

(11) Número de Publicação: **PT 1644009 T**

(51) Classificação Internacional:

A61K 31/7048 (2017.01) **A61K 31/56**
(2017.01)

A61K 31/58 (2017.01) **A61P 31/18** (2017.01)

A61P 31/12 (2017.01) **A61P 25/00** (2017.01)

A61P 19/00 (2017.01) **A61P 27/02** (2017.01)

A61P 9/10 (2017.01) **A61P 7/06** (2017.01)

A61P 17/00 (2017.01) **A61P 17/02** (2017.01)

C07J 1/00 (2017.01) **A61K 36/481** (2017.01)

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **2004.06.23**

(30) Prioridade(s): **2003.06.23 US 480988 P**

(43) Data de publicação do pedido: **2006.04.12**

(45) Data e BPI da concessão: **2017.11.29**
042/2018

(73) Titular(es):

TELOMERASE ACTIVATION SCIENCES, INC.
420 LEXINGTON AVE, SUITE 2900 NEW YORK
10170 **US**

(72) Inventor(es):

CALVIN B. HARLEY **US**
ALLISON C. CHIN **US**
TSUTOMU AKAMA **US**
NANCY YUK-YU IP **HK**
YUNG-HOU WONG **HK**

(74) Mandatário:

JOSÉ EDUARDO LOPES VIEIRA DE SAMPAIO
R DO SALITRE 195 RC DTO 1250-199 LISBOA **PT**

(54) Epígrafe: **COMPOSIÇÕES PARA AUMENTAR A ATIVIDADE DE TELOMERASE E PARA TRATAR INFEÇÕES POR VIH**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO TEM POR OBJETO PROCESSOS E COMPOSIÇÕES PARA AUMENTAR A ATIVIDADE DE TELOMERASE NAS CÉLULAS. ESSAS COMPOSIÇÕES INCLUEM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS, INCLUINDO FORMULAÇÕES TÓPICAS E NUTRACÊUTICAS. OS PROCESSOS E AS COMPOSIÇÕES SÃO ÚTEIS PARA TRATAR DOENÇAS SUJEITAS A TRATAMENTO POR MEIO DO AUMENTO DA ATIVIDADE DE TELOMERASE NAS CÉLULAS OU NOS TECIDOS DOS DOENTES, TAIS COMO, POR EXEMPLO, INFEÇÃO POR VIH, VÁRIAS DOENÇAS DEGENERATIVAS E DOENÇAS ALIMENTARES E DA PELE, AGUDAS OU CRÓNICAS. TAMBÉM SÃO ÚTEIS PARA AUMENTAR A CAPACIDADE REPLICATIVA DE CÉLULAS EM CULTURA, ASSIM COMO TERAPÊUTICA CELULAR EX VIVO E PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS ESTAMINAIS.

RESUMO

COMPOSIÇÕES PARA AUMENTAR A ATIVIDADE DE TELOMERASE E PARA TRATAR INFEÇÕES POR VIH

A presente invenção tem por objeto processos e composições para aumentar a atividade de telomerase nas células. Essas composições incluem formulações farmacêuticas, incluindo formulações tópicas e nutracêuticas. Os processos e as composições são úteis para tratar doenças sujeitas a tratamento por meio do aumento da atividade de telomerase nas células ou nos tecidos dos doentes, tais como, por exemplo, infecção por VIH, várias doenças degenerativas e doenças alimentares e da pele, agudas ou crônicas. Também são úteis para aumentar a capacidade replicativa de células em cultura, assim como terapêutica celular ex vivo e proliferação de células estaminais.

DESCRIÇÃO

COMPOSIÇÕES E PROCESSOS PARA AUMENTAR A ATIVIDADE DE TELOMERASE

Domínio da Invenção

A presente invenção tem por objeto compostos que induzem a atividade de telomerase em células, para serem utilizados no tratamento de infecções por VIH e composições farmacêuticas que contêm esses compostos, conforme definido nas reivindicações.

Antecedentes e referências da presente invenção

Telomerase

A telomerase é uma ribonucleoproteína que catalisa a adição de repetições teloméricas às extremidades de telómeros. Os telómeros são fileiras longas de sequências repetidas que tapam as extremidades dos cromossomas e crê-se que estabilizam o cromossoma. Nos seres humanos, os telómeros normalmente têm um comprimento de 7-10 kb e contêm várias repetições da sequência -TTAGGG-. A telomerase não é expressa na maior parte das células de adulto e o comprimento dos telómeros diminui com sucessivos ciclos de replicação. Após um certo número de ciclos de replicação, o encurtamento progressivo dos telómeros resulta no facto de as células entrarem num estágio de crise telomérica que, por sua vez, leva à senescência celular. Algumas doenças estão associadas com a perda rápida dos telómeros, resultando numa senescência prematura das células. A expressão dos genes que codificam a proteína telomerase humana em células humanas tem demonstrado

que confere um fenótipo imortal, presumivelmente através dos bypass de vias de senescência natural das células. Além disso, a expressão do gene telomerase em células envelhecidas, com telômeros curtos, tem demonstrado que produz um aumento do comprimento do telômero e que restaura um fenótipo normalmente associado a células mais jovens.

As células somáticas, ao contrário das células de tumor e de algumas células estaminais, têm pouca ou nenhuma atividade de telomerase e param de se dividir quando as extremidades teloméricas, de pelo menos alguns cromossomos, tiverem sido encurtadas até a um comprimento crítico, levando a uma senescência celular programada (morte das células). Dado que a perda de repetições teloméricas em células somáticas, que leva à senescência, aumenta com a diminuição da atividade da telomerase, a indução da atividade de telomerase, que tem o efeito de adicionar porções de repetições teloméricas aos telômeros, confere assim às células somáticas mortais uma capacidade replicativa acrescida e confere às células senescentes a capacidade de proliferar e sair de uma forma apropriada do ciclo após reparação do tecido danificado.

Os potenciais benefícios terapêuticos do aumento da atividade da telomerase em células somáticas incluem, por exemplo, o tratamento da SIDA, que é caracterizada por uma senescência precoce dos linfócitos T citotóxicos (células CD8⁺), que são responsáveis por matarem células CD4⁺ infectadas (ver, por exemplo, Dagarag *et al.*, 2003); a neuroproteção em doentes com Alzheimer (ver, por exemplo, Mattson, 2000); a cura de feridas e a manutenção de células de explantes, tais como células adrenocorticais (ver, por exemplo, Thomas *et al.*, 2000) ou células da medula óssea ou células do estroma/de enxertos do mesênquima (ver, por

exemplo, Simonsen et al., 2002). A seguir aparecem as citações completas destas referências.

Referências que discutem estas e outras características da telomerase incluem:

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

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

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

Cech, T.R. et al., U.S. Patent N°. 6 093 809 (25 Jul, 2000).

Cech, T.R. et al., U. S. Patent N°. 6 166 178 (26 Dez, 2000).

Cech, T.R. et al., U.S. Patent N°. 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 (Fev 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 (Maio 2000).

Fujimoto, R. et al., "Expression of telomerase components in oral keratinocytes and squamous cell carcinomas", *Oral Oncology* 37(2): 132-40 (Fev 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 Ago, 2000).

Hannon, G.J. e Beach, D.H., "Increasing proliferative capacity and preventing replicative senescence by increasing telomerase activity and inhibiting pathways inhibiting cell proliferation", *Pub. Ped. Int. PCT N°*. WO 2000/031238 (Jun 2000).

Hannon, G.J. et al., "Extension of cellular lifespan using telomerase-activating therapeutic agents", *Pub. Ped. Int. PCT N°*. WO 99/35243 (Jul 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 (Jun 25 1996).

Harley, C.B. et al., "Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts", *Nature* 345(6274): 458-60 (31 Maio 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).

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).

Jiang, X.R. et al., Pub. PCT N°. 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 (Jan 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 (Jan 1998).

Kim, N.W. et al., "Telomerase activity assays", *payenye norte-americana* N°. 5 629 154 (Maio 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).

Mattson, M.P., "Emerging neuroprotective strategies durante 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 (Jan 1999).

Oh, H. e Schneider, M.D., "The emerging role of telomerase in cardiac muscle cell growth and survival", *JMol Cell Cardiol* 34(7): 717-24 (Jul 2002).

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., and Hornsby, P.J., "Formation of functional tissue from transplanted adrenocortical cells expressing telomerase reverse transcriptase", *Nat Biotechnol* 18(1): 39-42 (Jan 2000).

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 norte-americana N°. 5 583 016 (Dez 1996).

West, M.D. et al., "Methods of screening durante compounds that derepress or increase telomerase activity", patente norte-americana N°. 6 007 989 (Dez 1999).

White, M.A., "Assembly of telomerase components and chaperonins and methods and compositions durante inhibiting or stimulating telomerase assembly", PCT Int. Appl. Pubn. N°. WO 2000/08135 (Feb. 2000).

Yang, J. et al., "Telomerized human microvasculature is functional in vivo", *Nature Biotechnology* (United States) 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 Set 1999).

Yudoh, K. et al., "Reconstituting telomerase activity using the telomerase catalytic subunit prevents the telomere shorting and replicative senescence in human osteoblasts", *J. Bone and Mineral Res.* 16(8): 1453-1464 (2001).

Os processos para aumentar a atividade da telomerase, sob o ponto de vista terapêutico, têm sido investigados, por exemplo, por Bodnar (1997), White (2000), Hannon *et al.* (1999; 2000), Franzese *et al.* (2001) e Yudoh *et al.* (2001), todos citados antes. Nestes relatórios, a atividade da telomerase é geralmente aumentada por uma hiper-expressão de TRTh, o gene que codifica a componente da proteína da telomerase humana ou por expressão de proteínas que medeiam a junção de telomerase, por exemplo, proteínas de choque térmico (White). Franzese *et al.*, relataram que o saquinavir, um inibidor de protease, prescrito para o tratamento de infecções por VIH, aumentou a atividade da telomerase em células mononucleares de sangue periférico; Vasa *et al.*, descreveram a ativação da telomerase e um atraso resultante na senescência endotelial, por meio da administração de um precursor de óxido nítrico (NO).

Astragalósidos e ginsenosídeos

Os compostos das famílias dos astragalósidos e dos ginsenosídeos têm sido referidos como tendo vários efeitos biológicos. As referências sobre a discussão da atividade biológica dos astragalósidos e dos ginsenosídeos incluem:

Bedir, E. *et al.*, "Immunostimulatory effects of cycloartane-type triterpene glycosides from *Astragalus* species", *Biol & Pharm Bull* 23(7): 834-7 (2000).

Binder, B. *et al.*, "Use of triterpensaponins, such as notoginsenoside R1 (NR1) and/or astragaloside (ASIV) durante preparing medicaments", patente norte-americana Nº. 5 770 578 (Jun 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).

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 p56lck kinase and cell proliferation in Jurkat T cells", *Korean J. Ginseng Sci.* 19(2): 117-21 (1995).

Huang, Y. et al., "Selected non-timber forest products with medicinal applications from Jilin Province in China", Conference Title: Forest communities in the third millennium: Linking research, business, and policy toward a sustainable non-timber forest product sector; Kenora, Ontario, Canada, 1-4 October, 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).

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 myocardium and the activity of Na,K-ATPase", *Chem. Nat. Compounds* 30(4): 469-473 (1994).

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 (Out 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); *Resumo do CA* N°. 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).

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. e Min, X., "Compositions and method durante treating or preventing osteoporosis", *Pyb. PCT* N°. WO 2001/01996.

Sengupta, S. et al., "Pharmaceutically effective compounds and their use", *Pub. PCT* N°.s. WO 2002/69980 e 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* N°. 1997: 570234.

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).

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-Ago 1997).

Zi-Pu, L. e Qian, C., "Effects of astragaloside IV on myocardial calcium transport and cardiac function in ischemic rats", Acta Pharmacol Sin 23(10): 898-904 (Out 2002).

Rokia et al. disclose in Pharmazie, 48(6), 1993, 452-454 that astragaloside II has anti-HIV and anticancer activity. The same teaching can be found in Phytochemistry, 45(8), 1997, 1597-1600 por Ionkova et al.

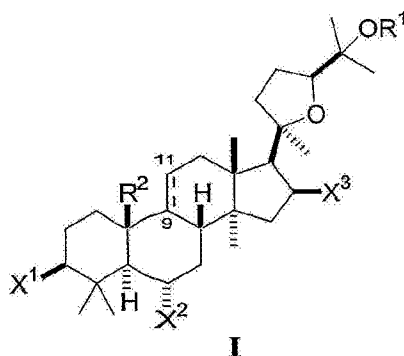
Sumário da invenção

A matéria de facto que não está englobada pelo âmbito das reivindicações, não faz parte da presente invenção aqui reivindicada. A presente invenção, aqui descrita, está geralmente relacionada com composições para serem utilizadas em processos de aumento da atividade da telomerase em células. Essas composições podem ser utilizadas em cultura de células, isto é, *in vitro* ou *ex vivo* ou *in vivo*, tais como células que crescem em tecidos de um indivíduo, incluindo seres humanos e animais não humanos, particularmente mamíferos não humanos.

Em aspetos particulares da presente memória descritiva, as composições contêm um composto de fórmula **I**, **II** ou **III**,

conforme se descreve a seguir. Alguns aspetos da presente memória descritiva incluem formulações desses compostos para serem utilizados em cosmética, em aplicações nutracêuticas e farmacêuticas, em particular, em aplicações em que o aumento da atividade de telomerase em células demonstrou ser ou espera-se que seja benéfico. Os processos para utilizar os compostos e as suas formulações, para essas aplicações, também são aqui providenciados, incluindo processos para a aplicação ou a administração dessas formulações após ter sido determinada a necessidade ou a vantagem em aumentar a atividade de telomerase em células ou tecidos.

A presente invenção inclui, num aspeto, um processo para aumentar a atividade de telomerase numa célula ou num tecido. O processo compreende o contacto da célula ou do tecido com uma formulação de um composto isolado de fórmula **I**, de fórmula **II** ou de fórmula **III**, que se seguem. Em modalidades preferidas, o composto é o composto de fórmula **I** ou de fórmula **II**, que se seguem. O processo pode ainda compreender uma etapa preliminar de identificação de uma célula ou de um tecido, em que se deseja um aumento da atividade de telomerase. De acordo com a presente invenção, nos compostos de fórmula **I**:



cada um de X^1 , X^2 e X^3 seleciona-se, independentemente, entre hidroxil, alcoxil inferior, aciloxil inferior, ceto e um glicósido;

OR^1 seleciona-se entre hidroxil, alcoxil inferior, aciloxil inferior e um glicósido;

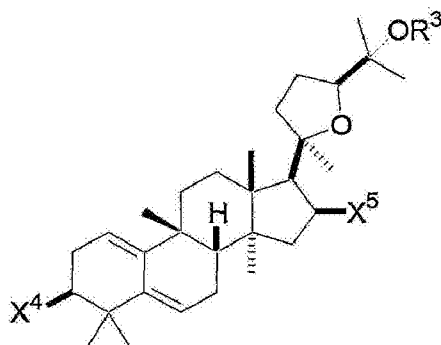
em que qualquer um dos grupos hidroxil no referido glicósido pode estar substituído por outro glicósido, um alquilo inferior ou um acilo inferior, de tal modo que o composto inclui um máximo de três glicósidos; e

R^2 representa metilo e ---- representa uma ligação dupla entre os carbonos 9 e 11; ou, em modalidades preferidas, R^2 forma, em conjunto com o carbono 9, um anel fundido de ciclopropilo e ---- representa uma ligação simples entre os carbonos 9 e 11.

Preferencialmente, o composto inclui zero, um ou dois, mais preferencialmente, zero ou dois glicósidos, nenhum dos quais está substituído por outro glicósido. Preferencialmente, os glicósidos estão na configuração D (ocorrência natural).

Em aspetos selecionados da descrição da fórmula **I**, cada um de X^1 e X^2 seleciona-se, independentemente, entre hidroxil, alcoxil inferior, aciloxil inferior e um glicósido e X^3 seleciona-se entre hidroxil, alcoxil inferior, aciloxil inferior, ceto e um glicósido. Noutras modalidades, X^1 representa OH ou um glicósido, cada um de X^2 e OR^1 representa, independentemente, OH ou um glicósido e X^3 representa OH ou ceto. Exemplos de compostos de fórmula **I** incluem astragalósido IV, cicloastragenol, astragenol, astragalósido-IV-16-ona, cicloastragenol-6- β -D-glicopiranosídeo e cicloastragenol-3- β -D-xilopiranosídeo. Os compostos para serem utilizados na presente invenção estão definidos nas reivindicações. Em modalidades selecionadas, o composto

seleciona-se entre astragalósido IV, cicloastragenol, astragenol e astragalósido-IV-16-ona. Numa modalidade, o composto é astragalósido IV. De acordo com um aspeto da presente invenção, nos compostos de fórmula **II**:



II

cada um de X^4 e X^5 seleciona-se, independentemente, entre hidroxil, alcoxi inferior, aciloxi inferior, ceto e um glicósido e

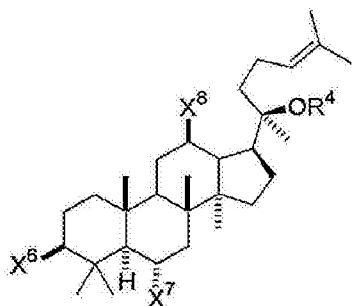
OR^3 seleciona-se entre hidroxil, alcoxi inferior, aciloxi inferior e um glicósido,

em que qualquer um dos grupos hidroxilo, no referido glicósido, pode estar substituído por outro glicósido, alquilo inferior ou acilo inferior, de tal modo que o composto inclui um máximo de três glicósidos.

Preferencialmente, o composto inclui zero, um ou dois glicósidos, nenhum dos quais está substituído por outro glicósido; os glicósidos estão, preferencialmente, na configuração D.

Em aspetos selecionados da fórmula **II**, cada um de X^4 e OR^3 seleciona-se entre hidroxil, alcoxi inferior, aciloxi inferior e um glicósido e X^5 seleciona-se entre hidroxil, alcoxi inferior, aciloxi inferior e ceto ($=O$). Noutras modalidades, X^4 representa OH ou um glicósido e cada um de X^5 e OR^3 representa OH. Numa modalidade, X^4 representa OH. De

acordo com um aspeto da presente invenção, nos compostos de fórmula **III**:



III

cada um de X^6 , X^7 e X^8 seleciona-se, independentemente, entre hidroxil, alcoxi inferior, aciloxi inferior, ceto e um glicósido e

OR^4 seleciona-se entre hidroxil, alcoxi inferior, aciloxi inferior e um glicósido,

em que qualquer um dos grupos hidroxilo no referido glicósido pode estar substituído por outro glicósido, alquilo inferior ou acilo inferior, de tal modo que o composto inclui, no máximo, três glicósidos.

Preferencialmente, o composto inclui zero, um ou dois glicósidos, nenhum dos quais está substituído por outro glicósido; os glicósidos estão, preferencialmente, na configuração D.

Em aspetos selecionados da fórmula **III**, cada um de X^6 , X^7 , X^8 e OR^4 seleciona-se, independentemente, entre hidroxil, alcoxi inferior, aciloxi inferior e um glicósido e seleciona-se, preferencialmente, entre hidroxil e um glicósido. Noutras modalidades, cada um de X^8 e OR^4 representa OH e cada um de X^6 e X^7 seleciona-se, independentemente, entre hidroxilo e um glicósido. Ainda noutros aspetos, cada um de OR^4 , X^6 e X^8 representa OH e X^7 representa um glicósido. Um exemplo de um composto de fórmula **III** é o ginsenosídeo RH1.

Um composto preferido, com as fórmulas **I**, **II** ou **III** anteriores, quando formulado num dissolvente, numa concentração de 1 µg/mL ou menos, é eficaz para produzir um nível de atividade de telomerase em queratinócitos ou fibroblastos, conforme se pode medir através de um ensaio TRAP, pelo menos 50 % superior ao nível nas referidas células tratadas com o referido dissolvente, conforme medido por um ensaio TRAP, conforme aqui descrito. Noutras modalidades preferidas, o composto é eficaz para produzir um nível de atividade de telomerase em queratinócitos ou fibroblastos, conforme se pode medir através de um ensaio TRAP, pelo menos 100 % superior ao nível, nas referidas células, tratadas com o referido dissolvente, conforme medido por um ensaio TRAP, conforme aqui descrito.

Exemplos de compostos de fórmulas **I-III** incluem os descritos na Fig. 1 e os designados aqui como **1** (astragalósido IV), **2** (cicloastragenol), **3** (astragenol), **4** (astragalósido-IV-16-ona), **5** (20R,24S-epoxi-3β,16β,25-tri-hidroxi-9β-metil-19-norlanost-1,5-dieno), **6** (cicloastragenol-6-p-D-glicopiranósido), **7** (cicloastragenol-3-β-D-xilopiranósido) e **8** (ginsenosídeo RH1). Os compostos **1-4**, **6** e **7** estão de acordo com a presente invenção. Em modalidades selecionadas, o composto seleciona-se entre os designados aqui como **1** (astragalósido IV), **2** (cicloastragenol), **3** (astragenol), **4** (astragalósido-IV-16-ona), **6** (cicloastragenol-6-β-D-glicopiranósido) e **7** (cicloastragenol-3-β-D-xilopiranósido). Noutras modalidades, o composto seleciona-se entre os designados aqui por **1**, **2**, **3** e **4**. Numa modalidade, o composto é astragalósido IV (**1**) ou cicloastragenol (**2**).

O processo de contacto de uma formulação de um composto isolado de fórmula **I**, **II** ou **III**, com uma célula ou um tecido, pode compreender, antes do referido contacto, a identificação

de uma célula ou de um tecido em que se deseja o aumento da atividade da telomerase. Os benefícios que se pretendem pelo aumento da atividade de telomerase numa célula ou num tecido incluem, por exemplo, o aumento da capacidade replicativa e/ou o prolongamento da vida da referida célula ou células, dentro do referido tecido.

O processo pode incluir o diagnóstico de um estado clínico num determinado indivíduo, de tal modo que seja desejável o aumento da atividade de telomerase nas células ou nos tecidos desse indivíduo e seja desejável a administração da formulação a esse indivíduo. O indivíduo é, preferencialmente, um mamífero, tal como um indivíduo ou um doente humano. Essas condições podem incluir, por exemplo, infecção por VIH, várias doenças degenerativas, tais como doença neurodegenerativa, doenças degenerativas dos ossos ou das articulações, degeneração macular, aterosclerose e anemia. Esses estados clínicos também incluem feridas ou outros estados clínicos agudos ou crónicos da epiderme, tal como, por exemplo, uma queimadura, abrasão, incisão, um sítio de enxerto, uma lesão causada por um agente infeccioso, uma úlcera venosa crónica, uma úlcera diabética, uma úlcera de compressão, herpes de pressão, uma úlcera da mucosa e formação de colóides.

De acordo com isto, a presente invenção providencia processos de tratamento de um estado clínico num doente, tal como os referidos antes, por meio do aumento da atividade da telomerase em células ou tecidos do doente, compreendendo esse método a administração, a um doente que necessite desse tratamento, de uma formulação de um composto isolado de fórmula **I**, de fórmula **II** ou de fórmula **III**, conforme se definiu antes. De acordo com a presente invenção, os compostos reivindicados utilizam-se para o tratamento de uma

infecção por VIH. As composições podem ser administradas por várias vias, por exemplo, oralmente, topicamente ou parentericamente.

A presente invenção ainda tem por objeto um processo de diagnóstico num indivíduo, de um estado de doença sujeito ao tratamento por meio do aumento da atividade de telomerase, numa célula ou no tecido de um indivíduo e a administração de um composto de fórmula **I**, **II** ou **III**, conforme descrito antes, preferencialmente, um composto de fórmula **I** ou **II**, num veículo farmacêutico, administrado então ao indivíduo que necessita desse tratamento.

Noutro aspeto, a presente invenção tem por objeto um processo de tratamento de um estado agudo ou crónico da epiderme, compreendendo o contacto das células da epiderme com uma formulação tópica de um composto isolado de fórmula **I**, de fórmula **II** ou de fórmula **III**, tal como foi definido antes. Em aspetos preferidos, o composto é de fórmula **I** ou de fórmula **II**. Noutras modalidades, o composto seleciona-se entre astragalósido IV, cicloastragenol, astragenol, astragalósido-IV-16-ona, cicloastragenol-6- β -D-glicopiranósido, cicloastragenol-3- β -D-xilopiranósido e 20R,24S-epoxi-3 β ,16 β ,25-tri-hidroxi-9 β -metil-19-norlanost-1,5-dieno (designado aqui como **5**).

As células com as quais a formulação entram em contacto podem incluir células de explantes que são contactadas *ex vivo*, por exemplo, para terapêuticas à base de células ou podem incluir outras células em cultura. De acordo com isto, a presente invenção tem por objeto um processo para aumentar a capacidade replicativa das células *in vitro* ou *ex vivo*, que compreende o contacto das referidas células com uma quantidade eficaz de uma composição, que contém um composto

de fórmula **I**, de fórmula **II** ou de fórmula **III**, tal como foi definido antes, incluindo os aspetos selecionados dos compostos, tal como foi definido antes. Em aspetos preferidos, o composto é de fórmula **I** ou de fórmula **II**, incluindo os aspetos selecionados dos compostos, tal como foi definido antes. Em geral, as células são células de mamíferos não transformadas; em aspetos selecionados, as células são células estaminais, tais como células estaminais de medula óssea, células do estroma da medula óssea, fibroblastos dérmicos jovens ou de passagem precoce, células de percursoros de ilhéus, células da neurosfera, células das suprarrenais, células-satélite dos músculos, osteoblastos, células epiteliais da retina pigmentadas e células CD8⁺ restritas a VIH.

Num aspeto relacionado, a presente invenção tem por objeto uma composição farmacêutica que compreende, num veículo aceitável sob o ponto de vista farmacêutico, um composto de fórmula **I**, tal como descrito antes, em que:

cada um de X^1 e X^2 seleciona-se, independentemente, entre hidroxil, alcoxi inferior, aciloxi inferior, ceto e um glicósido;

X^3 representa ceto;

OR^1 seleciona-se entre hidroxil, alcoxi inferior, aciloxi inferior e um glicósido;

em que qualquer um dos grupos hidroxilo no referido glicósido pode estar substituído por outro glicósido, alquilo inferior ou acilo inferior, de tal modo que o composto inclui um máximo de três glicósidos; e

R^2 representa metilo e ---- representa uma ligação dupla entre os carbonos 9 e 11; ou, em modalidades preferidas, R^2 forma, em conjunto com o carbono 9, um anel fundido

de ciclopropilo e ---- representa uma ligação simples entre os carbonos 9 e 11.

Preferencialmente, o composto inclui zero, um ou dois glicósidos, nenhum dos quais está substituído por outro glicósido e os glicósidos estão na configuração D.

Em aspetos seleccionados da composição, X^1 representa OH ou um glicósido e cada um de X^2 e OR^1 representa, independentemente, OH ou um glicósido. De acordo com a presente invenção, a composição farmacêutica está definida nas reivindicações. Numa modalidade, o composto é astragalósido-IV-16-ona (designado aqui como **4**). Num aspeto da presente invenção, a composição compreende, num veículo, aceitável sob o ponto de vista farmacêutico, um composto de fórmula **I**, tal como descrito antes, em que:

um de X^1 e X^2 selecciona-se entre hidroxil, alcoxi inferior, aciloxi inferior e ceto e o outro representa um glicósido; e

cada um de X_3 e OR^1 selecciona-se, independentemente, entre hidroxil, alcoxi inferior, aciloxi inferior e um glicósido;

em que qualquer um dos grupos hidroxilo no referido glicósido pode estar substituído por outro glicósido, alquilo inferior ou acilo inferior, de tal modo que o composto inclui no máximo três glicósidos; e

R^2 representa metilo e ---- representa uma ligação dupla entre os carbonos 9 e 11; ou, em modalidades preferidas, R^2 forma, em conjunto com o carbono 9, um anel fundido de ciclopropilo e ---- representa uma ligação simples entre os carbonos 9 e 11.

Preferencialmente, o composto inclui um glicósido, que não está substituído por outro glicósido e os glicósidos estão na configuração D. Numa modalidade, o composto seleciona-se entre cicloastragenol-6- β -D-glicopiranosídeo (designado aqui como **6**) e cicloastragenol-3- β -D-xilopiranosídeo (designado aqui como **7**). Noutro aspeto da presente invenção, a composição farmacêutica compreende, num veículo, aceitável sob o ponto de vista farmacêutico, um composto de fórmula **II**, tal como foi definido antes. Aspetos selecionados do composto foram também definidos antes. Num aspeto, o composto é designado aqui como **5**.

A presente invenção também tem por objeto compostos de fórmula **II**, tal como foi definido antes, incluindo aspetos selecionados, tal como foi definido antes. Num aspeto, o composto é designado aqui como **5**.

Num aspeto relacionado, a presente invenção tem por objeto uma formulação farmacêutica tópica de um composto isolado de fórmula **I**, de fórmula **II** ou de fórmula **III**, tal como foi definido antes. Os aspetos selecionados dos compostos também já foram definidos antes. Em aspetos preferidos da presente invenção, o composto é de fórmula **I** ou de fórmula **II**. De acordo com a presente invenção, na composição farmacêutica que contém uma formulação tópica, o composto isolado seleciona-se entre cicloastragenol, astragenol, astragalósido-IV-16-ona, cicloastragenol-6- β -D-glicopiranosídeo e cicloastragenol-3-beta-D-xilopiranosídeo. Esta formulação tópica normalmente contém um ou mais componentes selecionados no grupo que consiste num emulsionante, um espessante e um emoliente para a pele. Essas composições podem ser utilizadas para o tratamento de feridas ou de outros estados clínicos agudos ou crónicos da epiderme.

Noutro aspeto relacionado, a presente invenção tem por objeto composições nutracêuticas, que contêm uma formulação nutracêutica de um composto isolado de fórmula **I**, de fórmula **II** ou de fórmula **III**, tal como foi definido antes. Os aspetos seleccionados dos compostos também estão definidos antes. Nos aspetos referidos, o composto é de fórmula **I** ou de fórmula **II**, incluindo as modalidades seleccionadas, tal como foi definido antes. Noutros aspetos, o composto selecciona-se entre astragalósido IV, cicloastragenol, astragenol, astragalósido-IV-16-ona, cicloastragenol-6- β -D-glicopiranosídeo, cicloastragenol-3- β -D-xilopiranosídeo e 20R,24S-epoxi-3 β ,16 β ,25-tri-hidroxi-9 β -metil-19-norlanost-1,5-dieno (designado aqui como **5**). Noutros aspetos, a formulação nutracêutica compreende, para além do composto isolado de fórmula **I**, **II** ou **III**, um extrato herbáceo nutracêutico, que pode ser um extrato de *Astragalus membranaceus*.

Um composto isolado, de fórmula **I**, **II** ou **III**, tal como foi definido antes, incluindo os aspetos seleccionados, tal como foram descritos antes, também pode ser utilizado para o fabrico de um medicamento, para o tratamento de uma doença sujeita ao tratamento por aumento da atividade da telomerase numa célula ou num tecido. Exemplos dessas doenças estão discutidos com mais detalhe a seguir. Do mesmo modo, um composto isolado de fórmula **I**, **II** ou **III**, tal como foi definido antes, incluindo os aspetos seleccionados, tal como foram definidos antes, também pode ser utilizado para o fabrico de um medicamento para o tratamento de um estado crónico ou agudo da epiderme. Em aspetos preferidos dessas utilizações, o composto isolado é de fórmula **I** ou de fórmula **II**, incluindo os aspetos seleccionados da fórmula **I** ou da fórmula **II**, tal como foi definido antes.

Também se providencia um processo para selecionar um composto eficaz para aumentar a atividade de telomerase numa célula. De acordo com este processo, um derivado de um composto de fórmula **I**, de fórmula **II** ou de fórmula **III**, tal como foi definido antes, é analisado quanto à sua capacidade para aumentar a atividade de telomerase em queratinócitos ou fibroblastos, conforme medido por um ensaio de TRAP, tal como aqui descrito. O derivado seleciona-se se, quando formulado num dissolvente, numa concentração de 1 µg/mL ou menos, é eficaz para produzir um nível de atividade de telomerase em queratinócitos ou fibroblastos, conforme medido por um ensaio TRAP, pelo menos de 50 % ou superior e, preferencialmente, pelo menos 100 % ou superior, ao medido nas referidas células tratadas com o referido dissolvente. O derivado pode então ser formulado com um veículo tópico, farmacêutico ou nutracêutico.

Também se providencia, num aspeto relacionado, o processo de seleção de um agente para o tratamento de estados clínicos agudos ou crónicos da epiderme. De acordo com este processo, um derivado de um composto de fórmula **I**, de fórmula **II** ou de fórmula **III**, tal como foi definido antes, é ensaiado para a sua atividade de cura de feridas em queratinócitos ou fibroblastos, num ensaio de arranhões, tal como foi aqui descrito. O derivado seleciona-se se tem uma atividade de cura da ferida, como se mede num ensaio do arranhão, a uma concentração de 1 µg/mL, pelo menos de 50 % superior à de um dissolvente de controlo e, preferencialmente, pelo menos 100 % superior à de um dissolvente de controlo. O derivado pode então ser formulado com um veículo tópico.

Este e outros objetos e características da presente invenção vão tornar-se mais evidentes quando a descrição

detalhada da presente invenção que se segue for lida em conjunto com os desenhos que a acompanham.

Breve descrição dos desenhos

As figuras 1A-H mostram as estruturas de exemplos de compostos para serem utilizadas nos processos e composições aqui descritos. Os compostos **1-4, 6 e 7** estão dentro do âmbito das reivindicações.

A figura 2 mostra um aumento da atividade de telomerase em queratinócitos neonatais, tratados com **2** (cicloastragenol), conforme medido num ensaio de TRAP.

A figura 3 mostra um aumento da atividade de telomerase em queratinócitos neonatais, tratados com **1** (astragalósido IV), em comparação com FCE (10 nM) e num dissolvente de controlo, conforme medido num ensaio de TRAP.

A figura 4 é uma série de imagens geradas em computador, que mostram a atividade de cura de uma ferida por **1** (astragalósido IV) em queratinócitos de adultos idosos, conforme medido num "ensaio de arranhões".

A figura 5 é uma série de imagens geradas em computador, que mostram a atividade de cura de uma ferida por **1** (astragalósido IV) e por **2** (cicloastragenol), em queratinócitos neonatais de jovens.

A figura 6 é uma série de imagens geradas em computador, que mostram a atividade de cura de uma ferida por **1** (astragalósido IV) em queratinócitos envelhecidos, isolados ou na presença de um oligonucleótido de inibição de telomerase (GRN163) ou de um oligonucleótido de controlo (GRN137227).

A figura 7 é um gráfico que mostra a atividade de cura de feridas de **1** (astragalósido IV) em queratinócitos neonatais envelhecidos, na presença e na ausência de um

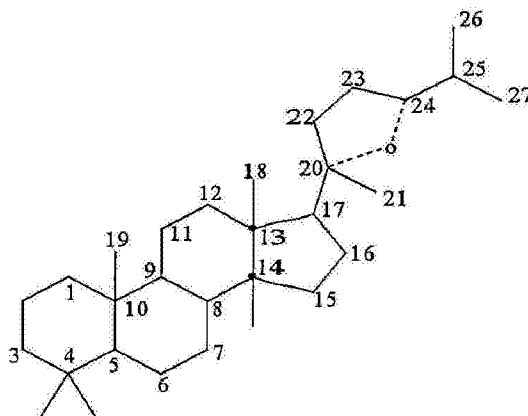
inibidor de telomerase GRN163 e em comparação com FCDP (fator de crescimento derivado de plaquetas) ~2 nM.

Descrição detalhada da invenção

I. Definições

Os termos que se seguem, tal como se utilizam aqui, têm os significados dados a seguir, salvo indicação em contrário.

Um esquema geral de numeração de átomos de carbono, utilizado para a nomenclatura dos compostos aqui descritos, está ilustrado a seguir. (Note-se que aos compostos da estrutura **II** falta o carbono 19 e aos compostos da estrutura **III** falta o carbono 18, ilustrados neste esquema. De acordo com isto, o esquema de numeração não pretende limitar as composições da presente invenção).



"Alquilo" refere-se a um radical monovalente, acíclico, completamente saturado, contendo carbono e hidrogénio, que pode ser linear ou ramificado. Exemplos de grupos alquilo são metilo, etilo, n-butilo, t-butilo, n-heptilo e isopropilo. "Alcoxi" refere-se a um grupo de fórmula OR, em que R representa alquilo, tal como foi definido antes. "Aciloxi" refere-se a um grupo de fórmula -OC(=O)R, em que R representa

alquilo, tal como foi definido antes. De acordo com isto, "acilo" refere-se a um grupo $-C(=O)R$.

"Alquilo inferior" (ou alcoxi inferior ou aciloxi inferior) refere-se a grupo com um a seis átomos de carbono; em modalidades selecionadas, esses grupos incluem um a quatro átomos de carbono, um ou dois átomos de carbono ou um átomo de carbono (isto é, metilo, metoxi, acetiloxi).

"Células estaminais" refere-se a células relativamente indiferenciadas de uma linha comum, que retém a capacidade para dividir e circular ao longo da vida pós-natal, para providenciar células que se podem diferenciar mais e se tornar especializadas (por exemplo, células estaminais em camadas basais da pele ou em tecido hematopoiético, tal como células primitivas na medula óssea, a partir das quais derivam vários tipos de células sanguíneas).

Por "eficaz para aumentar a atividade de telomerase numa célula", com referência a um composto, significa que uma composição contendo o composto, numa concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$ ou menos, é eficaz para produzir um nível de atividade de telomerase num queratinócito ou em células de fibroblastos, conforme medido num ensaio de TRAP, tal como aqui descrito, que é superior, num fator de pelo menos 1,5 (isto é, pelo menos 50 % superior), ao nível produzido por uma formulação semelhante que não contém o composto, conforme medido num ensaio de TRAP. Em modalidades preferidas, o composto é eficaz, a uma concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$ ou menos, para produzir um nível de atividade de telomerase dessa célula, conforme medido num ensaio de TRAP, conforme aqui descrito, que é superior por um fator de pelo menos 2 (isto é, pelo menos 100 % superior), ao nível produzido por uma formulação semelhante não contendo o composto.

Na referência à administração de um composto a um doente, uma "quantidade eficaz", refere-se a uma quantidade eficaz para aumentar a atividade de telomerase nas células ou nos tecidos do doente, tal como alcançar um resultado terapêutico desejado. Numa referência ao tratamento de células *in vitro* ou *ex vivo*, uma "quantidade eficaz" refere-se a uma quantidade eficaz para aumentar a atividade de telomerase nas células, aumentando assim a capacidade de replicação e/ou o prolongamento da vida das células.

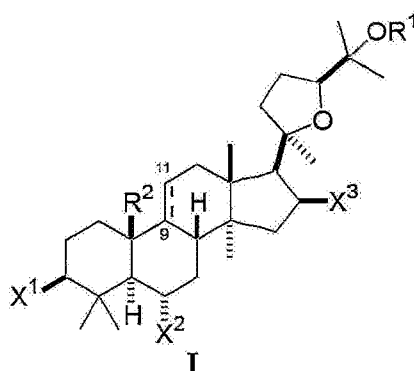
Em concentrações expressas aqui como % (p/v), 100 % (p/v) corresponde a 1 g de soluto/mL de dissolvente. Por exemplo, 0,1 % (p/v) = 1 mg/mL.

Uma "formulação de um composto isolado", refere-se a uma formulação preparada por combinação do composto isolado com um ou mais outros ingredientes (que podem ser ingredientes ativos ou inativos) para produzir a formulação. Quando o composto tenha sido diretamente purificado a partir de uma fonte natural, a expressão "composto isolado", requer que o composto (antes da formulação) tenha sido purificado não menos do que 100 vezes, em comparação com a pureza do composto na fonte natural. Quando o composto não é diretamente purificado, a partir de uma fonte natural, a expressão "composto isolado" refere-se a um composto que (antes da formulação) tenha sido produzido por um processo que envolve uma ou mais etapas de síntese química, resultando numa preparação do composto que tem uma pureza não inferior a 5 % (p/p).

II. Processos e composições para aumentar a atividade de telomerase

De acordo com a presente invenção, providenciam-se composições e processos para aumentar a atividade da telomerase numa célula. De acordo com a presente invenção, estes compostos destinam-se a ser utilizados no tratamento de uma infecção por VIH. De acordo com o processo, faz-se contactar uma célula ou um tecido com uma formulação de um composto isolado de fórmula **I**, **II** ou **III**, tal como aqui descrito, numa quantidade eficaz para aumentar a atividade de telomerase na célula ou no tecido, relativamente ao nível da atividade de telomerase na célula ou no tecido, na ausência do composto. O processo também pode incluir uma etapa preliminar de identificação de uma célula ou de um tecido, na qual se deseja um aumento da atividade de telomerase.

Num aspeto da presente invenção, o composto é representado pela fórmula **I**:



Na fórmula I, cada um de X^1 , X^2 e X^3 selecciona-se, independentemente, entre hidroxí, alcoxi inferior, aciloxi inferior, ceto e um glicósido e o grupo OR^1 selecciona-se entre hidroxí, alcoxi inferior, aciloxi inferior e um glicósido. Em aspetos seleccionados, cada um de X^1 e X^2

seleciona-se, independentemente, entre hidroxi, alcoxi inferior, aciloxi inferior e um glicósido.

Em aspetos selecionados de fórmula **I**, R^2 representa metilo e ---- representa uma ligação dupla entre os carbonos 9 e 11, tal como descrito. Noutros aspetos, R^2 forma, em conjunto com o carbono 9, um anel fundido de ciclopropilo; e ---- representa uma ligação simples entre os carbonos 9 e 11, tal como se demonstrou pelo exemplo, no composto **1** (ver fig. 1).

Por um "glicósido", tal como se utiliza aqui, com referência a qualquer um dos compostos em questão, de fórmulas **I**, **II** ou **III** (ou os seus derivados), entende-se um dos glicósidos conhecidos (isto é, ribósido, arabinósido, xilósido, lixósido, altrósido, glicósido, manósido, gulósido, idósido, galactósido e talósido). O glicósido está normalmente numa forma de anel com seis átomos no núcleo (piranose), por exemplo, glicopiranósido ou manopiranósido. Em modalidades selecionadas, o glicósido é um D-glicósido; isto é, tem a configuração encontrada nos monossacáridos de ocorrência natural. Exemplos específicos incluem D-ribo-piranósido, D-arabinopiranósido, D-xilopiranósido, D-glicopiranósido, manopiranósido e D-galactopiranósido. Os glicósidos preferidos incluem D-glicopiranósido e D-xilopiranósido. Noutros aspetos, a ligação está na configuração β ; por exemplo, β -D-glicopiranósido.

Qualquer um dos grupos hidroxilo livres num anel de glicósido, presente nos compostos em questão de fórmulas **I**, **II** ou **III** (ou os seus derivados), pode estar ainda estar substituído por um outro glicósido, alquilo inferior ou acilo inferior, por exemplo, metoxi ou acetiloxi. Preferencialmente, no máximo, um desses grupos hidroxilo está

substituído por outro glicósido. Mais preferencialmente, nenhum desses grupos hidroxilo está substituído por outro glicósido; isto é, a substituição é com acilo inferior, tal como acetilo ou alquilo inferior, tal como metilo. Numa modalidade, todos os grupos hidroxilo nos glicósidos estão insubstituídos.

Preferencialmente, um composto em questão, de fórmula **I**, **II** ou **III** (ou os seus derivados), inclui no máximo três glicósidos, mais preferencialmente, no máximo dois glicósidos. Em aspetos seleccionados, o composto inclui zero, um ou dois glicósidos, nenhum dos quais está substituído por outro glicósido. Noutros aspetos seleccionados, particularmente no que respeita à fórmula **I**, o composto inclui zero ou dois glicósidos, nenhum dos quais está substituído por outro glicósido.

Em aspetos seleccionados de fórmula **I**, cada um de X^1 e X^2 selecciona-se, independentemente, entre hidroxil, alcoxi inferior, aciloxi inferior, glicopiranosídeo e xilopiranosídeo e X^3 selecciona-se entre hidroxil, alcoxi inferior, aciloxi inferior, ceto, glicopiranosídeo e xilopiranosídeo, preferencialmente, entre hidroxil, alcoxi inferior, aciloxi inferior e ceto.

Noutros aspetos de fórmula **I**, X^1 selecciona-se entre hidroxil, alcoxi inferior, aciloxi inferior e β -D-xilopiranosídeo; X^2 selecciona-se entre hidroxil, alcoxi inferior, aciloxi inferior e β -D-glicopiranosídeo; X^3 selecciona-se entre hidroxil, alcoxi inferior, aciloxi inferior e ceto ($=O$); e OR^1 selecciona-se entre hidroxil, alcoxi inferior, aciloxi inferior e β -D-glicopiranosídeo.

Noutros aspetos selecionados da fórmula **I**, X^1 representa OH ou um glicósido, cada um de X^2 e OR^1 representa, independentemente, OH ou um glicósido e X^3 representa OH ou ceto. De acordo com a presente invenção, cada um de X^1 e X^2 representa OH ou um glicósido, OR^1 representa OH e X^3 representa OH, em que, se X^1 representa um glicósido, então é beta-D-xilopiranosídeo e em que, se X^2 representa um glicósido, então é beta-D-glicopiranosídeo. Ainda noutras modalidades, X^1 representa β -D-xilopiranosídeo, X^2 representa β -D-glicopiranosídeo, OR^1 representa OH e X^3 representa OH. Noutra modalidade, cada um de X^1 , X^2 , X^3 e OR^1 representa OH.

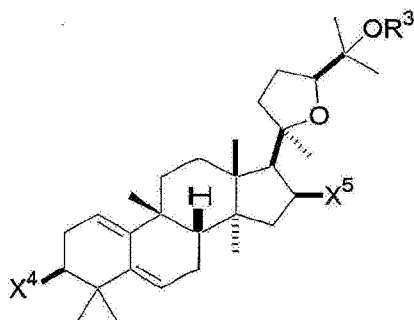
Para cada uma destas modalidades descritas, R^2 forma, com o carbono 9, um anel fundido de ciclopropilo. Exemplos de compostos de estrutura **I**, de acordo com a presente invenção, para serem utilizados nos processos da presente invenção, incluem os ilustrados na fig. 1 e designados aqui como **1** (astragalósido IV), **2** (cicloastragenol), **3** (astragenol), **4** (astragalósido-IV-16-ona), **6** (cicloastragenol-6- β -D-glicopiranosídeo) e **7** (cicloastragenol-3- β -D-xilopiranosídeo).

Outros compostos que têm a forma estrutural de cicloastragenol (**2**) substituídos com 3- β -D-glicopiranosídeo, também são considerados para serem utilizados nos processos da presente invenção. Preferencialmente, o composto inclui um total de um ou dois glicósidos, ligados a carbonos separados da estrutura (isto é, um glicósido não está ligado a outro glicósido). Exemplos incluem os compostos de ocorrência natural astragalósidos A, **1**, **2** e **7**, assim como, astraverrucinas **I** e **II** (que podem ser isoladas a partir de *Astragalus verrucosus*).

A presente invenção também tem por objeto composições farmacêuticas que contêm um ou mais compostos de fórmula **I**,

em que um de X^1 e X^2 seleciona-se entre hidroxí, alcoxi inferior, aciloxi inferior e ceto e o outro representa um glicósido. Noutras modalidades, os compostos selecionam-se entre os designados **6** e **7**. Noutras modalidades, a composição farmacêutica inclui um composto de fórmula **I**, em que X_3 representa ceto; numa modalidade, o composto é o composto designado por **4**.

Noutro aspeto, a presente invenção tem por objeto composições farmacêuticas que contêm compostos representados pela fórmula **II**.



II

Na fórmula **II**, cada um de X^4 e X^5 seleciona-se, independentemente, entre hidroxí, alcoxi inferior, aciloxi inferior, ceto e um glicósido e OR^3 seleciona-se entre hidroxí, alcoxi inferior, aciloxi inferior e um glicósido; em que "glicósido" e os seus vários aspetos têm os significados descritos antes. Tal como já se fez notar aqui, o composto inclui um máximo de três glicósidos, mais preferencialmente, um máximo de dois glicósidos. Em aspetos selecionados, o composto inclui zero, um ou dois glicósidos, nenhum dos quais está substituído por outro glicósido.

Em aspetos selecionados da fórmula **II**, X^4 seleciona-se entre hidroxí, alcoxi inferior, aciloxi inferior e um glicósido. Noutras modalidades, cada um de X^4 , X^5 e OR^3

seleciona-se, independentemente, entre hidroxí, alcoxi inferior, aciloxi inferior, glicopiranosídeo e xilopiranosídeo.

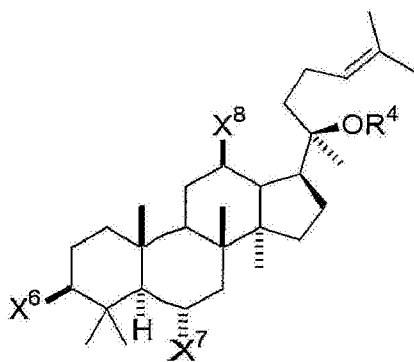
Noutros aspetos da fórmula **II**, cada um de X^4 e OR^3 seleciona-se entre hidroxí, alcoxi inferior, aciloxi inferior e um glicósido, preferencialmente, D-xilopiranosídeo ou D-glicopiranosídeo e X^5 seleciona-se entre hidroxí, alcoxi inferior, aciloxi inferior e ceto ($=O$). Preferencialmente, nestes aspetos, OR^3 seleciona-se entre hidroxí, alcoxi inferior e aciloxi inferior e, mais preferencialmente, hidroxí.

Noutros aspetos da fórmula **II**, cada um de X^4 , X^5 e OR^3 representa, independentemente, OH ou um glicósido, por exemplo, D-xilopiranosídeo ou D-glicopiranosídeo. Ainda noutros aspetos, X^4 representa OH ou um glicósido e cada um de X^5 e OR^3 representa OH. Num aspeto, cada um de X^4 , X^5 e OR^3 representa OH. Este composto (formalmente designado por 20R,24S-epoxi-3 β ,16 β ,25-tri-hidroxí-9 β -metil-19-norlanost-1,5-dieno) é designado aqui como **5**.

A presente invenção também tem por objeto os compostos de fórmula **II** anteriores, em que cada um de X^4 e X^5 seleciona-se, independentemente, entre hidroxí, alcoxi inferior, aciloxi inferior, ceto e um glicósido e OR^3 seleciona-se entre hidroxí, alcoxi inferior, aciloxi inferior e um glicósido, em que qualquer um dos grupos hidroxilo no referido glicósido pode estar substituído por outro glicósido, alquilo inferior ou acilo inferior. Em aspetos selecionados, o composto inclui zero, um ou dois glicósidos. Preferencialmente, cada um dos referidos glicósidos, quando presente, está na configuração D. Noutros aspetos, cada um de X^4 e OR^3 seleciona-se entre hidroxí, alcoxi inferior, aciloxi inferior e um glicósido e X^5 seleciona-se entre hidroxí,

alcoxi inferior, aciloxi inferior e ceto (=O). Aida noutros aspetos, X^4 representa OH ou um glicósido e cada um de X^5 e OR^3 representa OH. Num aspeto, cada um de X^4 , X^5 e OR^3 representa OH; isto é, o composto designado aqui como **5**.

Noutro aspeto, a presente invenção tem por objeto um processo para o aumento da telomerase numa célula ou num tecido, por contacto da célula ou do tecido com a formulação de um composto isolado de fórmula **III**. Novamente, o processo pode incluir a etapa de identificação de uma célula ou de um tecido em que se deseja um aumento da atividade de telomerase.



III

Na fórmula **III**, cada um de X^6 , X^7 , X^8 e OR^4 seleciona-se, independentemente, entre hidroxil, alcoxi inferior, aciloxi inferior, ceto e um glicósido, em que "glicósido" e os seus aspetos têm os significados definidos antes. Preferencialmente, o composto inclui um máximo de dois glicósidos, mais preferencialmente, um máximo de um glicósido, nenhum dos quais está substituído por outro glicósido. Os glicósidos preferidos incluem D-glicopiranosídeo e D-xilopiranosídeo.

Em aspetos selecionados da estrutura **III**, cada um de X^6 , X^7 , X^8 e OR^4 seleciona-se, independentemente, entre hidroxil,

alcoxi inferior, aciloxi inferior e um glicósido e seleciona-se, preferencialmente, entre hidroxí e um glicósido.

Noutros aspetos de estrutura **III**, cada um de X^8 e OR^4 representa OH e cada um de X^6 e X^7 seleciona-se, independentemente, entre hidroxilo e um glicósido, por exemplo, β -D-glicopiranosído. Noutros aspetos, OR^4 representa OH. Preferencialmente, cada um de X^6 e X^8 representa também OH e X^7 representa um glicósido. Um exemplo de um composto de estrutura **III** é o ginsenosído RH1, designado aquí como **8**.

III. Fontes e sínteses dos compostos de fórmulas I-III

Os compostos de fórmulas **I**, **II** e **III** normalmente podem ser isolados ou sintetizados a partir de materiais de ocorrência natural. Por exemplo, astragalósidos I-VII podem ser isolados a partir das raízes de *Astragalus membranaceus*, tal como descrito, por exemplo, em A. Kadota *et al.*, JP Kokai N°. 62012791 A2 (1987). Tal como se refere aquí, o tecido da raiz (8 kg), que está comercialmente disponível em várias fontes de ervas benéficas, é submetido a refluxo com MeOH, e dissolve-se novamente o extrato concentrado (200 g), em MeOH e fraciona-se por cromatografia em coluna de gel de sílica, utilizando como eluentes misturas de $CHCl_3$ /MeOH/ H_2O . Trata-se cada fração por cromatografia de fase inversa em gel de sílica, utilizando misturas de dissolventes semelhantes, para se obter as quantidades aproximadas que se seguem dos compostos isolados: 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) e astragalósido VII (0,1 g). Ver também Kitagawa *et al.*, Chem. Pharm. Bull. 31(2): 698-708 (1983b).

O astragalósido IV (designado aqui como **1**) também foi obtido pelos autores a partir de Ai Chunmei, Chengdu 610041, R.P. China.

O cicloastragenol (**2**) pode ser preparado por tratamento do astragalósido IV (**1**) com HCl metanólico, seguido de neutralização, um tratamento-padrão e purificação por cromatografia, tal como descrito na secção experimental que se segue (exemplo 1). O cicloastragenol também pode ser obtido por degradação oxidante (tratamento com oxigénio e sódio elementar) de um extrato em butanol de *Astragalus membranaceus*, tal como descrito por P-H Wang et al., J. Chinese Chem. Soc. 49: 103-6 (2002). O astragenol (**3**) e o cicloastragenol (**2**) também podem ser obtidos de acordo com os procedimentos de Kitagawa et al., Chem. Pharm. Bull. 31(2): 689-697 (1983a).

Os compostos designados aqui como **6** (cicloastragenol-6- β -D-glicopiranósido) e **7** (cicloastragenol-3- β -D-xilopiranósido) foram obtidos por refluxo de uma solução de astragalósido IV (**1**) e ácido sulfúrico em metanol, seguido de um tratamento padrão e cromatografia em gel de sílica, tal como descrito na secção experimental a seguir (exemplo 2). Também se obteve o rearranjo do produto **5** (não reivindicado) e de aglicona, isto é, cicloastragenol (**2**).

O composto de 16-ceto, **4**, foi preparado por acetilação dos grupos hidroxilo do glicósido de astragalósido IV, seguido de oxidação de clorocromato de piridínio do 16-hidroxilo e restauração dos hidroxilos do glicósido por tratamento com boro-hidreto de sódio (ver Kitagawa et al., 1983b, citado antes).

A preparação dos vários aspetos das fórmulas **I-III**, por exemplo, os compostos que têm vários graus de alquilação ou de acilação ou os grupos ceto, podem ser preparados de acordo com os processos conhecidos de síntese orgânica, utilizando materiais iniciais de ocorrência natural e/ou disponíveis comercialmente, tais como cicloastragenol, astragenol, os astragalósidos ou astraverrucinas ou panaxatriol, com separação dos produtos, se necessário. São dados vários exemplos na secção experimental que se segue. Por exemplo, pode-se geralmente modificar seletivamente os grupos hidroxilo 3-, 6- e/ou 16-, estericamente menos articulados, por exemplo, por acilação. Se desejado, os grupos hidroxilo que não tenham reagido, podem então ser modificados separadamente, por exemplo, por alquilação, seguida de eliminação eventual dos grupos acilo. Os compostos de fórmula **I** que têm um anel fundido de ciclopropilo (por exemplo, cicloastragenóis) podem ser convertidos nos compostos que têm um grupo 19-metilo e uma ligação dupla em 9-11 (por exemplo, astragenóis), por meio do tratamento com ácido sulfúrico. Esta reação pode ser acompanhada de desglicosilação, tal como se mostra nas reações dos exemplos 9B e 10B, que se seguem.

IV. Determinação da atividade biológica

A. Protocolo de ensaio por TRAP

A capacidade de um composto para aumentar a atividade de telomerase numa célula pode ser determinada utilizando o ensaio de TRAP (protocolo da amplificação da repetição telomérica), que é conhecido na técnica (por exemplo, Kim et al., patente norte-americana N°. 5 629 154; Harley et al., patente norte-americana N°. 5 891 639). Tal como se utiliza aqui, "a atividade de telomerase medida num ensaio por TRAP" refere-se à atividade de telomerase conforme medida em

queratinócitos ou fibroblastos, de acordo com o protocolo que se segue. A atividade é normalmente comparada com a atividade semelhante, medida num ensaio de controlo dessas células (por exemplo, uma atividade de telomerase 50 % superior à observada num controlo de dissolventes).

As linhas de células apropriadas para serem utilizadas num ensaio, preferencialmente, fibroblastos humanos normais (FHN) ou queratinócitos humanos normais (QHN), podem ser obtidos de fontes comerciais, tais como Cascade Biologics, Portland, OR ou 4C Biotech, Seneffe, Bélgica ou da ATCC (American Type Culture Collection). As linhas de células de fibroblastos humanos normais da ATCC, que podem ser localizadas no sítio da internet da ATCC, incluem, por exemplo, CCL135, CCL137 e CCL151.

As células são colocadas em placas aproximadamente a 5 000 células/poço, num meio de crescimento (por exemplo, meio Epi-Life + suplemento de fator de crescimento de queratinócitos + CaCl_2 60 mM, fornecido pela Cascade Biologics, Inc.), durante dois dias. As composições do ensaio, num dissolvente apropriado, tal como etanol a 95 % ou DMSO, são adicionadas a poços selecionados num intervalo de concentrações e são incubadas, durante 16-24 horas. Para os dados aqui referidos, o dissolvente utilizado foi o DMSO.

Prepara-se uma solução de diluição de células por adição de 3,0 mL de Nonidet® P40, 1,0 mL de tampão de diluição CHAPS (ver a seguir) e 1,0 mL de tampão 10 x TRAP (ver a seguir), a 5,0 mL de H_2O isento de DNase e de RNase. (água isenta de DNase e de RNase pode ser gerada por tratamento com DEPC (dietilpirocarbonato) ou adquirida em vendedores, tais como a Sigma).

A morfologia das células tratadas é observada primeiro ao microscópio, para verificar que não há sinais visuais de crescimento irregular. Retira-se o meio dos poços e lavam-se as células, duas vezes, em STF (isento de Ca e Mg). Os pratos são arrefecidos, preferencialmente, em gelo e adiciona-se o tampão de dissolução das células, (ver a seguir) (aproximadamente 100 µL por poço) e trituram-se com uma pipeta, para baixo e para cima, várias vezes. Faz-se a incubação das células em gelo, durante 1 hora.

Tampão de Lise de CHAPS

Concentrado	Para 1 mL	Conc. final.
Tris-HCl 1 M, a pH 7,5	10 µL	10 mM
MgCl ₂ 1 M	1 µL	1 mM
EGTA 0,5 M	2 µL	1 mM
AEBSF 100 mM	1 µL	0,1 mM
CHAPS ^a a 10 %	50 µL	0,5 %
ASB	1 mg	1 mg/mL
Glicerol a 100 %	100 µL	10 %
H ₂ O isento de DNase e de RNase	936 µL (para 1mL)	

^aAdiciona-se o detergente de CHAPS imediatamente antes da utilização do tampão de dissolução. Além disso, adiciona-se ao tampão de dissolução AEBSF (HCl de fluoreto de 4-(2-aminoetil)-benzeno-sulfonilo) imediatamente antes da etapa de extração.

Tampão de 10 x TRAP

Concentrado	Para 5 mL	Conc. final.
Tris-HCl 1 M, a pH 8,3	1 mL	200 mM
MgCl ₂ 1 M	75 µL	15 mM
KCl 1 M	2,15 mL	630 mM
Tween 20 (Boehringer Mannheim)	25 µL	0,5 %
EGTA 0,5 M	500 µL	10 mM
20 mg/mL de ASB	250 µL	1 mg/mL

Os materiais que se seguem combinam-se para gerar uma mistura principal para RCP.

Concentrado	Por reação (40 µL)	Conc. final^a
Tampão de 10 x TRAP	5,0 µL	1x
dNTPs 2,5 mM	1,0 µL	50 µM
Iniciador Ci5-TS (0,1 mg/mL)	0,2 µL	0.4 ng/mL
Iniciador ACX (0,1 mg/mL)	1,0 µL	2 ng/mL
Padrão interno TSU2 (1 pg/mL)	1,0 µL	20 fg/mL
Iniciador U2 (0,1 mg/mL)	1,0 µL	2 ng/mL
Taq-polimerase (5U/µL)	0,4 µL	2 unidades
H ₂ O isenta de DNase e de RNase	30,4 µL (para 40 µL total)	

^aCom base no volume final de uma mistura de 40 µL de RCP mais 10 µL de agente de dissolução de células = 50 µL.

A mistura para RCP inclui os seguintes componentes: iniciador Ci5-TS, um oligonucleótido marcado com 5'-Ci5 com a sequência 5'-AAT CCG TCG AGC AGA GTT-3' (SEQ ID N°. 1), é um substrato de telomerase. Consoante a atividade da telomerase no meio, as repetições de telômero (com a sequência ..AGGGTT..) serão adicionadas ao substrato, para formar produtos de telomerase, também referidos como produtos de telomerase ou produtos de TRAP. O iniciador ACX, com a sequência 5'-GCG CGG CTT ACC CTT ACC CTT ACC CTA ACC-3' (SEQ ID N°. 2), é um iniciador de retorno ancorado, que hibrida com os produtos derivados de telomerase.

O padrão interno TSU2, um oligonucleótido com a sequência 5'-AAT CCG TCG AGC AGA GTT AAA AGG CCG AGA AGC GAT-3'; SEQ ID N°. 3), uma extensão da sequência do iniciador TS, é adicionado numa pequena quantidade controlada para fins de quantificação. O iniciador U2, com a sequência 5'-ATC GCT TCT CGG CCT TTT (SEQ ID N°. 4), é um iniciador de retorno concebido para hibridar com a região 3' do padrão interno.

Adiciona-se uma amostra do produto da dissolução de células (10 µL) a 40 µL desta mistura para RCP, num tubo de reação e faz-se a incubação da mistura, à temperatura ambiente (30 °C), durante 30 minutos. Faz-se a RCP por incubação da mistura às temperaturas que se seguem, durante os tempos indicados: 94 °C/30 s, 60 °C/30 s e 72 °C/30 s; repete-se este ciclo de três etapas para fazer 20-30, preferencialmente, 31 ciclos.

Adiciona-se corante de carga contendo, por exemplo, azul de bromofenol e xileno-cianol e submetem-se as amostras a uma PAGE de não desnaturação a 10-15 %, em 0,6x TBE, até o azul de bromofenol desaparecer do gel. Observa-se a formação do produto, por exemplo, utilizando um aparelho de imagiologia de flúor, para a deteção dos produtos de telomerase marcados com CY5 (excitação máxima a 650 nm; emissão máxima a 670 nm).

A quantidade final do padrão interno TSU2, após amplificação, é geralmente de 5-10 mole por 50 µL da mistura reacional. O controlo interno dá origem a um produto específico da amplificação por RCP de 36-mer, que aparece como uma banda distinta no gel, abaixo do primeiro produto de adição de telómeros (isto é, o produto de uma adição de telómero ao oligonucleótido TS, seguido da amplificação com um iniciador de retorno ACX). Esta banda de controlo interno pode ser utilizada para normalizar as amplificações por RCP a partir de diferentes amostras.

O número relativo de moléculas de produto de telomerase (TM) gerado neste ensaio determina-se de acordo com a fórmula seguinte:

$$TM = (T_{\text{Produtos de TRAP}} - T_{\text{BKD1}}) / (T_{\text{Padrão Interno}} - T_{\text{BK2}})$$

em que: $T_{\text{Produtos de TRAP}}$ é a intensidade total medida no gel para todos os produtos de telomerase, T_{BKD1} é a intensidade inicial medida numa coluna em branco para uma área equivalente em dimensão à área dos produtos de telomerase, $T_{\text{Padrão Interno}}$ é a intensidade da banda do padrão interno e T_{BKD2} é a intensidade inicial medida numa coluna em branco para uma área equivalente em dimensão à área englobada pela banda do padrão interno. O número resultante é o número de moléculas dos produtos de telomerase gerado para um dado tempo de incubação, em que, para os fins da determinação de TM, é designado aqui como 30 minutos.

Os compostos preferidos de fórmulas **I**, **II** ou **III**, tal como foi descrito antes, são capazes de produzir, a uma concentração de 1 µg/mL ou menos, um nível de atividade de telomerase nos fibroblastos ou nos queratinócitos pelo menos 25 % superior ao nível dessa atividade observado num dissolvente de controlo. Mais preferencialmente, o composto é capaz de produzir, a uma concentração de 1 µg/mL ou menos, uma atividade de telomerase pelo menos 50 % superior à observada num dissolvente de controlo. Atividades ainda mais potentes podem ser apropriadas para algumas aplicações, tais como compostos que produzem atividades de telomerase pelo menos 75 %, 100 % ou 500 % superior ao nível dessa atividade observada num dissolvente de controlo, conforme medido num ensaio de TRAP descrito, a uma concentração de 1 µg/mL ou menos.

B. Resultados dos exemplos do ensaio de TRAP

A eficácia do aumento da atividade de telomerase foi avaliada para os compostos de fórmula **I** anteriores, em várias concentrações. Os ensaios realizaram-se em células HEKneoP (queratinócitos neonatais), de acordo com o protocolo

descrito antes. As concentrações variaram entre aproximadamente 0,031 μM e 10 μM , em DMSO.

Tal como se mostra na fig. 2, para composições contendo o composto **1** (astragalósido IV), a atividade de telomerase aumentou com o aumento da concentração até cerca de 360 % do controlo, a 1,0 μM , depois decresceu à medida que a concentração aumentou até 10 μM . Como se mostra na fig. 2, para as composições contendo **2** (cicloastragenol), a atividade de telomerase aumentou até cerca de 300 % do controlo, a 0,11 μM (em comparação com cerca de 200 % em células tratadas com FCE (fator de crescimento epidérmico) 10 nM) e depois diminuíram com outros aumentos da concentração.

A tabela 1 dá, para as composições contendo cada um de os compostos ilustrados nas figs. 1A-G, a concentração mínima eficaz (CME) do composto que produziu um nível de atividade de telomerase duas vezes o que se observou no DMSO de controlo (isto é, 100 %) superior).

Tabela 1

Designação	Nome	CME, 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-tri-hidroxi-9 β -metil-19-norlanost-1,5-dieno	0,10
6	Cicloastragenol-6- β -D-glicopiranósido	3,2
7	Cicloastragenol-3- β -D-xilopiranósido	3,2
8	Ginsenósido RH1	10

C. Protocolo do ensaio da cura de feridas

Os compostos de fórmula **I-III** podem ser utilizados para promover a cura de feridas, queimaduras, abrasão ou outros estados clínicos agudos ou crónicos da epiderme, conforme vai ser discutido a seguir. Tal como se utiliza aqui "atividade de cura de feridas conforme medida num ensaio de arranhões" refere-se à atividade, conforme medida em queratinócitos ou em fibroblastos, de acordo com o protocolo que segue e expressa como o valor CF ilustrado na fórmula que se segue.

Colocaram-se as células num frasco (5×10^5 células por frasco) e fez-se a sua cultura, durante dois dias, numa câmara húmida, a CO_2 a 5 %, a 37 °C. Para criar a "ferida", utiliza-se uma pipeta de plástico de 2 mL, que se raspa para "arranhar" a superfície da célula. A ferida ideal tem aproximadamente 2-3 mm de largura e 50 mm de comprimento (ao longo do eixo do X do frasco de cultura de tecidos). As células são novamente tratadas com meio contendo quer veículo (DMSO; amostra de controlo) ou composições de ensaio em concentrações múltiplas. Identifica-se uma área de ferida, marca-se o frasco e documenta-se o aparecimento das células fotograficamente, ao longo de 3-4 dias contínuos de observação da cultura de células.

A quantidade de fecho da ferida determina-se medindo a largura da ferida ao longo do tempo para as amostras tratadas com os compostos, relativamente às células tratadas com o veículo ou a outras células de controlo. As medições são realizadas a partir das fotografias tiradas para cada uma das amostras nos dias 1 (imediatamente após o arranhão), 2, 3 e 4. A percentagem de cura de feridas (também expressa como "atividade de cura de feridas") calcula-se pela seguinte fórmula:

$$CF = 100 - [100 \times L_n/L_0],$$

em que L_n é a largura da ferida no dia n e L_0 é a largura da ferida no dia um (isto é, imediatamente após o arranhão).

Os compostos de fórmula **I-III** preferidos, tal como foram descritos antes, são capazes de produzir, a uma concentração de 1 µg/mL ou menos, uma quantidade da cura da ferida (atividade de cura da ferida), num ensaio de arranhão de queratinócitos ou de fibroblastos, tal como foi descrito antes, em que é pelo menos 25 % superior ao observado em células de controlo ou não tratadas. Atividades ainda mais potentes podem ser apropriadas para algumas aplicações, tal como compostos que produzem, a uma concentração de 1 µg/mL ou menos, uma quantidade de cura da ferida, num ensaio de arranhão de queratinócitos ou de fibroblastos, em que é pelo menos 50 % ou 100 % superior ao observado em células de controlo ou não tratadas.

D. Exemplos dos resultados dos ensaio de arranhões

A atividade de cura de feridas dos compostos **1** (astragalósido IV) e **2** (cicloastragenol) da presente invenção foi avaliada em queratinócitos envelhecidos, por via de um ensaio de arranhões, tal como foi descrito antes. Os resultados de um ensaio típico estão ilustrados na fig. 4, em que a fila do topo das imagens mostra as células de controlo (tratadas com dissolvente, DMSO) e as filas do fundo mostram as células tratadas com 0,1 µg/mL (cerca de 0,13 µM) de **1**, no mesmo dissolvente. As células tratadas confluíram ao 4º dia, em contraste com as células de controlo, nas quais uma "ferida" com uma dimensão apreciável permaneceu no 4º dia. Verificaram-se resultados semelhantes com esta composição e

com **2** (cicloastragenol) 0,01 μM , em queratinócitos jovens, como se mostra na fig. 5.

A figura 6 ilustra mostra a atividade de cura de feridas de uma composição contendo **1** (astragalósido IV), em queratinócitos de adulto envelhecidos, conforme medido num ensaio semelhante, na presença ou na ausência de um oligonucleótido de inibição de telomerase (GRN163) e de um oligonucleótido de controlo (GRN137227). Tal como se mostra, o oligonucleótido de inibição de telomerase, GRN163, bloqueia os efeitos da cura da ferida da composição **1**; o efeito do oligonucleótido de controlo, GRN137226, é mínimo. (GRN163 é um oligonucleótido inibidor de telomerase que se dirige à região matriz do componente de ARN de telomerase. Especificamente, GRN163 é um oligonucleótido de tiofosforamidato de N3'→P5', de 13-mer, descrito em detalhe na publicação PCT N°. WO 01/18015. GRN137227 é um oligonucleótido de controlo de tiofosforamidato de N3'→P5', de 13-mer, com uma sequência desemparelhada).

A tabela 2 a seguir mostra os valores de CF (atividade de cura de feridas) para os compostos **1** e **2** utilizados nos ensaios de arranhões, ilustrados nas figs. 5 e 6, com base nos resultados desses ensaios, utilizando a fórmula ilustrada antes.

Tabela 2

	Largura aproximada da ferida (unidades arbitrárias)				CF _{controlo}	CF _{ensaio}
	Controlo Dia 1	Controlo Dia 4	Ensaio Dia 1	Ensaio Dia 4		
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

A figura 7 ilustra graficamente o fecho da ferida como uma percentagem de controlo para o composto **1** (astragalósido IV) da presente invenção, em queratinócitos neonatais envelhecidos, na presença ou na ausência de um inibidor de telomerase (GRN163) e em comparação com 50 ng/mL (aproximadamente 2 mL) de FCDP (fator de crescimento derivado de plaquetas). Tal como se mostra, a eficácia do composto **1** foi comparável à de FCDP e foi novamente bloqueada pela adição de GRN163.

V. Seleção de compostos adicionais

A presente invenção também tem por objeto processos de seleção de compostos adicionais eficazes para aumentar a atividade de telomerase, rastreando derivados dos compostos de fórmula **I**, **II** ou **III** num ensaio de TRAP, tal como descrito aqui. Neste aspeto, um "derivado" inclui um composto produzido por modificação de um composto de fórmula **I**, **II** ou **III**, de uma ou mais das seguintes maneiras: conversão de um grupo hidroxilo com um carbamato de alquilo inferior, halogéneo, tiol, tioéter de alquilo inferior, amino, (alquil inferior)-amino, (alquil inferior)-amida, aldeído ou o grupo ceto; adição de um grupo alquilo inferior a esse aldeído ou grupo ceto ou a um grupo ceto existente (por exemplo, alquilação, com formação de mais um grupo hidroxilo); adição de halogéneo, hidroxilo e/ou hidrogénio a uma ligação dupla carbono-carbono; eliminação de um grupo hidroxilo (isto é, conversão para hidrogénio); e inversão da estereoquímica de um ou mais centros quirais, preferencialmente, um centro quiral portador de oxigénio. Tal como se utiliza aqui, um "derivado" produzido por estas modificações, exclui os próprios compostos de fórmulas **I**, **II** e **III**, tal como foi definido antes.

Todas estas modificações podem ser conseguidas utilizando processos-padrão de síntese, utilizando reações de síntese bem conhecidas, tais como substituição nucleofílica, que pode incluir a conversão de um grupo hidroxilo num grupo eliminável melhor, tal como tosilato; esterificação; alquilação; oxidação; redução; halogenação; hidratação; hidrogenação; etc.

Um derivado de um composto de fórmula **I**, **II** ou **III**, formulado num meio dissolvente apropriado, a uma ou mais concentrações, é rastreado por um ensaio de TRAP de queratinócitos ou fibroblastos, tal como foi descrito antes. Os derivados preferidos para seleção incluem os que são eficazes, quando formulados num dissolvente, a uma concentração de 1 µg/mL ou menos, para produzir um nível de atividade de telomerase em queratinócitos ou fibroblastos, conforme medido num ensaio de TRAP, é pelo menos 50 % superior ao que foi medido nas referidas células tratadas com o referido dissolvente.

Alternativamente ou adicionalmente, um derivado de fórmula **I**, **II** ou **III**, formulado num meio dissolvente apropriado, em uma ou mais concentrações, é avaliado quanto à atividade de cura de feridas num ensaio de arranhões, tal como foi definido antes. Os derivados preferidos para a seleção incluem os que têm uma atividade de cura de feridas, a uma concentração de 1 µg/mL ou menos, pelo menos 25 % superior e, mais preferencialmente, pelo menos 50 % superior à de um dissolvente de controlo.

VI. Indicações terapêuticas e processos de tratamento

A presente invenção tem por objeto processos para aumentar a atividade de telomerase numa célula, por meio do

contacto de uma célula ou de um tecido com uma formulação de um composto isolado de fórmula **I**, **II** ou **III**, conforme descrito na secção II anterior, numa quantidade eficaz para aumentar a atividade de telomerase na célula. O processo pode incluir a etapa preliminar de identificação de uma célula ou de um tecido no qual se deseja um aumento da atividade de telomerase. A célula pode estar em cultura, isto é, *in vitro* ou *ex vivo* ou dentro de um indivíduo ou doente *in vivo*.

Os benefícios que se pretendem realizar, a partir do aumento da atividade de telomerase numa célula ou num tecido incluem, por exemplo, o aumento da capacidade de replicação e/ou o tempo de vida das células contactadas. O processo pode ainda compreender o diagnóstico de um estado clínico de um indivíduo ou de um doente, em que o aumento da atividade de telomerase nas células ou nos tecidos do doente é desejado; por exemplo, o diagnóstico de uma doença de um indivíduo, que vai ser tratado por meio do aumento da atividade da telomerase em células ou tecidos. De acordo com isto, a presente invenção tem por objeto processos de tratamento de um estado clínico de um doente, que necessite desse tratamento, com uma quantidade eficaz de um composto de fórmula **I**, **II** ou **III**, conforme descrito na secção II anterior. Uma "quantidade eficaz" refere-se a uma quantidade eficaz para aumentar a atividade da telomerase nas células ou nos tecidos de um doente, de forma a atingir-se um resultado terapêutico.

Esses estados clínicos podem incluir, por exemplo, estados clínicos associados a senescência celular ou com uma taxa acrescida de proliferação de uma célula na ausência de telomerase, o que leva a acelerar a perda de repetições de telómeros. Por "taxa acrescida de proliferação" entende-se uma maior taxa de divisão de células em comparação com as

células normais desse tipo de células ou em comparação com células normais desse tipo de células em outros indivíduos. A senescência desses grupos de células numa idade anormalmente precoce pode, eventualmente, levar à doença (ver West et al., patente norte-americana N°. 6 007 989).

Existem vários estados de doença nos quais um aumento da atividade de telomerase, nalguns tipos de células, pode ser benéfico. De acordo com isto, a presente invenção tem por objeto processos de tratamento de estados clínicos de doentes, que se selecionam a seguir, por meio do aumento da atividade de telomerase nas células do doente, compreendendo a administração, a um indivíduo que necessite desse tratamento, de uma quantidade eficaz de um composto de fórmula **I**, **II** ou **III**, tal como foi descrito antes. Nalguns casos, o estado clínico também pode ser submetido ao tratamento por meio de uma terapêutica com células *ex vivo*, tal como se descreve a seguir, utilizando os tipos de células associadas (indicados entre parêntesis).

(a) doença de Alzheimer, doença de Parkinson, doença de Huntington e acidente vascular cerebral (células do sistema nervoso central, incluindo neurónios, células gliais, por exemplo, astrócitos, células endoteliais, fibroblastos),

(b) doenças da pele relacionadas com a idade, tais como atrofia dérmica e emagrecimento da derme, elastólise e enrugamento da pele, hiperplasia ou hipoplasia das glândulas sebáceas, lentigo senil e outras anomalias da pigmentação, embranquecimento do cabelo e perda de cabelo ou emagrecimento do cabelo ou úlceras crónicas da pele (fibroblastos, células das glândulas sebáceas, melanócitos, queratinócitos, células de Langerhan,

células endoteliais microvasculares, células dos folículos pilosos),

(c) doenças articulares degenerativas (células da cartilagem articular, tais como condrócitos e fibroblastos lacunares e fibroblastos sinoviais),

(d) osteoporose e outros estados clínicos degenerativos do sistema do esqueleto (células do sistema do esqueleto, tais como osteoblastos, células do estroma da medula-óssea ou do mesênquima, células osteoprogenitoras),

(e) doenças relacionadas com a idade e com o stress do sistema vascular incluindo aterosclerose, calcificação, trombose e aneurismas (células do sistema cardíaco e vascular, incluindo células endoteliais, células do músculo liso e fibroblastos adventícios),

(f) degeneração macular relacionada com a idade (células dos olhos, tais como células do epitélio pigmentado e células endoteliais),

(g) SIDA (células CD8⁺ restritas ao VIH); e

(h) insuficiências do sistema imunitário relacionadas com a idade e com o stress, incluindo insuficiências da renovação dos tecidos, que ocorre com o envelhecimento natural, com o cancro, com a terapêutica do cancro, com infeções agudas ou crónicas ou com distúrbios genéticos que causam uma renovação acelerada de células e anemias relacionadas com outros estados clínicos degenerativos (outras células do sistema imunitário, incluindo células das linhas de linfóides, mielóides e eritróides, tais como linfócitos B e T, monócitos, macrófagos do tecido circulante e especializado, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, células AN (*assassinas naturais*, em inglês NK) e os seus respetivos progenitores).

Para além dos tipos de células indicados antes, podem também ser benéficos, sob o ponto de vista terapêutico, outros tipos de células em que se dê um aumento da atividade de telomerase incluindo esses tipos de células, mas não se limitando a células do fígado, glândulas endócrina e exócrina, músculo liso ou musculatura do esqueleto. De acordo com a presente invenção, os compostos destinam-se a ser utilizados no tratamento de infeções por VIH. No caso de indivíduos infetados com VIH, a renovação das células CD8⁺ aumenta à medida que estas células tentam controlar o nível de células CD4⁺ infetadas por VIH. Na SIDA (item (g) anterior) crê-se que a doença seja causada pela senescência precoce das células CD8⁺ restritas ao VIH. O envelhecimento dessas células não só é atribuído à quantidade anormal de perda de sequências de telómeros por duplicação das células, mas, além disso, ao aumento da taxa de replicação das células, de tal modo que o desgaste dessas células é superior ao normal para esse grupo de células. A presente invenção tem por objeto compostos para serem utilizados em processos de tratamento de um indivíduo infetado com VIH e, mais particularmente, de redução da senescência precoce de células CD8⁺ restritas ao VIH num indivíduo infetado com VIH, por meio da administração ao indivíduo que necessita desse tratamento de uma quantidade eficaz de um composto, conforme se especifica nas reivindicações. Um aumento da atividade da telomerase pode beneficiar as células que não se dividem, assim como, as células que proliferam, por exemplo, em condições associadas com a suscetibilidade acrescida à morte das células devido ao stress, tal como isquémia na insuficiência cardíaca ou no acidente vascular (ver, por exemplo, Oh and Schneider, J Mol Cell Cardiol 34(7): 717-24; Mattson, Exp Gerontol. 35(4):489-502). A presente invenção providencia assim processos de redução da morte das células num indivíduo, induzida por lesões do ADN ou por stress, tal

como num indivíduo que experimente condições isquémica de tecidos devido a insuficiência cardíaca ou acidente vascular, aumentando a atividade de telomerase nas células do indivíduo, compreendendo a administração a esse indivíduo que necessita desse tratamento, de uma quantidade eficaz de um composto de fórmula **I**, **II** ou **III**, conforme descrito na secção II anterior. Tal como já se fez notar antes, o processo pode incluir a etapa preliminar de diagnóstico num indivíduo do estado clínico indicado.

Noutro aspeto, as composições podem ser utilizadas para o tratamento de indivíduos, em que um ou mais tipos de células estão limitadas nesse doente e cuja vida pode ser prolongada por meio do prolongamento da capacidade dessas células para continuar a sua replicação ou para resistirem à morte de células induzida por stress. Um exemplo desse grupo de células diz respeito aos linfócitos presentes nos doentes com síndrome de Down. A presente invenção tem assim também por objeto um processo de aumento da capacidade replicativa e/ou do tempo de vida dos linfócitos presentes num doente com síndrome de Down, por meio do aumento da atividade de telomerase nas referidas células do doente, compreendendo a administração a esse doente de uma quantidade eficaz de um composto de fórmula **I**, **II** ou **III**, conforme descrito na secção II anterior. As composições podem também ser utilizadas para aumentar a resistência à morte das células induzida por stress, que ocorre durante o envelhecimento normal.

Noutro aspeto da presente invenção, o aumento da atividade de telomerase é eficaz para promover a cura de feridas, queimaduras, efeitos de abrasão ou outros estados clínicos agudos ou crónicos da epiderme. A presente invenção providencia assim um processo de tratamento de um estado clínico agudo ou crónico da epiderme, por meio da

administração, a um doente que necessite desse tratamento, preferencialmente topicamente na área afetada, de uma quantidade eficaz de uma formulação de um composto isolado de fórmula **I**, **II** ou **III**, tal como descrito na secção II anterior.

Tal como se utiliza aqui, um "estado clínico agudo ou crónico da epiderme", inclui estados clínicos agudos, tais como lesões sofridas em traumatismos, queimaduras, efeitos de abrasão, incisões cirúrgicas, sítios de enxerto de dadores e lesões causadas por agentes infecciosos e estados clínicos crónicos, tais como úlcera venosa crónica, úlcera diabética, úlcera de compressão, herpes de pressão e úlceras ou herpes da superfície da mucosa. Também estão incluídas lesões superficiais da pele ou epiteliais causadas por um estado clínico inflamatório persistente ou por uma infeção ou por um defeito genético (tal como formação de coloides e anomalias da coagulação). Ver, por exemplo, a publicação PCT N°. WO 02/91999.

Os efeitos desejáveis de um aumento da atividade de telomerase nesse tratamento incluem a proliferação ou a migração de células no sítio do tratamento, a epitelialização da superfície, o sarar de uma ferida se durante o caso ou a restauração da função fisiológica normal. Por "epitelialização" ou "re-epitelialização" de um sítio de tratamento, significa um aumento da densidade das células epiteliais nesse sítio, em resultado da terapêutica aplicada.

O processo também pode ser utilizado para aumentar o crescimento de células enxertadas. Os efeitos desejáveis no aumento da atividade de telomerase, num desses tratamentos inclui a cobertura do sítio de tratamento, a sobrevivência das células enxertadas, a falta de rejeição imunitária, o

fecho de uma ferida, se estiver presente ou a restauração da função fisiológica normal. As células enxertadas podem participar no fecho da ferida, quer participando diretamente no processo de cura (por exemplo, tornando-se parte do tecido da cura) ou cobrindo a ferida e assim providenciando um ambiente que promova a cura por meio de células hospedeiras.

A presente invenção também contempla a manipulação da pele e a reparação de quaisquer defeitos percebidos na superfície da pele para outras finalidades, tais como melhorias cosméticas. Noutro aspeto, os processos e composições da presente invenção podem ser utilizados para aumentar a capacidade de replicação e/ou estender o tempo de vida das células em cultura, por exemplo, na terapia de células *ex vivo* ou produção de anticorpos monoclonais, por meio do aumento da atividade de telomerase nas células. O aumento da atividade de telomerase aumenta a capacidade replicativa dessas células por meio do retardamento da perda de repetições de telómeros e/ou aumentando a resistência à morte das células induzida por stress durante a proliferação de células.

No caso de aplicações *ex vivo*, adiciona-se uma quantidade eficaz de um composto de fórmula **I**, **II** ou **III**, tal como foi definido antes, a células de explantes obtidos a partir de um indivíduo. Uma "quantidade eficaz" refere-se a uma quantidade eficaz para aumentar a atividade de telomerase nas células, aumentando assim a capacidade replicativa e/ou aumentando o período de vida das células.

As células de explantes podem incluir, por exemplo, células estaminais, tais como células estaminais de medula óssea (patente norte-americana N°. 6.007.989), células do estroma da medula óssea (Simonsen et al., Nat Biotechnol

20(6): 592-6, 2002) ou células adrenocorticais (Thomas et al., Nat Biotechnol 18(1):39-42, 2000). Os estados clínicos de doenças, tais como as indicadas nos itens (a)-(g) anteriores podem também ser submetidos a uma terapêutica à base de células *ex vivo*. Os seus exemplos incluem a utilização de células satélites do músculo para o tratamento de distrofia muscular, osteoblastos para tratar osteoporose, células epiteliais da retina pigmentadas para a degeneração macular relacionada com a idade, condrócitos para osteoartrite e etc.

Por exemplo, o reconhecimento que as células funcionais CD8⁺ estão limitadas em doentes com SIDA para controlar a expansão de células CD4⁺ infetadas, permite visualizar um protocolo terapêutico, em que as células CD8⁺ restritas a VIH são eliminadas do indivíduo infetado com VIH num estado precoce, quando a SIDA durante detetada pela primeira vez, depois são armazenadas num banco e mais tarde podem ser reintroduzidas no indivíduo, quando esse indivíduo já não tiver disponível as células CD8⁺ necessárias. Assim, a vida de um indivíduo pode ser prolongada por um protocolo que envolve a administração continuada dessas células limitantes do indivíduo, nos momentos apropriados. Estes momentos apropriados podem ser determinados seguindo a senescência das células CD8⁺ ou determinando o comprimento dos telómeros dentro dessas células CD8⁺, como uma indicação do momento em que essas células se vão tornar senescentes. De acordo com a presente memória descritiva, as células armazenadas podem ser expandidas num certo número, na presença de um agente que retarda a perda das repetições de telómeros, isto é, um composto de fórmula **I**, **II** ou **III**, conforme descrito na secção II anterior.

De acordo com isto, a presente invenção tem por objeto processos de terapêutica à base de células *ex vivo*, que incluem a obtenção de uma população de células de um indivíduo e a expansão de uma população de células *ex vivo*, em que a população de células é tratada com um composto de fórmula **I**, **II** ou **III**, conforme descrito na secção II anterior, numa quantidade eficaz para aumentar a atividade de telomerase e assim aumentar a capacidade de replicação e/ou prolongar a vida da população de células. O processo inclui geralmente o diagnóstico, num indivíduo, do estado clínico desse indivíduo para ser tratado por terapêutica à base de células *ex vivo*, tal como referido anteriormente.

Noutra modalidade, a presente invenção tem por objeto um processo de proliferação de células estaminais, em que se trata a população de células estaminais com um composto de fórmula **I**, **II** ou **III**, conforme descrito na secção II anterior, numa quantidade eficaz para aumentar a atividade de telomerase e assim aumentar a capacidade replicativa e/ou prolongar a vida dessa população de células.

VII. Formulações e processos de administração

A presente invenção engloba processos de preparação de composições farmacêuticas úteis para aumentar a atividade telomerase numa célula e/ou para promover a cura de feridas. De acordo com isto, combina-se um composto isolado de fórmula **I**, **II** ou **III**, conforme descrito na secção II, com um excipiente farmacêutico e, eventualmente, com outros agentes clínicos, adjuvantes e similares, que podem incluir ingredientes ativos e inativos. As composições podem ter a forma de um sólido, semissólido, pó liofilizado ou formas farmacêuticas líquidas, tais como, por exemplo, comprimidos, cápsulas, formulações de libertação sustentada, soluções,

suspensões, emulsões, supositórios, cremes, pomadas, loções, aerossóis ou similares. As formulações podem ser providenciadas em formas farmacêuticas unitárias apropriadas para administração simples das doses precisas.

Pode-se formular um composto isolado de fórmula **I**, **II** ou **III** como um suplemento dietético ou um nutracêutico, para administração oral. Para uma formulação nutracêutica ou uma formulação farmacêutica oral, os excipientes apropriados incluem graus farmacêuticos de veículos, tais como manitol, lactose, glicose, sacarose, amido, celulose, gelatina, estearato de magnésio, sacarina sódica e/ou carbonato de magnésio. Para utilizar em formulações líquidas orais, a composição pode ser preparada sob a forma de solução, suspensão, emulsão ou xarope, sendo fornecida quer na forma sólida, quer na forma líquida, apropriada para hidratação num veículo aquoso, tal como, por exemplo, solução salina aquosa, dextrose aquosa, glicerol ou etanol, preferencialmente, água ou soro fisiológico normal. Se desejado, a composição também pode conter quantidades menores de substâncias auxiliares não tóxicas, tais como agentes de molhagem, agentes emulsionantes ou tampões. Também se pode incorporar um composto isolado de fórmula **I**, **II** ou **III**, em formulações nutracêuticas existentes, tais como as que estão convencionalmente disponíveis, que podem também incluir um extrato herbáceo, tal como um extrato de *Astragalus membranaceus*.

Para se utilizar na cura de feridas ou no tratamento de outros estados agudos ou crônicos da epiderme, formula-se um composto de fórmula **I**, **II** ou **III** para administração tópica. O veículo para aplicação tópica pode estar numa ou várias formas, por exemplo, uma loção, um creme, um gel, uma pomada, um stick, um aerossol ou uma pasta. Estas formas de produto podem ser formuladas de acordo com processos bem conhecidos.

Podem conter vários tipos de veículos, incluindo, mas não se limitando a soluções, aerossóis, emulsões, géis e lipossomas. O veículo pode ser formulado, por exemplo, como uma emulsão, com uma base de óleo em água ou água em óleo. Os componentes hidrofóbicos (oleosos) apropriados, utilizados nas emulsões, incluem, por exemplo, óleos vegetais, gorduras e óleos animais, hidrocarbonetos sintéticos e os seus ésteres e álcoois, incluindo poliésteres, assim como, óleos de organopolisiloxano. Estas emulsões também incluem um emulsionante e/ou um tensioativo, por exemplo, um tensioativo não iónico, tal como são bem conhecidos na técnica, para dispersar e suspender a fase descontínua dentro da fase contínua.

A formulação tópica normalmente contém um ou mais componentes selecionados entre um agente estruturante, um agente espessante ou gelificante e um emoliente ou lubrificante. Os agentes estruturantes frequentemente utilizados incluem álcoois de cadeia longa, tais como álcool de estearilo e éteres de glicerilo ou ésteres de glicerilo e éteres de oligo(óxido de etileno) ou os seus ésteres. Os agentes espessantes e gelificantes incluem, por exemplo, polímeros de ácido acrílico ou metacrílico e os seus ésteres, poliacrilamidas e espessantes de ocorrência natural, tais como agar, carragenano, gelatina e goma de guar. Exemplos de emolientes incluem ésteres de triglicéridos, ésteres de ácidos gordos, amidas, ceras, tais como cera de abelha, espermacéticos ou cera de carnaúba, fosfolípidos, tais como lecitina e esteróis e os seus ésteres de ácidos gordos. As formulações tópias podem ainda incluir outros componentes tal como são conhecidos na técnica, por exemplo, astringentes, fragrâncias, pigmentos, agentes que melhoram a penetração na pele, protetores solares, etc.

As composições farmacêuticas podem também ser formuladas para administração parentérica, transdérmica ou por inalação. Uma composição injetável para administração parentérica normalmente contém o composto ativo numa solução apropriada para IV, tal como uma solução salina fisiológica esterilizada. A composição também pode ser formulada sob a forma de uma suspensão num lípido ou num fosfolípido, numa suspensão lipossômica ou numa emulsão aquosa.

Para administração por inalação, o composto ativo é formulado sob a forma de partículas de aerossóis sólidas ou líquidas. A formulação pode também incluir um propelente e/ou um dispersante, tal como lactose, para facilitar a formação do aerossol. Para a administração transdérmica, o composto ativo é incluído, preferencialmente, num adesivo transdérmico, que permite uma libertação lenta do composto para uma região selecionada da pele e que pode também incluir substâncias que aumentam a permeação, tais como álcoois alifáticos ou glicerol.

Os processos para a preparação dessas formulações são conhecidos ou serão evidentes para os especialistas nesta técnica; por exemplo, ver Remington's Pharmaceutical Sciences (19th Ed., Williams & Wilkins, 1995). A composição que vai ser administrada irá conter uma quantidade do composto selecionado, numa quantidade eficaz sob o ponto de vista da segurança farmacêutica, para aumentar a atividade de telomerase nas células ou nos tecidos-alvo.

Preferencialmente, a composição farmacêutica ou nutracêutica contém pelo menos 0,1 % (p/v) de um composto de fórmula **I**, **II** ou **III**, tal como foi definido antes, preferencialmente, superior a 0,1 % até cerca de 10 %, preferencialmente, até cerca de 5 % e, mais

preferencialmente, até cerca de 1 % (p/v). A escolha de uma concentração apropriada depende de fatores, tais como a dose desejada, a frequência e o processo de administração do agente ativo.

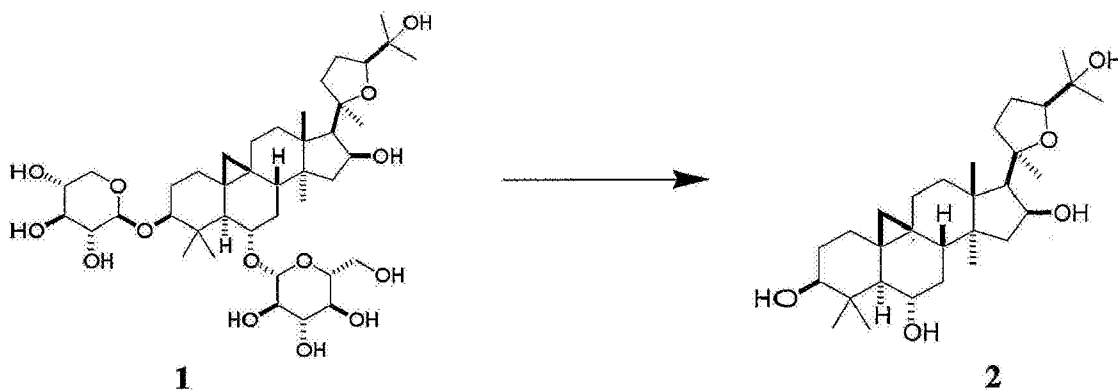
Para o tratamento de um indivíduo ou de um doente, tal como um mamífero ou um doente humano, determinam-se as doses com base em fatores, tais como o peso e estado geral de saúde do indivíduo, o estado clínico a ser tratado, a gravidade dos sintomas, etc. As doses e concentrações determinam-se para produzir o efeito benéfico desejado ao mesmo tempo que evitam quaisquer efeitos secundários indesejáveis. As doses típicas dos compostos em questão, estão num intervalo de cerca de 0,5 e 500 mg/dia para um doente humano, preferencialmente, cerca de 1-100 mg/dia. Por exemplo, regimes de doses mais altas incluem, por exemplo, 50-100, 75-100 ou 50-75 mg/dia e regimes de doses mais baixas incluem, por exemplo, 1-50, 25-50 ou 1-25 mg/dia. Em modalidades específicas, por exemplo, o composto designado aqui como **2** (cicloastragenol) é administrado a um nível de pelo menos 1 mg/dia, preferencialmente, pelo menos 5 mg/dia; ou o composto designado aqui como **1** (astragalósido IV) é administrado a um nível de pelo menos 50 mg/dia, preferencialmente, pelo menos 100 mg/dia.

Estudos que suportam a presente invenção indicam que os compostos de fórmula **I-III** têm uma excelente biodisponibilidade e uma baixa toxicidade. Por exemplo, um composto representativo, o cicloastragenol (**2**), foi negativo para a potencial mutação bacteriana inversa no teste de Ames, utilizando estirpes de teste TA98, TA100, TA1535, TA1537 de *Salmonella Typhimurium* e a estirpe de teste, WP2uvrA de *E. coli*, a níveis até 5 000 µg/placa. Foram também sistematicamente bem tolerados em ratos Sprague-Dawley, após

injeções intravenosas únicas até 10 mg/kg. Não se observou nenhuma alteração dependente da dose para os machos ou as fêmeas, quer no seu comportamento (comer, beber), peso bruto, peso dos órgãos (coração, pulmões, fígado, rins, glândulas supra-renais e baço), nem na hematologia nem na química clínica.

Exemplos (os compostos 1-4, 6 e 7 estão de acordo com a presente invenção)

Exemplo 1. Conversão de astragalósido IV (1) em cicloastragenol (2)

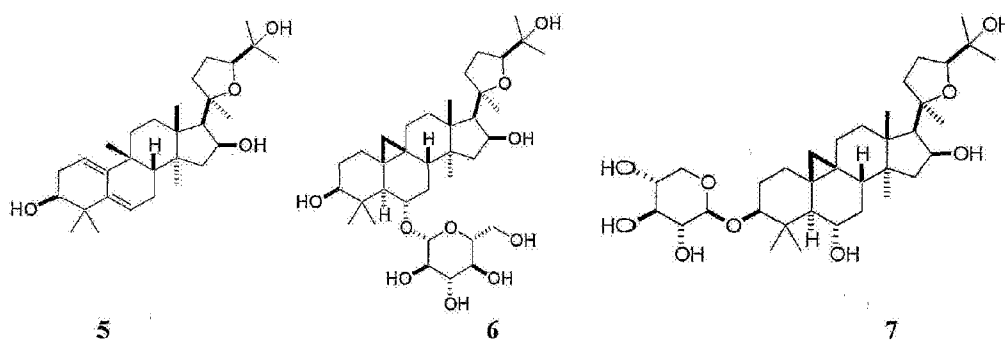


Adicionou-se "HCl-MeOH 10" (TCI America) (500 mL) a astragalósido IV (1) (5,00 g, mmole) e agitou-se a mistura, à temperatura ambiente, durante 7 dias. Concentrou-se a mistura reacional até cerca de metade do seu volume, a pressão reduzida, a 20 °C (sem aquecimento). Repartiu-se a mistura entre bicarbonato de sódio aquoso e acetato de etilo. Extraíu-se a camada aquosa, novamente, com acetato de etilo. Combinaram-se as camadas orgânicas, lavaram-se com cloreto de sódio saturado, secaram-se com sulfato de sódio anidro e concentraram-se a pressão reduzida. Purificou-se o resíduo por cromatografia em coluna (clorofórmio:metanol a 20:1 ~14:1). Para substituir o dissolvente residual por etanol, dissolveu-se o material purificado em etanol e

eliminou-se o dissolvente a pressão reduzida, para se obter **2** (2,1 g, 64 %).

RMN do ^1H (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). IEP-EM m/z Positivo 491 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$, Negativo 549 ($\text{M}+\text{AcO}$) $^-$. CCF (Merck, Kieselgel 60) $R_f = 0,33$ (clorofórmio/metanol a 6:1).

Exemplo 2. Preparação dos compostos **5**, **6** e **7** a partir de astragalósido IV (**1**): Eliminação dos glicósidos do astragalósido IV (**1**), com e sem concomitante rearranjo



A uma solução de astragalósido IV (**1**, 1,00 g, 1,28 mmole), em metanol (80 mL) adicionou-se ácido sulfúrico (0,4 mL) e fez-se o refluxo da mistura, durante 1,5 h. Após arrefecimento para a temperatura ambiente, verteu-se a mistura em acetato de etilo e água. Lavou-se a camada orgânica com salmoura e secou-se com sulfato de sódio anidro. Eliminou-se o dissolvente a pressão reduzida e purificou-se o resíduo por cromatografia em coluna de gel de sílica (clorofórmio/metanol a 20:1 ~ 10:1 ~ 7:1), para se obter o produto **5** (24 mg, 4,0 %) rearranjado, monoglicósidos **6** (172 mg, 21 %) e **7** (29 mg, 3,6 %) e a aglicona cicloastragenol (**2**) (326 mg, 52 %).

GRN140724: IEP-EM m/z 623 $(M+H)^+ + C_{35}H_{58}O_9 = 622$

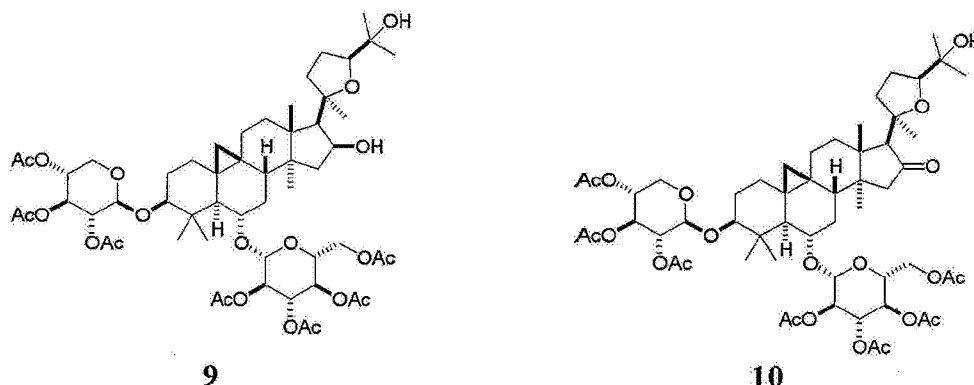
GRN140725: IEP-EM m/z 653 $(M+H)^+ + C_{36}H_{60}O_{10} = 652$

GRN140726: IEP-EM m/z 473 $(M+H)^+ + C_{30}H_{48}O_4 = 472$.

RMN do 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 0,72, 0,85, 0,95, 1,05, 1,11, 1,17, 1,18 e 1,25 (s, 3H cada), 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 largo, 1H), 5,57 (s largo, 1H).

Exemplo 3. Acetilação de **1**; formação de 16-cetona **10**:

Obtiveram-se os compostos **9** e **10** que se seguem, de acordo com o processo de Kitagawa 1983b, citado antes. Em resumo, a acetilação de astragalósido IV (**1**) originou **9**, em conjunto com uma quantidade menor da contraparte de 16-acetato. A oxidação de clorocromato de piridínio **9** originou **10**.



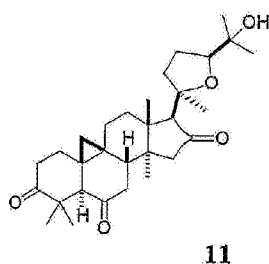
Exemplo 4: Preparação de **4** (ver fig. 1) por desacetilação de **10**

À solução de **10** anterior (10 mg, 0,0093 mmole), em metanol, adicionou-se boro-hidreto de sódio (10 mg, 0,26 mmole) e agitou-se a mistura, à temperatura ambiente, durante a noite. Diluiu-se a mistura com clorofórmio (3 mL) e submeteu-se diretamente a cromatografia em coluna de gel de

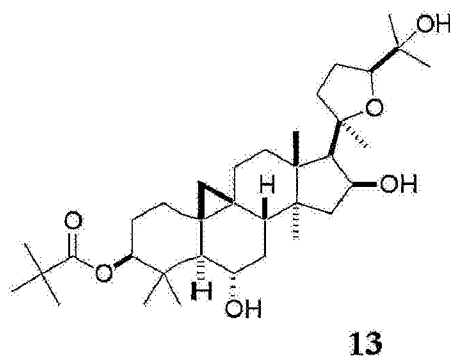
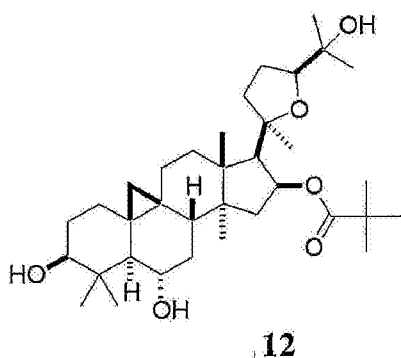
sílica (clorofórmio/metanol a 3:1), para se obter **4** (8,0 mg, quant.). IEP-EM m/z 783 $(M+H)^+ + C_{41}H_{66}O_{14} = 782$.

Exemplo 5: Formação da triona **11** de cicloastragenol **2**

Obteve-se o derivado de 3,6,16-triona **11** de cicloastragenol, por oxidação com CrO_3 de **2**, de acordo com o processo de Kitagawa et al., Chem. Pharm. Bull. 31(2): 689-697 (1983a).



Exemplo 6. Acilação dos grupos 3- ou 6-hidroxilo de cicloastragenol (**2**)



A uma solução de cicloastragenol (**2**) (50 mg, 0,10 mmole), em diclorometano (5 mL) adicionou-se trietilamina (0,030 mL, 0,22 mmole) e cloreto de pivaloílo (0,014 mL, 0,12 mmole) e agitou-se a mistura, a 0 °C, durante a noite. Submeteu-se diretamente a mistura a cromatografia em coluna de gel de sílica (hexano/acetato de etilo a

1:1 ~ 1:2), para se obter **12** (17 mg, 30 %) e **13** (3,3 mg, 2,9 %).

12: IEP-EM m/z 575 (M+H)⁺ + C₃₅H₅₈O₆ = 574.

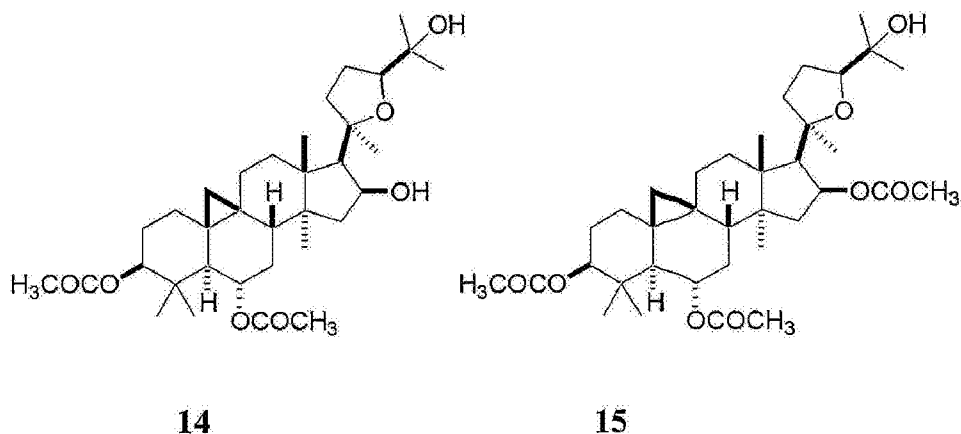
RMN do ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 0,32 (d, J = 4,7 Hz, 1H), 0,49 (d, J = 4,7 Hz, 1H), 0,92 (s, 3H), 0,95 (s, 3H), 1,07 (s, 3H), 1,1-2,0 (m, 17H), 1,15 (s, 9H), 1,18 (s, 3H), 1,21 (s, 3H), 1,34 (s, 6H), 2,19 (dd, J = 13,7, 9,8 Hz, 1H), 2,36 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 3,27 (m, 1H), 3,51 (td, J = 9,4, 3,5 Hz, 1H), 3,71 (t, J = 7,4 Hz, 1H), 5,32 (td, J = 7,8, 4,7 Hz, 1H).

13: IEP-EM m/z 575 (M+H)⁺ + C₃₅H₅₈O₆ = 574.

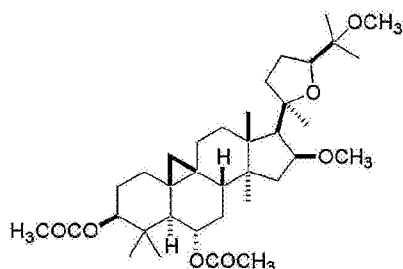
RMN do ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 0,35 (d, J = 4,3 Hz, 1H), 0,51 (d, J = 4,3 Hz, 1H), 0,92 (s, 3H), 1,0-2,0 (m, 17H), 1,03 (s, 3H), 1,09 (s, 3H), 1,12 (s, 3H), 1,17 (s, 9H), 1,21 (s, 3H), 1,24 (s, 3H), 1,28 (s, 3H), 2,29 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 2,53 (m, 1H), 3,50 (m, 1H), 3,73 (t, J = 7,2 Hz, 1H), 4,50 (dd, J = 10,9, 4,3 Hz, 1H), 4,65 (m, 1H).

Exemplo 7A. Acetilação dos hidroxilos secundários de cicloastragenol (2)

Realizou-se esta reação de acordo com o processo de Kitagawa 1983a, citado antes. Em resumo, a acetilação com anidrido acético/piridina, originou uma mistura de **14** (produto principal) e **15** (produto secundário).



Exemplo 7B. Metilação de 3,6-diacetil-cicloastragenol (**14**)
com retenção dos grupos acetilo

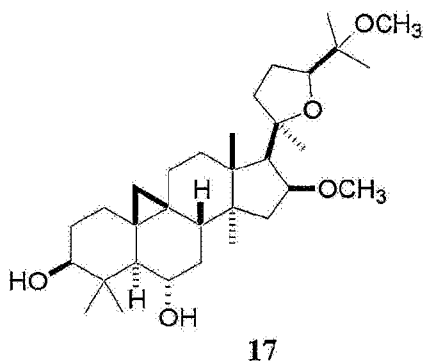


16

A uma solução de **14** (30 mg, 0,052 mmole), em dimetilformamida (3 mL), adicionou-se iodometano (0,75 mL, 12 mmole) e hidreto de sódio (dispersão em óleo a 60 %, 40 mg, 1,0 mmole), a 0 °C, em atmosfera de azoto e agitou-se a mistura, à temperatura ambiente, durante a noite. Adicionou-se água e extraiu-se a mistura com acetato de etilo. Lavou-se a camada orgânica com água e salmoura e secou-se com sulfato de sódio anidro. Eliminou-se o dissolvente a pressão reduzida e purificou-se o resíduo por cromatografia em coluna de gel de sílica (hexano/acetato de etilo a 4:1), para se obter o composto **16** (29 mg, 92 %).

IEP-EM m/z 603 $(M+H)^+ + C_{36}H_{58}O_7 = 602$. RMN do 1H (400 MHz, $CDCl_3$) 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).

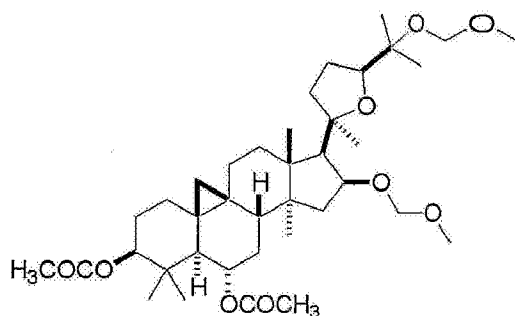
Exemplo 7C. Preparação de 16,25-dimetoxi-cicloastragenol **17**:
eliminação dos grupos acetilo de **16**



Agitou-se, à temperatura ambiente, durante 48 h, uma mistura de **16** (28 mg, 0,046 mmole) e metóxido de sódio (0,5 mole/L, em metanol, 6 mL). Adicionou-se água e extraiu-se a mistura com acetato de etilo. Lavou-se a camada orgânica com água e salmoura e secou-se com sulfato de sódio anidro. Eliminou-se o dissolvente a pressão reduzida e purificou-se o resíduo por cromatografia em coluna de gel de sílica (hexano/acetato de etilo a 2:3), para se obter o composto de dimetoxi-diol **17** (23 mg, 96 %).

IEP-EM m/z 519 $(M+H)^+ + C_{32}H_{54}O_5 = 518$. RMN do 1H (400 MHz, $CDCl_3$) 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), 1,1-1,9 (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).

Exemplo 7D. Alquilação de 3,6-diacetil-cicloastragenol (**14**)
com retenção dos grupos acetilo

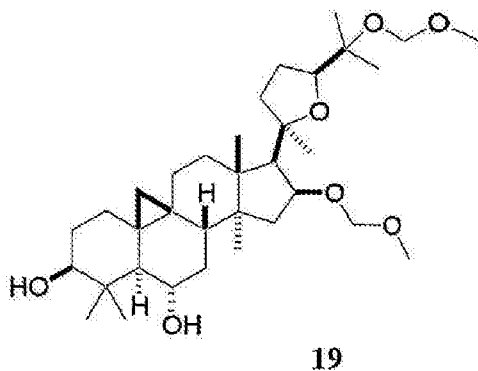


18

A uma solução de **14** (109 mg, 0,190 mmole) em diclorometano (10 mL), adicionou-se di-isopropiletilamina (1,0 mL) e éter metílico de clorometilo (0,5 mL) e agitou-se a mistura, à temperatura ambiente, durante 24 h. Adicionou-se água e extraiu-se a mistura com acetato de etilo. Lavou-se a camada orgânica com água e salmoura e secou-se com sulfato de sódio anidro. Eliminou-se o dissolvente a pressão reduzida e purificou-se o resíduo por cromatografia em coluna de gel de sílica (hexano/acetato de etilo a 3:1), para se obter o composto **18** (114 mg, 90 %).

RMN do ^1H (400 MHz, CDCl_3) 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).

Exemplo 7E. Eliminação dos grupos acetilo de **18**

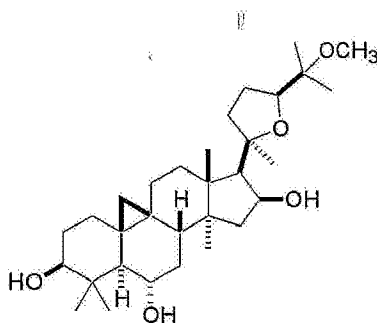


Agitou-se, à temperatura ambiente, durante 48 h, a mistura anterior de **18** (3,6-diacetil-16,25-di(metoximetil)-éter, derivado de cicloastragenol) (102 mg, 0,150 mmole) e metóxido de sódio (0,5 mole/L, em metanol, 10 mL). Adicionou-se água e extraiu-se a mistura com acetato de etilo. Lavou-se a camada orgânica com água e salmoura e secou-se com sulfato de sódio anidro. Eliminou-se o dissolvente a pressão reduzida e purificou-se o resíduo por cromatografia em coluna de gel de sílica (hexano/acetato de etilo a 1:1), para se obter o composto de di(metoximetilo) **19** (80 mg, 92 %).

IEP-EM m/z 579 $(M+H)^+ + C_{34}H_{58}O_7 = 578$.

RMN do 1H (400 MHz, $CDCl_3$) 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).

Exemplo 8. Alquilação de triacetil-cicloastragenol **15**,
seguido de eliminação dos grupos acetilo



20

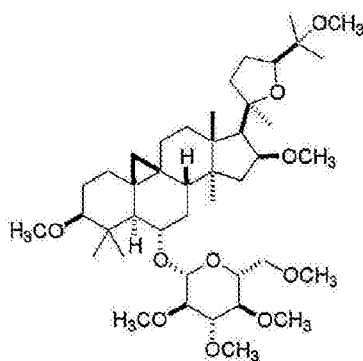
A uma solução de **15** (30 mg, 0,049 mmole), em dimetil-formamida (3 mL), adicionou-se iodometano (0,75 mL, 12 mmole) e hidreto de sódio (dispersão em óleo a 60 %, 40 mg, 1,0 mmole), a 0 °C, em atmosfera de azoto e agitou-se a mistura, à temperatura ambiente, durante a noite. Adicionou-se água e extraiu-se a mistura com acetato de etilo. Lavou-se a camada orgânica com água e salmoura e secou-se com sulfato de sódio anidro. Eliminou-se o dissolvente a pressão reduzida.

Adicionou-se ao resíduo metóxido de sódio em metanol (0,5 mole/L, 6 mL) e agitou-se a mistura, à temperatura ambiente, durante a noite. Adicionou-se ácido clorídrico a 10 % e extraiu-se a mistura com acetato de etilo. Lavou-se a camada orgânica com água e salmoura e secou-se com sulfato de sódio anidro. Eliminou-se o dissolvente a pressão reduzida e purificou-se o resíduo por cromatografia em coluna de gel de sílica (hexano/acetato de etilo a 1:2), para se obter **20** (23 mg, 93 %).

IEP-EM m/z 505 $(M+H)^+ + C_{31}H_{52}O_5 = 504$. RMN do 1H (400 MHz, $CDCl_3$) 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).

Exemplo 9A. Alquilação dos hidroxilos livres de monoglicósido cicloastragenol **6**



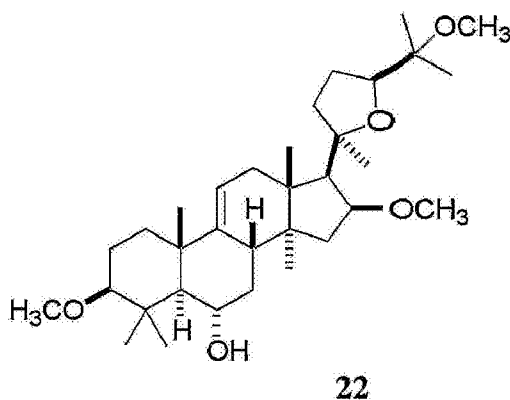
21

A uma solução de **6** (50 mg, 0,077 mmole), em dimetilformamida (4 mL), adicionou-se iodometano (1,0 mL, 16 mmole) e hidreto de sódio (dispersão em óleo a 60 %, 60 mg, 1,5 mmole), a 0 °C, em atmosfera de azoto e agitou-se a mistura, à temperatura ambiente, durante a noite. Adicionou-se água e extraiu-se a mistura com acetato de etilo. Lavou-se a camada orgânica com água e salmoura e secou-se com sulfato de sódio anidro. Eliminou-se o dissolvente a pressão reduzida e purificou-se o resíduo por cromatografia em coluna de gel de sílica (hexano/acetato de etilo a 3:1), para se obter o composto de permetoxi **21** (33 mg, 57 %).

IEP-EM m/z 751 $(M+H)^+ + C_{43}H_{74}O_{10} = 750$. RMN do 1H (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).

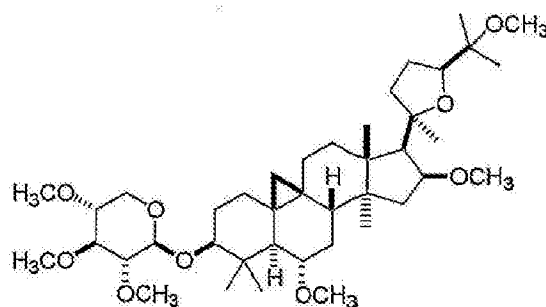
Exemplos 9B. Preparação de 3,16,25-trimetoxi-astragenol **22**:
eliminação do glicósido do composto de permetoxi **21** com
concomitante rearranjo



A uma solução de **21** (30 mg, 0,040 mmole), em metanol (10 mL), adicionou-se ácido sulfúrico (0,2 mL) e fez-se o refluxo da mistura, durante 10 h. Adicionou-se água e extraiu-se a mistura com acetato de etilo. Lavou-se a camada orgânica com água e salmoura e secou-se com sulfato de sódio anidro. Eliminou-se o dissolvente a pressão reduzida e purificou-se o resíduo por cromatografia em coluna de gel de sílica (hexano/acetato de etilo a 4:1), para se obter **22** (3,6 mg, 17 %).

IEP-EM m/z 533 $(M+H)^+ + C_{33}H_{56}O_5 = 532$. RMN do 1H (400 MHz, $CDCl_3$) 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 largo, $J = 5,5$ Hz, 1H).

Exemplo 10A. Alquilação dos hidroxilos livres do monoglicósido de cicloastragenol **7**

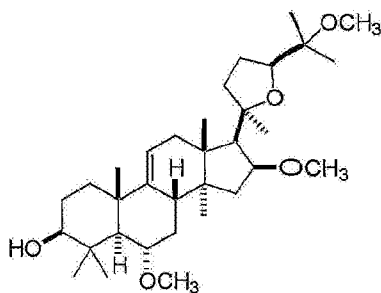


23

Obteve-se o composto **23** (18 mg, 53 %) a partir do composto **7** (30 mg), de acordo com o processo de preparação anterior do composto **21**.

IEP-EM m/z 707 $(M+H)^+$ + $C_{41}H_{70}O_9$ = 706. RMN do 1H (400 MHz, $CDCl_3$) 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).

Exemplo 10B. Preparação de 6,16,25-trimetoxi-astragenol **24**: eliminação do glicósido do composto de permetoxi **23** com concomitante rearranjo

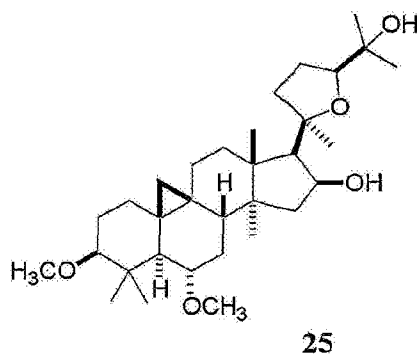


24

Obteve-se o composto **24** (7,1 mg, 56 %) a partir do **23** (17 mg), de acordo com o procedimento utilizado para a preparação anterior do composto **22**.

IEP-EM m/z 533 $(M+H)^+ + C_{33}H_{56}O_5 = 532$. RMN do 1H (400 MHz, $CDCl_3$) 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).

Exemplo 11. Preparação de 3,6-dimetoxi-cicloastragenol **25**: metilação do composto de 16,25-di(metoximetil)éter **19** com a eliminação dos grupos de di(metoximetil)éter



A uma solução de **19** (30 mg, 0,052 mmole), em dimetil-formamida (3 mL), adicionou-se iodometano (0,75 mL, 12 mmole) e hidreto de sódio (dispersão em óleo a 60 %, 40 mg, 1,0 mmole), a 0 °C, em atmosfera de azoto e agitou-se a mistura, à temperatura ambiente, durante a noite. Adicionou-se água e extraiu-se a mistura com acetato de etilo. Lavou-se a camada orgânica com água e salmoura e secou-se com sulfato de sódio anidro. Eliminou-se o dissolvente a pressão reduzida.

Adicionou-se a este resíduo tetra-hidrofurano (5 mL) e ácido clorídrico a 10 % (1 mL) e agitou-se a mistura, à

temperatura ambiente, durante a noite, depois fez-se o seu refluxo, durante 1 h. Adicionou-se água e extraiu-se a mistura com acetato de etilo. Lavou-se a camada orgânica com água e salmoura e secou-se com sulfato de sódio anidro. Eliminou-se o dissolvente a pressão reduzida e purificou-se o resíduo por cromatografia em coluna de gel de sílica (hexano/acetato de etilo a 3:1 ~1:1), para se obter **25** (13 mg, 48 %) e uma pequena quantidade (7,4 mg, 25 %) do composto de 3,6-dimetoxi-16-(metoximetil)éter **26**.

25: IEP-EM m/z 563 (M+H)⁺ + C₃₄H₅₈O₆ = 562.

RMN do ¹H (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).

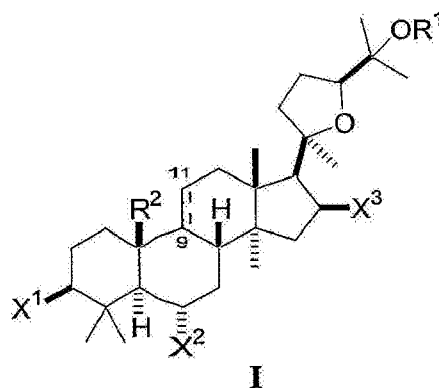
26: IEP-EM m/z 519 (M+H)⁺ + C₃₂H₅₄O₅ = 518.

RMN do ¹H (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).

Lisboa, 22 de Fevereiro de 2018.

REIVINDICAÇÕES

1. Composto isolado de fórmula **I**:



caracterizado pelo facto de

X¹ representar hidroxí ou β-D-xilopiranosídeo,

X² representar hidroxí ou β-D-glicopiranosídeo e

X³ representar hidroxí;

OR¹ representar hidroxí;

e

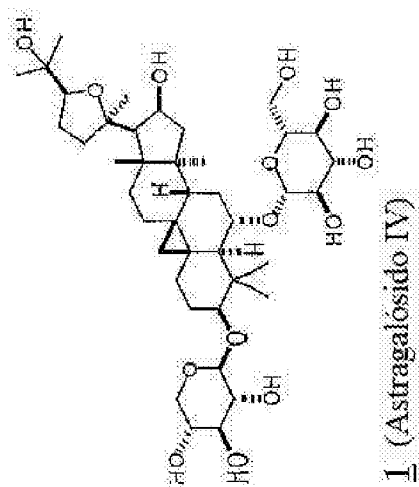
R² formar, em conjunto com o carbono 9, um anel fundido de ciclopropilo e ---- representar uma ligação simples entre os carbonos 9 e 11,

numa quantidade eficaz para ser utilizado no tratamento de uma infeção por VIH.

2. Astragalósido-IV-16-ona numa quantidade eficaz para ser utilizado no tratamento de uma infeção por VIH.
3. Composição farmacêutica, caracterizada pelo facto de conter um veículo aceitável sob o ponto de vista farmacêutico, um composto selecionado entre Astragalósido-IV-16-ona, cicloastragenol-6-β-D-glicopiranosídeo e cicloastragenol-3-β-D-xilopiranosídeo.

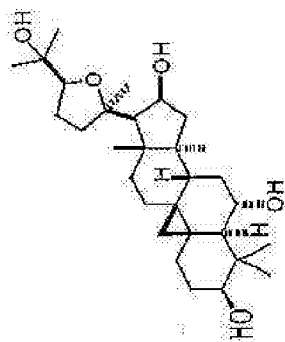
4. Composição farmacêutica, caracterizada pelo facto de conter uma solução tópica de um composto isolado seleccionado entre cicloastragenol, astragenol, Astragalósido-IV-16-ona, cicloastragenol-6- β -D-glicopiranósido e cicloastragenol-3- β -D-xilopiranósido.
5. Composição, de acordo com a reivindicação 4, caracterizada pelo facto de o respetivo composto estar presente na referida formulação, numa concentração de pelo menos 0,1 % (p/v).

Lisboa, 22 de Fevereiro de 2018.



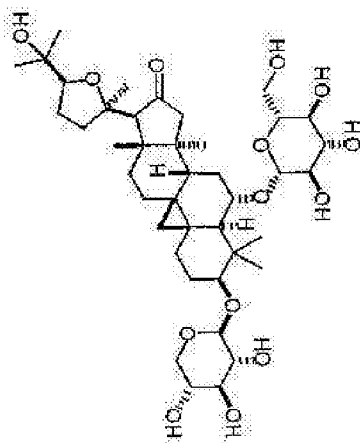
1 (Astragalósido IV)

Fig. 1A



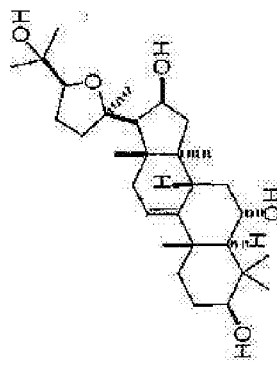
2 (Cicloastragenol)

Fig. 1B



4 (Astragalósido-IV-16-ona)

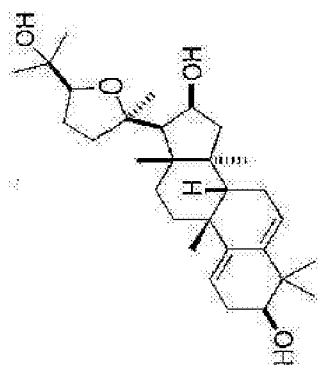
Fig. 1D



3 (Astragenol)

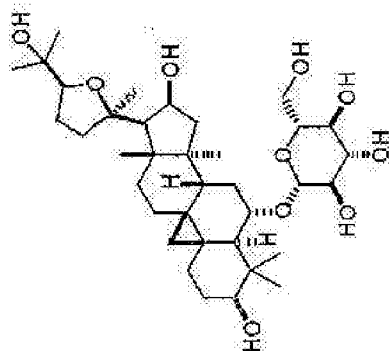
Fig. 1C

Fig. 1



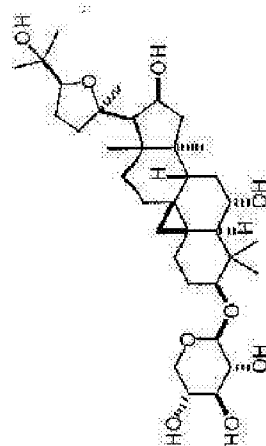
5

Fig. 1E



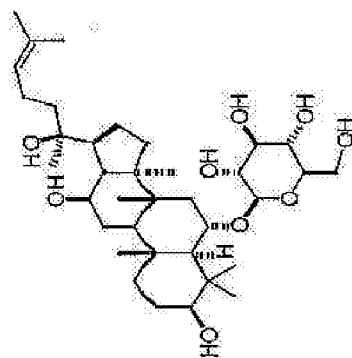
6

Fig. 1F



7

Fig. 1G



8 (Ginsenoside RHI)

Fig. 1H

Fig. 1 (continuação)

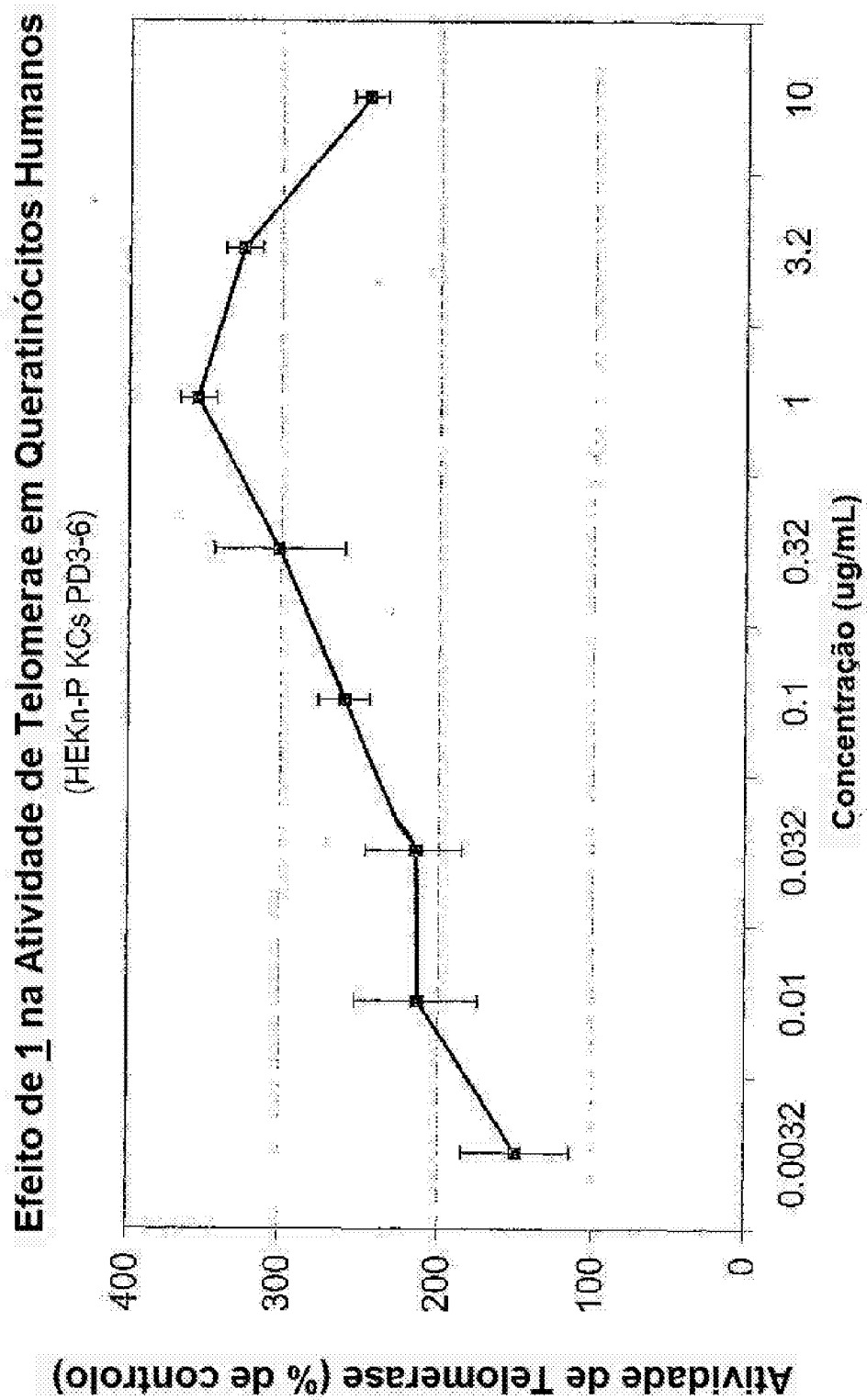


Fig. 2

Efeito de 2 na Atividade de Telomerase em Queratinócitos Humanos

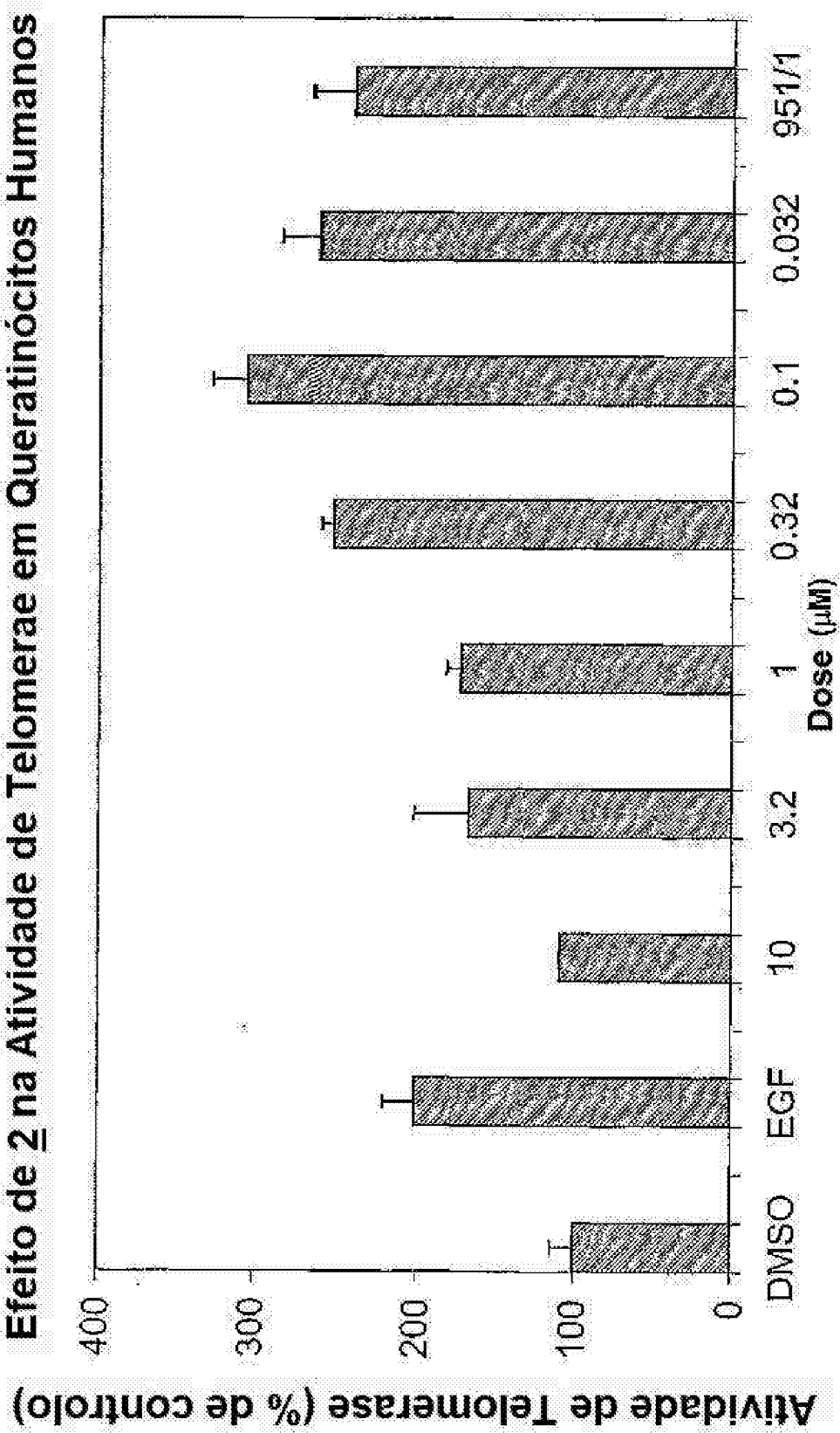


Fig. 3

Aceleração da Cura de Feridas em Queratinócitos de Adultos Idosos
(HEKa18, PD32)

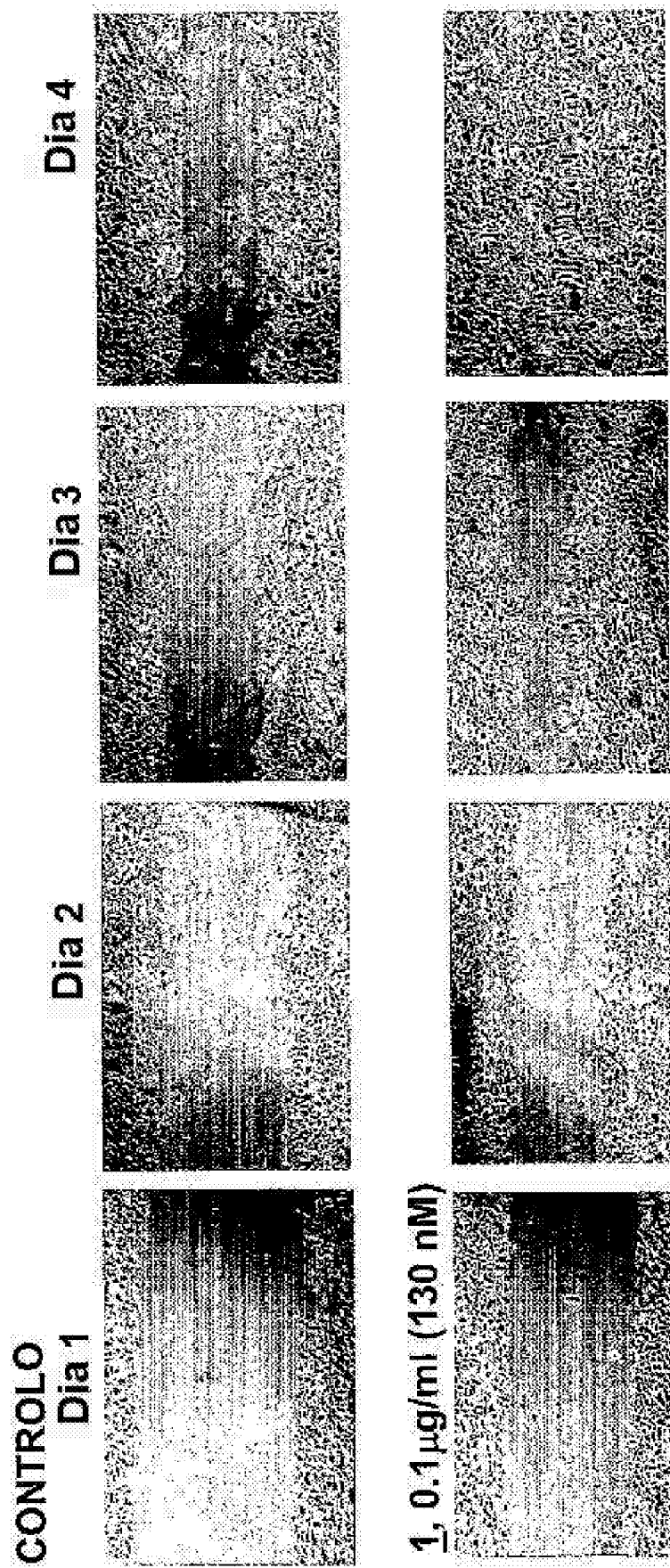
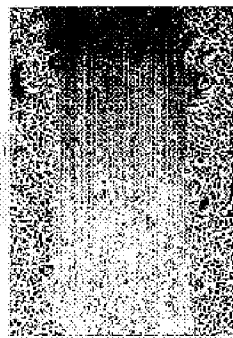


Fig. 4

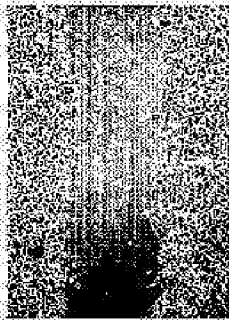
Aceleração da Cura de Feridas em Queratinócitos de Jovens

(HEKn-P, PD14)

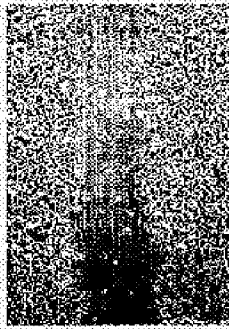
CONTROLO
Dia 1



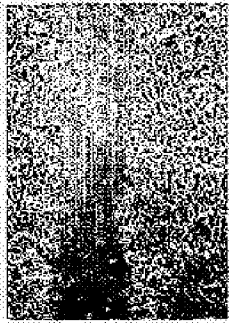
Dia 2



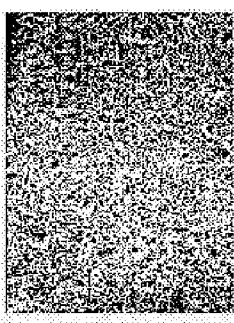
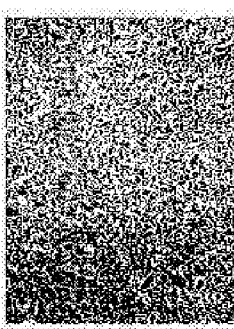
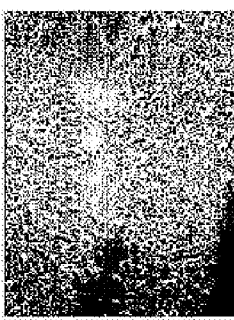
Dia 3



Dia 4



1, 12.7 nM



2, 10 nM

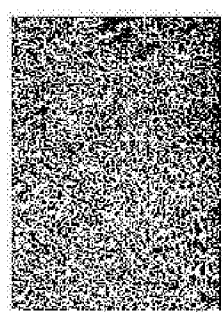
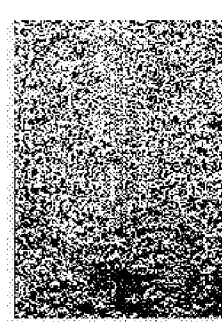
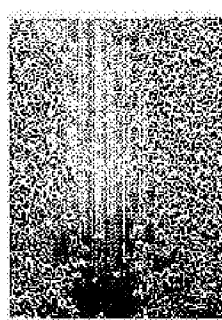
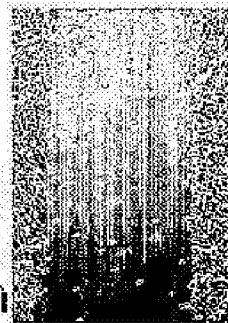


Fig. 5

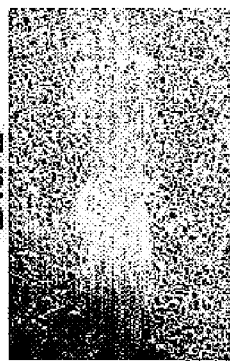
Aceleração da Cura de Feridas em Queratinócitos de Idosos

1, 1µg/ml (1.3 µM)

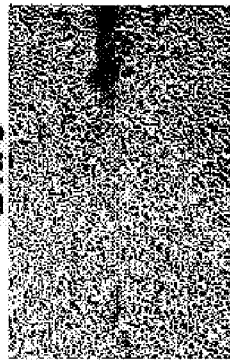
Dia 1



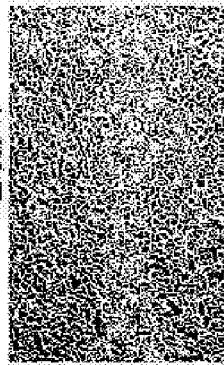
Dia 2



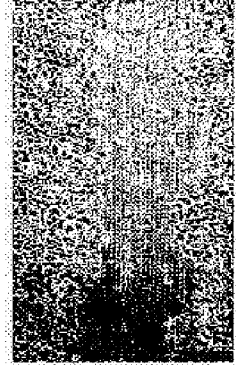
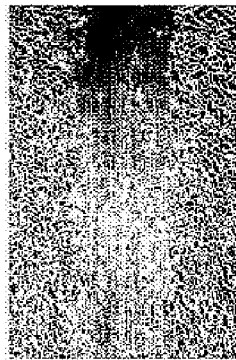
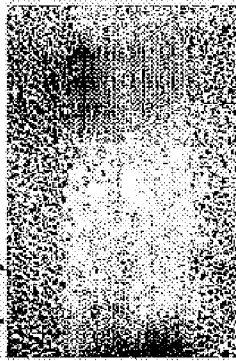
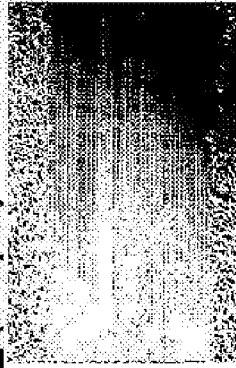
Dia 3



Dia 4



1 (1.3 µM) + GRN163 (10µM)



1 (1.3 µM) + GRN137227 (10µM)

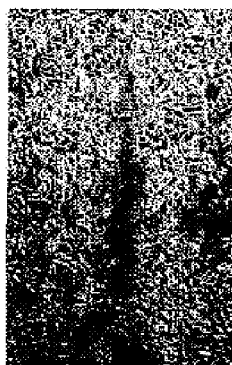
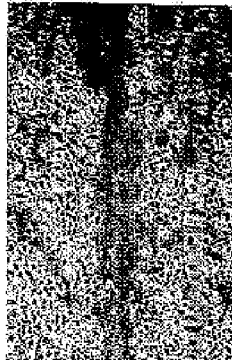
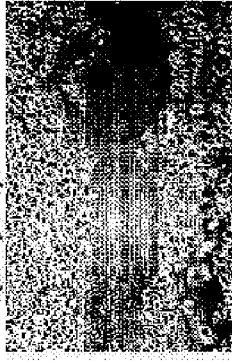
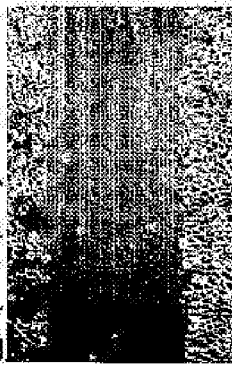


Fig. 6

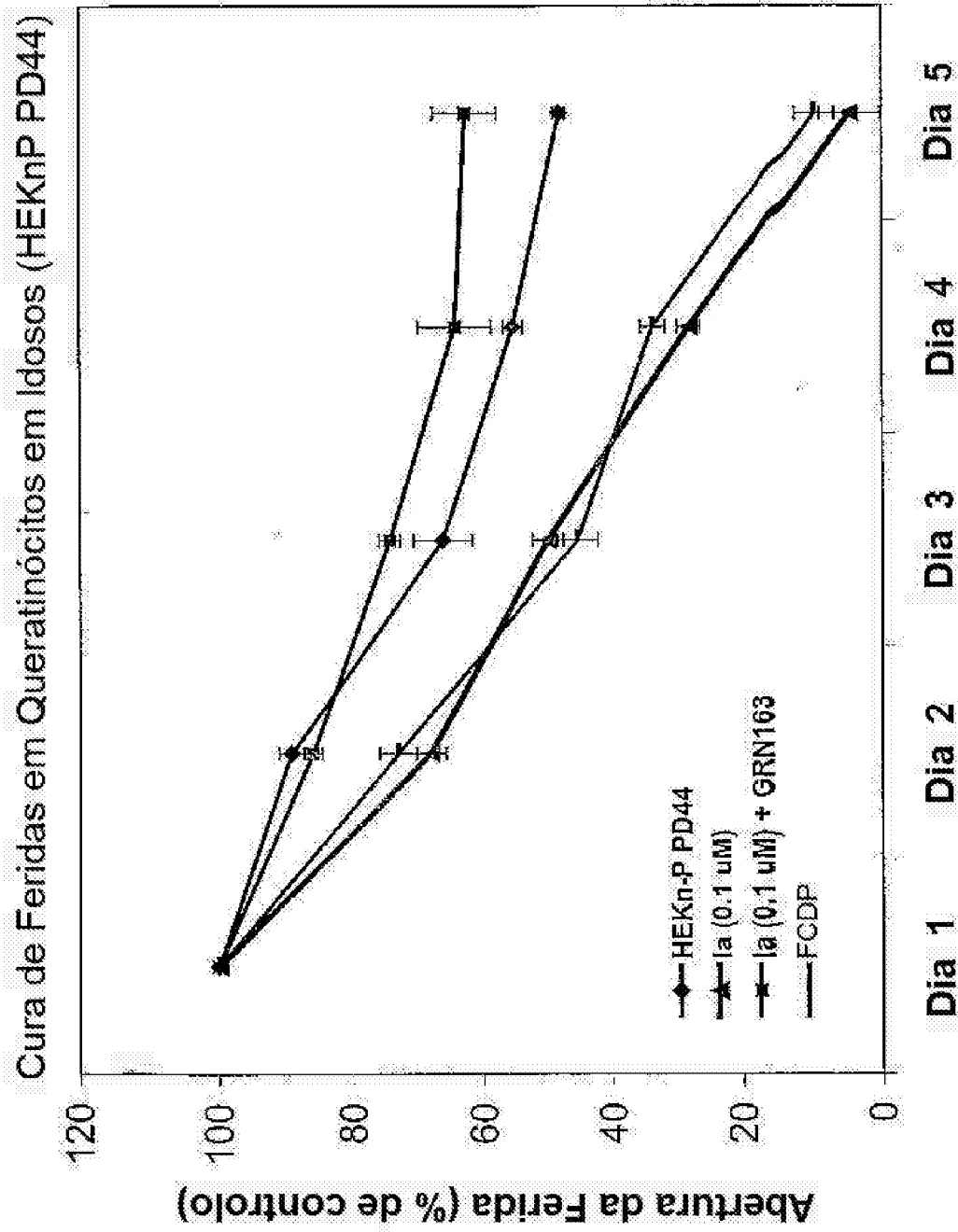


Fig. 7