

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 716 528**

51 Int. Cl.:

A61K 31/58	(2006.01)	A61P 7/06	(2006.01)
A61K 31/56	(2006.01)	A61P 17/00	(2006.01)
A61K 31/7048	(2006.01)	A61P 17/02	(2006.01)
A61K 36/481	(2006.01)		
C07J 1/00	(2006.01)		
A61P 31/12	(2006.01)		
A61P 25/00	(2006.01)		
A61P 19/00	(2006.01)		
A61P 27/02	(2006.01)		
A61P 9/10	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.06.2004** **E 12180710 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.01.2019** **EP 2548880**

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

30 Prioridad:

23.06.2003 US 480988 P

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

13.06.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**HALRLEY, CALVIN B.;
CHIN, ALLISON C.;
AKAMA, TSUTOMU;
IP, NANCY YUK-YU;
WONG, YUNG-HOU, PH.D. y
MILLER-MARTINI, DAVID M., DR.**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 716 528 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones para aumentar la actividad telomerasa

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a composiciones para inducir la actividad telomerasa en células.

10 **Antecedentes de la invención y referencias**10 **Telomerasa**

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

Las células somáticas, al contrario que las células tumorales y ciertas células madre, tienen poca o ninguna actividad telomerasa y dejan de dividirse cuando los extremos teloméricos de al menos algunos cromosomas se han acortado a una longitud crítica, produciendo senescencia celular programada (muerte celular). Puesto que la pérdida de las repeticiones teloméricas en células somáticas, que produce senescencia, aumenta por baja actividad telomerasa, la inducción de la actividad telomerasa, que tiene el efecto de añadir haces de repeticiones teloméricas a los telómeros, otorga por tanto a células somáticas mortales capacidad de replicación aumentada, y otorga a células senescentes la capacidad para proliferar y salir apropiadamente del ciclo celular tras la reparación del tejido dañado.

Los beneficios terapéuticos potenciales de la actividad telomerasa aumentada en células somáticas incluyen, por ejemplo, tratamiento de SIDA, que se caracteriza por la senescencia temprana de los linfocitos T citotóxicos (células CD8+) que son responsables de destruir células CD4⁺ infectadas (véase, por ejemplo, Dagarag *et al.*, 2003); neuroprotección en pacientes de Alzheimer (véase, por ejemplo, Mattson, 2000); cicatrización y mantenimiento de células en explantes, tales como células corticosuprarrenales (véase, por ejemplo, Thomas *et al.*, 2000) o células de médula ósea o injerto estromal/mesenquimatoso (véase, por ejemplo, Simonsen *et al.*, 2002). Las citas enteras de estas referencias aparecen a continuación.

Las referencias que discuten estas y otras características de la telomerasa incluyen:

Allsopp, R.C. *et al.*, "Telomere shortening is associated with cell division *in vitro* and *in vivo*", *Exp. Cell Res.* 220(1):194-200 (Sep 1995).

Allsopp, R.C. *et al.*, "Telomerase is required to slow telomere shortening and extend replicative lifespan of HSC during serial transplantation", *Blood* (e-publicación) 27 Mar 2003.

Bodnar, A.G. *et al.*, "Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells" *Science* 279(5349):349-52 (16 enero 1998).

Cech, T.R. *et al.*, Patente en EE UU No. 6.093.809 (25 de julio, 2000).

Cech, T.R. *et al.*, Patente en EE UU No. 6.166.178 (26 Dic, 2000).

Cech, T.R. *et al.*, Patente en EE UU No. 6.261.836 (Jul 2001).

Chiu, C.P. *et al.*, "Replicative senescence and cell immortality: the role of telomeres and telomerase" *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 214(2):99-106 (Feb 1997).

Dagarag, M. *et al.*, "Differential impairment of lytic and cytokine functions in senescent human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxic T lymphocytes", *J. Virol.* 77(5):3077-83 (Mar 2003).

Farwell, D.G. *et al.*, "Genetic and epigenetic changes in human epithelial cells immortalized by telomerase", *American Journal of Pathology* 156(5):1537-47 (Mayo 2000).

Fujimoto, R. *et al.*, "Expression of telomerase components in oral keratinocytes and squamous cell carcinomas", *Oral Oncology* 37(2):132-40 (Feb 2001).

Funk, Walter D. *et al.*, "Telomerase expression restores dermal integrity to *in vitro*-aged fibroblasts in a reconstituted skin model", *Experimental Cell Research* 258(2):270-278 (1 de agosto, 2000).

Hannon, G.J. y Beach, D.H., "Increasing proliferative capacity and preventing replicative senescence by increasing telomerase activity and inhibiting pathways inhibiting cell proliferation", Publicación de solicitud internacional PCT No. WO 2000/031238 (Junio 2000).

Hannon, G. J. *et al.*, "Extension of cellular lifespan using telomerase-activating therapeutic agents", publicación de

- solicitud internacional PCT No. WO 99/35243 (Julio 1999).
- Harle-Bachor, C. *et al.*, "Telomerase activity in the regenerative basal layer of the epidermis in human skin and in immortal and carcinoma-derived skin keratinocytes", *Proc Natl Acad Sci USA* 93(13):6476-81 (25 de Junio 1996).
- 5 Harley, C.B. *et al.*, "Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts", *Nature* 345(6274):458-60 (31 de Mayo 1990).
- Harley, C.B. *et al.*, "Telomerase, cell immortality, and cancer", *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 59:307-15 (1994).
- Harley, C.B. *et al.*, "Telomeres and telomerase in aging and cancer", *Curr. Opin Genet. Dev.* 5(2):249-55 (Abr 1995).
- 10 Harley, C.B. *et al.*, "Telomerase and cancer", *Important Adv. Oncol.* 57-67 (1996).
- Harley, C.B., "Human aging and telomeres", *Ciba Found. Symp.* 211:129-39 (1997).
- Harley, C.B., "Telomerase is not an oncogene", *Oncogene* 21: 494-502 (2002)
- Henderson, S. *et al.*, "In situ analysis of changes in telomere size during replicative aging and cell transformation", *J. Cell Biol.* 134(1):1-12 (Jul 1996).
- 15 Jiang, X.R. *et al.*, Publicación PCT No. WO 02/91999.
- Jiang, X.R. *et al.*, "Telomerase expression in human somatic cells does not induce changes associated with a transformed phenotype", *Nature Genetics* 21(1):111-4 (Enero 1999).
- Kang, M.K. *et al.*, "Replicative senescence of normal human oral keratinocytes is associated with the loss of telomerase activity without shortening of telomeres", *Cell Growth & Differentiation* 9(1):85-95 (Enero 1998).
- 20 Kim, N.W. *et al.*, "Telomerase activity assays", Patente en EE UU No. 5.629.154 (Mayo 1997).
- Lee, K.M. *et al.*, "Immortalization with telomerase of the Nestin-positive cells of the human pancreas", *Biochem Biophys Res Commun* 301(4):1038-44 (21 Feb 2003).
- Ludwig, A. *et al.*, "Ribozyme cleavage of telomerase mRNA sensitizes breast epithelial cells to inhibitors of topoisomerase", *Cancer Res.*, 61: 3053-3061 (2001).
- 25 Mattson, M.P., "Emerging neuroprotective strategies for Alzheimer's disease: dietary restriction, telomerase activation, and stem cell therapy", *Exp Gerontol.* 35(4):489-502 (Jul 2000).
- Morales, C. P. *et al.*, "Absence of cancer-associated changes in human fibroblasts immortalized with telomerase", *Nature Genetics* 21(1):115-8 (Enero 1999).
- Oh, H. y Schneider, M.D., "The emerging role of telomerase in cardiac muscle cell growth and survival", *J Mol Cell Cardiol* 34(7):717-24 (Jul 2002).
- 30 Simonsen, J.L. *et al.*, "Telomerase expression extends the proliferative life-span and maintains the osteogenic potential of human bone marrow stromal cells", *Nat Biotechnol* 20(6):592-6 (Jun 2002).
- Thomas, M., Yang, L., y Hornsby, P.J., "Formation of functional tissue from transplanted adrenocortical cells expressing telomerase reverse transcriptase", *Nat Biotechnol* 18(1):39-42 (Enero 2000).
- 35 Vasa, M. *et al.*, "Nitric oxide activates telomerase and delays endothelial cell senescence", *Circ. Res.* 87(7):540-542 (2000).
- Villeponteau, B. *et al.*, Patente en EE UU No. 5.583.016 (Dic 1996).
- West, M.D. *et al.*, "Methods of screening for compounds that derepress or increase telomerase activity", Patente en EE UU No. 6.007.989 (Dic 1999).
- 40 White, M.A., "Assembly of telomerase components and chaperonins and methods and compositions for inhibiting or stimulating telomerase assembly", publicación de solicitud internacional PCT No. WO 2000/08135 (Feb. 2000).
- Yang, J. *et al.*, "Telomerized human microvasculature is functional in vivo", *Nature Biotechnology* (Estados Unidos) 19(3):219-24 (Mar 2001).
- Yang, J., *et al.*, "Human endothelial cell life extension by telomerase expression", *J. Biol. Chem.* 274(37):26141-8 (10 Sep 1999).
- 45 Yudoh, K. *et al.*, "Reconstituting telomerase activity using the telomerase catalytic subunit prevents the telomere shortening and replicative senescence in human osteoblasts", *J. Bone and Mineral Res.* 16(8):1453-1464 (2001).

Se han investigado métodos de aumentar la actividad telomerasa terapéuticamente por, por ejemplo, Bodnar (1997), White (2000), Hannon *et al.* (1999; 2000), Franzese *et al.* (2001), y Yudoh *et al.* (2001), todos citados anteriormente. En estos artículos, la actividad telomerasa se aumenta en general por sobreexpresión de hTERT, el gen que codifica el componente proteico de la telomerasa humana, o por expresión de proteínas que median el ensamblaje de la telomerasa, por ejemplo, proteínas de choque térmico (White). Franzese *et al.* describen que Saquinavir, un inhibidor de proteasa recetado para el tratamiento de la infección por VIH, aumentó la actividad telomerasa en células mononucleares de sangre periférica; Vasa *et al.* describieron la activación de la telomerasa, y un retraso resultante en senescencia endotelial, por administración de un precursor del óxido nítrico (NO).

Astragalósidos y ginsenósidos

60 Se han descrito compuestos de las familias de astragalósido y ginsenósido que tienen varios efectos biológicos. Las referencias que discuten la actividad biológica de los astragalósidos y ginsenósidos incluyen:

- Bedir, E. *et al.*, "Immunostimulatory effects of cycloartane-type triterpene glycosides from *Astragalus* species", *Biol & Pharm Bull* 23(7):834-7 (2000).
- 65 Binder, B. *et al.*, "Use of triterpensaponins, such as notoginsenoside R1 (NR1) and/or astragaloside (ASIV) for preparing medicaments", patente en EE UU No. 5.770.578 (Junio 1998).

- Calzada, L. *et al.*, "Effect of tetracyclic triterpenes (argentatins A, B and D) on the estradiol receptor of hormone-dependent tumors of human breast", *Medical Science Research* 23(12):815-16 (1995).
- Chen, X. *et al.*, "Protective effect of ginsenoside Rg1 on dopamin-induced apoptotic in PC12 cells", *Acta Pharmacol Sinica* 22(8):673-678 (2001).
- 5 Hashimoto, K. *et al.*, "Skin tissue regeneration promoters comprising ginsenoside Rb1", WO 200192289 (2001); EP 1295893 A1 (2003).
- Hong, H.-Y. *et al.*, "Stimulatory effects of ginsenoside-Rg₁ on p56^{lck} kinase and cell proliferation in Jurkat T cells", *Korean J. Ginseng Sci.* 19(2):117-21 (1995).
- 10 Huang, Y. *et al.*, "Selected non-timber forest products with medicinal applications from Jilin Province in China", Título de la conferencia: Forest communities in the third millennium: Linking research, business, and policy toward a sustainable non-timber forest product sector; Kenora, Ontario, Canadá, 1-4 Octubre, 1999; General Technical Report-North Central Research Station, USDA Forest Service (No.NC-217): p.93-101 (2000).
- Kaneko, M. *et al.*, "Accelerated recovery from cyclophosphamide-induced leukopenia in mice administered a Japanese ethical herbal drug, *Hochu-ekki-to*", *Immunopharmacology* 44(3):223-231 (1999).
- 15 Kinjo, J. *et al.*, "Anti-herpes virus activity of fabaceous triterpenoidal saponins", *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 23(7):887-9 (Jul 2000).
- Khushbaktova, Z. A. *et al.*, "Influence of cycloartanes from plants of the genus *Astragalus* and their synthetic analogs on the contractive function of the myocarbium and the activity of Na,K-ATPase", *Chem. Nat. Compounds* 30(4): 469-473 (1994).
- 20 Lee, Y.J. *et al.*, "Ginsenoside-Rg1, one of the major active molecules from *Panax ginseng*, is a functional ligand of glucocorticoid receptor", *Mol Cell Endocrinol* 133(2):135-40 (Oct 1997).
- Liu, P. *et al.*, "Effect of ginsenosides Rb1, Rg1, Rh1 and Re on proliferation of cells *in vitro*", *Tianran Chanwu Yanjiu Yu Kaifa* 8(4):36-41 (1996); CA Abstract No. 1997:400846.
- Oda, K. *et al.*, "Adjuvant and haemolytic activities of 47 saponins derived from medicinal and food plants", *Biol. Chem.* 381(1):67-74 (2000).
- 25 Pistelli, L., *et al.*, "Antimicrobial and antifungal activity of crude extracts and isolated saponins from *Astragalus verrucosus*", *Fitoterapia* 73(4):336-339 (2002).
- Prince, R.L. y Min, X., "Compositions and method for treating or preventing osteoporosis", publicación PCT No. WO 2001/01996.
- 30 Sengupta, S. *et al.*, "Pharmaceutically effective compounds and their use", publicaciones PCT Nos. WO 2002/69980 y WO 2002/07732.
- Wang, S. *et al.*, "Promoting effect of ginsenoside Re on the proliferation of murine bone marrow cells", *Baiqiuen Yike Daxue Xuebao* 23(2):141-142 (1997); CA Abstract No. 1997:570234.
- 35 Wang, Y-P. *et al.*, "Effect of astragaloside IV on T,B lymphocyte proliferation and peritoneal macrophage function in mice", *Acta Pharmacologica Sinica* 23(3):263-6 (Mar 2002).
- Yasukawa, K. *et al.*, "Sterol and triterpene derivatives from plants inhibit the effects of a tumor promoter, and sitosterol and betulinic acid inhibit tumor formation in mouse skin two-stage carcinogenesis", *Oncology* 48(1):72-6 (1991).
- 40 Yamamoto, M. *et al.*, "The stimulatory effects of ginseng saponins on proliferation and DNA synthesis of human vascular endothelial cells and skin fibroblasts in relation to cytokines or growth factors", *Nissei Byoin Igaku Zasshi* 24(1):12-13 (1996).
- Zhang W.J. *et al.*, "Regulation of the fibrinolytic potential of cultured human umbilical vein endothelial cells: astragaloside IV downregulates plasminogen activator inhibitor-1 and upregulates tissue-type plasminogen activator expression", *Journal of Vascular Research* 34(4):273-80 (Jul-Ag 1997).
- 45 Zi-Pu, L. y Qian, C., "Effects of astragaloside IV on myocardial calcium transport and cardiac function in ischemic rats", *Acta Pharmacol Sin* 23(10): 898-904 (Oct 2002).

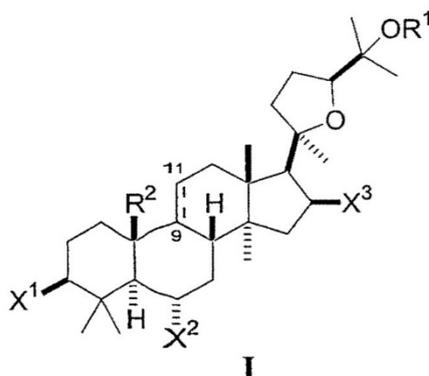
Sumario de la invención

50 La invención descrita en el presente documento en general se refiere a formulaciones para aumentar la actividad telomerasa en células. Tales composiciones pueden usarse en células *in vivo*, tales como células en crecimiento en tejidos de un sujeto, incluyendo sujetos humanos y animales no humanos, particularmente mamíferos no humanos.

55 En realizaciones particulares, las composiciones comprenden un compuesto de fórmula I, como se define en las reivindicaciones. Los aspectos de la invención incluyen formulaciones de tales compuestos para su uso en aplicaciones cosméticas, nutracéuticas y farmacéuticas, en particular en aplicaciones donde aumentar la actividad telomerasa en células se muestra que es, o se espera que sea, beneficioso.

60 La presente invención incluye, en un aspecto, una formulación para su uso en un método de aumentar la actividad telomerasa en una célula o tejido. La formulación comprende un compuesto aislado de fórmula I, para su uso en el tratamiento de una enfermedad como se define en la reivindicación 1. El método puede comprender además la etapa preliminar de identificar una célula o tejido en el que se desea un aumento en la actividad telomerasa. En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método no terapéutico para reparar defectos en la superficie de la piel para la mejora cosmética que comprende aplicar un compuesto aislado como se define en la reivindicación 7.

65 La presente divulgación describe compuestos de fórmula I, II y III. En compuestos de fórmula I:

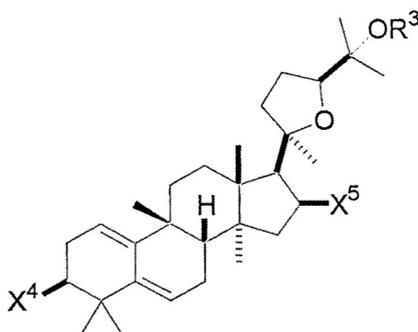


5 cada uno de X^1 , X^2 y X^3 se selecciona independientemente de hidroxilo, alcoxi inferior, aciloxi inferior, ceto, y un glucósido;
 OR¹ se selecciona de hidroxilo, alcoxi inferior, aciloxi inferior, y un glucósido;
 en donde cualquiera de los grupos hidroxilo en dicho glucósido puede estar sustituido con un glucósido adicional, alquilo inferior, o acilo inferior, de modo que el compuesto incluye un máximo de tres glucósidos; y
 10 R^2 es metilo y $\text{---}=\text{---}$ representa un doble enlace entre los carbonos 9 y 11; o, en realizaciones preferidas, R^2 forma, junto con el carbono 9, un anillo de ciclopropilo fusionado, y $\text{---}\text{---}$ representa un enlace sencillo entre los carbonos 9 y 11.

15 Preferentemente, el compuesto incluye cero, uno, o dos, más preferentemente cero o dos, glucósidos, ninguno de los cuales está sustituido con un glucósido adicional. Preferentemente, los glucósidos son de la configuración D (natural).

En realizaciones seleccionadas de fórmula I, cada uno de X^1 y X^2 se selecciona independientemente de hidroxilo, alcoxi inferior, aciloxi inferior, y un glucósido y X^3 se selecciona de hidroxilo, alcoxi inferior, aciloxi inferior, ceto, y un glucósido. En realizaciones adicionales, X^1 es OH o un glucósido, cada uno de X^2 y OR¹ es independientemente OH o un glucósido; y X^3 es OH o ceto. Los compuestos ejemplares de fórmula I incluyen astragalósido IV, cicloastragenol, astragenol, astragalósido IV 16-ona, cicloastragenol 6- β -D-glucopiranosido y cicloastragenol 3- β -D-xilopiranosido. En realizaciones seleccionadas, el compuesto se selecciona de astragalósido IV, cicloastragenol, astragenol y astragalósido IV 16-ona. En una realización, el compuesto es astragalósido IV.

25 En compuestos de fórmula II:

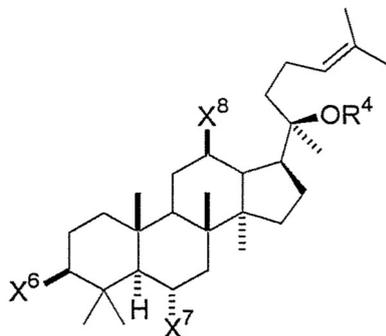


30 cada uno de X^4 y X^5 se selecciona independientemente de hidroxilo, alcoxi inferior, aciloxi inferior, ceto, y un glucósido, y
 OR³ se selecciona de hidroxilo, alcoxi inferior, aciloxi inferior, y un glucósido,
 en donde cualquiera de los grupos hidroxilo en dicho glucósido puede estar sustituido con un glucósido adicional, alquilo inferior, o acilo inferior, de modo que el compuesto incluye un máximo de tres glucósidos.

35 Preferentemente, el compuesto incluye cero, uno, o dos glucósidos, ninguno de los cuales está sustituido con un glucósido adicional. Preferentemente, los glucósidos son de la configuración D.

En realizaciones seleccionadas de fórmula II, cada uno de X^4 y OR³ se selecciona de hidroxilo, alcoxi inferior, aciloxi inferior, y un glucósido, y X^5 se selecciona de hidroxilo, alcoxi inferior, aciloxi inferior, y ceto (=O). En realizaciones adicionales X^4 es OH o un glucósido, y cada uno de X^5 y OR³ es OH. En una realización, X^4 es OH.

En compuestos de fórmula III:



III

5 cada uno de X⁶, X⁷ y X⁸ se selecciona independientemente de hidroxilo, alcoxi inferior, aciloxi inferior, ceto, y un glucósido, y OR⁴ se selecciona de hidroxilo, alcoxi inferior, aciloxi inferior, y un glucósido, en el que cualquiera de los grupos hidroxilo en dicho glucósido puede estar sustituido con un glucósido adicional, alquilo inferior, o acilo inferior, de modo que el compuesto incluye un máximo de tres glucósidos.

10 Preferentemente, el compuesto incluye cero, uno, o dos glucósidos, ninguno de los cuales está sustituido con un glucósido adicional. Preferentemente, los glucósidos son de la configuración D.

15 En realizaciones seleccionadas de fórmula III, cada uno de X⁶, X⁷, X⁸ y OR⁴ se selecciona independientemente de hidroxilo, alcoxi inferior, aciloxi inferior, y un glucósido, y preferentemente se selecciona de hidroxilo y un glucósido. En realizaciones adicionales, cada uno de X⁸ y OR⁴ es OH, y cada uno de X⁶ y X⁷ se selecciona independientemente de hidroxilo y un glucósido. En realizaciones aun adicionales, cada uno de OR⁴, X⁶ y X⁸ es OH y X⁷ es un glucósido. Un compuesto ejemplar de fórmula III es ginsenósido RH1.

20 Un compuesto preferido de fórmula I, II o III anteriormente, cuando se formula en un disolvente a una concentración de 1 µg/ml o menos, es eficaz para producir un nivel de actividad telomerasa en queratinocitos o fibroblastos, medido en un ensayo TRAP, al menos un 50 % mayor que el nivel en dichas células tratadas con dicho disolvente, medido en un ensayo TRAP como se describe en el presente documento. En realizaciones preferidas adicionales, el compuesto es eficaz para producir un nivel de actividad telomerasa en queratinocitos o fibroblastos, medido en un ensayo TRAP, al menos un 100 % mayor que el nivel en dichas células tratadas con dicho disolvente, medido en un ensayo TRAP como se describe en el presente documento.

30 Los compuestos ejemplares de fórmulas I-III incluyen los representados en la Figura 1 y designados en el presente documento como 1 (astragalósido IV), 2 (cicloastragenol), 3 (astragenol), 4 (astragalósido IV 16-ona), 5 (20R,24S-epoxi-3β,16β,25-trihidroxi-9β-metil-19-norlanost-1,5-dieno), 6 (cicloastragenol 6-β-D-glucopiranosido), 7 (cicloastragenol 3-β-D-xilopiranosido), y 8 (ginsenósido RH1). En realizaciones seleccionadas, el compuesto se selecciona de los designados en el presente documento como 1 (astragalósido IV), 2 (cicloastragenol), 3 (astragenol), 4 (astragalósido IV 16-ona), 5 (20R,24S-epoxi-3β,16β,25-trihidroxi-9β-metil-19-norlanost-1,5-dieno), 6 (cicloastragenol 6-β-D-glucopiranosido), y 7 (cicloastragenol 3-β-D-xilopiranosido). En realizaciones adicionales, el compuesto se selecciona de los designados en el presente documento como 1, 2, 3, 4 y 5. En una realización, el compuesto es astragalósido IV (1) o cicloastragenol (2).

40 La presente divulgación describe un método de poner en contacto una formulación de un compuesto aislado de fórmula I, II, o III con una célula o tejido que puede comprender, antes de dicha puesta en contacto, identificar una célula o tejido en el que se desea un aumento en la actividad telomerasa. Los beneficios que se van a producir al aumentar la actividad telomerasa en una célula o tejido incluyen, por ejemplo, aumento de la capacidad de replicación y/o la longevidad de dicha célula o células en dicho tejido.

45 El método puede incluir diagnosticar una afección en un sujeto de tal manera que se desee aumentar la actividad telomerasa en las células o tejido del sujeto, y administrar la formulación al sujeto. El sujeto es preferentemente un sujeto mamífero, tal como un sujeto o paciente humano. Tales afecciones pueden incluir, por ejemplo, infección por VIH, diversas enfermedades degenerativas, tales como enfermedad neurodegenerativa, enfermedad degenerativa de los huesos o articulaciones, degeneración macular, aterosclerosis y anemia. Tales afecciones también incluyen heridas y otras afecciones agudas o crónicas de la epidermis, tales como, por ejemplo, una quemadura, una abrasión, una incisión, un sitio de injerto, una lesión causada por un agente infeccioso, una úlcera venosa crónica, una úlcera diabética, una úlcera de compresión, úlceras de decúbito, una úlcera mucosa, y formación de queloides.

La invención proporciona una formulación para su uso en métodos de tratar una afección en un paciente, tales como las indicadas anteriormente, aumentando la actividad telomerasa en células o tejido del paciente, comprendiendo la formulación un compuesto aislado de fórmula I, como se define en la reivindicación 1. Las composiciones pueden administrarse por diversas vías, por ejemplo, oral, tópica o parenteralmente.

La presente divulgación proporciona además un método de diagnosticar en un sujeto un estado de enfermedad sujeto a tratamiento aumentando la actividad telomerasa en una célula o tejido del sujeto, y administrar un compuesto de fórmula I, II o III como se ha descrito anteriormente, preferentemente un compuesto de fórmula I o II, en un vehículo farmacéutico, al sujeto en necesidad de tal tratamiento.

En un aspecto adicional, la invención proporciona una formulación para su uso en un método de tratar una afección aguda o crónica de la epidermis, que comprende poner en contacto células epidérmicas con una formulación tópica de un compuesto aislado de fórmula I, como se define en la reivindicación 1. En realizaciones preferidas, el compuesto es de fórmula I o fórmula II. En realizaciones adicionales, el compuesto se selecciona de astragalósido IV, cicloastragenol, astragenol, astragalósido IV 16-ona, cicloastragenol 6-β-D-glucopiranosido, cicloastragenol 3-β-D-xilopiranosido, y 20R,24S-epoxi-3β,16β,25-trihidroxi-9β-metil-19-norlanost-1,5-dieno (designado en el presente documento como 5).

Las células con las que la formulación se pone en contacto también pueden incluir células en explante que se ponen en contacto *ex vivo*, por ejemplo, para terapias celulares, u otras células en cultivo. En consecuencia, la presente divulgación proporciona un método de potenciar la capacidad de replicación de células *in vitro* o *ex vivo*, que comprende poner en contacto dichas células con una cantidad eficaz de una composición que comprende un compuesto de fórmula I, de fórmula II o de fórmula III, como se ha definido anteriormente, incluyendo realizaciones seleccionadas de los compuestos como se ha definido anteriormente. En realizaciones preferidas, el compuesto es de fórmula I o de fórmula II, incluyendo realizaciones seleccionadas de los compuestos como se ha definido anteriormente. En general, las células son células de mamífero no transformadas; en realizaciones seleccionadas, las células son células madre, tal como células madre de médula ósea, células estromales de médula ósea, fibroblastos dérmicos jóvenes o de pase temprano, células precursoras de islotes, células de neuroesfera, células corticosuprarrenales, células satélite de músculo, osteoblastos, células epiteliales pigmentadas retinianas, y células CD8⁺ restringidas a VIH.

En un aspecto relacionado, la divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende, en un vehículo farmacéuticamente aceptable, un compuesto de fórmula I como se ha representado anteriormente donde:

cada uno de X¹ y X² se selecciona independientemente de hidroxilo, alcoxi inferior, aciloxi inferior, ceto, y un glucósido; X³ es ceto;

OR¹ se selecciona de hidroxilo, alcoxi inferior, aciloxi inferior, y un glucósido;

en donde cualquiera de los grupos hidroxilo en dicho glucósido puede estar sustituido con un glucósido adicional, alquilo inferior, o acilo inferior, de modo que el compuesto incluye un máximo de tres glucósidos; y

R² es metilo y  representa un doble enlace entre los carbonos 9 y 11; o, en realizaciones preferidas, R² forma, junto con el carbono 9, un anillo de ciclopropilo fusionado, y  representa un enlace sencillo entre los carbonos 9 y 11.

Preferentemente, el compuesto incluye, cero, uno o dos glucósidos, ninguno de los cuales está sustituido con un glucósido adicional, y los glucósidos son de la configuración D.

En realizaciones seleccionadas de la composición X¹ es OH o un glucósido, y cada uno de X² y OR¹ es independientemente OH o un glucósido. En una realización, el compuesto es astragalósido IV 16-ona (designado en el presente documento como 4).

Alternativamente, la composición comprende, en un vehículo farmacéuticamente aceptable, un compuesto de fórmula I como se representa anteriormente, donde:

uno de X¹ y X² se selecciona de hidroxilo, alcoxi inferior, aciloxi inferior, y ceto, y el otro es un glucósido; y

cada uno de X³ y OR¹ es independientemente hidroxilo, alcoxi inferior, aciloxi inferior, y un glucósido;

en el que cualquiera de los grupos hidroxilo en dicho glucósido puede estar sustituido con un glucósido adicional, alquilo inferior, o acilo inferior, de modo que el compuesto incluye un máximo de tres glucósidos; y

R² es metilo y  representa un doble enlace entre los carbonos 9 y 11; o, en realizaciones preferidas, R² forma, junto con el carbono 9, un anillo de ciclopropilo fusionado, y  representa un enlace sencillo entre los carbonos 9 y 11.

Preferentemente, el compuesto incluye un glucósido, que no está sustituido con un glucósido adicional, y que es de la configuración D. En una realización, el compuesto se selecciona de cicloastragenol 6-β-D-glucopiranosido (designado en el presente documento como 6) y cicloastragenol 3-β-D-xilopiranosido (designado en el presente como 7).

Alternativamente, la composición farmacéutica comprende, en un vehículo farmacéuticamente aceptable, un compuesto de fórmula II como se ha definido anteriormente. Las realizaciones seleccionadas del compuesto también son como se ha definido anteriormente. En una realización, el compuesto es el designado en el presente documento como 5.

5 La presente divulgación también proporciona compuestos de fórmula II como se han definido anteriormente, incluyendo realizaciones seleccionadas como se han definido anteriormente. En una realización, el compuesto es el designado en el presente documento como 5.

10 En un aspecto relacionado, la presente divulgación proporciona una formulación farmacéutica tópica de un compuesto aislado de fórmula I, de fórmula II o de fórmula III, como se han definido anteriormente. Las realizaciones seleccionadas de los compuestos también se definen anteriormente. En realizaciones preferidas, el compuesto es de fórmula I o fórmula II. En realizaciones adicionales, el compuesto se selecciona de astragalósido IV, cicloastragenol, astragenol, astragalósido IV 16-ona, cicloastragenol 6-β-D-glucopiranosido y cicloastragenol 3-β-D-xilopiranosido y 20R,24S-epoxi-3β,16β,25-trihidroxi-9β-metil-19-norlanost-1,5-dieno (designado en el presente documento como 5). La formulación tópica comprende típicamente uno o más componentes seleccionados del grupo que consiste en un emulsionante, un espesante y un emoliente de la piel. Tales composiciones pueden usarse para el tratamiento de heridas u otras afecciones agudas o crónicas de la epidermis.

20 En otro aspecto relacionado, la presente divulgación proporciona composiciones nutracéuticas que comprenden una formulación nutracéutica de un compuesto aislado de fórmula I, de fórmula II o de fórmula III, como se ha definido anteriormente. Las realizaciones seleccionadas de los compuestos también se definen anteriormente. En realizaciones preferidas el compuesto es de fórmula I o fórmula II, incluyendo realizaciones seleccionadas como se han definido anteriormente. En realizaciones adicionales, el compuesto se selecciona de astragalósido IV, cicloastragenol, astragenol, astragalósido IV 16-ona, cicloastragenol 6-β-D-glucopiranosido, cicloastragenol 3-β-D-xilopiranosido, y 20R,24S-epoxi-3β,16β,25-trihidroxi-9β-metil-19-norlanost-1,5-dieno (designado en el presente documento como 5). En realizaciones adicionales, la formulación nutracéutica comprende, además del compuesto aislado de fórmula I, II o III, un extracto de hierbas nutracéutico, que puede ser un extracto de *Astragalus membranaceus*.

30 Un compuesto aislado de fórmula I, II o III, como se ha definido anteriormente, incluyendo realizaciones seleccionadas como se han descrito anteriormente, también puede usarse para la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad sujeta a tratamiento aumentando la actividad telomerasa en una célula o tejido. Los ejemplos de tales enfermedades se discuten en más detalle posteriormente. De forma similar, un compuesto aislado de fórmula I, II o III, como se ha definido anteriormente, incluyendo realizaciones seleccionadas como se han descrito anteriormente, también puede usarse para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una afección crónica o aguda de la epidermis. En realizaciones preferidas de tales usos, el compuesto aislado es de fórmula I o fórmula II, incluyendo realizaciones seleccionadas de fórmula I o fórmula II como se describe anteriormente.

40 También se desvela un método de seleccionar un compuesto eficaz para aumentar la actividad telomerasa en una célula. Según este método, un derivado de un compuesto de fórmula I, fórmula II, fórmula III, como se ha definido anteriormente, se ensaya para su capacidad de aumentar la actividad telomerasa en queratinocitos o fibroblastos, medido por un ensayo TRAP como se describe en el presente documento. El derivado se selecciona si, cuando se formula en un disolvente a una concentración de 1 μg/ml o menos, es eficaz para producir un nivel de actividad telomerasa en queratinocitos o fibroblastos, medido en un ensayo TRAP, al menos un 50 % mayor, y preferentemente al menos un 100 % mayor, que ese medido en dichas células tratadas con dicho disolvente. El derivado puede formularse después con un vehículo tópico, farmacéutico o nutracéutico.

50 También se desvela, en un aspecto relacionado, un método de seleccionar un agente para el tratamiento de afecciones agudas o crónicas de la epidermis. Según este método, un derivado de un compuesto de fórmula I, fórmula II, fórmula III, como se ha definido anteriormente, se ensaya para la actividad de cicatrización de heridas en queratinocitos o fibroblastos, en un ensayo de arañazo como se describe en el presente documento. El derivado se selecciona si tiene una actividad cicatrizante medida en un ensayo de arañazo, a una concentración de 1 μg/ml, al menos un 50 % mayor que la de un control de disolvente, preferentemente al menos un 100 % mayor que la de un disolvente control. El derivado puede formularse después con un vehículo tópico.

55 Estos y otros objetos y rasgos de la invención serán más completamente evidentes cuando se lea la siguiente descripción detallada junto con los dibujos acompañantes. Nótese que el alcance de la invención se define por las reivindicaciones. Cualquier materia objeto que cae fuera del alcance de las reivindicaciones se proporciona solamente para fines de información. Cualquier referencia en la descripción a métodos de tratamiento se refiere a los compuestos, las composiciones farmacéuticas y los medicamentos de la presente invención para su uso en un método de tratamiento del cuerpo humano (o animal) por terapia.

Breve descripción de los dibujos

65 Las Figuras 1A-H muestran las estructuras de compuestos ejemplares para su uso en los métodos y composiciones descritos en el presente documento.

La Figura 2 muestra un aumento de la actividad telomerasa en queratinocitos neonatales tratados con **2** (cicloastragenol), medido en un ensayo TRAP.

5 La Figura 3 muestra un aumento de la actividad telomerasa en queratinocitos neonatales por **1** (astragalósido IV), en comparación con EGF (10 nM) y un control de disolvente, medido en un ensayo TRAP.

La Figura 4 es una serie de imágenes generadas por ordenador que muestran la actividad cicatrizante de **1** (astragalósido IV) en queratinocitos adultos que envejecen, medido en un "ensayo de arañazo".

10 La Figura 5 es una serie de imágenes generadas por ordenador que muestran la actividad cicatrizante de **1** (astragalósido IV) y **2** (cicloastragenol) en queratinocitos neonatales jóvenes.

15 La Figura 6 es una serie de imágenes generadas por ordenador que muestran la actividad cicatrizante de **1** (astragalósido IV) en queratinocitos que envejecen, solo y en presencia de un oligonucleótido inhibidor de telomerasa (GRN163) o un oligonucleótido control (GRN137227).

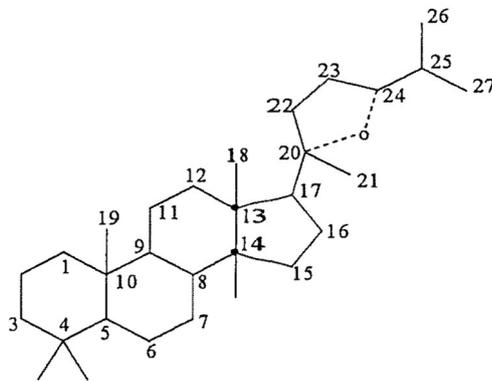
20 La Figura 7 es un gráfico que muestra la actividad cicatrizante de **1** (astragalósido IV) en queratinocitos neonatales que envejecen, en presencia y ausencia del inhibidor de telomerasa GRN163, y en comparación con PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas) ~2 nM.

Descripción detallada de la invención

I. Definiciones

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

30 Se muestra a continuación un esquema general de numeración de átomos de carbono usado para la nomenclatura de los compuestos descritos en el presente documento. (Nótese que los compuestos de estructura II carecen del carbono 19, y los compuestos de estructura III carecen del carbono 18 mostrado en este esquema. En consecuencia, no se pretende que el esquema de numeración limite las composiciones de la invención).



35 "Alquilo" se refiere a un radical monovalente acíclico completamente saturado que contiene carbono e hidrógeno, que puede ser ramificado o lineal. Los ejemplos de grupos alquilo son metilo, etilo, n-butilo, t-butilo, n-heptilo, e isopropilo. "Alcoxi" se refiere a un grupo de forma OR, donde R es alquilo como se ha definido anteriormente. "Aciloxi" se refiere a un grupo de la forma -OC(=O)R, donde R es alquilo como se ha definido anteriormente. Según esto, "acilo" se refiere al grupo -C(=O)R.

40 "Alquilo inferior" (o alcoxi inferior, o aciloxi inferior) se refiere a tal grupo que tiene de uno a seis átomos de carbono; en realizaciones seleccionadas, tales grupos incluyen de uno a cuatro átomos de carbono, uno o dos átomos de carbono, o un átomo de carbono (es decir, metilo, metoxi, acetiloxi).

45 "Células madre" se refiere a células relativamente no diferenciadas de un linaje común que retienen la capacidad de dividirse y ciclar durante toda la vida postnatal, para proporcionar células que se pueden diferenciar más y especializarse (por ejemplo, células madre en las capas basales de la piel o en tejido hematopoyético, tal como células primitivas en la médula ósea de las que derivan todos los diferentes tipos de células sanguíneas).

50 Mediante "eficaz para aumentar la actividad telomerasa en una célula", con referencia a un compuesto, se quiere decir que una composición que contiene el compuesto a una concentración de 1 µg/ml o menos es eficaz para producir un nivel de actividad telomerasa en un queratinocito o fibroblasto, medido en un ensayo TRAP como se describe en el

presente documento, que es mayor, en un factor de al menos 1,5 (es decir, al menos un 50 % mayor) que el nivel producido por una formulación similar que no contiene el compuesto, medido en un ensayo TRAP. En realizaciones preferidas, el compuesto es eficaz, a una concentración de 1 µg/ml o menos, para producir un nivel de actividad telomerasa en tal célula, medido en un ensayo TRAP como se describe en el presente documento, que es mayor en un factor de al menos 2 (es decir, al menos un 100 % mayor) que el nivel producido por una formulación similar que no contiene el compuesto.

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

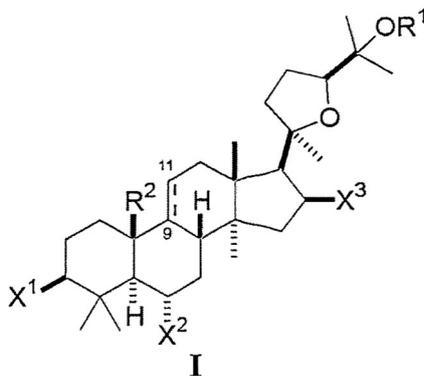
En concentraciones expresadas en el presente documento como % (p/v), un 100 % (p/v) corresponde a 1 g de soluto/ml de disolvente. Por ejemplo, el 0,1 % (p/v) = 1 mg/ml.

Una "formulación de un compuesto aislado" se refiere a una formulación preparada combinando el compuesto aislado con uno o más otros ingredientes (que pueden ser ingredientes activos o inactivos) para producir la formulación. Donde el compuesto se ha purificado directamente de una fuente natural, la frase "compuesto aislado" requiere que el compuesto (antes de la formulación) se haya purificado no menos de 100 veces comparado con la pureza del compuesto en la fuente natural. Donde el compuesto no se purifica directamente de una fuente natural, la frase "compuesto aislado" se refiere a un compuesto que (antes de la formulación) se ha producido por un proceso que implica una o más etapas de síntesis química, produciendo una preparación del compuesto que no tiene menos del 5 % (p/p) de pureza.

II. Métodos y composiciones para aumentar la actividad telomerasa

De acuerdo con la presente divulgación, se proporcionan composiciones y métodos para aumentar la actividad telomerasa en una célula. De acuerdo con el método, una célula o tejido se pone en contacto con una formulación de un compuesto aislado de fórmula I, II o III como se divulga en el presente documento, en una cantidad eficaz para aumentar la actividad telomerasa en la célula o tejido, relativa al nivel de actividad telomerasa en la célula o tejido en ausencia del compuesto. El método también puede incluir una etapa preliminar de identificar una célula o tejido en que se desea una actividad telomerasa aumentada.

En una realización, el compuesto está representado por la fórmula I:



En la fórmula I, cada uno de X¹, X² y X³ se selecciona independientemente de hidroxilo, alcoxi inferior, aciloxi inferior, ceto, y un glucósido, y el grupo OR¹ se selecciona de hidroxilo, alcoxi inferior, aciloxi inferior, y un glucósido. En realizaciones seleccionadas, cada uno de X¹ y X² se selecciona independientemente de hidroxilo, alcoxi inferior, aciloxi inferior, y un glucósido.

En realizaciones seleccionadas de fórmula I, R² es metilo y \equiv representa un doble enlace entre los carbonos 9 y 11, como se representa. De acuerdo con la presente invención, R² forma, junto con el carbono 9, un anillo de ciclopropilo fusionado, y \equiv representa un enlace sencillo entre los carbonos 9 y 11, como se muestra, por ejemplo, en el compuesto 1 (véase, la figura 1).

Mediante un "glucósido", como se usa en el presente documento en referencia a cualquiera de los compuestos objeto de fórmulas I, II, o III (o derivados de los mismos), se quiere decir uno de los glucósidos conocidos (es decir, ribósido, arabinósido, xilósido, lixósido, altrósido, glucósido, manósido, gulósido, idósido, galactósido, y talósido). El glucósido típicamente está en la forma de anillo de seis miembros (piranósido), por ejemplo, glucopiranósido o manopiranósido. En realizaciones seleccionadas, el glucósido es un D-glucósido, es decir, tiene la configuración encontrada en

monosacáridos naturales. Ejemplos específicos incluyen, D-ribopiranosido, D-arabinopiranosido, D-xilopiranosido, D-glucopiranosido, manopiranosido y D-galactopiranosido. Los glucósidos preferidos incluyen D-glucopiranosido y D-xilopiranosido. En realizaciones adicionales, la unión es de la configuración β ; por ejemplo, β -D-glucopiranosido.

5 Cualquiera de los grupos hidroxilo libres en un anillo glucósido presente en los compuestos objeto de fórmulas **I**, **II** o **III** (o derivados de los mismos) puede estar sustituido adicionalmente con un glucósido adicional, alquilo inferior, o acilo inferior, por ejemplo, metoxi o acetiloxi. Preferentemente, como mucho uno de tal grupo hidroxilo está sustituido con un glucósido adicional. Más preferentemente, ninguno de tal grupo hidroxilo está sustituido con un glucósido adicional, es decir, la sustitución es acilo inferior, tal como acetilo, o alquilo inferior, tal como metilo. En una realización, todos los grupos hidroxilo en el glucósido o glucósidos están sin sustituir.

15 Preferentemente, un compuesto objeto de fórmula **I**, **II** o **III** (o un derivado de los mismos) incluye un máximo de tres glucósidos, más preferentemente un máximo de dos glucósidos. En realizaciones seleccionadas, el compuesto incluye cero, uno o dos glucósidos, ninguno de los cuales está sustituido con un glucósido adicional. En realizaciones seleccionadas adicionales, particularmente con respecto a la fórmula **I**, el compuesto incluye cero o dos glucósidos, ninguno de los cuales está sustituido con un glucósido adicional.

20 En realizaciones seleccionadas de fórmula **I**, cada uno de X^1 y X^2 se selecciona independientemente de hidroxilo, alcoxi inferior, aciloxi inferior, glucopiranosido, y xilopiranosido, y X^3 se selecciona de hidroxilo, alcoxi inferior, aciloxi inferior, ceto, glucopiranosido, y xilopiranosido, preferentemente de hidroxilo, alcoxi inferior, aciloxi inferior, y ceto.

25 En realizaciones seleccionadas de fórmula **I**, X^1 se selecciona de hidroxilo, alcoxi inferior, aciloxi inferior y β -D-xilopiranosido; X^2 se selecciona de hidroxilo, alcoxi inferior, aciloxi inferior y β -D-glucopiranosido; X^3 se selecciona de hidroxilo, alcoxi inferior, aciloxi inferior, y ceto (=O); y OR^1 se selecciona de hidroxilo, alcoxi inferior, aciloxi inferior, y β -D-glucopiranosido.

30 En realizaciones seleccionadas adicionales de fórmula **I**, X^1 es OH o un glucósido, cada uno de X^2 y OR^1 es independientemente OH o un glucósido, y X^3 es OH o ceto. En realizaciones adicionales, cada uno de X^1 y X^2 es OH o un glucósido, OR^1 es OH, y X^3 es OH. De acuerdo con la invención, X^1 es β -D-xilopiranosido, X^2 es β -D-glucopiranosido, OR^1 es OH, y X^3 es OH. En otra realización de la presente invención, cada uno de X^1 , X^2 , X^3 y OR^1 es OH.

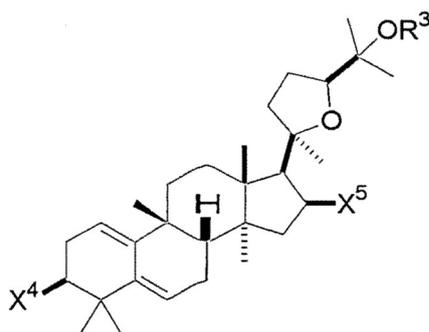
35 Para cada una de estas realizaciones descritas, las realizaciones adicionales incluyen compuestos en los que R^2 es metilo y \equiv representa un doble enlace y otras realizaciones, generalmente preferidas, incluyen compuestos en los que R^2 forma, junto con el carbono 9, un anillo de ciclopropilo fusionado.

40 Los compuestos ejemplares de estructura **I** para su uso en los métodos de la invención incluyen los mostrados en la Figura 1, y designados en el presente documento como **1** (astragalósido IV), **2** (cicloastragenol), **3** (astragenol), **4** (astragalósido IV 16-ona), **6** (cicloastragenol 6- β -D-glucopiranosido) y **7** (cicloastragenol 3- β -D-xilopiranosido).

45 Otros compuestos que tienen la estructura esqueleto de cicloastragenol (**2**) sustituido con un 3- β -D-glucopiranosido también se consideran para su uso en los métodos de la invención. Preferentemente, el compuesto incluye un total de uno o dos glucósidos, unidos a carbonos separados de la estructura esqueleto (es decir, un glucósido no está unido a un glucósido adicional). Los ejemplos incluyen los compuestos naturales astragalósidos A, 1, 2, y 7, así como las astraverrucinas I y II (que pueden aislarse de *Astragalus verrucosus*).

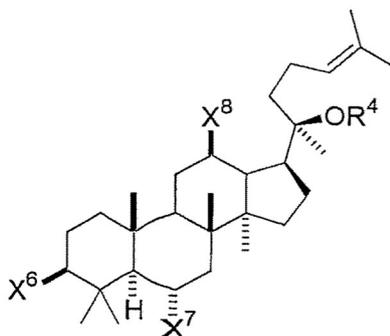
50 La invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más compuestos de fórmula **I**, en los que uno de X^1 y X^2 es como se define en la reivindicación 1. En realizaciones adicionales, los compuestos se seleccionan de los designados **6** y **7**. En otras realizaciones, la composición farmacéutica incluye un compuesto de fórmula **I** en el que X^3 es ceto; en una realización, el compuesto es el compuesto designado como **4**.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden compuestos representados por la fórmula **II**.



II

- 5 En la fórmula II, cada uno de X⁴ y X⁵ se selecciona independientemente de hidroxilo, alcoxi inferior, aciloxi inferior, ceto, y un glucósido, y OR³ se selecciona de hidroxilo, alcoxi inferior, aciloxi inferior, y un glucósido; donde "glucósido" y sus diversas realizaciones son como se ha descrito anteriormente. Como se ha indicado anteriormente, el compuesto incluye un máximo de tres glucósidos, más preferentemente, un máximo de dos glucósidos. En realizaciones seleccionadas, el compuesto incluye cero, uno o dos glucósidos, ninguno de los cuales está sustituido con un glucósido adicional.
- 10 En realizaciones seleccionadas de fórmula II, X⁴ se selecciona de hidroxilo, alcoxi inferior, aciloxi inferior, y un glucósido. En realizaciones adicionales, cada uno de X⁴, X⁵ y OR³ se selecciona independientemente de hidroxilo, alcoxi inferior, aciloxi inferior, glucopiranosido y xilopiranosido.
- 15 En realizaciones adicionales de fórmula II, cada uno de X⁴ y OR³ se selecciona de hidroxilo, alcoxi inferior, aciloxi inferior y un glucósido, preferentemente, D-xilopiranosido o D-glucopiranosido, y X⁵ se selecciona hidroxilo, alcoxi inferior, aciloxi inferior, y ceto (=O). Preferentemente, en estas realizaciones, OR³ se selecciona de hidroxilo, alcoxi inferior, y aciloxi inferior, y es más preferentemente hidroxilo.
- 20 En realizaciones adicionales de fórmula II, cada uno de X⁴, X⁵ y OR³ es independientemente OH o un glucósido, por ejemplo, D-xilopiranosido o D-glucopiranosido. En realizaciones aún adicionales, X⁴ es OH o un glucósido, y cada uno de X⁵ y OR³ es OH. En un aspecto, cada uno de X⁴, X⁵ y OR³ es OH. Este compuesto (formalmente nombrado 20R,24S-epoxi-3β,16β,25-trihidroxi-9β-metil-19-norlanost-1,5-dieno) se designa en el presente documento como **5**.
- 25 La presente divulgación también proporciona compuestos de fórmula II, anteriormente, donde cada uno de X⁴ y X⁵ se selecciona independientemente de hidroxilo, alcoxi inferior, aciloxi inferior, ceto, y un glucósido, y OR³ se selecciona de hidroxilo, alcoxi inferior, aciloxi inferior, y un glucósido, en donde cualquiera de los grupos hidroxilo en dicho glucósido puede estar sustituido con un glucósido adicional, alquilo inferior o acilo inferior. En realizaciones seleccionadas, el compuesto incluye cero, uno o dos glucósidos. Preferentemente cada uno de dicho glucósido, cuando está presente, es de la configuración D. En realizaciones adicionales, cada uno de X⁴ y OR³ se selecciona de hidroxilo, alcoxi inferior, aciloxi inferior y un glucósido, y X⁵ se selecciona hidroxilo, alcoxi inferior, aciloxi inferior, y ceto (=O). En realizaciones aún adicionales, X⁴ es OH o un glucósido, y cada uno de X⁵ y OR³ es OH. En una realización, cada uno de X⁴, X⁵ y OR³ es OH, es decir, el compuesto designado en el presente documento como **5**.
- 35 En un aspecto adicional, la presente divulgación proporciona un método de aumentar la telomerasa en una célula o tejido, poniendo en contacto la célula o tejido con una formulación de un compuesto aislado de fórmula III. De nuevo, el método puede incluir la etapa de identificar una célula o tejido en que se desea un aumento en actividad telomerasa.



III

En la fórmula **III**, cada uno de X⁶, X⁷, X⁸ y OR⁴ se selecciona independientemente de hidroxilo, alcoxi inferior, aciloxi inferior, ceto, y un glucósido, donde "glucósido" y sus diversas realizaciones son como se ha descrito anteriormente. Preferentemente, el compuesto incluye un máximo de dos glucósidos, más preferentemente, un máximo de un glucósido, ninguno de los cuales está sustituido con un glucósido adicional. Los glucósidos preferidos incluyen D-glucopiranosido y D-xilopiranosido.

En realizaciones seleccionadas de la estructura **III**, cada uno de X⁶, X⁷, X⁸ y OR⁴ se selecciona independientemente de hidroxilo, alcoxi inferior, aciloxi inferior, y un glucósido, y preferentemente se selecciona de hidroxilo y un glucósido.

En realizaciones adicionales de la estructura **III**, cada uno de X⁸ y OR⁴ es OH, y cada uno de X⁶ y X⁷ se selecciona independientemente de hidroxilo y un glucósido, por ejemplo, β-D-glucopiranosido. En realizaciones adicionales, OR⁴ es OH. Preferentemente cada uno de X⁶ y X⁸ es también OH y X⁷ es un glucósido. Un compuesto ejemplar de estructura **III** es ginsenosido RH1, designado en el presente documento como **8**.

III. Fuentes y síntesis de compuestos de fórmulas I-III

Los compuestos de fórmulas **I**, **II** y **III** pueden en general aislarse o sintetizarse a partir de materiales naturales. Por ejemplo, los astragalósidos I-VII pueden aislarse de raíz de *Asatragalus membranaceus*, como se describe, por ejemplo, en A. Kadota *et al.* JP Kokai N.º 62012791 A2 (1987). Como se describe en la misma, el tejido de raíz (8 kg), que está disponible en el mercado de diversas fuentes de hierbas beneficiosas, se somete a reflujo con MeOH, y el extracto concentrado (200 g) se redissuelve en MeOH y se fracciona por cromatografía en columna en gel de sílice usando mezclas de CHCl₃/MeOH/H₂O como eluyentes. Cada fracción se procesa por cromatografía inversa en gel de sílice usando mezclas de disolventes similares, para dar las siguientes cantidades aproximadas de compuestos aislados: acetilastragalósido I (0,2 g), astragalósido I (3,5 g), isoastragalósido I (0,3 g), astragalósido II (2,3 g), astragalósido III (1,0 g), astragalósido IV (0,8 g), astragalósido V (0,1 g), astragalósido VI (0,3 g), y astragalósido VII (0,1 g). Véase también Kitagawa *et al.*, *Chem. Pharm. Bull.* 31(2):698-708 (1983b).

El astragalósido IV (designado en el presente documento como **1**) también se obtuvo por los presentes autores de Ai Chunmei, Chengdu 610041, P.R. China.

El cicloastragenol (**2**) puede prepararse por tratamiento de astragalósido IV (**1**) con HCl metanólico, seguido de neutralización, tratamiento convencional y purificación por cromatografía, como se describe en la Sección experimental posteriormente (Ejemplo 1). También puede obtenerse cicloastragenol por degradación oxidativa (tratamiento con oxígeno y sodio elemental) de un extracto en butanol de *Astragalus membranaceus*, como describen P-H Wang *et al.*, *J. Chinese Chem. Soc.* 49:103-6 (2002). El astragenol (**3**) y el cicloastragenol (**2**) también pueden obtenerse según el procedimiento de Kitagawa *et al.*, *Chem. Pharm. Bull.* 31(2):689-697 (1983a).

Los compuestos designados en el presente documento como **6** (cicloastragenol 6-β-D-glucopiranosido) y **7** (cicloastragenol 3-β-D-xilopiranosido) se obtuvieron sometiendo a reflujo una solución de astragalósido IV (**1**) y ácido sulfúrico en metanol seguido de tratamiento convencional y cromatografía en gel de sílice, como se describe en la sección experimental posteriormente (Ejemplo 2). También se obtuvieron el producto de reorganización **5** y la aglucona, es decir, cicloastragenol (**2**).

El compuesto 16-ceto **4** se preparó por acetilación de los grupos hidroxilo del glucósido de astragalósido IV, seguido de oxidación con clorocromato de piridinio del 16-hidroxilo y restablecimiento de los hidroxilos del glucósido por tratamiento con borohidruro de sodio (véase, Kitagawa *et al.*, 1983b, citado anteriormente).

La preparación de diversas realizaciones de fórmulas I-III, por ejemplo, compuestos que tienen grados variables de alquilación o acilación, o grupos ceto, puede prepararse de acuerdo con métodos conocidos de síntesis orgánica, usando materiales de partida de origen natural y/o disponibles en el mercado tales como cicloastragenol, astragenol, los astragalósidos o astraverrucinas, o panaxatriol, con separación de productos según se necesite. Se dan varios ejemplos en la sección experimental posteriormente. Por ejemplo, los grupos hidroxilo 3, 6 y/o 16 menos estéricamente entorpecidos en general pueden modificarse selectivamente, por ejemplo, por acilación. Si se desea, los grupos hidroxilo sin reaccionar pueden modificarse después por separado, por ejemplo, por alquilación, seguido de la retirada opcional de los grupos acilo. Los compuestos de fórmula **I** que tienen un anillo ciclopropilo condensado (por ejemplo, cicloastragenoles) pueden convertirse en los compuestos que tienen un grupo 19-metilo y un doble enlace 9-11 (por ejemplo, astragenoles) por tratamiento con ácido sulfúrico. Esta reacción puede acompañarse de desglucosilación, como se muestra en las reacciones de los Ejemplos 9B y 10B, posteriormente.

IV. Determinación de la actividad biológica

A. Protocolo del ensayo TRAP

La capacidad de un compuesto para aumentar la actividad telomerasa en una célula puede determinarse usando el ensayo TRAP (Protocolo de Amplificación de Repeticiones Teloméricas, por sus siglas en inglés), que se conoce en la técnica (por ejemplo, Kim *et al.*, Patente de EE UU N.º 5.629.154; Harley *et al.*, Patente de EE UU N.º 5.891.639).

Como se usa en el presente documento, "actividad telomerasa medida en un ensayo TRAP" se refiere a la actividad telomerasa medida en queratinocitos o fibroblastos según el siguiente protocolo. La actividad típicamente se compara con la actividad medida de forma similar en un ensayo control de tales células (por ejemplo, una actividad telomerasa un 50 % mayor que la observada en un control de disolvente).

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

Las células se siembran a aproximadamente 5000 células/pocillo, en medio de cultivo (por ejemplo, medio Epi-Life + suplemento de factor de crecimiento de queratinocitos + CaCl₂ 60 mM, suministrado por Cascade Biologics, Inc.) durante dos días. Se añaden las composiciones de prueba en un disolvente adecuado, tal como etanol al 95 % o DMSO, a los pocillos seleccionados en un intervalo de concentraciones y se incuban durante 16-24 horas. Para los datos descritos en el presente documento, el disolvente usado fue DMSO.

La solución de lisado de las células se prepara por adición de 3,0 ml de Nonidet® P-40, 1,0 ml de tampón de lisis CHAPS (véase posteriormente), y 1,0 ml de tampón TRAP 10X (véase posteriormente) a 5,0 ml de H₂O sin DNasa, ni RNasa (El agua sin DNasa, ni RNasa puede generarse por tratamiento con DEPC (pirocarbonato de dietilo) o comprar de vendedores tales como Sigma).

La morfología de las células tratadas primero se observa en un microscopio, para verificar que no hay signos visuales de crecimiento irregular. El medio se retira de los pocillos y las células se enjuagan dos veces en PBS (sin Ca ni Mg). Las placas se enfrían, preferentemente en hielo, y se añade (aproximadamente 100 µl por pocillo) tampón de lisis (véase posteriormente) y se trituran pipeteando arriba y abajo varias veces. Las células se incuban en hielo durante 1 hora.

Tampón de lisis CHAPS

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

^a El detergente CHAPS se añade justo antes del uso del tampón de lisis. Además, se añade AESBF (fluoruro de 4-(2-aminoetil)-bencenosulfonilo HCl) al tampón de lisis justo antes de la etapa de extracción.

Tampón TRAP 10X

<u>Solución madre</u>	<u>Para 5 ml</u>	<u>Concentración final</u>
Tris-HCl 1 M pH 8,3	1 ml	200 mM
MgCl ₂ 1 M	75 µl	15 mM
KCl 1M	3,15 ml	630 mM
Tween 20 (Boehringer Mannheim)	25 µl	0,5 %
EGTA 0,1 M	500 µl	10 mM
BSA 20 mg/ml	250 µl	1 mg/ml

Se combinan los siguientes materiales para generar una mezcla maestra de PCR.

<u>Solución madre</u>	<u>Por reacción (40 µl)</u>	<u>Concentración final^a</u>
Tampón TRAP 10X	5,0 µl	1X
dNTP 2,5 mM	1,0 µl	50 µM
Cebador Cy5-TS (0,1 mg/ml)	0,2 µl	0,4 ng/ml
Cebador ACX (0,1 mg/ml)	1,0 µl	2 ng/ml
Est. Int. TSU2 (1 pg/ml)	1,0 µl	20 fg/ml
Cebador U2 (0,1 mg/ml)	1,0 µl	2 ng/ml
Polimerasa Taq (5 U/µl)	0,4 µl	2 unidades
H ₂ O sin DNasa, ni RNasa	30,4 µl (hasta 40 µl total)	

^a Basado en el volumen final de 40 µl de mezcla de PCR más 10 µl de lisado celular = 50 µl.

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

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

Se añade una muestra del lisado celular (10 µl) a 40 µl de esta mezcla de PCR en un tubo de reacción, y la mezcla se incuba a temperatura ambiente (30 °C) durante 30 minutos. La PCR se lleva a cabo incubando la mezcla a las siguientes temperaturas durante los tiempos indicados: 94 °C/30 s, 60 °C/30 s, y 72 °C/30 s; repitiendo este ciclo de tres etapas para realizar 20-30, preferentemente 31 ciclos.

Se añade colorante de carga que contiene, por ejemplo, azul de bromofenol y xileno cianol, y las muestras se someten a PAGE no desnaturante al 10-15 % en TBE 0,6x, hasta que el azul de bromofenol se sale del gel. La formación de producto se observa, por ejemplo, usando un *fluoroimager* para la detección de los productos de telomerasa marcados con CY5 (excitación máxima a 650 nm; emisión máxima a 670 nm).

La cantidad final del patrón interno TSU2 después de la amplificación es en general 5-10 amol por mezcla de reacción de 50 µl. Este control interno da un producto específico de amplificación de PCR 36-mero que aparece como una banda distinta en el gel por debajo del primer producto de adición telomérica (es decir, el producto de una adición telomérica al oligonucleótido TS, seguido de amplificación con el cebador inverso ACX). Esta banda de control interno puede usarse para normalizar las amplificaciones de PCR de diferentes muestras.

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

$$TM = (T_{\text{productos TRAP}} - T_{\text{BKD1}}) / (T_{\text{Est Int}} - T_{\text{BKD2}})$$

donde: $T_{\text{productos TRAP}}$ es la intensidad total medida en el gel para todos los productos de telomerasa, T_{BKD1} es la intensidad de fondo medida en un carril en blanco para un área equivalente en tamaño a la abarcada por los productos de telomerasa, $T_{\text{Est Int}}$ es la intensidad para la banda del patrón interno, y T_{BKD2} es la intensidad de fondo en un carril en blanco para un área equivalente en tamaño a la abarcada por la banda del patrón interno. El número resultante es el número de moléculas de productos de telomerasa generados para un tiempo de incubación determinado que, para los fines de determinar TM, se designa en el presente documento como 30 minutos.

Los compuestos preferidos de fórmulas I, II o III como se han descrito anteriormente son capaces de producir, a una concentración de 1 µg/ml o menor, un nivel de actividad telomerasa en fibroblastos o queratinocitos al menos un 25 % mayor que el nivel de tal actividad visto en un control de disolvente. Más preferentemente, el compuesto es capaz de producir, a una concentración de 1 µg/ml o menor, una actividad telomerasa al menos un 50 % mayor que la vista en un control de disolvente. Actividades incluso más potentes pueden ser apropiadas para algunas aplicaciones, tal como compuestos que producen actividades telomerasa al menos aproximadamente un 75 %, 100 % o 500 % mayores que el nivel de tal actividad visto en un control de disolvente, medido en el ensayo TRAP descrito, a una concentración de 1 µg/ml o menor.

B. Resultados de ensayo TRAP ejemplares

Se evaluó la eficacia en aumentar la actividad telomerasa para compuesto de fórmula I anteriormente en varias concentraciones. Los ensayos se llevaron a cabo en células HEKneoP (queratinocitos neonatales), según el protocolo descrito anteriormente. Las concentraciones variaron desde aproximadamente 0,03 µM a 10 µM en DMSO.

Como se muestra en la Figura 2, para composiciones que contienen el compuesto 1 (astragalósido IV), la actividad telomerasa aumentó al aumentar la concentración, hasta aproximadamente un 306 % del control a 1,0 µM, después disminuyó según la concentración aumentó más hasta 10 µM. Como se muestra en la Figura 2, para composiciones que contienen 2 (cicloastragenol), la actividad telomerasa aumentó hasta aproximadamente el 300 % del control a 1,0 µM (comparada con aproximadamente el 200 % en células tratadas con EGF (factor de crecimiento epidérmico) 10 nM), después disminuyó con aumentos adicionales en concentración.

La tabla 1 da, para composiciones que contienen cada uno de los compuestos mostrados en las figuras 1A-G, la concentración eficaz mínima (CEM) del compuesto que produjo un nivel de actividad telomerasa dos veces la vista en un control de DMSO (es decir, un 100 % mayor).

Tabla 1

Designación	Nombre	CEM, μM
1	astragalósido IV	0,01
2	cicloastragenol	0,01
3	astragenol	0,03
4	astragalósido IV 16-ona	0,03
5	20R,24S-epoxi-3 β ,16 β ,25-trihidroxi-9 β -metil-19-norlanost-1,5-dieno	0,10
6	cicloastragenol 6- β -D-glucopiranósido	3,2
7	cicloastragenol 3- β -D-xilopiranósido	3,2
8	ginsenosido RH1	10

C. Protocolo de ensayo de cicatrización

5 Los compuestos de fórmula I-III pueden usarse para fomentar la cicatrización de heridas, quemaduras, abrasiones u otras afecciones agudas o crónicas de la epidermis, como se discute posteriormente. Como se usa en el presente documento, "actividad de cicatrización medida en un ensayo de arañazo" se refiere a la actividad medida en queratinocitos o fibroblastos según el siguiente protocolo, y expresada como el valor de C mostrado en la fórmula posterior.

10 Las células se siembran en matraces (5×10^5 células por matraz) y se cultivan durante dos días en una cámara humidificada a CO_2 al 5 %, 37 °C. Para crear la "herida", una pipeta de plástico de 2 ml se arrastra suavemente para "arañar" la superficie celular. La herida ideal tiene aproximadamente 2-3 mm de anchura y 50 mm de longitud (a lo largo del eje largo de la botella de cultivo). Las células se vuelven a tratar con medio que contiene o bien vehículo (DMSO, muestra control) o composiciones de prueba a múltiples concentraciones. Se identifica un área de herida, la botella se marca, y el aspecto de las células se documenta fotográficamente durante 3-4 días de cultivo seguido de las células.

15 La cantidad de cierre de herida se determina midiendo la anchura de la herida a lo largo del tiempo para muestras tratadas con compuesto relativas a células tratadas con vehículo u otro control. Las medidas se hacen a partir de las fotografías tomadas para cada una de las muestras los días 1 (inmediatamente después de arañar), 2, 3 y 4. El porcentaje de cicatrización (también expresado como "actividad de cicatrización") se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$25 \quad C = 100 - [100 \times A_n/A_0]$$

donde A_n es la anchura de la herida el día n y A_0 es la anchura de la herida el día uno (inmediatamente después de arañar).

30 Los compuestos preferidos de fórmula I-III como se han descrito anteriormente son capaces de producir, a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ o menos, una cantidad de cierre de herida (actividad de cicatrización) en un ensayo de arañazo de queratinocitos o fibroblastos, como se ha descrito anteriormente, que es al menos el 25 % mayor que la vista en células sin tratar o control. Actividades incluso más potentes pueden ser apropiadas para algunas aplicaciones, tal como compuestos que producen, a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ o menos, una cantidad de cierre de herida en un ensayo de arañazo de queratinocitos o fibroblastos que el al menos aproximadamente un 50 % o un 100 % mayor que la vista en células sin tratar o control.

D. Resultados ejemplares del ensayo de arañazo

40 Se evaluó la actividad de cicatrización de los compuestos de la invención 1 (astragalósido IV) y 2 (cicloastragenol) en queratinocitos que envejecen, mediante un ensayo de arañazo como se ha descrito anteriormente. Los resultados de un ensayo típico se muestran en la Figura 4, donde la fila superior de imágenes muestra células control (tratadas con disolvente, DMSO), y la fila inferior muestra células tratadas con 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (aproximadamente 0,13 μM) de 1 en el mismo disolvente. Las células tratadas estaban confluentes el día 4, en contraste con las células control, en las que una "herida" considerable permanecía el día 4. Se vieron resultados similares con esta composición y con 0,01 μM de 2 (cicloastragenol) en queratinocitos jóvenes, como se muestra en la Figura 5.

45 La Figura 6 muestra la actividad de cicatrización de una composición que contiene 1 (astragalósido IV) en queratinocitos adultos que envejecen, medida en un ensayo similar, en presencia y ausencia de un oligonucleótido inhibidor de telomerasa (GRN163) y un oligonucleótido control (GRN137227). Como se muestra, el oligo inhibidor de telomerasa GRN163 bloquea los efectos de cicatrización de la composición de 1; el efecto del oligo control GRN137227 es mínimo. (GRN163 es un oligonucleótido inhibidor de telomerasa que se dirige a la región molde del componente ARN de la telomerasa. Específicamente, GRN163 es un oligonucleótido tiofosforamidato N3'→P5' 13-mero, descrito

en detalle en la publicación PCT No. WO 01/18015. GRN137227 es un oligonucleótido control tiosforamidato N3'→P5' 13-mero que tiene una secuencia mal emparejada).

5 La tabla 2 a continuación muestra los valores de C (actividad de cicatrización) para los compuestos 1 y 2 empleados en los ensayos de arañazo mostrados en las Figuras 5 y 6, basados en los resultados de esos ensayos, usando la fórmula mostrada anteriormente.

Tabla 2

	Anchura aprox. de la herida (unidades arbitrarias)				C _{control}	C _{prueba}
	Día 1 control	Día 4 control	Día 1 prueba	Día 4 prueba		
Fig. 4 (1)	22	10	17	0	54,5	100
Fig. 5 (1)	19	9	18	0	52,6	100
Fig. 5 (2)	19	9	21	2	52,6	90,5

10 La figura 7 ilustra gráficamente el cierre de herida como porcentaje del control para el compuesto de la invención 1 (astragalósido IV) en queratinocitos neonatales que envejecen, en presencia y ausencia de un inhibidor de telomerasa (GRN163), y en comparación con PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas) 50 ng/ml (aprox. 2 ml). Como se muestra, la eficacia de 1 era comparable a la de PDGF, y de nuevo se bloqueó por la adición de GRN163.

15 V. Selección de compuestos adicionales

La presente divulgación también proporciona métodos de seleccionar compuestos adicionales eficaces para aumentar la actividad telomerasa, por cribado de derivados de compuestos de fórmula I, II, o III en un ensayo TRAP como se describe en el presente documento. En este aspecto, un "derivado" incluye un compuesto producido por modificación de un compuesto de fórmula I, II o III en una o más de las siguientes formas: conversión de un grupo hidroxilo a un grupo carbamato de alquilo inferior, halógeno, tiol, tioéter de alquilo inferior, amino, alquilamino inferior, amida de alquilo inferior, aldehído, o ceto (por ejemplo, alquilación, con formación de un grupo hidroxilo adicional); adición de halógeno, hidroxilo y/o hidrógeno a un doble enlace carbono-carbono; retirada de un grupo hidroxilo (es decir, conversión a hidrógeno); e inversión de estereoquímica en uno o más centros quirales, preferentemente un centro quiral que tiene oxígeno. Como se usa en el presente documento, un "derivado" producido por tal modificación o modificaciones excluye los compuestos de fórmulas I, II y III mismos como se han definido anteriormente.

Todas estas modificaciones pueden lograrse usando métodos de síntesis convencionales, empleando reacciones sintéticas bien conocidas tales como sustitución nucleófila, que puede incluir la conversión de un grupo hidroxilo a un grupo saliente mejor, tales como tosiloato; esterificación; alquilación; oxidación; reducción; halogenación; hidratación; hidrogenación; etc.

Un derivado de un compuesto de fórmula I, II, o III, formulado en un medio disolvente adecuado a una o más concentraciones, se criba en un ensayo TRAP de queratinocitos o fibroblastos como se ha descrito anteriormente. Los derivados preferidos para la selección incluyen los que son eficaces, cuando se formulan en un disolvente a una concentración de 1 µg/ml o menos, para producir un nivel de actividad telomerasa en queratinocitos o fibroblastos, medido en un ensayo TRAP, al menos un 50 % mayor que la medida en dichas células tratadas con dicho disolvente.

Alternativamente, o además, un derivado de fórmula I, II, o III, formulado en un medio disolvente adecuado a una o más concentraciones, se ensaya para actividad de cicatrización en un ensayo de arañazo como se ha descrito anteriormente. Los derivados preferidos para la selección incluyen los que tienen una actividad de cicatrización, a una concentración de 1 µg/ml o menos, al menos el 25 % mayor, y más preferentemente al menos un 50 % mayor, que la de un control de disolvente.

45 VI. Indicaciones terapéuticas y métodos de tratamiento

La presente invención proporciona métodos para aumentar la actividad telomerasa en una célula, poniendo en contacto una célula o tejido con una formulación de un compuesto aislado de fórmula I, como se define en las reivindicaciones, en una cantidad eficaz para aumentar la actividad telomerasa en la célula. El método puede incluir la etapa preliminar de identificar una célula o tejido en el que se desea un aumento de la actividad telomerasa. La célula puede estar en cultivo, es decir, *in vitro* o *ex vivo*, o dentro de un sujeto o paciente *in vivo*.

Los beneficios que se van a producir de un aumento en la actividad telomerasa en una célula o tejido incluyen, por ejemplo, aumento de la capacidad de replicación y/o longevidad de las células puestas en contacto. El método puede comprender además diagnosticar una afección en un sujeto o paciente en donde se desea un aumento en la actividad telomerasa en células o tejido del paciente; por ejemplo, diagnosticar una enfermedad sujeta a tratamiento por un aumento en la actividad telomerasa en células o tejido. En consecuencia, la invención proporciona métodos de tratar una afección en un paciente, aumentando la actividad telomerasa en células o tejido de dicho paciente, el método comprende administrar a un sujeto en necesidad de tal tratamiento una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula

I, como se define en las reivindicaciones. Una "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad eficaz para aumentar la actividad telomerasa en las células o tejido del paciente, de modo que se alcance un resultado terapéutico.

Dichas afecciones pueden incluir, por ejemplo, afecciones asociadas a senescencia celular o a una tasa aumentada de proliferación de una célula en ausencia de telomerasa, lo que produce pérdida de telómeros acelerada. Mediante "tasa de proliferación aumentada" se quiere decir mayor tasa de división celular comparada con células normales de ese tipo celular, o comparada con células normales en otros individuos de ese tipo celular. La senescencia de esos grupos de células a una edad anormalmente temprana puede finalmente producir enfermedad (véase, West *et al.*, patente de EE UU N.º 6.007.989).

Existen diversos estados de enfermedad en los que un aumento en la actividad telomerasa en ciertos tipos celulares puede ser beneficioso. En consecuencia, la invención proporciona métodos de tratar en un paciente una afección seleccionada de las siguientes, aumentando la actividad telomerasa en las células del paciente, que comprende administrar a un sujeto en necesidad de tal tratamiento, una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula I, como se define en las reivindicaciones. En algunos casos, la afección también puede estar sometida a tratamiento por terapia celular *ex vivo*, como se describe posteriormente, empleando los tipos celulares asociados (indicados en paréntesis).

(a) enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, e ictus (células del sistema nervioso central, incluyendo neuronas, células de glía, por ejemplo, astrocitos, células endoteliales, fibroblastos),

(b) enfermedades seniles de la piel, tal como atrofia y adelgazamiento dérmico, elastolisis y arrugas en la piel, hiperplasia o hipoplasia de glándulas sebáceas, lentigo senil, y otras anomalías de pigmentación, encanecimiento del pelo y pérdida o adelgazamiento del pelo, o úlceras crónicas de la piel (fibroblastos, células de glándulas sebáceas, melanocitos, queratinocitos, células de Langerhans, células endoteliales microvasculares, células del folículo piloso),

(c) enfermedad degenerativa de las articulaciones (células del cartílago articular, tal como condrocitos y fibroblastos lacunares y sinoviales),

(d) osteoporosis y otras afecciones degenerativas del sistema esquelético (células del sistema esquelético, tal como osteoblastos, células estromales o mesenquimatosas de la médula ósea, células osteoprogenitoras),

(e) enfermedades seniles y de estrés del sistema vascular incluyendo aterosclerosis, calcificación, trombosis y aneurismas (células del corazón y sistema vascular, incluyendo células endoteliales, células de músculo liso, y fibroblastos adventicios),

(f) degeneración macular senil (células del ojo, tal como células de epitelio pigmentadas y endoteliales vasculares),

(g) SIDA (células CD8⁺ restringidas a VIH), y

(h) alteración del sistema inmunitario senil y por estrés, incluyendo alteración de la renovación de tejido, que se produce con envejecimiento natural, cáncer, terapia de cáncer, infecciones agudas o crónicas, o con trastornos genéticos que producen recambio celular acelerado, y anemias relacionadas y otras afecciones degenerativas (otras células del sistema inmunitario, incluyendo células en los linajes linfocitos, mieloides y eritroides, tal como linfocitos B y T, monocitos, macrófagos circulantes y especializados en tejido, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, células NK, y sus respectivos progenitores).

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

Como un ejemplo, en el caso de individuos infectados por VIH, el recambio de células CD8⁺ aumenta ya que estas células intentan controlar el nivel de células CD4⁺ infectadas por VIH. En SIDA (punto (g) anteriormente), se cree que la enfermedad está causada por la senescencia temprana de células CD8⁺ restringidas a VIH. El envejecimiento de tales células se atribuye no solamente a la cantidad anómala de pérdida de secuencias de telómeros por duplicación celular, sino, además, a la tasa de replicación aumentada de las células, de modo que el desgaste de los telómeros es mayor de lo normal para ese grupo de células. La presente divulgación, por tanto, proporciona métodos de tratar un sujeto infectado por VIH, y más particularmente de reducir la senescencia temprana de células CD8⁺ restringidas a VIH en un sujeto infectado por VIH, administrando a un sujeto en necesidad de tal tratamiento una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula I, II o III como se desvela en la Sección II anterior.

Un aumento en la actividad telomerasa puede beneficiar a células que no se dividen, así como a células en proliferación, por ejemplo, en afecciones asociadas con susceptibilidad aumentada a muerte celular debido a estrés, tales como isquemia en insuficiencia cardíaca o en ictus (véase, por ejemplo, Oh y Schneider, *J Mol Cell Cardiol* 34(7):717-24; Mattson, *Exp Gerontol.* 35(4):489-502). La presente divulgación, por tanto, proporciona métodos de reducir la muerte celular inducida por estrés o daño al ADN en un sujeto, tal como un sujeto que experimenta

afecciones isquémicas en tejido debido a insuficiencia cardiaca o ictus, aumentando la actividad telomerasa en las células del sujeto, que comprende administrar a un sujeto en necesidad de tal tratamiento una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula I, II o III como se divulga en la sección II anteriormente. Como se ha indicado anteriormente, el método puede incluir la etapa preliminar de diagnosticar en el sujeto la afección indicada.

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

En un aspecto adicional de la invención, aumentar la actividad telomerasa es eficaz para fomentar la cicatrización de heridas, quemaduras, abrasiones u otras afecciones agudas o crónicas de la epidermis. La invención, por tanto, proporciona un método de tratar una afección aguda o crónica de la epidermis, administrando a un paciente en necesidad de tal tratamiento, preferentemente por vía tópica al área afectada, una cantidad eficaz de una formulación de un compuesto aislado de fórmula I, como se define en las reivindicaciones.

Como se usa en el presente documento, una "afección aguda o crónica de la epidermis" incluye afecciones agudas tal como lesiones padecidas en traumatismo, quemaduras, abrasiones, incisiones quirúrgicas, sitios de injertos donantes, y lesiones causadas por agentes infecciosos, y afecciones crónicas tal como úlcera venosa crónica, úlcera diabética, úlcera de compresión, úlceras de decúbito, y úlceras o llagas de la superficie mucosa. También se incluyen lesiones de la piel o superficie epitelial causadas por una afección o infección inflamatoria persistente, o por un defecto genético (tal como formación de queloide y anomalías de coagulación). Véase, por ejemplo, la publicación PCT N.º WO 02/91999.

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

El método también puede usarse para aumentar el crecimiento de células injertadas. Los efectos deseables de un aumento en la actividad telomerasa en tal tratamiento incluyen cobertura del sitio de tratamiento, supervivencia de las células injertadas, falta de rechazo inmunitario, cierre de una herida si está presente, o restablecimiento de la función fisiológica normal. Las células injertadas pueden participar en el cierre de una herida ya sea participando directamente en el proceso de cicatrización (por ejemplo, convirtiéndose en parte del tejido cicatrizado), o cubriendo la herida y proporcionando de esta manera un medio que fomenta la cicatrización por células hospedadoras.

La invención también contempla la manipulación de la piel y la reparación de cualquier defecto percibido en la superficie de la piel para otros fines, tal como mejora estética.

En un aspecto adicional, los métodos y composiciones de la divulgación pueden usarse para aumentar la capacidad de replicación y/o extender la longevidad de células en cultivo, por ejemplo, en terapia celular *ex vivo* o en la producción de anticuerpos monoclonales, aumentando la actividad telomerasa en las células. Aumentar la actividad telomerasa aumenta la capacidad de replicación de tales células ralentizando la pérdida de repeticiones de los telómeros y/o mejorando la resistencia a muerte celular inducida por estrés durante la proliferación celular.

En el caso de aplicaciones *ex vivo*, una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula I, II o III como se han descrito anteriormente, se añade a células en explantes obtenidas de un sujeto. Una "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad eficaz para aumentar la actividad telomerasa en las células, aumentando de esta manera la capacidad de replicación y/o la longevidad de las células.

Las células en explantes pueden incluir, por ejemplo, células madre, tal como células madre de médula ósea (patente de EE UU N.º 6.007.989), células estromales de médula ósea (Simonsen *et al.*, *Nat Biotechnol* 20(6):592-6, 2002), o células corticosuprarrenales (Thomas *et al.*, *Nat Biotechnol* 18(1):39-42, 2000). Los estados de enfermedad tal como los indicados en los puntos (a)-(g) anteriormente también se pueden someter a terapia celular *ex vivo*. Los ejemplos incluyen el uso de células satélite de músculo para el tratamiento de distrofia muscular, osteoblastos para tratar osteoporosis, células epiteliales pigmentadas retinianas para degeneración macular senil, condrocitos para artrosis, y así sucesivamente.

Por ejemplo, el reconocimiento de que células CD8⁺ funcionales son limitantes en pacientes de SIDA para controlar la expansión de células CD4⁺ infectadas permite que se conciba un protocolo terapéutico en el que células CD8⁺ restringidas a VIH se retiran de un individuo infectado por VIH en una fase temprana, cuando se detecta el SIDA, se

almacenen en un banco, y después se vuelvan a introducir en el individuo en una fase posterior, cuando ese individuo ya no tiene las células CD8⁺ requeridas disponibles. Por tanto, la vida de un individuo se puede extender mediante un protocolo que implica la administración continuada de las células limitantes de ese individuo en puntos de tiempo apropiados. Estos puntos de tiempo apropiados pueden determinarse siguiendo la senescencia de células CD8⁺, o determinando la longitud de los telómeros en tales células CD8⁺, como una indicación de cuando esas células se volverán senescentes. De acuerdo con la presente divulgación, las células almacenadas se pueden expandir en número en presencia de un agente que ralentiza la pérdida de repeticiones de telómeros, es decir, un compuesto de fórmula I, II o III como se divulga en la sección II anteriormente.

En consecuencia, la presente divulgación proporciona métodos de terapia celular *ex vivo*, que incluyen obtener una población celular de un sujeto, y expandir la población celular *ex vivo*, en donde la población celular se trata con un compuesto de fórmula I, II o III como se divulga en la sección II anteriormente, en una cantidad eficaz para aumentar la actividad telomerasa y aumentar mediante ello la capacidad de replicación y/o la longevidad de la población celular. El método generalmente incluye diagnosticar en un sujeto una afección objeto de tratamiento por terapia celular *ex vivo*, tales como las indicadas anteriormente.

En una realización adicional, la presente divulgación proporciona un método de proliferación de células madre, en donde una población de células madre se trata con un compuesto de fórmula I, II o III como se divulga en la sección II anteriormente, en una cantidad eficaz para aumentar la actividad telomerasa y aumentar mediante ello la capacidad de replicación y/o la longevidad de la población celular.

VI. Formulaciones y métodos de administración

La presente divulgación abarca métodos de preparar composiciones farmacéuticas útiles para aumentar la actividad telomerasa en una célula y/o fomentar la cicatrización. Según esto, un compuesto aislado de fórmula I, II o III como se describe en la sección II se combina con un excipiente farmacéutico, y opcionalmente con otros agentes medicinales, adyuvantes, y similares, que pueden incluir ingredientes activos e inactivos. Las composiciones pueden tomar la forma de formas farmacéuticas sólidas, semisólidas, polvo liofilizado o líquidas, tal como, por ejemplo, comprimidos, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida, soluciones, suspensiones, emulsiones, supositorios, cremas, pomadas, lociones, aerosoles, o similares. Las formulaciones se pueden proporcionar en formas farmacéuticas unitarias adecuadas para la administración sencilla de dosis precisas.

Un compuesto aislado de fórmula I, II o III también puede formularse como un suplemento nutricional o nutracéutico, para la administración oral. Para una formulación nutracéutica, o una formulación farmacéutica oral, los excipientes adecuados incluyen calidades farmacéuticas de soportes tal como manitol, lactosa, glucosa, sacarosa, almidón, celulosa, gelatina, estearato de magnesio, sacarina sódica, y/o carbonato de magnesio. Para su uso en formulaciones líquidas orales, la composición puede prepararse como una solución, suspensión, emulsión, o jarabe, suministrándose o bien en forma sólida o líquida adecuada para hidratación en un soporte acuoso tal como, por ejemplo, solución salina acuosa, dextrosa acuosa, glicerol, o etanol, preferentemente agua o solución salina normal. Si se desea, la composición también puede contener cantidades minoritarias de sustancias auxiliares no tóxicas tal como agentes humectantes, agentes emulsionantes, o tampones. Un compuesto aislado de fórmula I, II o III también se puede incorporar a formulaciones nutracéuticas existentes, tal como están convencionalmente disponibles, que también pueden incluir un extracto de hierbas, tal como un extracto de *Astragalus membranaceus*.

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

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

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

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

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

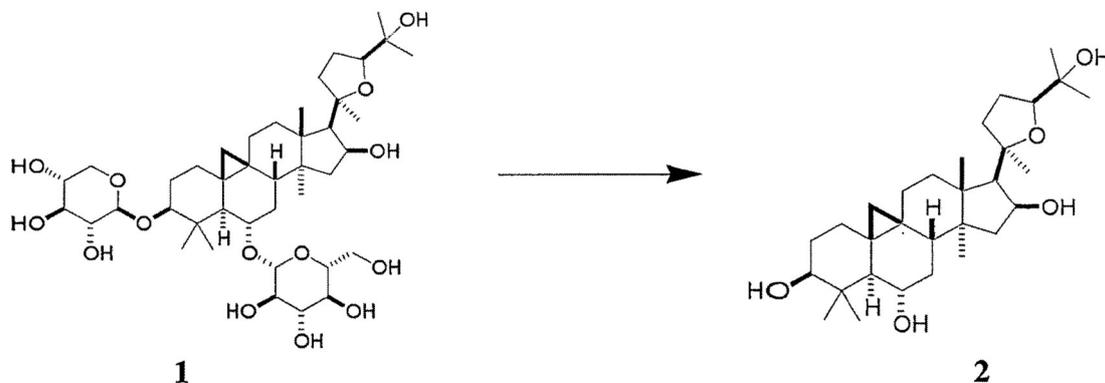
Preferentemente, la composición farmacéutica o nutracéutica contiene al menos el 0,1 % (p/v) de un compuesto de fórmula I, II o III como se ha descrito anteriormente, preferentemente mayor del 0,1 %, hasta aproximadamente el 10 %, preferentemente hasta aproximadamente el 5 %, y más preferentemente hasta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

Para el tratamiento de un sujeto o paciente, tal como un mamífero o un paciente humano, las dosis se determinan basadas en factores tales como el peso y salud global del sujeto, la afección tratada, gravedad de los síntomas, etc. Se determinan dosis y concentraciones para producir el beneficio deseado al tiempo que se evita cualquier efecto secundario indeseado. Las dosis típicas de los compuestos objeto están en el intervalo desde aproximadamente 0,5 a 500 mg/día para un paciente humano, preferentemente aproximadamente 1-100 mg/día. Por ejemplo, pautas de dosis mayores incluyen, por ejemplo, 50-100, 75-100, o 50-75 mg/día, y pautas de dosis menores incluyen, por ejemplo, 1-50, 25-50 o 1-25 mg/día. En realizaciones específicas, por ejemplo, el compuesto designado en el presente documento como **2** (cicloastragenol) se administra a un nivel de al menos 1 mg/día, preferentemente al menos 5 mg/día; o el compuesto designado en el presente documento como **1** (astragalósido IV) se administra a un nivel de al menos 50 mg/día, preferentemente al menos 100 mg/día.

Los estudios en apoyo de la invención indican que los compuestos de fórmula I-III tienen excelente biodisponibilidad y baja toxicidad. Por ejemplo, un compuesto representativo, cicloastragenol (**2**), fue negativo para potencial mutación bacteriana inversa en la prueba de Ames, empleando cepas controladoras de *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537 y cepa controladora de *E. coli* WP2 *uvrA*, a niveles de hasta 5000 µg/placa. Se toleró bien sistémicamente en ratas Sprague-Dawley, después de inyecciones intravenosas únicas de hasta 10 mg/kg. No se observaron cambios dependientes de dosis significativos para machos o hembras en comportamiento (comer, beber), peso bruto, pesos de órganos (corazón, pulmón, hígado, riñones, glándulas suprarrenales y bazo), hematología o bioquímica clínica.

Ejemplos

Ejemplo 1. Conversión de astragalósido IV (**1**) a cicloastragenol (**2**)

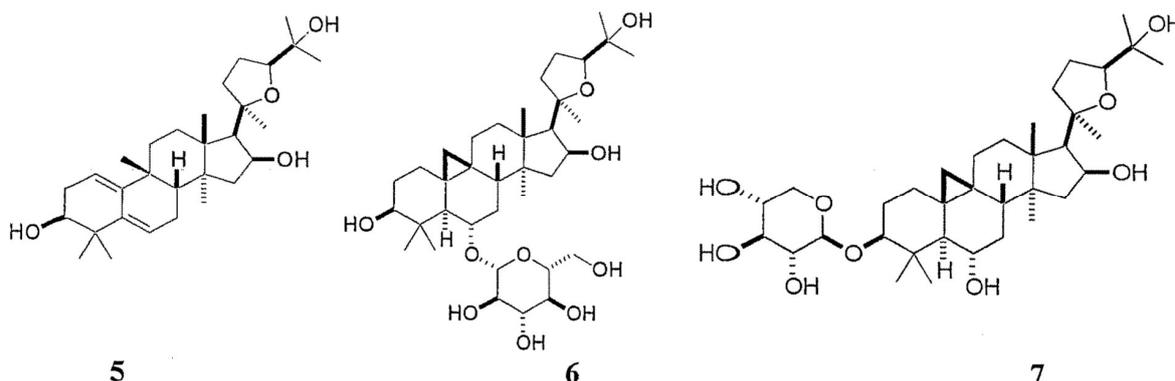


Se añadió a astragalósido IV (**1**) (5,00 g, mmol) "HCl-MeOH 10" (TCI America) (500 ml) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 7 días. La mezcla de reacción se concentró a aproximadamente la mitad del volumen a presión reducida a 20 °C (sin calentar). La mezcla se repartió en bicarbonato de sodio acuoso y acetato de etilo. La fase acuosa se extrajo con acetato de etilo otra vez. Las fases orgánicas se combinaron, lavaron con cloruro de sodio

saturado, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, y se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna (cloroformo/metanol 20:1 ~ 14:1). Para sustituir el disolvente residual con etanol, el material purificado se disolvió en etanol y el disolvente se eliminó a presión reducida para dar **2** (2,1 g, 64 %).

- 5 ^1H RMN (CDCl_3) δ (ppm) 0,34 (d, $J=4,7$ Hz, 1H), 0,48 (d, $J=4,3$ Hz, 1H), 0,92 (s, 3H), 0,93 (s, 3H), 1,0-1,8 (m, 13H), 1,11 (s, 3H), 1,19 (s, 3H), 1,22 (s, 6H), 1,27 (s, 3H), 1,9-2,0 (m, 4H), 2,30 (d, $J=7,8$ Hz, 1H), 2,54 (q, $J=11,8$ Hz, 1H), 3,27 (m, 1H), 3,50 (m, 1H), 3,72 (t, $J=7,4$ Hz, 1H), 4,65 (q, $J=7,4$ Hz, 1H). ESI-MS m/z Positivo 491 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$, Negativo 549 ($\text{M}+\text{AcO}$) $^-$; TLC (Merck, Kieselgel 60) $R_f = 0,33$ (cloroformo/metanol 6:1)

10 **Ejemplo 2. Preparación de los compuestos 5, 6 y 7 a partir de astragalósido IV (1): Retirada de glucósidos de astragalósido IV (1), con y sin reorganización concomitante**



- 15 A una solución de astragalósido IV (**1**, 1,00 g, 1,28 mmol) en metanol (80 ml) se añadió ácido sulfúrico (0,4 ml), y la mezcla se sometió a reflujo durante 1,5 horas. Después de enfriar a temperatura ambiente, la mezcla se echó en acetato de etilo y agua. La fase orgánica se lavó con salmuera y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El disolvente se eliminó a presión reducida, y el residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (cloroformo/metanol 20:1 ~ 10:1 ~ 7:1) para dar el producto reorganizado **5** (24 mg, 4,0 %), monoglucósidos **6** (172 mg, 21 %) y **7** (29 mg, 3,6 %) y la aglucona, cicloastragenol (**2**) (326 mg, 52 %).

GRN140724: ESI-MS m/z 623 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$ $\text{C}_{35}\text{H}_{56}\text{O}_9 = 622$

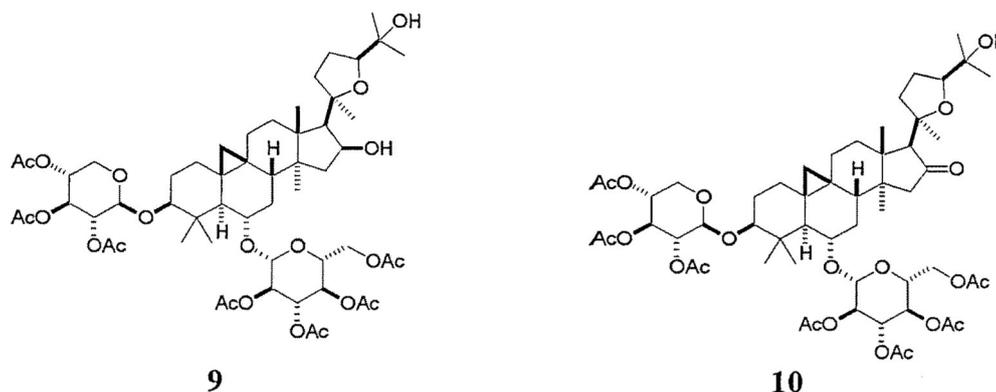
GRN140725: ESI-MS m/z 653 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$ $\text{C}_{36}\text{H}_{60}\text{O}_{10} = 652$

GRN140726: ESI-MS m/z 473 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$ $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_4 = 472$.

- 25 ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 0,72, 0,85, 0,95, 1,05, 1,11, 1,17, 1,18, y 1,25 (s, 3H cada uno), 0,9-2,1 (m, 13H), 2,20 (d, $J=7,4$ Hz, 1H), 2,4-2,6 (m, 2H), 3,42 (m, 1H), 3,70 (dd, $J=7,8, 5,9$ Hz, 1H), 4,63 (q, $J=7,4$ Hz, 1H), 5,45 (s a, 1H), 5,57 (s a, 1H).

30 **Ejemplo 3. Acetilación de 1; formación de 16-cetona 10:**

Los compuestos **9** y **10**, a continuación, se obtuvieron según el método de Kitagawa 1983b, citado anteriormente. Brevemente, la acetilación de astragalósido IV (**1**) proporcionó **9**, junto con una cantidad menor del equivalente 16-acetato. La oxidación con clorocromato de piridinio de **9** dio **10**.



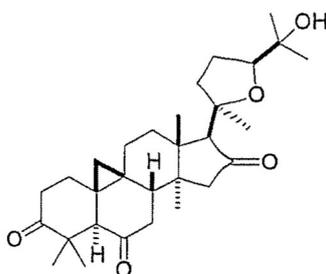
35

Ejemplo 4. Preparación de 4 (véase la Figura 1) por desacetilación de 10

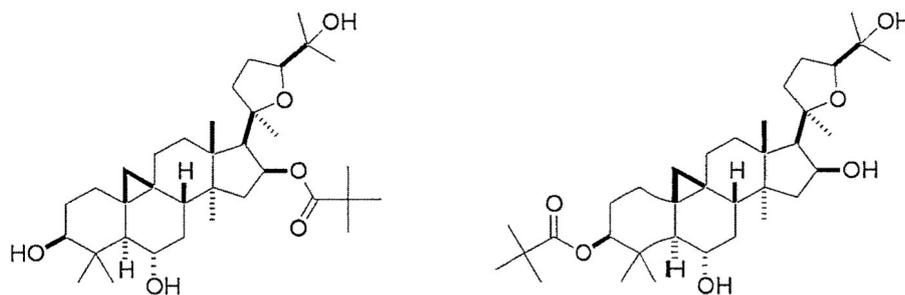
A una solución de **10**, anteriormente (10 mg, 0,0093 mmol) en metanol se añadió bromohidruro de sodio (10 mg, 0,26 mmol), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla se diluyó con cloroformo (3 ml) y se sometió directamente a cromatografía en columna de gel de sílice (cloroformo/metanol 3:1) para dar **4** (8,0 mg, cuant.). ESI-MS m/z 783 (M+H)⁺ C₄₁H₆₆O₁₄ = 782.

Ejemplo 5. Formación de triona **11** de cicloastragenol **2**

El derivado 3,6,16-triona **11** de cicloastragenol se obtuvo por oxidación con CrO₃ de **2**, según el método de Kitagawa *et al.*, *Chem. Pharm. Bull.* 31(2):689-697 (1983a).

**11**

Ejemplo 6. Acilación del grupo hidroxilo 3 o 6 de cicloastragenol (**2**)

**12****13**

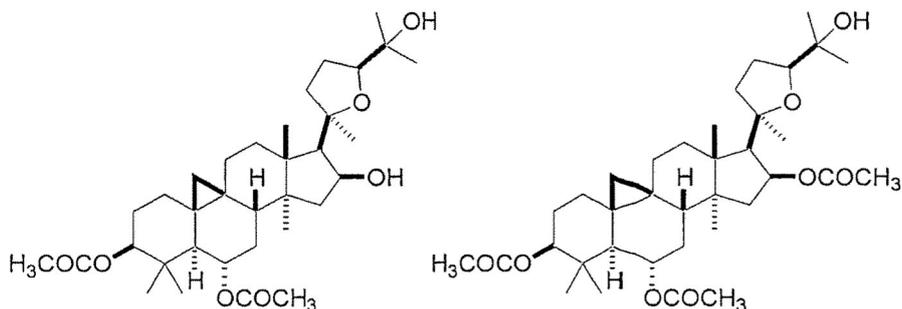
A una solución de cicloastragenol (**2**) (50 mg, 0,10 mmol) en diclorometano (5 ml) se añadieron trietilamina (0,030 ml, 0,22 mmol) y cloruro de pivaloilo (0,014 ml, 0,12 mmol) y la mezcla se agitó a 0 °C durante la noche. La mezcla se sometió directamente a cromatografía en columna de gel de sílice (hexano/acetato de etilo 1:1 ~ 1:2) para dar **12** (17 mg, 30 %) y **13** (3,3 mg, 2,9 %).

12: ESI-MS m/z 575 (M+H)⁺ C₃₅H₅₈O₆ = 574. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 0,32 (d, J = 4,7 Hz, 1H), 0,49 (d, J = 4,7 Hz, 1H), 0,92 (s, 3H), 0,95 (s, 3H), 1,07 (s, 3H), 1,1-2,0 (m, 17H), 1,15 (s, 9H), 1,18 (s, 3H), 1,21 (s, 3H), 1,34 (s, 6H), 2,19 (dd, J = 13,7, 9,8 Hz, 1H), 2,36 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 3,27 (m, 1H), 3,51 (td, J = 9,4, 3,5 Hz, 1H), 3,71 (t, J = 7,4 Hz, 1H), 5,32 (td, J = 7,8, 4,7 Hz, 1H).

13: ESI-MS m/z 575 (M+H)⁺ C₃₅H₅₈O₆ = 574. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 0,35 (d, J = 4,3 Hz, 1H), 0,51 (d, J = 4,3 Hz, 1H), 0,92 (s, 3H), 1,0-2,0 (m, 17H), 1,03 (s, 3H), 1,09 (s, 3H), 1,12 (s, 3H), 1,17 (s, 9H), 1,21 (s, 3H), 1,24 (s, 3H), 1,28 (s, 3H), 2,29 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 2,53 (m, 1H), 3,50 (m, 1H), 3,73 (t, J = 7,2 Hz, 1H), 4,50 (dd, J = 10,9, 4,3 Hz, 1H), 4,65 (m, 1H).

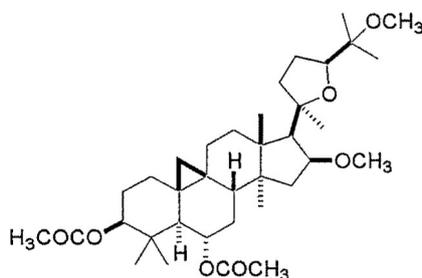
Ejemplo 7A. Acetilación de los hidroxilos secundarios de cicloastragenol (**2**)

Esta reacción se llevó a cabo según el método de Kitagawa 1983a, citado anteriormente. Brevemente, la acetilación con anhídrido acético/piridina dio una mezcla de **14** (producto principal) y **15** (producto minoritario).



14

15

Ejemplo 7B. Metilación de 3,6-diacetil cicloastragenol (14), con retención de grupos acetilo

16

5

A una solución de **14** (30 mg, 0,052 mmol) en dimetilformamida (3 ml) se añadieron yodometano (0,75 ml, 12 mmol) e hidruro de sodio (dispersión en aceite al 60 %, 40 mg, 1,0 mmol) a 0 °C en nitrógeno, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Se añadió agua, y la mezcla se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con agua y salmuera y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (hexano/acetato de etilo 4:1) para dar el compuesto **16** (29 mg, 92 %).

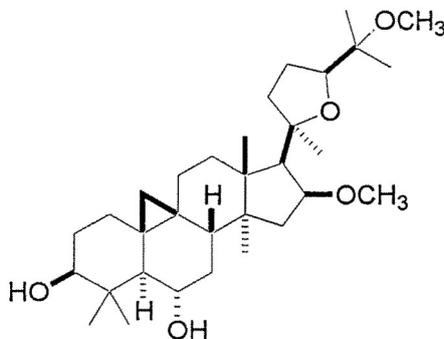
10

ESI-MS m/z 603 (M+H)⁺ C₃₆H₅₈O₇= 602. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 0,33 (d, *J*= 4,7 Hz, 1H), 0,56 (d, *J*= 4,7 Hz, 1H), 0,82 (s, 3H), 0,89 (s, 3H), 0,96 (s, 3H), 1,06 (s, 3H), 1,1-1,9 (m, 17H), 1,13 (s, 3H), 1,19 (s, 3H), 1,23 (s, 3H), 1,97 (s, 3H), 2,02 (s, 3H), 2,3-2,4 (m, 2H), 3,05 (s, 3H), 3,23 (s, 3H), 3,81 (dd, *J*= 9,0, 6,6 Hz, 1H), 3,95 (td, *J*= 7,8, 5,1 Hz, 1H), 4,54 (dd, *J*= 10,9, 4,7 Hz, 1H), 4,70 (td, *J*= 9,4, 4,3 Hz, 1H).

15

Ejemplo 7C. Preparación de 16,25-dimetoxi cicloastragenol, 17: retirada de grupos acetilo de 16

20



17

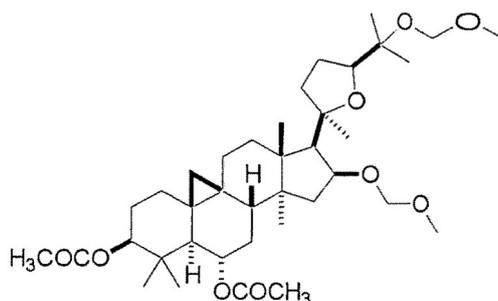
25

Una mezcla de **16** (28 mg, 0,046 mmol) y metóxido de sodio (0,5 mol/l en metanol, 6 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 48 horas. Se añadió agua, y la mezcla se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con agua y salmuera y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El disolvente se eliminó a presión reducida, y el residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (hexano/acetato de etilo 2:3) para dar el compuesto dimetoxi

diol **17** (23 mg, 96 %)

ESI-MS m/z 519 (M+H)⁺ C₃₂H₅₄O₅ = 518. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 0,32 (d, *J* = 4,7 Hz, 1H), 0,47 (d, *J* = 4,3 Hz, 1H), 0,90 (s, 3H), 0,93 (s, 3H), 1,06 (s, 3H), 1,11,9 (m, 17H), 1,13 (s, 3H), 1,20 (s, 3H), 1,22 (s, 3H), 1,23 (s, 3H), 2,3-2,4 (m, 2H), 3,06 (s, 3H), 3,23 (s, 3H), 3,27 (m, 1H), 3,51 (td, *J* = 9,4, 3,5 Hz, 1H), 3,81 (dd, *J* = 9,4, 6,6 Hz, 1H), 3,96 (td, *J* = 7,8, 5,5 Hz, 1H).

Ejemplo 7D. Alquilación de 3,6-diacetil cicloastragenol (14), con retención de grupos acetilo

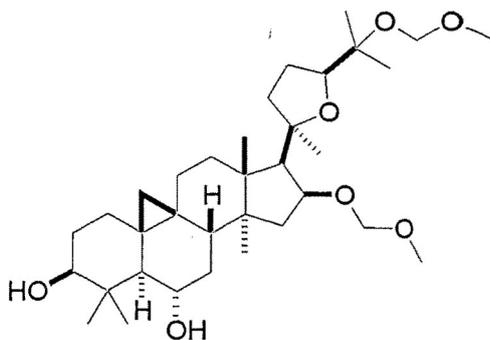


18

A una solución de **14** (109 mg, 0,109 mmol) en diclorometano (10 ml) se añadieron diisopropiletilamina (1,0 ml) y clorometil metil éter (0,5 ml), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. Se añadió agua, y la mezcla se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con agua y salmuera y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El disolvente se eliminó a presión reducida, y el residuo se purificó por cromatografía en columna en gel de sílice (hexano/acetato de etilo 3:1) para dar el compuesto **18** (114 mg, 90 %).

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 0,31 (d, *J* = 5,1 Hz, 1H), 0,56 (d, *J* = 4,7 Hz, 1H), 0,80 (s, 3H), 0,88 (s, 3H), 0,96 (s, 3H), 1,1-2,0 (m, 18H), 1,15 (s, 3H), 1,17 (s, 3H), 1,28 (s, 3H), 1,34 (s, 3H), 1,96 (s, 3H), 2,02 (s, 3H), 2,28 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H), 3,30 (s, 3H), 3,33 (s, 3H), 3,81 (t, *J* = 7,2 Hz, 1H), 4,17 (m, 1H), 4,5-4,6 (m, 3H), 4,7-4,8 (m, 3H).

Ejemplo 7E. Retirada de los grupos acetilo de 18

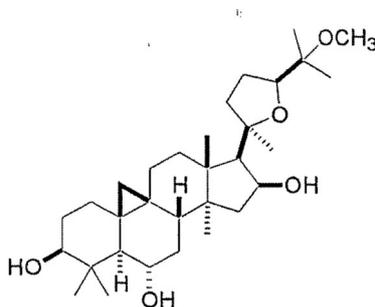


19

Una mezcla de **18**, anterior (derivado 3,6-diacetil-16,25-di(metoximetil)éter de cicloastragenol) (102 mg, 0,150 mmol) y metóxido de sodio (0,5 mol/l en metanol, 10 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 48 horas. Se añadió agua, y la mezcla se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con agua y salmuera y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El disolvente se eliminó a presión reducida, y el residuo se purificó por cromatografía en columna en gel de sílice (hexano/acetato de etilo 1:1) para dar el compuesto di(metoximetil)éter **19** (80 mg, 92 %).

ESI-MS m/z 579 (M+H)⁺ C₃₄H₅₈O₇ = 578. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 0,32 (d, *J* = 4,7 Hz, 1H), 0,48 (d, *J* = 4,3 Hz, 1H), 0,89 (s, 3H), 0,93 (s, 3H), 1,1-2,0 (m, 18H), 1,15 (s, 3H), 1,17 (s, 3H), 1,22 (s, 3H), 1,29 (s, 3H), 1,34 (s, 3H), 2,29 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H), 3,28 (m, 1H), 3,30 (s, 3H), 3,33 (s, 3H), 3,53 (m, 1H), 3,81 (t, *J* = 7,2 Hz, 1H), 4,18 (td, *J* = 7,8, 5,5 Hz, 1H), 4,50 (d, *J* = 6,6 Hz, 1H), 4,54 (d, *J* = 6,2 Hz, 1H), 4,71 (d, *J* = 7,0 Hz, 1H), 4,76 (d, *J* = 7,4 Hz, 1H).

Ejemplo 8. Alquilación de triacetil cicloastragenol 15, seguido por retirada de grupos acetilo

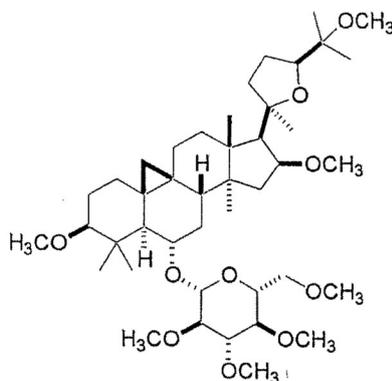
**20**

5 A una solución de **15** (30 mg, 0,049 mmol) en dimetilformamida (3 ml) se añadieron yodometano (0,75 ml, 12 mmol) e hidruro de sodio (dispersión en aceite al 60 %, 40 mg, 1,0 mmol) a 0 °C en nitrógeno, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Se añadió agua, y la mezcla se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con agua y salmuera y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El disolvente se eliminó a presión reducida.

10 Al residuo se añadió metóxido de sodio en metanol (0,5 mol/l, 6 ml), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Se añadió ácido clorhídrico al 10 %, y la mezcla se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con agua y salmuera y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El disolvente se eliminó a presión reducida, y el residuo se purificó por cromatografía en columna en gel de sílice (hexano/acetato de etilo 1:2) para dar **20** (23 mg, 93 %).

15 ESI-MS m/z 505 (M+H)⁺ C₃₁H₅₂O₅ = 504. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 0,33 (d, J= 4,3 Hz, 1H), 0,48 (d, J= 4,3 Hz, 1H), 0,8-2,1 (m, 17H), 0,91 (s, 3H), 0,93 (s, 3H), 1,04 (s, 3H), 1,14 (s, 3H), 1,20 (s, 3H), 1,22 (s, 3H), 1,23 (s, 3H), 2,28 (d, J= 7,8 Hz, 1H), 2,60 (q, J= 10,9 Hz, 1H), 3,17 (s, 3H), 3,27 (m, 1H), 3,51 (td, J= 9,8, 3,5 Hz, 1H), 3,72 (dd, J= 9,0, 5,5 Hz, 1H), 4,62 (m, 1H).

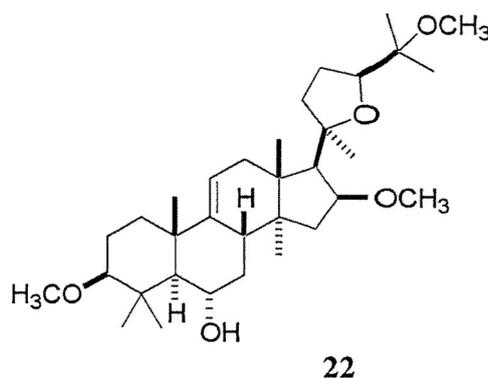
20 **Ejemplo 9A. Alquilación de los hidroxilos libres de cicloastragenol monoglucósido 6**

**21**

25 A una solución de **6** (50 mg, 0,077 mmol) en dimetilformamida (4 ml) se añadieron yodometano (1,0 ml, 16 mmol) e hidruro de sodio (dispersión en aceite al 60 %, 60 mg, 1,5 mmol) a 0 °C en nitrógeno, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Se añadió agua, y la mezcla se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con agua y salmuera y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El disolvente se eliminó a presión reducida, y el residuo se purificó por cromatografía en columna en gel de sílice (hexano/acetato de etilo 3:1) para dar el compuesto permetoxi **21** (33 mg, 57 %).

30 ESI-MS m/z 751 (M+H)⁺ C₄₃H₇₄O₁₀ = 750. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 0,21 (d, J= 4,7 Hz, 1H), 0,47 (d, J= 4,3 Hz, 1H), 0,8-2,0 (m, 17H), 0,87 (s, 3H), 0,89 (s, 3H), 1,05 (s, 3H), 1,13 (s, 3H), 1,17 (s, 3H), 1,22 (s, 3H), 2,3-2,4 (m, 2H), 2,67 (dd, J= 11,0, 4,1 Hz, 1H), 2,92 (t, J= 8,2 Hz, 1H), 3,06 (s, 3H), 3,1-3,6 (m, 6H), 3,22 (s, 3H), 3,32 (s, 3H), 3,35 (s, 3H), 3,48 (s, 3H), 3,49 (s, 3H), 3,59 (s, 3H), 3,80 (dd, J= 9,0, 6,6 Hz, 1H), 3,94 (m, 1H), 4,24 (d, J= 7,4 Hz, 1H).

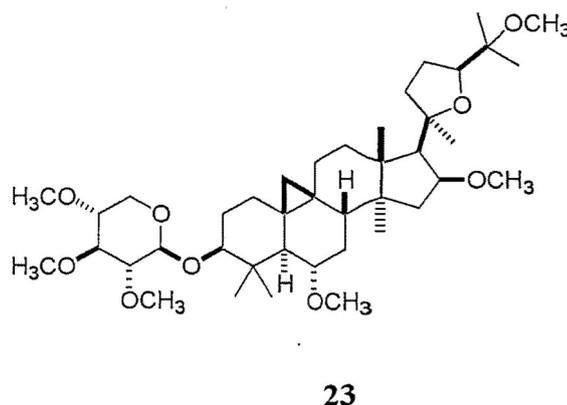
35 **Ejemplo 9B. Preparación de 3,16,25-trimetoxi astragenol, 22: retirada del glucósido del compuesto permetoxi 21, con reorganización concomitante**



5 A una solución de **21** (30 mg, 0,040 mg) en metanol (10 ml) se añadió ácido sulfúrico (0,2 ml) y la mezcla se sometió a reflujo durante 10 horas. Se añadió agua, y la mezcla se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con agua y salmuera y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El disolvente se eliminó a presión reducida, y el residuo se purificó por cromatografía en columna en gel de sílice (hexano/acetato de etilo 4:1) para dar **22** (3,6 mg, 17 %).

10 ESI-MS m/z 533 (M+H)⁺ C₃₃H₅₆O₅ = 532. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 0,73 (s, 3H), 0,8-2,0 (m, 18H), 0,85 (s, 3H), 1,00 (s, 3H), 1,03 (s, 3H), 1,06 (s, 3H), 1,14 (s, 3H), 1,24 (s, 3H), 1,25 (s, 3H), 2,3-2,4 (m, 2H), 2,58 (dd, J= 10,9, 3,9 Hz, 1H), 3,09 (s, 3H), 3,24 (s, 3H), 3,34 (s, 3H), 3,80 (dd, J= 9,4, 6,6 Hz, 1H), 3,98 (m, 1H), 5,25 (d a, = 5,5 Hz, 1H).

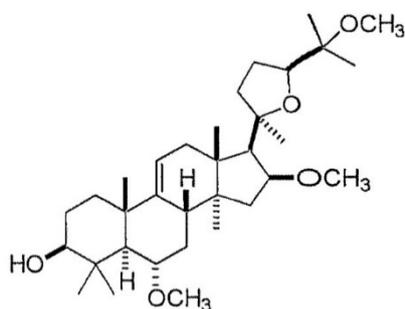
Ejemplo 10A. Alquilación de los hidroxilos libres de cicloastagenol monoglucósido 7



15 El compuesto **23** (18 mg, 53 %) se obtuvo a partir de **7** (30 mg) según el procedimiento usado para la preparación del compuesto **21**, anteriormente.

20 ESI-MS m/z 707 (M+H)⁺ C₄₁H₇₀O₉ = 706. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 0,20 (d, J= 4,3 Hz, 1H), 0,44 (d, J= 4,3 Hz, 1H), 0,8-1,9 (m, 17H), 0,90 (s, 3H), 0,93 (s, 3H), 1,05 (s, 3H), 1,11 (s, 3H), 1,13 (s, 3H), 1,18 (s, 3H), 1,23 (s, 3H), 2,3-2,4 (m, 2H), 2,9-3,6 (m, 6H), 3,09 (s, 3H), 3,20 (s, 3H), 3,22 (s, 3H), 3,42 (s, 3H), 3,58 (s, 3H), 3,59 (s, 3H), 3,80 (dd, J= 9,0, 6,6 Hz, 1H), 3,9-4,0 (m, 2H), 4,21 (d, J= 7,4 Hz, 1H).

25 **Ejemplo 10B. Preparación de 6,16,25-trimetoxi astragenol, 24: retirada del glucósido del compuesto permetoxi 23, con reorganización concomitante**

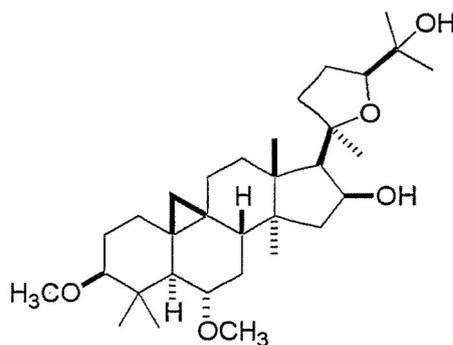


24

El compuesto **24** (7,1 mg, 56 %) se obtuvo a partir de **23** (17 mg) según el procedimiento usado para la preparación del compuesto **22**, anteriormente.

5 ESI-MS m/z 533 (M+H)⁺ C₃₃H₅₆O₅ = 532. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 0,74 (s, 3H), 0,8-2,4 (m, 18H), 0,85 (s, 3H), 0,92 (s, 3H), 1,03 (s, 3H), 1,06 (s, 3H), 1,14 (s, 3H), 1,23 (s, 3H), 1,24 (s, 3H), 3,10 (s, 3H), 3,18 (m, 1H), 3,23 (s, 3H), 3,34 (s, 3H), 3,53 (m, 1H), 3,80 (dd, $J=9,4, 6,6$ Hz, 1H), 3,97 (m, 1H), 5,24 (d, $J=5,5$ Hz, 1H).

10 **Ejemplo 11. Preparación de 3,6-dimetoxi cicloastragenol, 25: metilación del compuesto 16,25-di(metoximetil)éter 19, con retirada de los grupos di(metoximetil)éter**



25

15 A una solución de **19** (30 mg, 0,052 mmol) en dimetilformamida (3 ml) se añadieron yodometano (0,75 ml, 12 mmol) e hidruro de sodio (dispersión en aceite al 60 %, 40 mg, 1,0 mmol) a 0 °C en nitrógeno, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Se añadió agua, y la mezcla se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con agua y salmuera y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El disolvente se eliminó a presión reducida.

20 A este residuo se añadieron tetrahidrofurano (5 ml) y ácido clorhídrico al 10 % (1 ml), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche, después se sometió a reflujo durante 1 hora. Se añadió agua, y la mezcla se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con agua y salmuera y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El disolvente se eliminó a presión reducida, y el residuo se purificó por cromatografía en columna en gel de sílice (hexano/acetato de etilo 3:1 ~ 1:1) para dar **25** (13 mg, 48 %) y una cantidad menor (7,4 mg, 25 %) del compuesto 3,6-dimetoxi-16-(metoximetil)éter **26**.

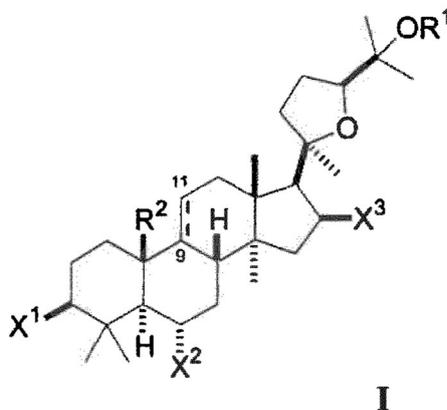
25 **25:** ESI-MS m/z 563 (M+H)⁺ C₃₄H₅₈O₆ = 562. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 0,19 (d, $J=4,7$ Hz, 1H), 0,45 ($J=4,3$ Hz, 1H), 0,8-2,3 (m, 18H), 0,86 (s, 3H), 0,92 (s, 3H), 1,05 (s, 3H), 1,07 (s, 3H), 1,20 (s, 3H), 1,24 (s, 3H), 1,28 (s, 3H), 2,41 (d, $J=8,2$ Hz, 1H), 2,70 (dd, $J=11,1, 4,5$ Hz, 1H), 2,90 (m, 1H), 3,19 (s, 3H), 3,326 (s, 3H), 3,330 (s, 3H), 3,71 (t, $J=7,4$ Hz, 1H), 4,37 (m, 1H), 4,53 (d, $J=6,2$ Hz, 1H), 4,59 (d, $J=6,2$ Hz, 1H).

30 **26:** ESI-MS m/z 519 (M+H)⁺ C₃₂H₅₄O₅ = 518. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 0,21 (d, $J=4,3$ Hz, 1H), 0,45 (d, $J=4,3$ Hz, 1H), 0,8-2,0 (m, 17H), 0,86 (s, 3H), 0,93 (s, 3H), 1,06 (s, 3H), 1,12 (s, 3H), 1,20 (s, 3H), 1,21 (s, 3H), 1,28 (s, 3H), 2,30 (d, $J=7,8$ Hz, 1H), 2,54 (q, $J=10,2$ Hz, 1H), 2,69 (dd, $J=11,3, 4,3$ Hz, 1H), 2,89 (td, $J=8,2, 4,3$ Hz, 1H), 3,19 (s, 3H), 3,32 (s, 3H), 3,72 (t, $J=7,2$ Hz, 1H), 4,66 (m, 1H).

35

REIVINDICACIONES

1. Una formulación de un compuesto aislado de fórmula I:



5

donde:

- 10 X¹ es hidroxilo o β-D-xilopiranosido,
 X² es hidroxilo o β-D-glucopiranosido, y
 X³ es hidroxilo;
 OR¹ es hidroxilo;

y

- 15 R² forma, junto con el carbono 9, un anillo ciclopropilo fusionado, y --- representa un enlace sencillo entre los carbonos 9 y 11 en una cantidad eficaz para su uso en el tratamiento de enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, degeneración macular, anemia o una afección crónica o aguda de la epidermis seleccionada del grupo que consiste en una herida, quemadura, una abrasión, una incisión, un sitio de injerto, una lesión causada por un agente infeccioso, una úlcera venosa crónica, una úlcera diabética, una úlcera de compresión, una úlcera de decúbito, una úlcera mucosa, y formación de queloide, aumentando la actividad telomerasa en las células o el tejido del paciente.

20

2. La formulación para su uso de la reivindicación 1, en la que dicho compuesto incluye cero, uno o dos glucósidos.

3. La formulación para su uso de la reivindicación 1, en la que dicho compuesto incluye cero o dos glucósidos.

25

4. La formulación para su uso de la reivindicación 1, en la que el compuesto se selecciona de astragalósido IV, cicloastragenol, cicloastragenol 6-β-D-glucopiranosido y cicloastragenol 3-β-D-xilopiranosido.

5. La formulación de la reivindicación 4 para su uso de la reivindicación 1, en la que el compuesto se selecciona de astragalósido IV y cicloastragenol.

30

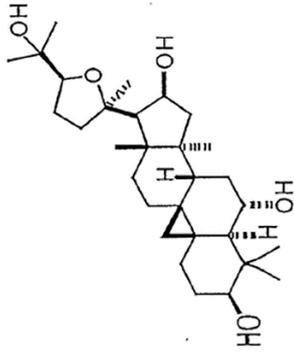
6. La formulación de la reivindicación 5 para su uso de la reivindicación 1, en la que dicho compuesto es cicloastragenol.

7. Un método no terapéutico para reparar defectos en la superficie de la piel para mejora cosmética que comprende aplicar un compuesto aislado seleccionado de cicloastragenol, astragenol, astragalósido IV, astragalósido IV 16-ona, cicloastragenol 6-β-D-glucopiranosido y cicloastragenol 3-β-D-xilopiranosido.

35

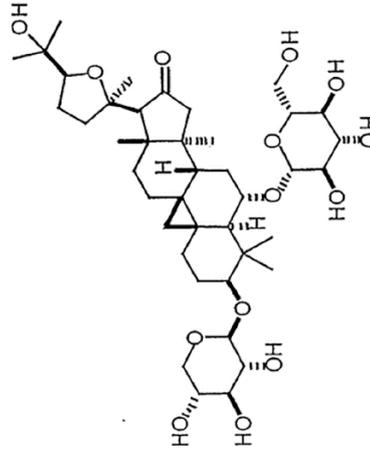
8. El método no terapéutico de la reivindicación 7, en el que dicho compuesto es cicloastragenol.

40



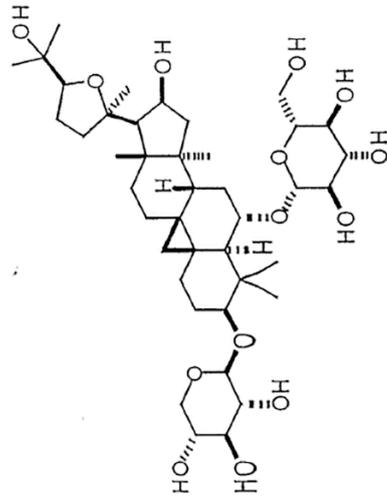
2 (Cicloastragenol)

Fig. 1B



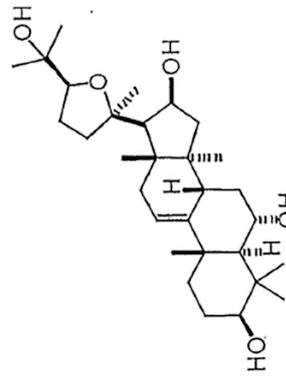
4 (Astragalósido IV 16-ona)

Fig. 1D



1 (Astragalósido IV)

Fig. 1A



3 (Astragenol)

Fig. 1C

Fig. 1

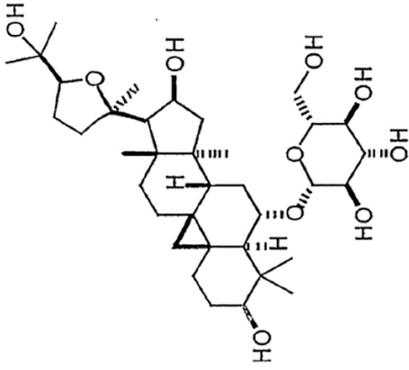


Fig. 1F

6

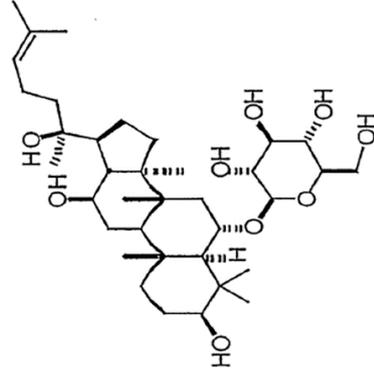


Fig. 1H

8 (Gingenosido RH1)

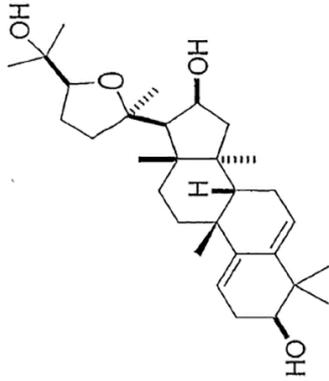


Fig. 1E

5

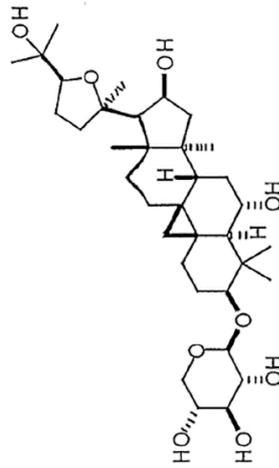


Fig. 1G

7

Fig. 1 cont

**Efecto de 1 sobre la actividad telomerasa en queratinocitos humanos
(HEKn-P PD3-6)**

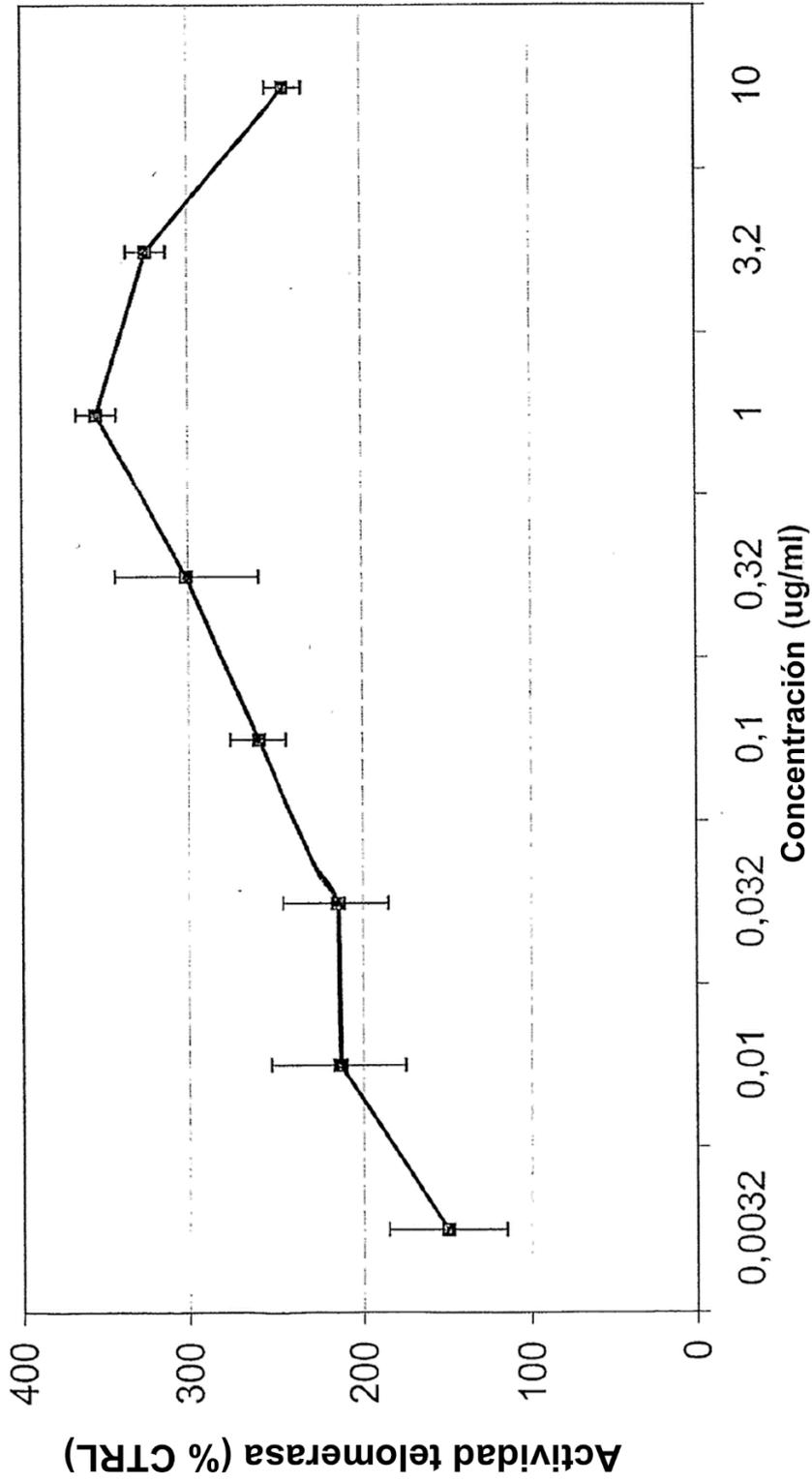


Fig. 2

Efecto de **2** sobre la actividad telomerasa en queratinocitos humanos

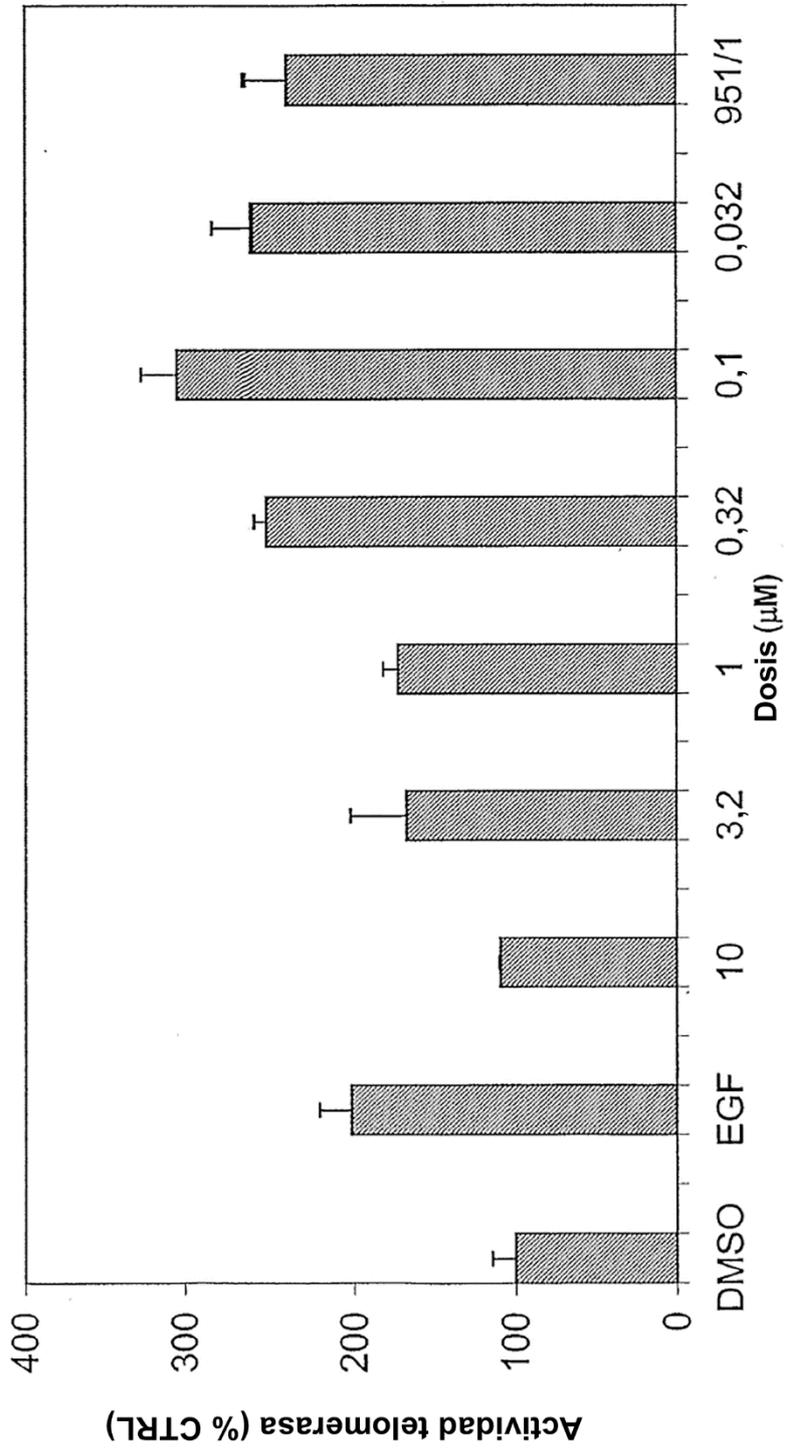


Fig. 3

Aceleración de la cicatrización en queratinocitos adultos que envejecen
(HEKa-18, PD32)

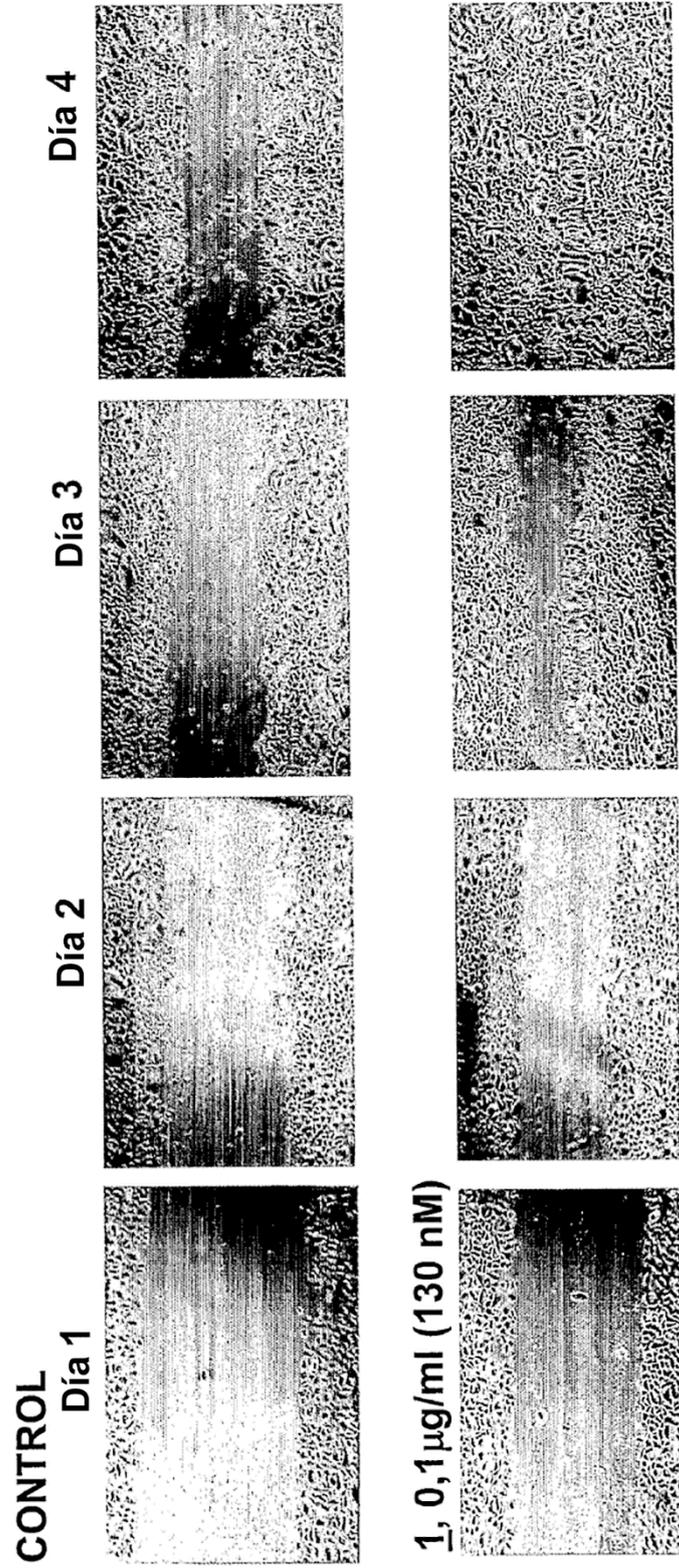


Fig. 4

Aceleración de la cicatrización en queratinocitos jóvenes (HEKn -P, PD14)

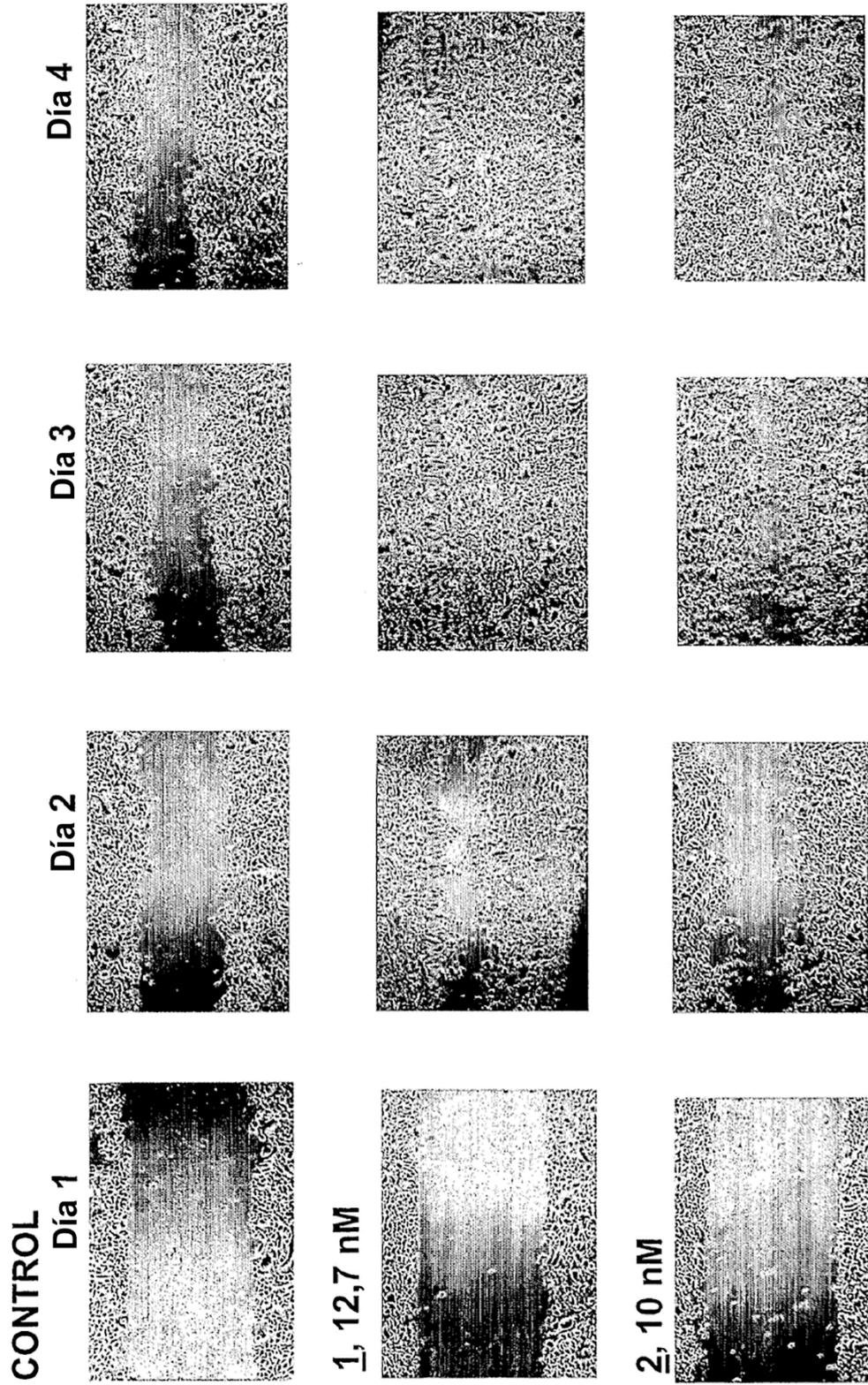


Fig. 5

Aceleración de la cicatrización en queratinocitos que envejecen

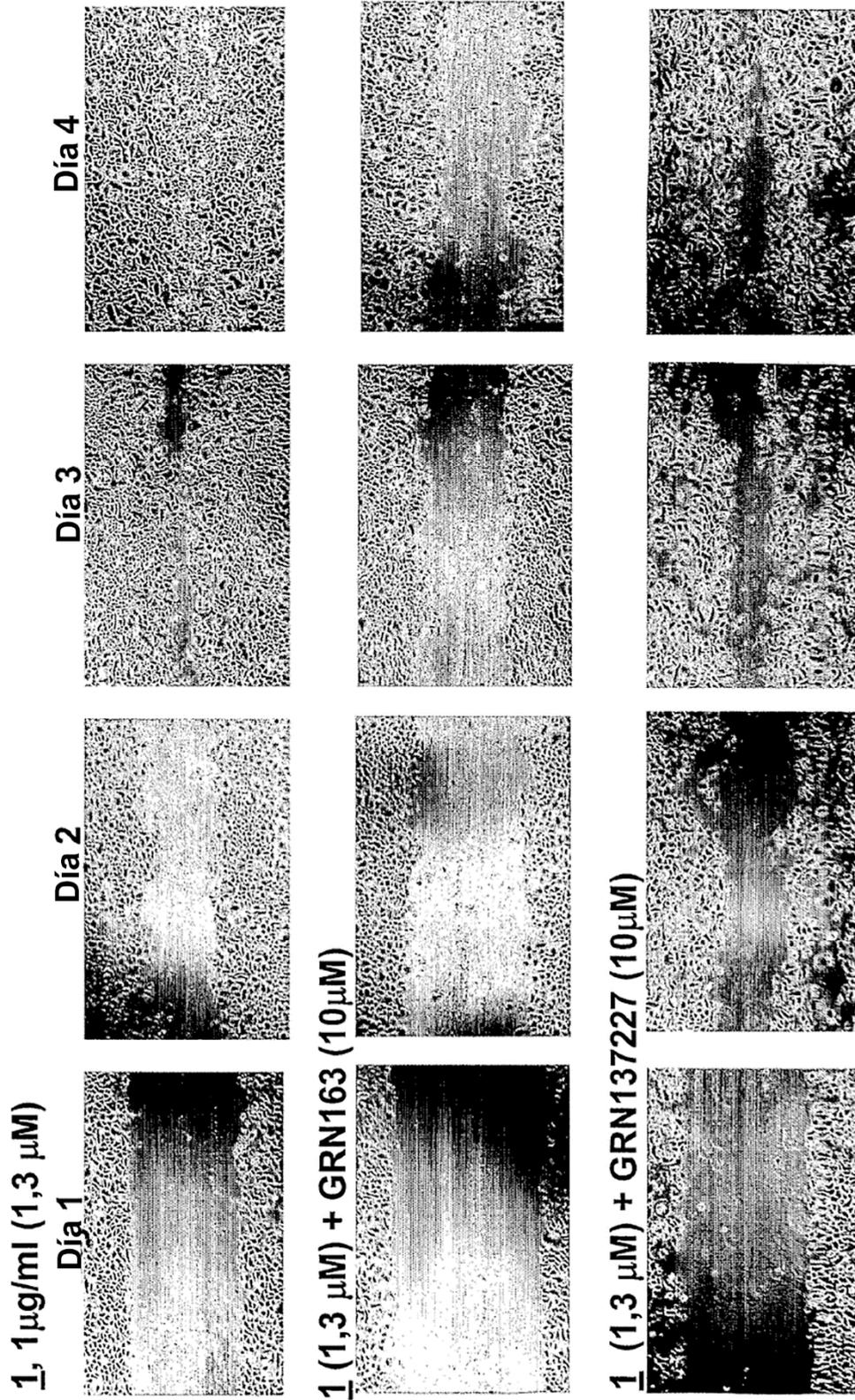


Fig. 6

Cicatrización en queratinocitos que envejecen (HEKn-P PD44)

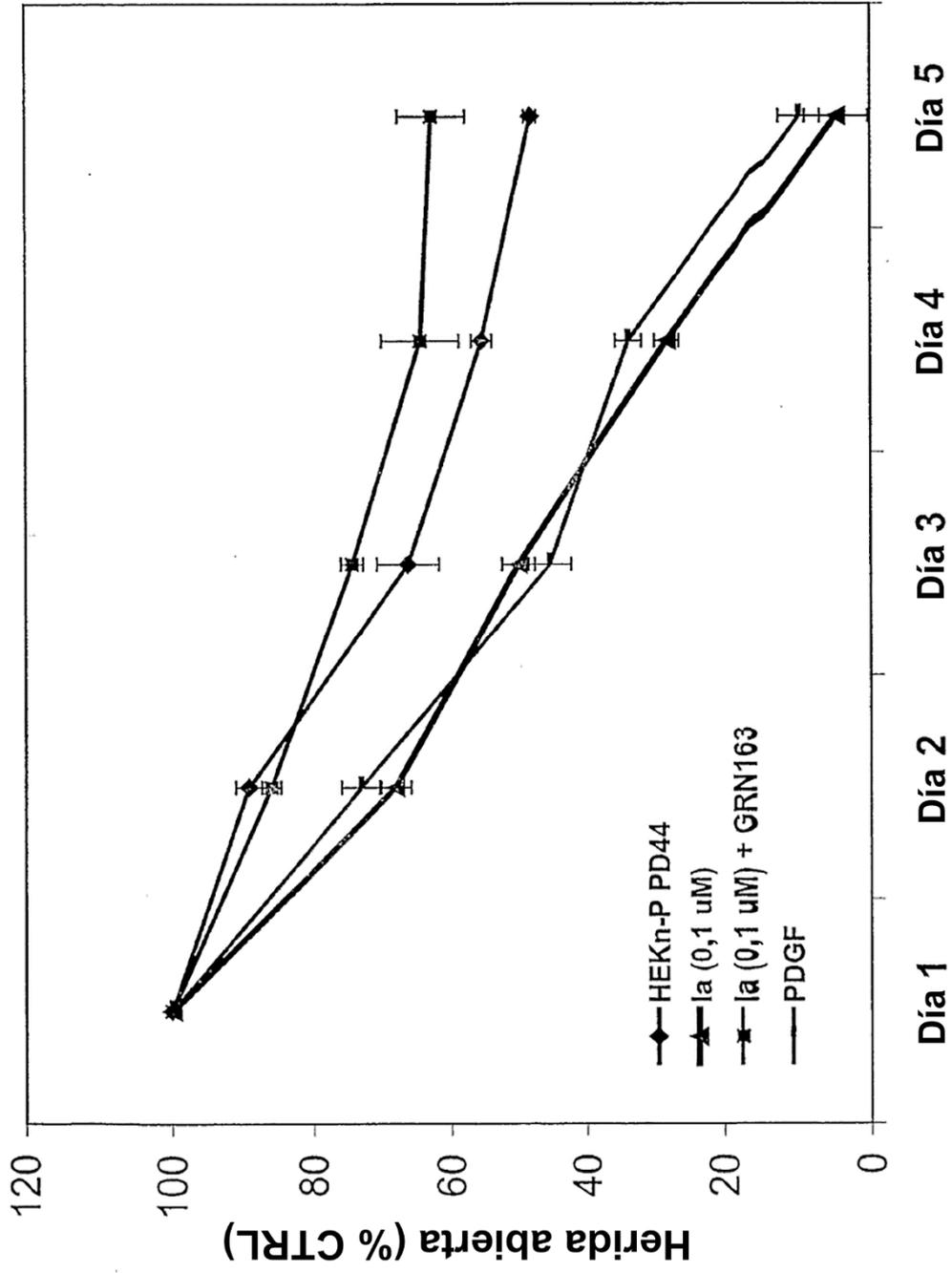


Fig. 7