27 que contenía KCl 25 mM (Invitrogen, Carlsbad, CA). Las células se sembraron después en una placa de 24 pocillos (1 placa/cerebelo) y se cultivaron en medio Neurobasal (Invitrogen) suplementado con B27, KCl 20 mM, glutamina 0,5 mM, penicilina 100 unidades/mL, estreptomina 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Se añadió rapamicina a los 7 días de cultivo. 31 días más tarde, el ensayo MTT se realizó para determinar la supervivencia de las células neuronales. Como se muestra en la Fig. 14A, la mayoría de las células CGN ya se habían perdido después de 31 días en cultivo. Sin embargo, bajas dosis de rapamicina previnieron dicha pérdida y prolongaron la vida útil de las células GCN en cultivo, pero las dosis más altas de rapamicina no tuvieron tal efecto.

Para el análisis de ROS, se sembraron células CGN aisladas nuevas en cultivo en suspensión en medio completo Neurobasal en tubos de 12X75 mm a una densidad de un (1) millón de células/mL/tubo. Las células se trataron con rapamicina durante 20 horas y después se tiñeron con 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de deshidrorodamina 123 durante 30 minutos antes del análisis FACS. Como muestra la Fig. 14B, la rapamicina redujo el nivel regular de ROS de células CGN en suspensión

## Ejemplo 17

## Dosis bajas de rapamicina reducen el tamaño del infarto cerebelar en un modelo de apoplejía de rata.

El modelo de oclusión de la arteria cerebral media (MCA) de la apoplejía isquémica se usó en este ejemplo. Ratas espontáneamente hipertensas propensas a apoplejía (SHR-SP) se dividieron aleatoriamente en dos grupos (n=8 en cada grupo): un grupo DMSO de control apareado y un grupo de rapamicina. Se anestesiaron con hidrato de cloral 15% (300 mg/kg, i.p.). Se indujo isquemia cerebral permanente mediante electrocoagulación de la porción distal de la MCA usando un método modificado descrito por Tamura y McGill (Tamura, A., y otros, J. Cerebral. Blood Flow Metab., 1:53-60 (1981). McGill, J.K., y otros, Stroke, 36:135-141 (2005)). En resumen, un segmento de la MCA derecho entre el haz olfativo

y la vena cerebral inferior se electrocoaguló. La arteria coagulada se cortó con microtijeras para asegurar la interrupción completa del suministro de sangre.

5 La rapamicina y el control DMSO se administraron 10 minutos después de la oclusión de MCA. Las muestras de cerebro se cosecharon 24 h después de la oclusión de MCA. Se tiñeron inmediatamente secciones coronales de 2 mm de grosor con cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC) 2%. La región del infarto se veía pálida, mientras que la región normal se veía roja. El área de infarto y las áreas hemisféricas de cada sección (ambos lados) se rastrearon y cuantificaron mediante un sistema de análisis de imágenes (Microsystems Type DM LB2, Leica, Alemania). La posible interferencia de un edema cerebral en la evaluación del volumen del infarto se corrigió con un método estándar de restar el volumen del hemisferio ipsilateral no isquémico del volumen del hemisferio contralateral. El volumen de infarto se expresó como un porcentaje del hemisferio contralateral. Los pesos del tejido de infarto y el hemisferio se midieron de manera similar. Como se muestra en la Fig. 15A, la rapamicina a una dosis baja de 10 µg/kg redujo significativamente el volumen de infarto inducido por la oclusión de MCA. Por el contrario, la rapamicina a una dosis normal de 1 mg/kg no tuvo este efecto, como se informa en la bibliografía (Sharkey, J.J. y Butcher, S.P., Nature, 371:336-339 (1994)). Además, la administración de rapamicina en dosis de 0, 0,3, 1, 3 y 10 µg/kg durante 20 días antes de la oclusión de MCA además previno el daño cerebral (Fig. 15B).

#### Ejemplo 18

20 Dosis bajas de rapamicina reducen las ROS inducidas por MPP+.

MPP<sup>+</sup>, un inhibidor del complejo I (NADH CoQ1 reductasa) en la cadena respiratoria mitocondrial, es una neurotoxina dopaminérgica. Se usa comúnmente para inducir la enfermedad de Parkinson en modelos marinos. Las células de fibroblastos primarios humanos WI-38 se trataron con MPP<sup>+</sup> 200 µM durante 3 días. Varias concentraciones de rapamicina además se incubaron con células durante 3 días, como se indica en la Fig. 14. Las células se tiñeron después con deshidrorodamina 123 en la oscuridad durante 30 minutos. Las células se analizaron después mediante FACS. Deshidrorodamina 123 puede oxidarse a rodamina (que muestra fluorescencia) en proporción a los niveles de ROS. Como se muestra en la Fig. 16, MPP<sup>+</sup> aumentó significativamente el nivel de ROS. Dosis bajas de rapamicina en intervalos picomolares (pM) redujeron significativamente este aumento.

30 Ejemplo 19:

*Dosis bajas de rapamicina reducen el tamaño del infarto de miocardio en un modelo de rata.* Para determinar el infarto de miocardio (MI) en ratas, se usaron ratas macho Sprague-Dawley (SD) de 200 a 250 g en peso (n=10-12 para cada grupo). Se administró rapamicina a dosis de 0, 10 o 100 µg/kg/día durante 3 días antes del experimento de MI. En condiciones de anestesia con éter, el corazón se exteriorizó a través de una toractomía izquierda, y las arterias descendentes anteriores izquierdas se ligaron con una sutura de polipropileno 6-0 entre el tracto de salida pulmonar y la aurícula izquierda. Después, el corazón palpitante volvió rápidamente a su posición normal, se cerró el tórax y se retiró el aire. Las ratas se devolvieron a las jaulas con las condiciones mencionadas anteriormente. Cinco horas después de la ligadura de la arteria coronaria, las ratas se mataron por una sobredosis de pentobarbital. El ventrículo izquierdo se aisló y se cortó en 4 a 5 cortes perpendiculares al eje cardíaco largo. Las piezas se tiñeron durante 30 minutos a 37 °C en una solución de tampón nitroazul de fosfato de tetrazolio 0,1% y el tamaño de MI se midió como se describe (Lin, L.L., y otros, J. Cardiovasc. Pharmacol., 50:327-332 (2007)). El tejido normal se tiñó de azul, mientras que el tejido necrótico permaneció sin teñir. Los tejidos teñidos y no teñidos se aislaron y pesaron por separado. El tamaño de MI se expresó como una fracción del peso total del ventrículo izquierdo. Como se muestra en la Fig. 16, la dosis baja de rapamicina a 10 µg/kg/día redujo significativamente el tamaño del infarto de miocardio, pero no la dosis más alta de 100 µg/kg/día.

La cita o identificación de cualquier documento en esta solicitud no es una admisión de que dicho documento está disponible como técnica anterior a la presente invención.

50 Se entiende que las descripciones detalladas anteriores y los ejemplos que se acompañan son meramente ilustrativos y no deben tomarse como limitaciones sobre el alcance de la invención. El alcance completo de la invención se debería determinar por las reivindicaciones.

Reivindicaciones

- 5 1. Composición de inhibidor de TOR para su uso en el tratamiento de enfermedades o trastornos relacionados con la edad de los seres humanos,

10 en donde dicho inhibidor de TOR es una dosis baja de rapamicina o un análogo de esta seleccionado de Deforolimus, AP-23675, AP-23841, Zotarolimus, CCI779/Temsirolimus, RAD-001/Everolimus, 7-epi-rapamicina, 7-tiometil-rapamicina, 7-epi-trimetoxi-rapamicina, 2-desmetil-rapamicina y 42-O-(2-hidroxi)etil-rapamicina, en donde dicho inhibidor de TOR no inhibe el crecimiento celular en la fase G1 del ciclo celular y la traducción de proteínas, en donde dichas bajas dosis de rapamicina se administran a una dosificación oral diaria de 0,01 a 10 µg/día.
- 15 2. La composición de inhibidor de TOR para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho inhibidor de TOR es una dosis baja de rapamicina, o una sal, solvato o profármaco farmacéuticamente aceptable de esta.
- 20 3. La composición de inhibidor de TOR para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde dicha dosis baja de rapamicina se administra como un compuesto aislado, un extracto crudo o un microorganismo no purificado que comprende rapamicina.
- 25 4. La composición de inhibidor de TOR para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en donde dicha baja dosis de rapamicina se administra como un microorganismo no purificado de *Streptomyces hygroscopicus*, que comprende rapamicina.
- 30 5. La composición de inhibidor de TOR para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la composición comprende además un segundo agente seleccionado de un antioxidante, un agente antihipertensivo, un agente reductor de lípidos, un agente antiapoplejía, un agente anticancerígeno y un agente de antienvjecimiento diferente.
- 35 6. La composición de inhibidor de TOR para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde dicho antioxidante se selecciona de vitamina C, vitamina E, betacaroteno y otros carotenoides, selenio, ácido lipoico, licopina, luteína, zeaxantina, coenzima Q10, glutatión, N-acetil cisteína, melatonina, genisteína, estradiol, extracto de té y extracto de semilla de uva.
7. La composición inhibidora de TOR para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde dicho agente de antienvjecimiento diferente se selecciona de AICAR, 2-desoxiglucosa, LY294002, metformina, EGCG, GSE, selenito, genisteína, silibinina, isotiocianato de alilo, isotiocianato de fenetilo, extractos de arándano, trisulfuro de dialilo, isotiocianato de bencilo, resveratrol y licopeno.

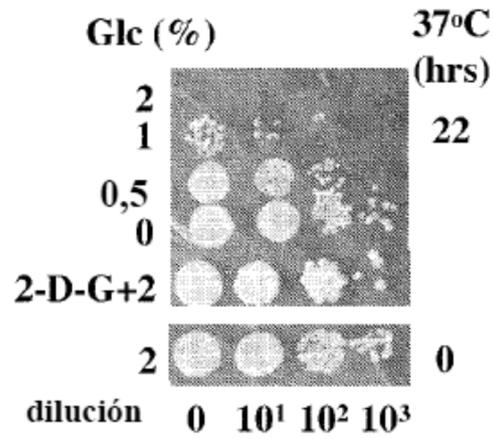


Figura 1A

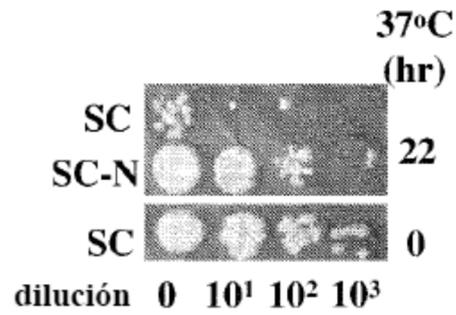


Figura 1B

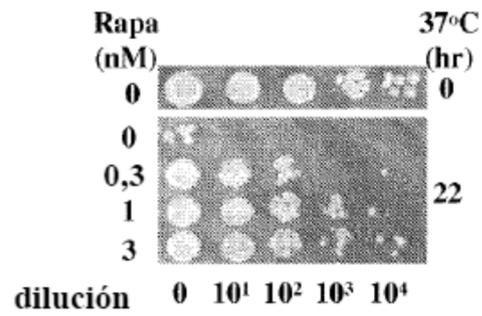


Figura 1C

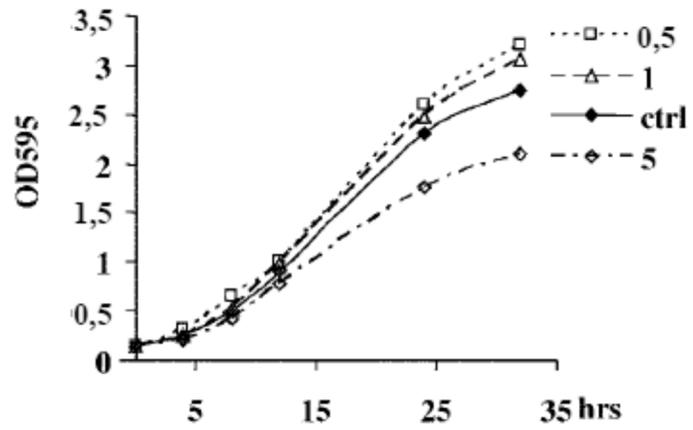


Figura 1D

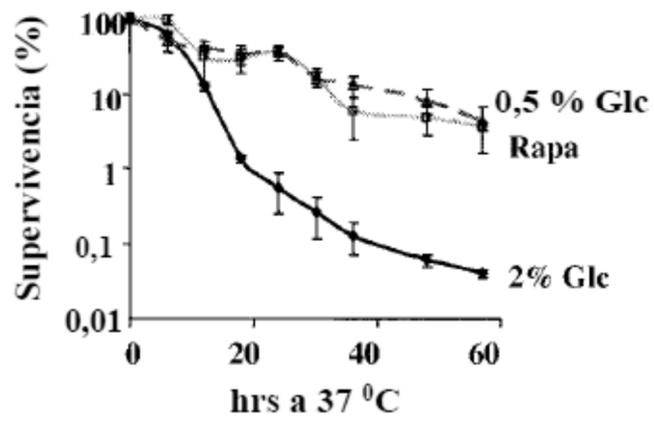


Figura 1E

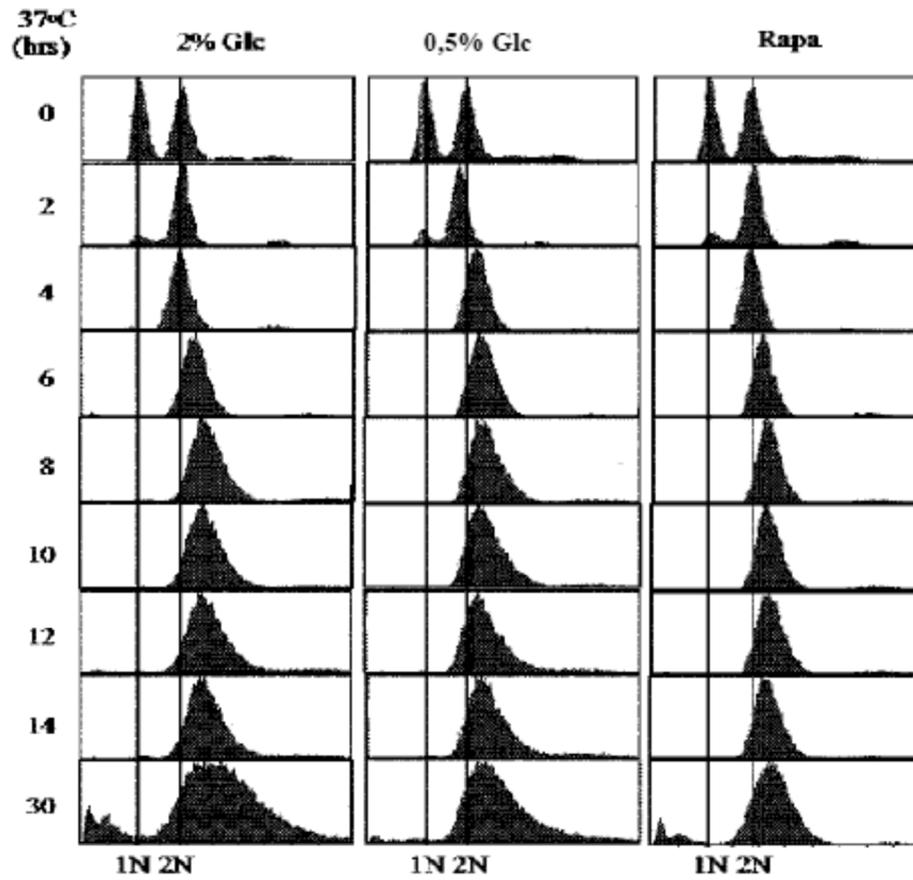


Figura 2A

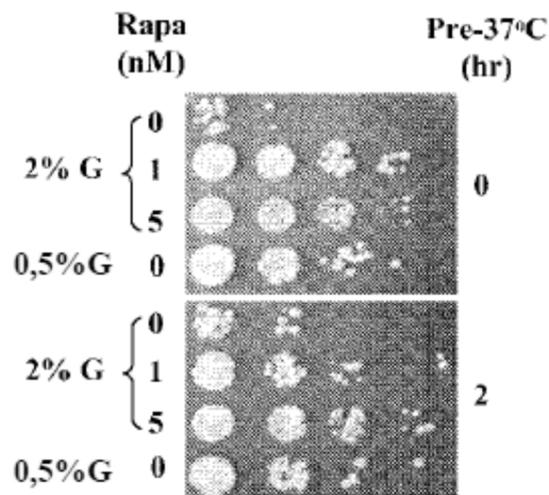


Figura 2B

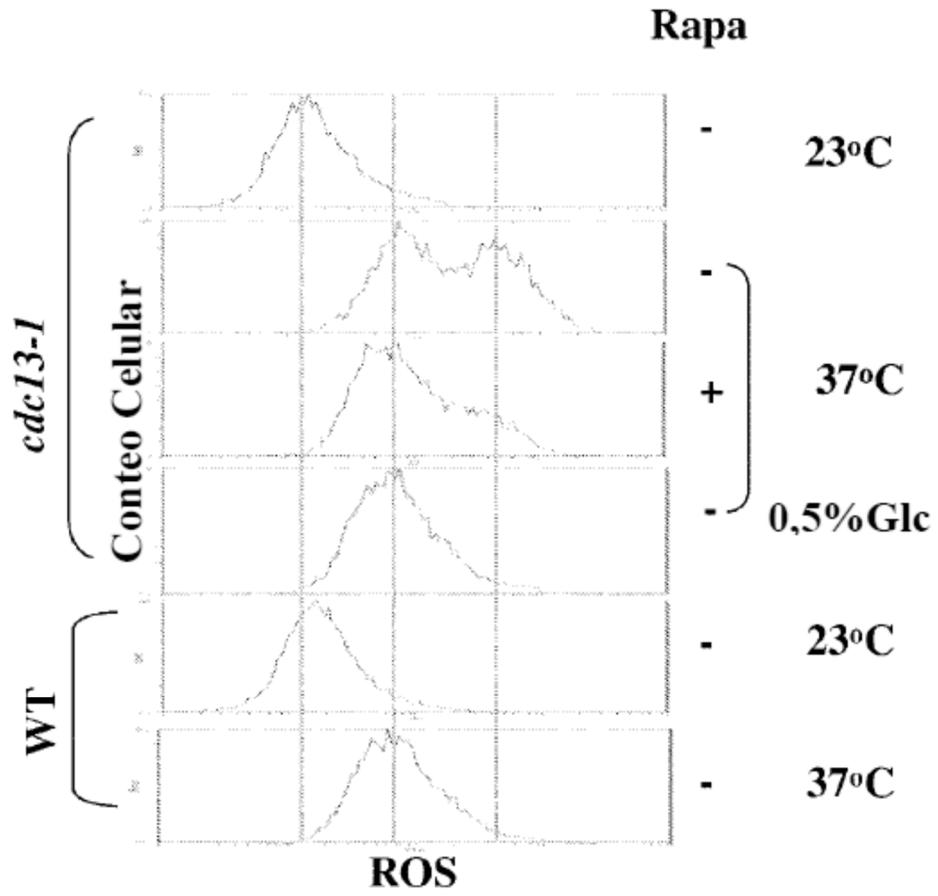


Figura 3A

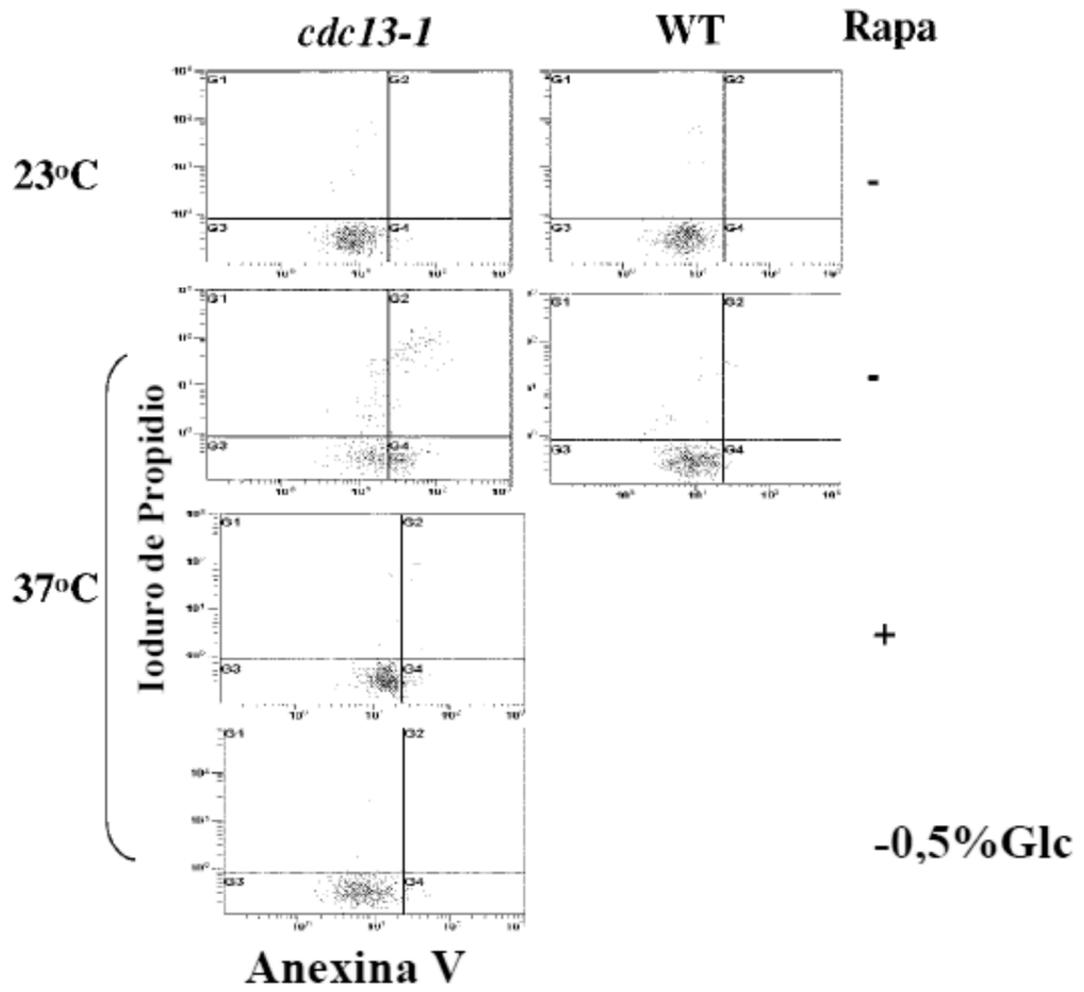


Figura 3B

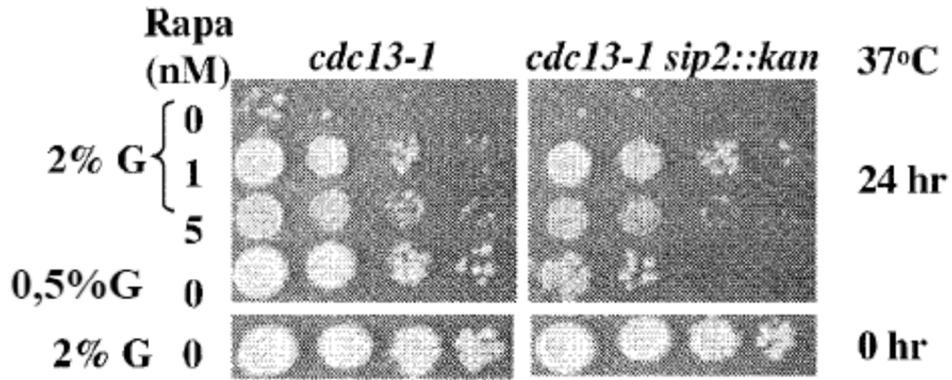


Figura 4A

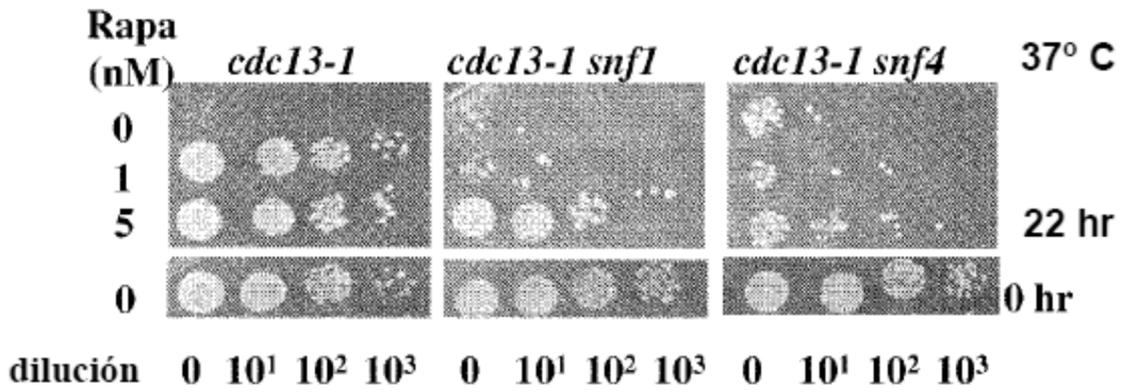


Figura 4B

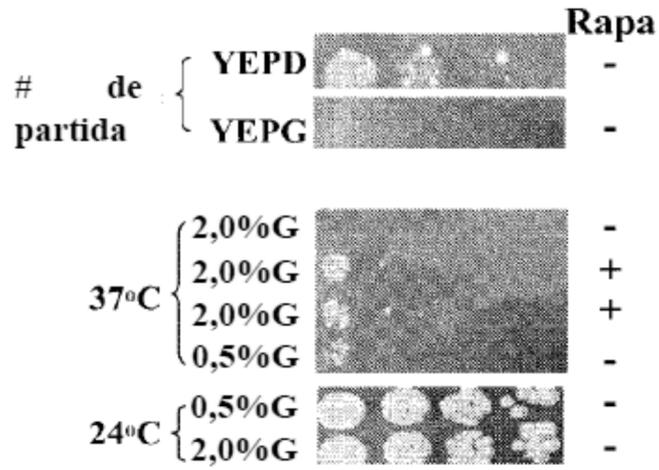


Figura 5A

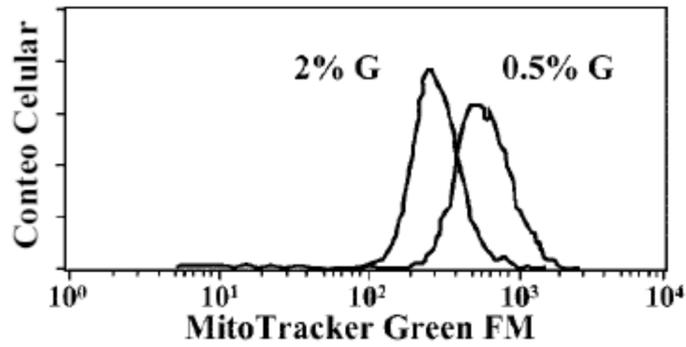


Figura 5B

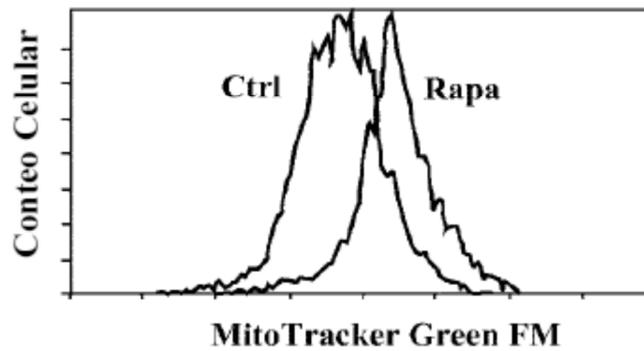


Figura 5C

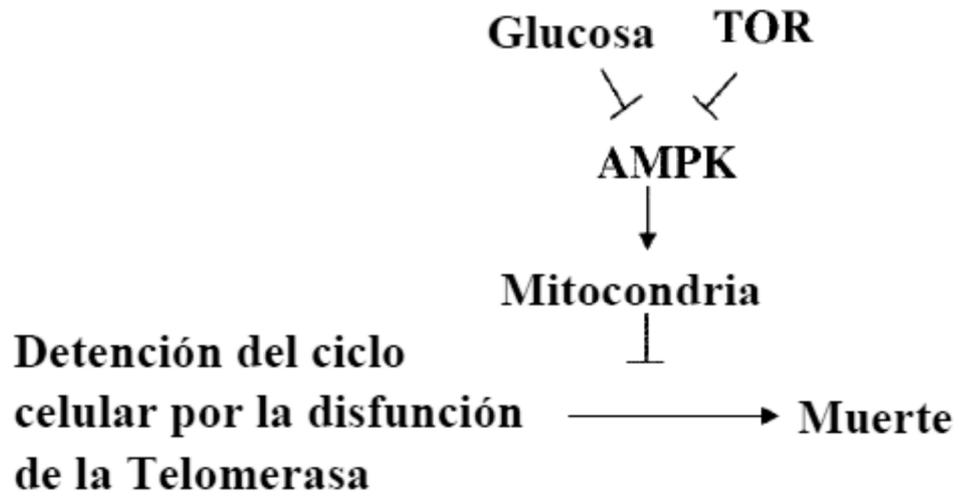


Figura 6

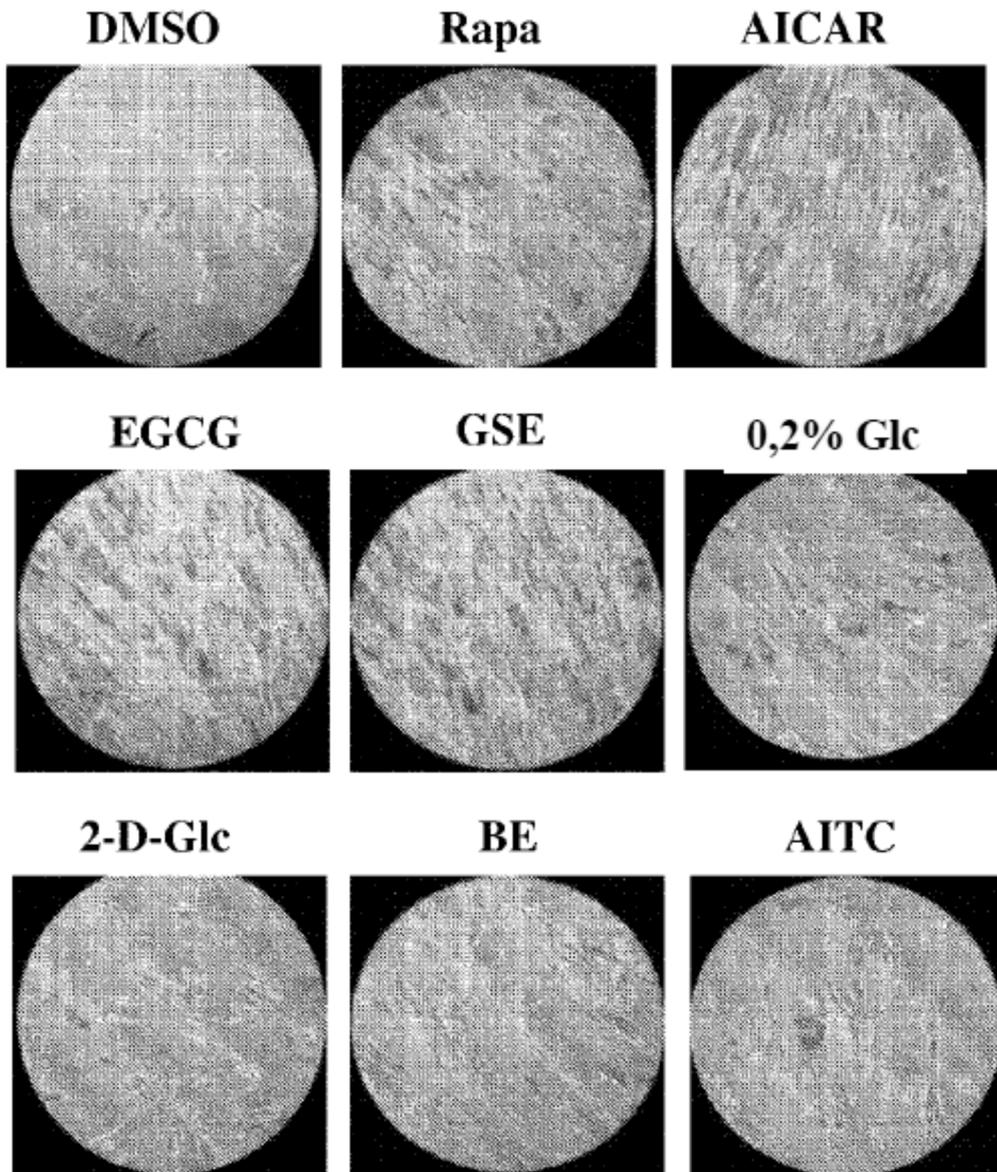


Figura 7

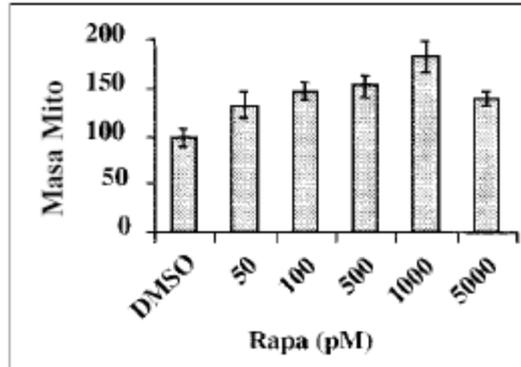


Figura 8A

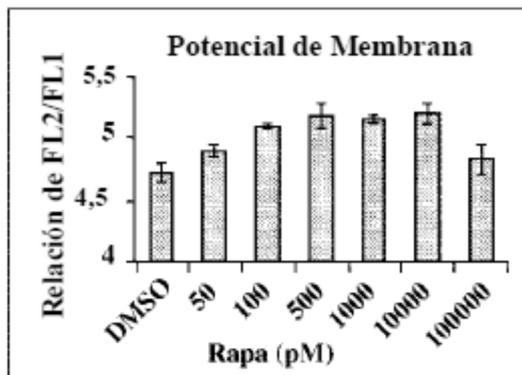


Figura 8B

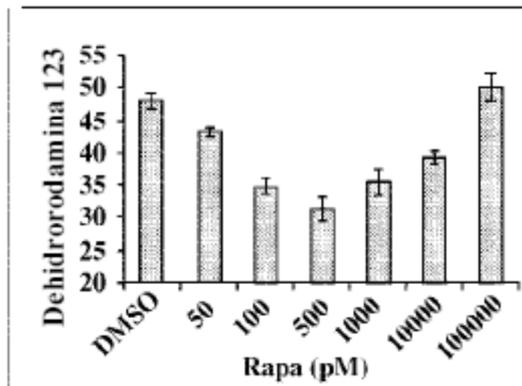


Figura 8C

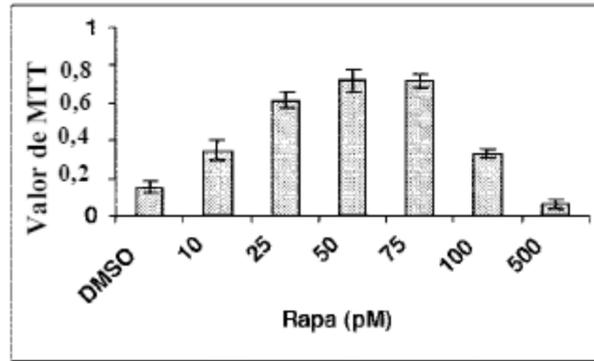


Figura 9A

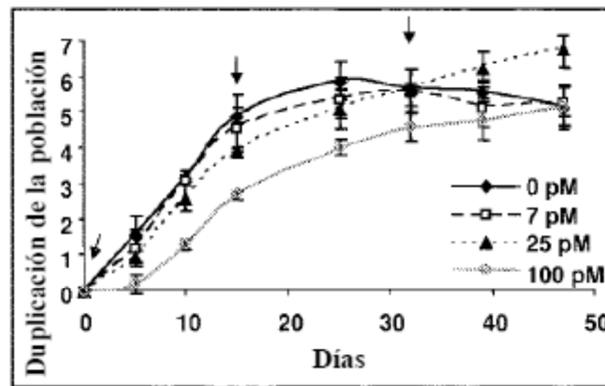


Figura 9B

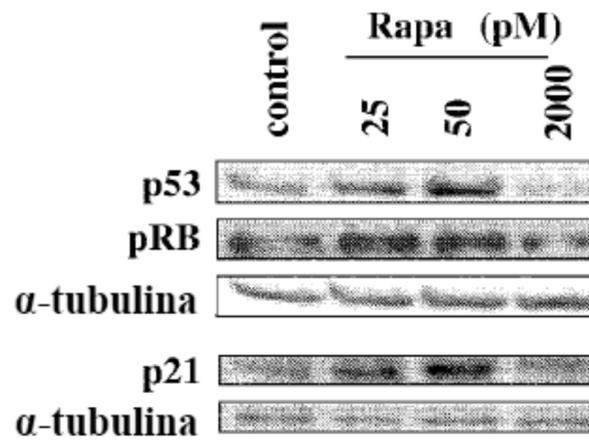


Figura 9C

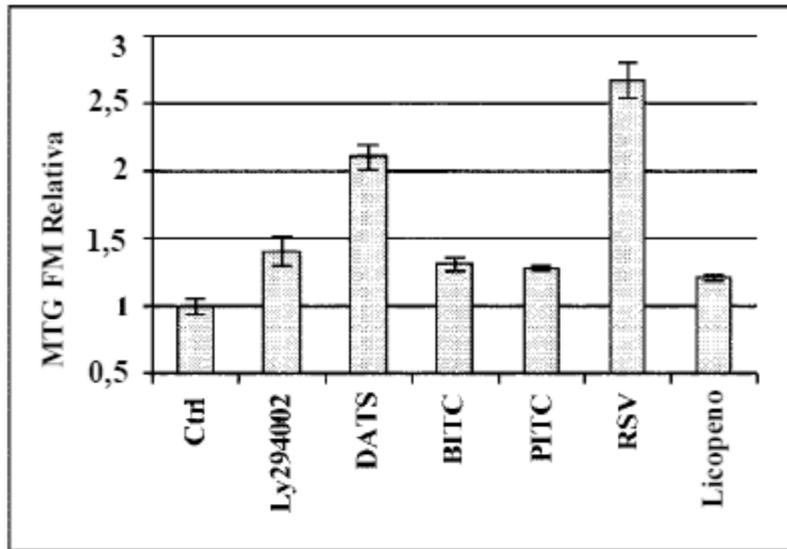


Figura 10A

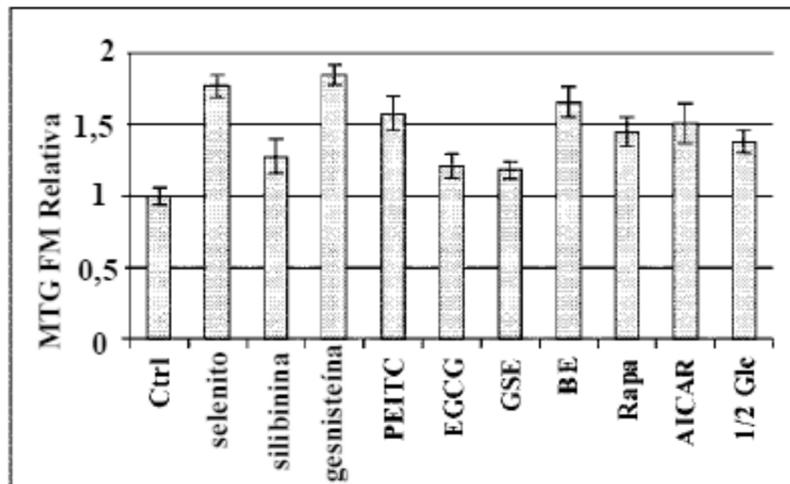


Figura 10B



Figura 11

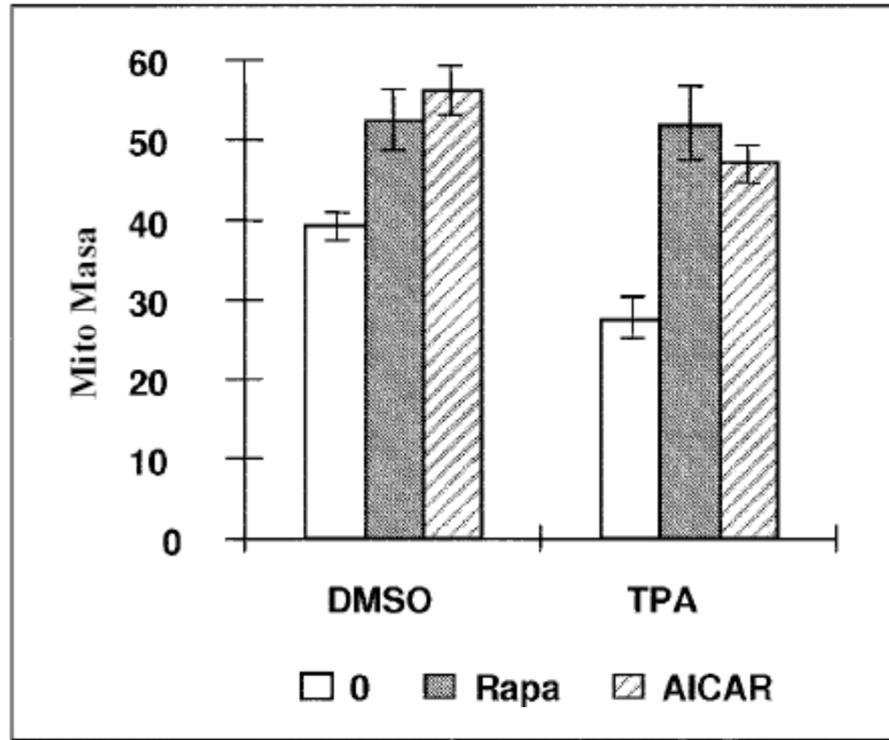


Figura 12

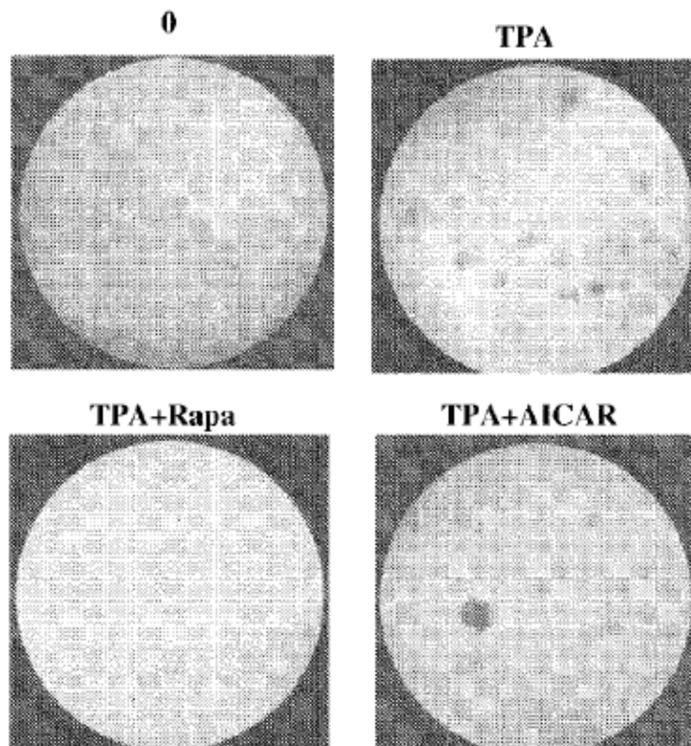


Figura 13A

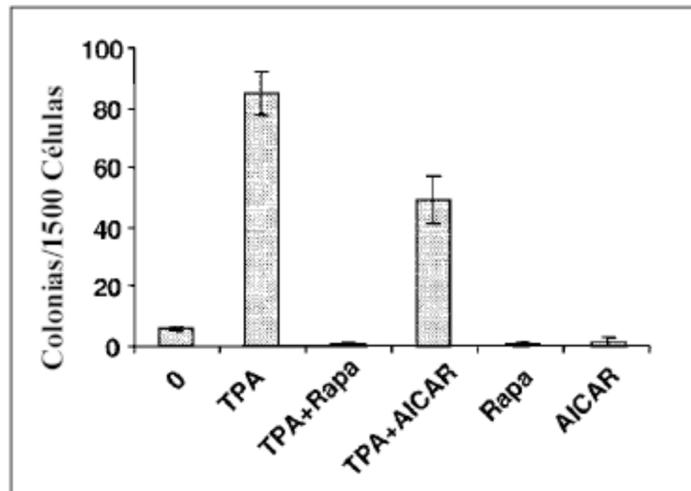


Figura 13B

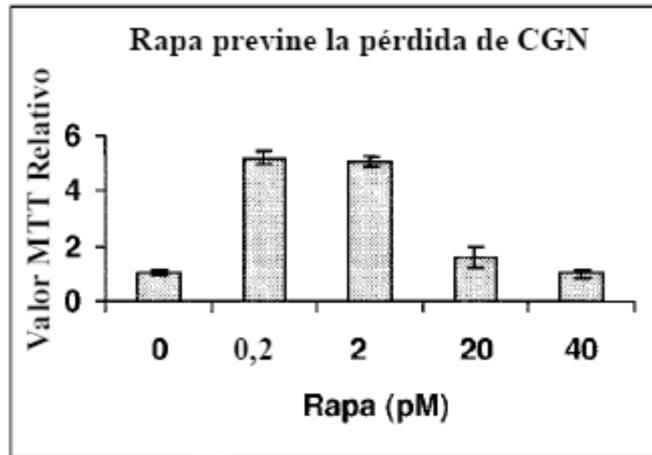


Figura 14A

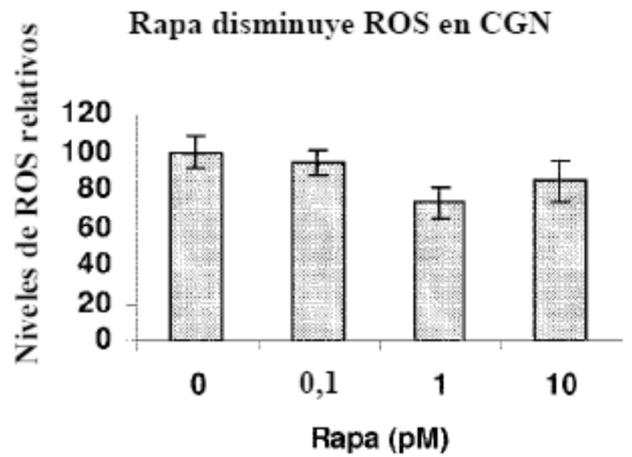


Figura 14B

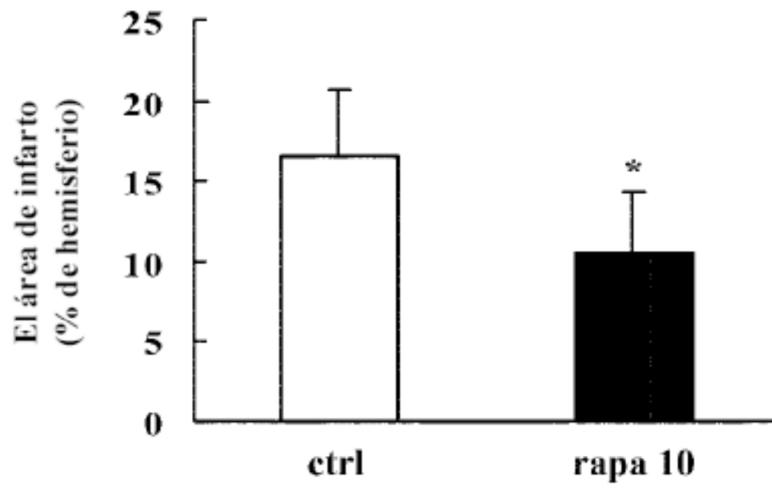


Figura 15A

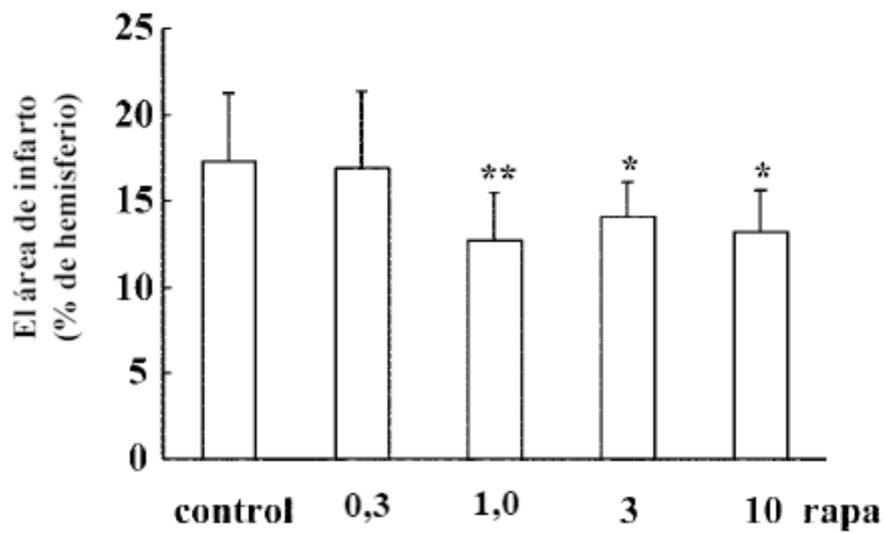


Figura 15B

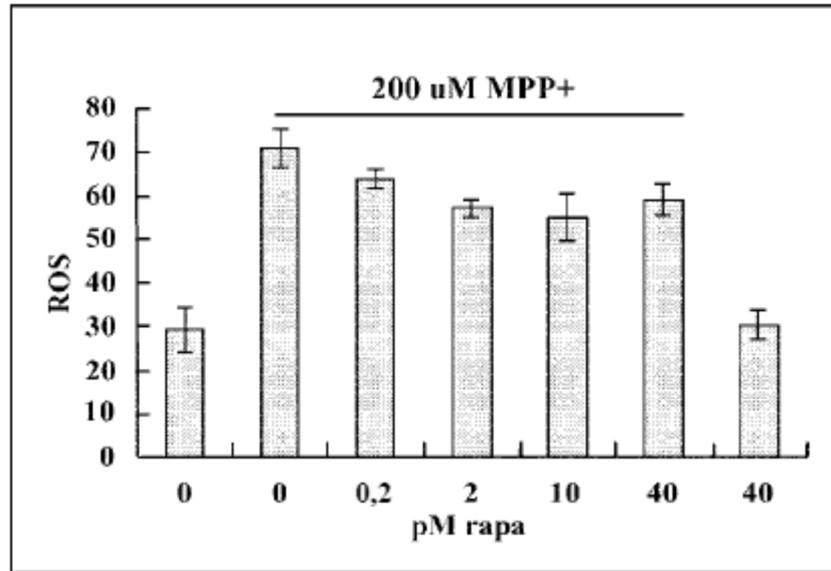


Figura 16

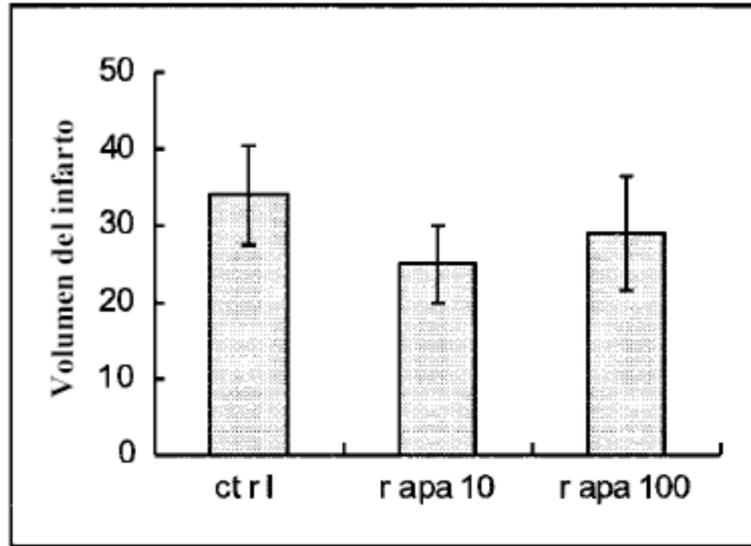


Figura 17

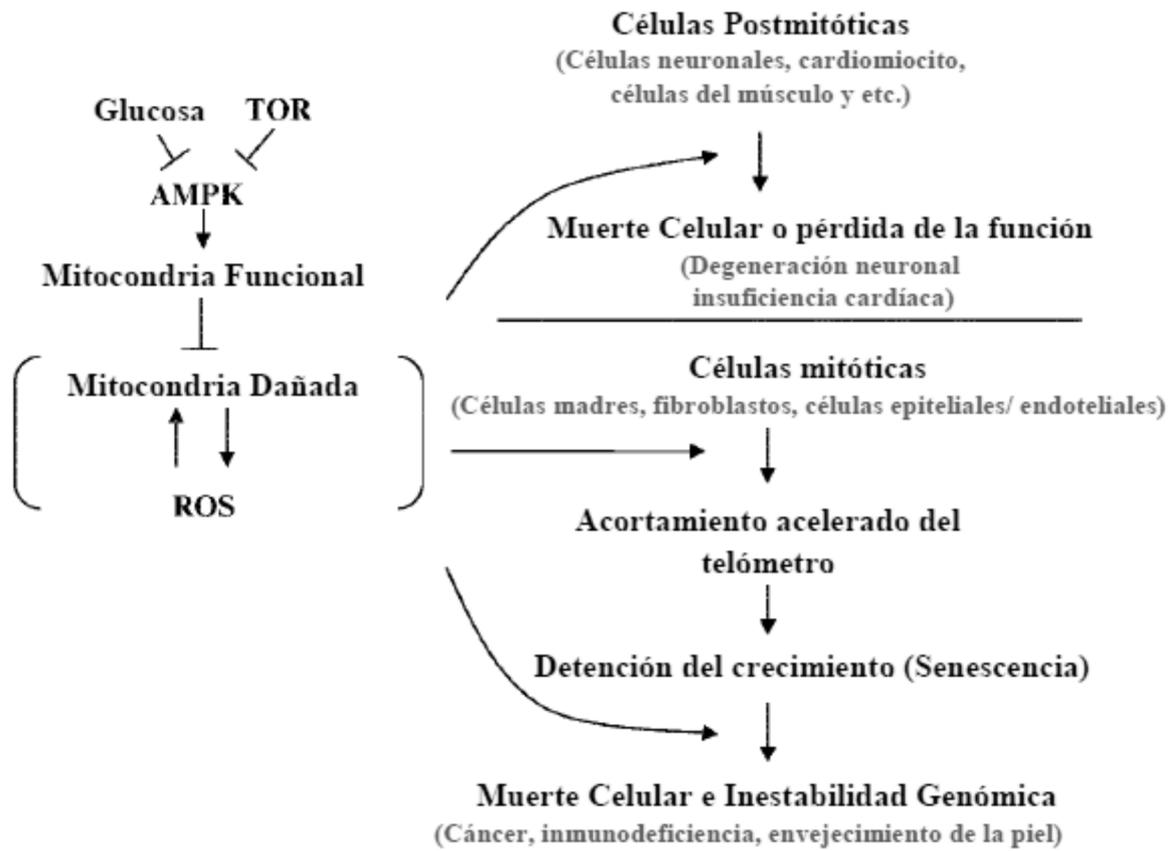


Figura 18

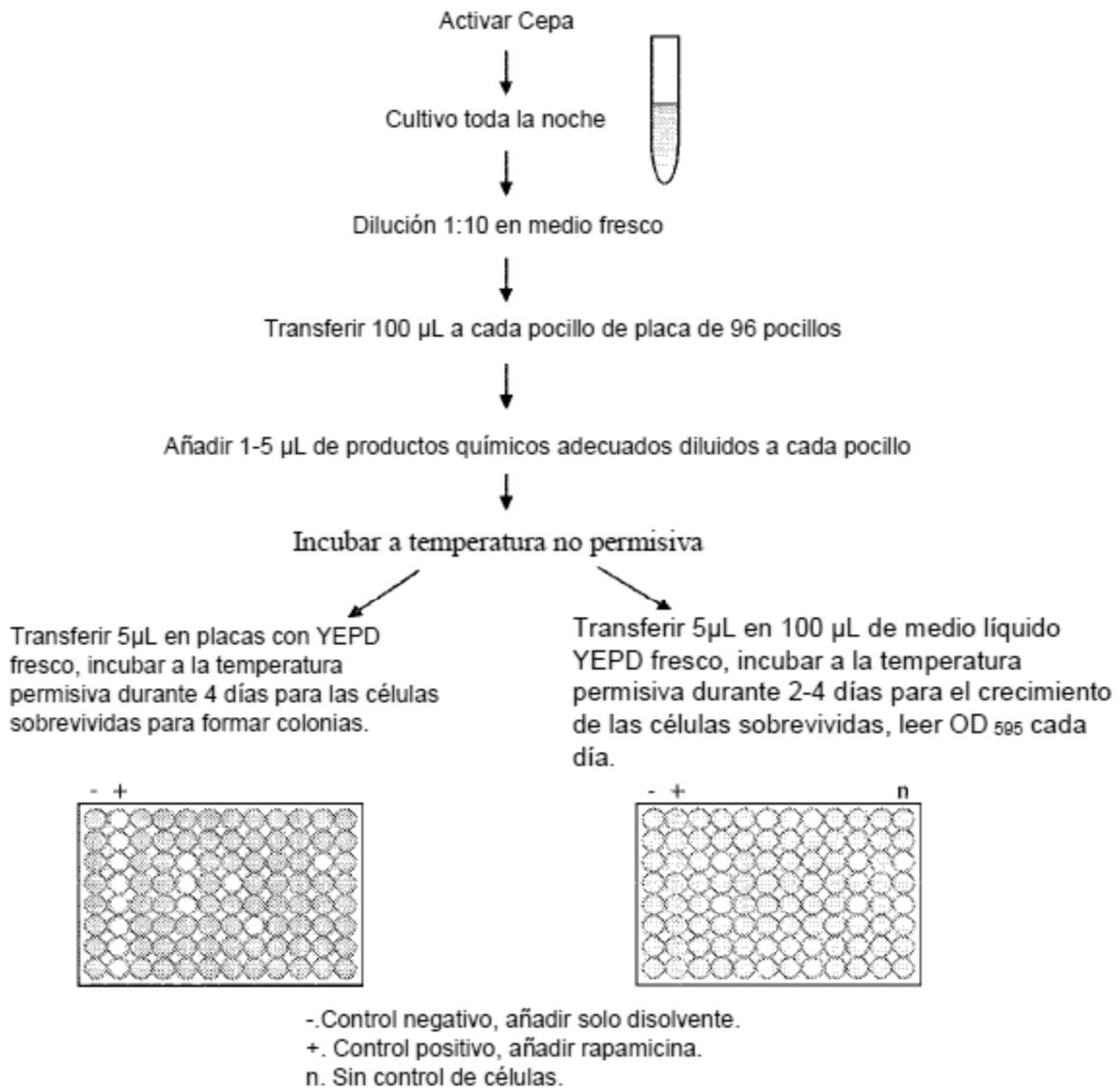
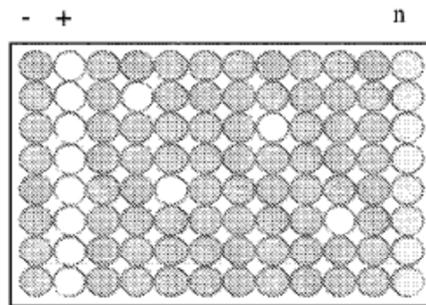
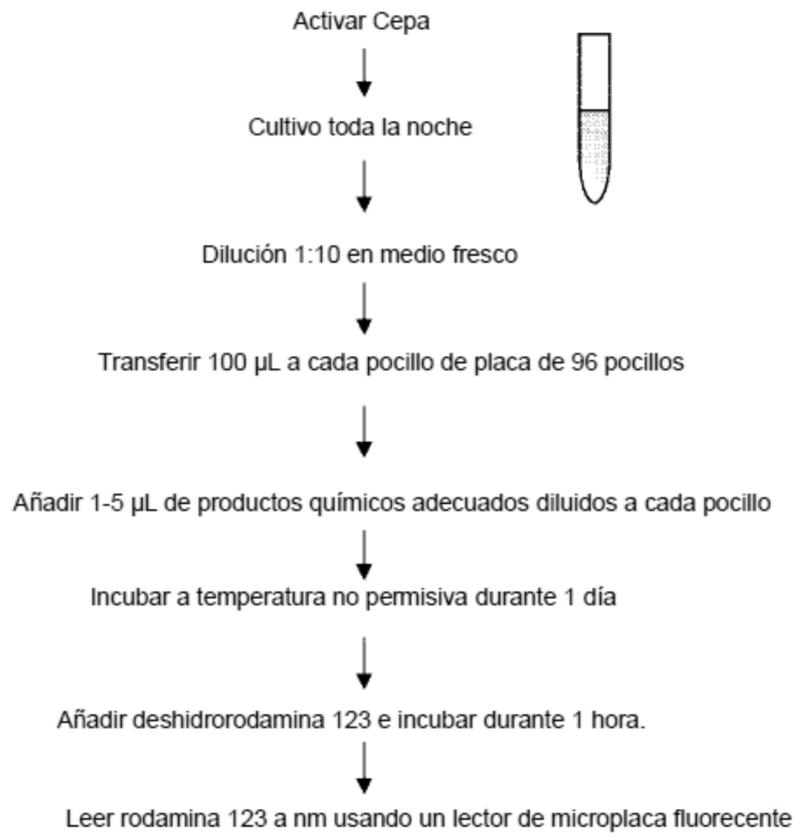


Figura 19



- Control negativo, añadir solo disolvente.  
+ Control positivo, añadir rapamicina.  
n. Sin control de células.

Figura 20

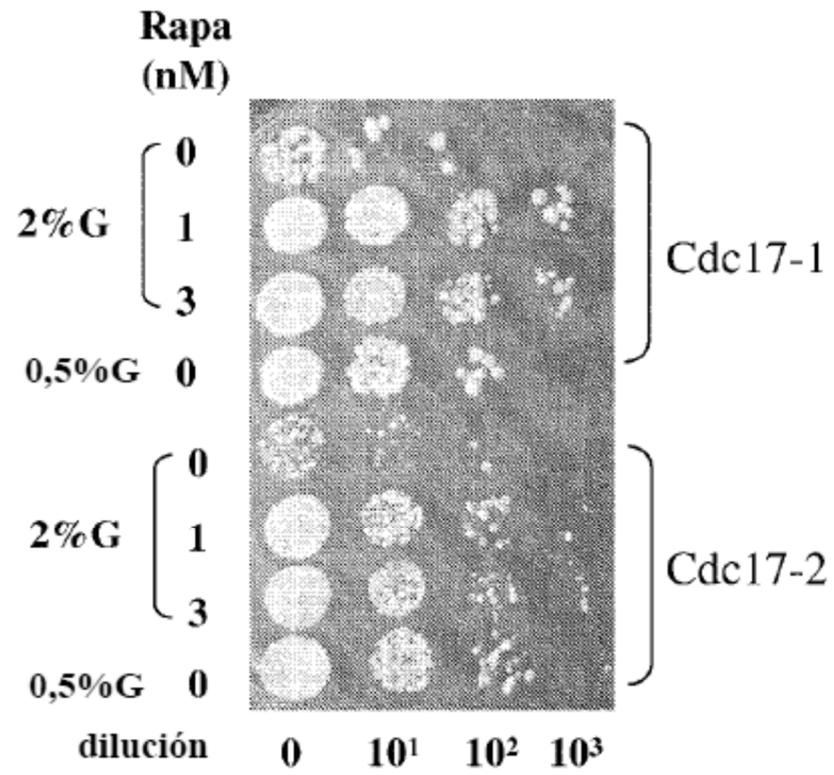


Figura 21