

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 965 890**

51 Int. Cl.:

C07D 207/337 (2006.01)
C07D 401/12 (2006.01)
A61K 31/675 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)
A61P 27/00 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.06.2019 PCT/US2019/037067**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **19.12.2019 WO19241567**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.06.2019 E 19819804 (6)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.10.2023 EP 3807245**

54 Título: **Acilsulfonamidas que son antagonistas de la familia Bcl para su uso en la gestión clínica de afecciones provocadas o mediadas por células senescentes y para tratar cáncer**

30 Prioridad:
13.06.2018 US 201862684681 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.04.2024

73 Titular/es:
**UNITY BIOTECHNOLOGY, INC. (100.0%)
285 East Grand Avenue
South San Francisco, CA 94080, US**

72 Inventor/es:
**BEAUSOLEIL, ANNE-MARIE y
HUDSON, RYAN**

74 Agente/Representante:
LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 965 890 T3

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

DESCRIPCIÓN

Acilsulfonamidas que son antagonistas de la familia Bcl para su uso en la gestión clínica de afecciones provocadas o mediadas por células senescentes y para tratar cáncer

5

Solicitud de prioridad

Esta solicitud reivindica prioridad respecto a la solicitud de patente provisional estadounidense n.º 62/684.681, presentada el 13 de junio de 2018.

10

Campo de la invención

La invención se refiere a nuevos compuestos de molécula pequeña que inhiben la actividad de la proteína Bcl.

Antecedentes

Las células senescentes se caracterizan como células que ya no tienen capacidad de replicación, pero permanecen en el tejido de origen, provocando un fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP). Una premisa de esta divulgación es que muchas afecciones relacionadas con la edad están mediadas por células senescentes, y que la eliminación selectiva de las células de los tejidos en o alrededor de la afección puede usarse clínicamente para el tratamiento de tales afecciones.

20

La patente estadounidense 10.130.628 (Laberge *et al.*) describe el tratamiento de ciertas afecciones relacionadas con la edad que se cree que están mediadas al menos en parte por células senescentes usando inhibidores de MDM2, inhibidores de Bcl e inhibidores de Akt. El documento US 20170266211 A1 (David *et al.*) describe el uso de inhibidores de Bcl particulares para el tratamiento de afecciones relacionadas con la edad. Las patentes estadounidenses 8.691.184, 9.096.625 y 9.403.856 (Wang *et al.*) describen inhibidores de Bcl en una biblioteca de moléculas pequeñas.

25

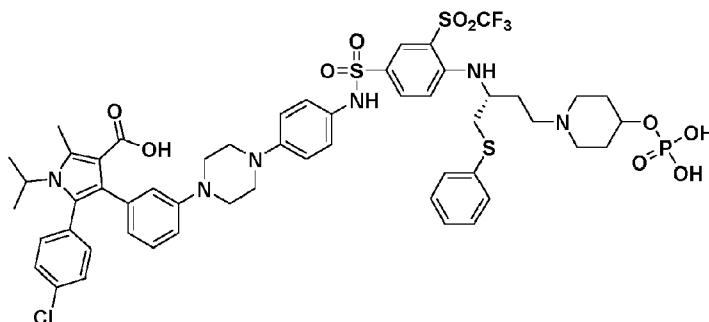
Otras divulgaciones relacionadas con el papel de las células senescentes en la enfermedad humana incluyen las publicaciones previas a la concesión US 2017/0056421 A1 (Zhou *et al.*), WO 2016/185481 (Yeda Inst.), US 2017/0216286 A1 (Kirkland *et al.*) y US 2017/0281649 A1 (David); y los artículos de Furhmann-Stroissnigg *et al.* (Nat Commun. 4 de septiembre de 2017;8(1):422), Blagosklonny (Cancer Biol Ther. Diciembre de 2013;14(12):1092-7) y Zhu *et al.* (Aging Cell. Agosto de 2015;14(4):644-58).

30

35

Sumario

La invención proporciona un compuesto, que es:



40

ácido (R)-5-(4-clorofenil)-1-isopropil-2-metil-4-(3-(4-(4-((1-(feniltio)-4-(fosfonooxi)piperidin-1-il)butan-2-il)amino)-3-((trifluorometil)sulfonyl)fenil)sulfonamido)fenil)piperazin-1-il)fenil)-1H-pirrol-3-carboxílico,

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

45

La invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende el compuesto según la invención en un excipiente farmacéuticamente compatible.

La invención proporciona además una dosis unitaria de una composición farmacéutica que comprende: una cantidad de un compuesto que inhibe la función de Bcl configurada para su uso en el tratamiento de una afección asociada a senescencia que está provocada o mediada al menos en parte por células senescentes, en donde el compuesto es el compuesto según la invención, en donde la composición contiene una formulación del compuesto configurada para su administración a un tejido diana en un sujeto que manifiesta la afección asociada a senescencia, en donde la formulación y la cantidad del compuesto en la dosis unitaria configuran la dosis

55

unitaria para que sea eficaz en la eliminación selectiva de células senescentes en o alrededor del tejido en el sujeto, disminuyendo de ese modo la gravedad de uno o más signos o síntomas de la afección sin provocar efectos adversos en el sujeto cuando se administra al tejido como una sola dosis, opcionalmente en donde la dosis unitaria se envasa con un folleto informativo que describe el uso y los beneficios asociados de los fármacos en el tratamiento de la afección asociada con células senescentes.

5

Además, la invención proporciona el compuesto según la invención o la composición farmacéutica según la invención para su uso en uno de:

- 10 - eliminar selectivamente células senescentes de un tejido o una población celular mixta,
- tratar una afección relacionada con senescencia, opcionalmente en donde la afección relacionada con senescencia se selecciona del grupo que consiste en osteoartritis, una afección oftálmica y una afección pulmonar,
- 15 - eliminar selectivamente células cancerosas de un tejido o una población celular mixta, o
- tratar cáncer.

20 Dibujos

La figura 1 muestra un esquema de síntesis general para sintetizar químicamente compuestos a modo de ejemplo según esta invención.

25 Las figuras 2A, 2B y 2C muestran la expresión de los marcadores de células senescentes p16, IL-6 y MMP13 respectivamente en un modelo animal de osteoartritis. El fenotipo de senescencia puede mejorarse mediante Nutlin-3A, un agente senolítico que inhibe MDM2. Pueden seleccionarse inhibidores de Bcl según esta invención como agentes senolíticos para el mismo propósito.

30 La figura 3A muestra que un agente senolítico eficaz restaura una carga de peso simétrica en ratones tratados en el modelo de osteoartritis. Las figuras 3B, 3C y 3D son imágenes que muestran la histopatología de las articulaciones en estos ratones. El tratamiento con el agente ayuda a prevenir o revierte la destrucción de la capa de proteoglicano.

35 Las figuras 4A y 4B muestran la reversión tanto de la neovascularización como de la obstrucción de vasos en el modelo de ratón de retinopatía inducida por oxígeno (OIR) cuando se administra por vía intravítrea un agente senolítico. Las figuras 4C y 4D se toman del modelo de estreptozotocina (STZ) para la retinopatía diabética. La fuga vascular inducida por STZ se atenúa con la administración intravítrea de un agente senolítico.

40 La figura 5 muestra que la eliminación de células senescentes ayuda a restaurar la saturación de oxígeno (SPO₂) en un modelo de ratón para la EPOC (enfermedad pulmonar obstructiva crónica) inducida por el humo de cigarrillos (CS).

45 La figura 6 muestra datos tomados de un modelo de ratón para aterosclerosis, en el que ratones endogámicos que carecen del receptor de LDL se alimentaron con una dieta rica en grasas. El panel derecho muestra la tinción de placas en la aorta. El panel del medio muestra cuantitativamente que el área de superficie de la aorta cubierta con placas se redujo mediante el tratamiento con un agente senolítico.

Descripción detallada

50 Las células senescentes se caracterizan por ser células que ya no tienen capacidad de replicación, pero permanecen en el tejido de origen, provocando un fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP). Una premisa de esta divulgación es que muchas afecciones relacionadas con la edad están mediadas por células senescentes, y que la eliminación selectiva de las células de los tejidos en o alrededor de la afección puede usarse clínicamente para el tratamiento de tales afecciones.

55

La tecnología descrita y reivindicada a continuación representa la primera descripción de una nueva clase de inhibidores de Bcl que pueden usarse para eliminar selectivamente células senescentes de un tejido diana con fines de tratamiento de afecciones relacionadas con la edad.

60

Inhibición de la actividad de la proteína Bcl

65 La familia de proteínas Bcl (TC# 1.A.21) incluye proteínas conservadas evolutivamente que comparten dominios de homología de Bcl-2 (BH). Las proteínas Bcl son más notables por su capacidad para regular por incremento o por disminución la apoptosis, una forma de muerte celular programada, en la mitocondria. La siguiente explicación se proporciona para ayudar al usuario a comprender algunos de los fundamentos científicos de los

compuestos de esta divulgación. Estos conceptos no son necesarios para poner en práctica la invención, ni limitan el uso de los compuestos y métodos descritos en el presente documento de ninguna manera más allá de lo expresamente establecido o requerido.

- 5 En el contexto de esta divulgación, las proteínas Bcl de particular interés son aquellas que regulan por disminución la apoptosis. Las proteínas Bcl antiapoptóticas contienen dominios BH1 y BH2, algunas de ellas contienen un dominio BH4 N-terminal adicional (Bcl-2, Bcl-x(L) y Bcl-w (Bcl-2L2)). La inhibición de estas proteínas aumenta la tasa o susceptibilidad de las células a la apoptosis. Por tanto, puede usarse un inhibidor de tales proteínas para ayudar a eliminar células en las que se expresan las proteínas.

10

A mediados de la década de 2000, Abbott Laboratories desarrolló un inhibidor novedoso de Bcl-2, Bcl-xL y Bcl-w, conocido como ABT-737 (Navitoclax). Este compuesto es parte de un grupo de inhibidores de molécula pequeña (SMI) miméticos de BH3 que seleccionan como diana estas proteínas de la familia de Bcl-2, pero no A1 o Mcl-1. ABT-737 es superior a los inhibidores de BCL-2 anteriores dada su mayor afinidad por Bcl-2, Bcl-xL y Bcl-w. Estudios *in vitro* demostraron que las células primarias de pacientes con neoplasias malignas de células B son sensibles a ABT-737. En pacientes humanos, ABT-737 es eficaz contra algunos tipos de células cancerosas, pero está sujeto a trombocitopenia limitante de la dosis.

15

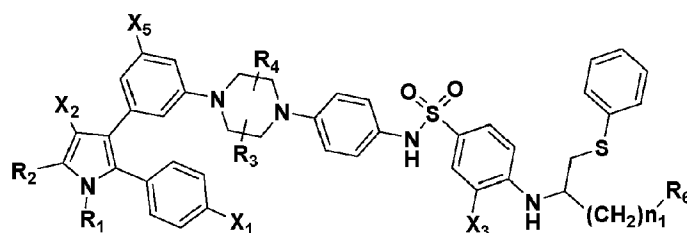
Ahora se ha descubierto que los compuestos descritos en el presente documento encajan en el sitio activo de la proteína Bcl proporcionando una fuerte inhibición de Bcl y/o promoviendo la apoptosis de las células diana. Estos compuestos pueden desarrollarse como fármacos muy potentes y específicos para seleccionar como diana células senescentes y células cancerosas, tal como se describe en las secciones siguientes.

20

Compuestos modelo

25

En el presente documento se describen compuestos que tienen una estructura que se encuentra dentro del alcance de la fórmula mostrada a continuación.



30

en donde:

X₁ es haluro, preferiblemente -Cl;

35

X₂ es -COOH;

X₃ es -SO₂CF₃; -SO₂CH₃; o -NO₂

X₅ es -F o -H;

40

R₁ es -CH(CH₃)₂;

R₂ es o bien -H o bien -CH₃, preferiblemente -CH₃;

45

R₃ y R₄ son independientemente o bien -H o bien -CH₃, preferiblemente ambos -H;

n₁ es de 1 a 3, preferiblemente 2; y

R₆ se selecciona de -OH,

50



en donde el grupo hidroxilo grupo en R₆ está opcionalmente fosforilado.

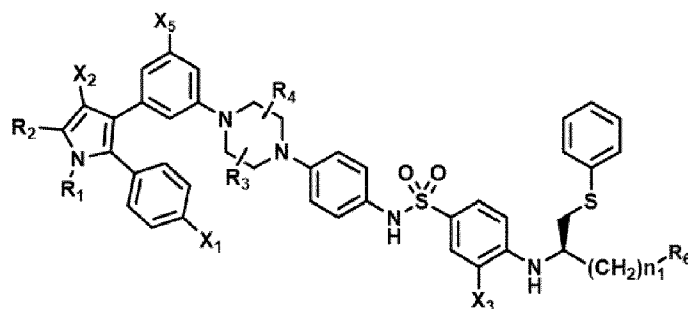
55

Cualquiera de los posibles constituyentes en la fórmula viene con la condición de que si X₃ es -SO₂CF₃, entonces el grupo hidroxilo en R₆ debe estar fosforilado. En combinación con cualquiera de las opcionales enumeradas anteriormente, el grupo -COOH de X₂ puede estar fosforilado así como o en lugar del grupo hidroxilo, a elección

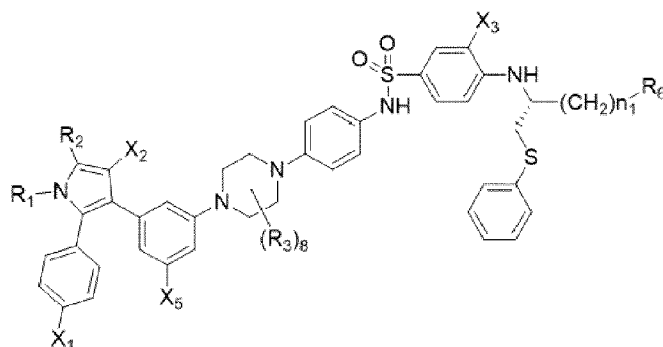
del usuario.

Una forma "fosforilada" de un compuesto es un compuesto en el que uno o más grupos -OH o -COOH se han sustituido con un grupo fosfato que es o bien -OPO₃H₂ o bien -C_nPO₃H (donde n es de 1 a 4), de manera que el grupo fosfato puede eliminarse *in vivo* (por ejemplo, mediante enzimólisis). Una forma no fosforilada o desfosforilada no tiene tal grupo.

A menos que se indique explícitamente o se requiera lo contrario, los compuestos representados sin estereoquímica incluyen una mezcla racémica de todos los estereoisómeros, y preparaciones enantioméricamente puras con cualquier enantiómero como alternativa. Cualquiera de los compuestos de fórmula I normalmente, pero no necesariamente, tienen la estereoquímica representada en la fórmula I a continuación:

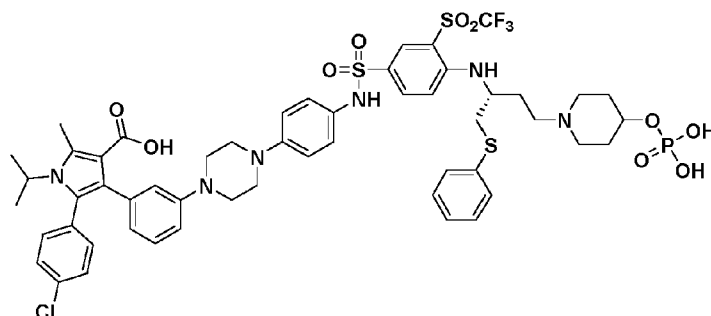


que puede representarse también tal como sigue:



en donde cada R₃ es independientemente o bien -H o bien -CH₃.

La invención proporciona un compuesto, que es



ácido (R)-5-(4-clorofenil)-1-isopropil-2-metil-4-(3-(4-(4-((1-(feniltio)-4-(4-(fosfonooxi)piperidin-1-il)butan-2-il)amino)-3-(trifluorometil)sulfonyl)fenil)sulfonamido)fenil)piperazin-1-il)fenil)-1H-pirrol-3-carboxílico,

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Evaluación de compuestos para determinar la actividad senolítica y quimioterápica

Estos y otros compuestos expuestos en esta divulgación pueden evaluarse a nivel molecular para determinar su capacidad para funcionar de un modo que indique que son agentes candidatos para su uso como agentes

activos para la preparación de medicamentos y su uso en terapia humana.

Por ejemplo, cuando la terapia incluye desencadenar la apoptosis de células senescentes por medio de Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w u otra proteína de la familia Bcl, pueden someterse a prueba los compuestos para determinar su capacidad para inhibir la unión entre una o más proteínas Bcl y sus respectivos ligandos afines. El ejemplo 1 proporciona una ilustración de un ensayo homogéneo (un ensayo que no requiere una etapa de separación) para el propósito de determinar la unión a las isoformas de Bcl. Los compuestos pueden examinarse a nivel molecular para determinar su capacidad para interactuar con la isoforma diana, provocando de ese modo senólisis. Los ejemplos 2 y 3 proporcionan ilustraciones de ensayos diseñados para este propósito.

Alternativamente o además, pueden evaluarse los compuestos para determinar su capacidad para destruir células senescentes específicamente. Las células cultivadas se ponen en contacto con el compuesto y se determina el grado de citotoxicidad o inhibición de las células. La capacidad del compuesto para destruir o inhibir células senescentes puede compararse con el efecto del compuesto sobre células normales que se dividen libremente a baja densidad y células normales que se encuentran en un estado quiescente a alta densidad. Los ejemplos 2 y 3 proporcionan ilustraciones de la destrucción de células senescentes usando la línea celular IMR90 de fibroblastos de tejido diana humano y células HUVEC. Se conocen protocolos similares y pueden desarrollarse u optimizarse para someter a prueba la capacidad de las células para destruir o inhibir otras células senescentes y otros tipos de células, tales como células cancerosas.

Además pueden examinarse inhibidores de Bcl candidatos que son eficaces en la destrucción selectiva de células senescentes *in vitro* en modelos animales para una enfermedad particular. Los ejemplos 4, 5, 6 y 7 de la sección experimental a continuación proporcionan ilustraciones de osteoartritis, enfermedad ocular, enfermedad pulmonar y aterosclerosis, respectivamente.

Alternativamente o además, pueden evaluarse los compuestos para determinar su capacidad para destruir células cancerosas o tumorales específicamente. Las células cultivadas se ponen en contacto con el compuesto y se determina el grado de citotoxicidad para las células y/o la capacidad para inhibir la proliferación celular. El efecto sobre las células cancerosas puede compararse con el efecto del compuesto sobre células normales del mismo tipo de tejido original en cultivo. También pueden someterse a prueba los compuestos para determinar su capacidad para eliminar tumores, inhibir el crecimiento de células cancerosas y tratar síntomas y signos de cáncer en modelos animales establecidos. El ejemplo 8 proporciona ilustraciones de ensayos *in vitro* e *in vivo* para evaluar el potencial de los compuestos de esta divulgación como agentes quimioterápicos.

35 Formulación de medicamentos

La preparación y formulación de agentes farmacéuticos para su uso según esta divulgación puede incorporar tecnología convencional, tal como se describe, por ejemplo, en la edición actual de *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*. La formulación normalmente se optimizará para su administración al tejido diana, por ejemplo, mediante administración local, de una manera que mejore el acceso del agente activo a las células senolíticas diana y proporcione la duración óptima del efecto, minimizando al mismo tiempo los efectos secundarios o la exposición a tejidos que no están implicados en la afección que está tratándose.

Pueden prepararse preparaciones farmacéuticas para su uso en el tratamiento de afecciones relacionadas con senescencia y otras enfermedades mezclando un inhibidor de Bcl con una base o portador farmacéuticamente aceptable y, según sea necesario, uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. Dependiendo del tejido diana, puede resultar apropiado formular la composición farmacéutica para liberación sostenida o prolongada. Las formulaciones orales de liberación prolongada pueden incluir una mezcla de variantes isómeras, agentes de unión o recubrimientos. Las formulaciones inyectables de liberación prolongada pueden incluir el agente activo en combinación con un agente de unión, agente encapsulante o micropartícula. Para el tratamiento de enfermedades de las articulaciones tales como osteoartritis, la composición farmacéutica normalmente se formula para administración intraarticular. Para el tratamiento de enfermedades oculares tales como glaucoma, retinopatía diabética o degeneración macular relacionada con la edad (DMAE), la composición puede formularse para administración intravítrea o intracameral. Para el tratamiento de enfermedades pulmonares, la composición puede formularse como un aerosol o para administración intratraqueal.

Esta divulgación proporciona productos comerciales que son kits que incluyen dosis unitarias de uno o más de los agentes o composiciones descritos en esta divulgación. Estos kits normalmente comprenden una preparación farmacéutica en uno o más recipientes. Las preparaciones pueden proporcionarse como una o más dosis unitarias (o bien combinadas o bien separadas). El kit puede contener un dispositivo tal como una jeringa para la administración del agente o la composición en o alrededor del tejido diana de un sujeto que lo necesita. El producto también puede contener o estar acompañado de un prospecto informativo que describe el uso y los beneficios asociados de los fármacos en el tratamiento de la afección asociada con células senescentes y, opcionalmente, un aparato o dispositivo para la administración terapéutica de la composición.

65 Diseño del tratamiento

Las células senescentes se acumulan con la edad, razón por la cual las afecciones mediadas por células senescentes se producen con mayor frecuencia en adultos mayores. Además, diferentes tipos de estrés sobre los tejidos pulmonares pueden promover la aparición de células senescentes y el fenotipo que expresan. Los factores estresantes celulares incluyen estrés oxidativo, estrés metabólico, daño al ADN (por ejemplo, resultante de la exposición a la luz ultravioleta ambiental o un trastorno genético), activación de oncogenes y acortamiento de los telómeros (resultante, por ejemplo, de la hiperproliferación). Los tejidos que están sujetos a tales factores estresantes pueden tener una mayor prevalencia de células senescentes, lo que a su vez puede conducir a la presentación de ciertas afecciones a una edad más temprana o en una forma más grave. Una susceptibilidad hereditaria a ciertas afecciones sugiere que la acumulación de células senescentes que median en enfermedades puede verse influenciada directa o indirectamente por componentes genéticos, lo que puede conducir a una presentación más temprana.

Uno de los beneficios del paradigma de células senescentes es que la eliminación exitosa de las células senescentes puede proporcionar al sujeto un efecto terapéutico a largo plazo. Las células senescentes son esencialmente no proliferativas, lo que significa que la repoblación posterior de un tejido con más células senescentes sólo puede producirse mediante la conversión de células no senescentes del tejido en células senescentes, un proceso que lleva considerablemente más tiempo que la simple proliferación. Como principio general, un período de terapia con un agente senolítico que sea suficiente para eliminar células senescentes de un tejido diana (una sola dosis o una pluralidad de dosis administradas, por ejemplo, todos los días, quincenalmente o semanalmente, administradas a lo largo de un período de unos pocos días, una semana o varios meses) puede proporcionar al sujeto un período de eficacia (por ejemplo, durante dos semanas, un mes, dos meses o más) durante el cual no se administra el agente senolítico, y el sujeto experimenta alivio, reducción o reversión de uno o más signos o síntomas adversos de la afección que está tratándose.

Para tratar una afección particular relacionada con senescencia con un agente senolítico según esta divulgación, el régimen terapéutico dependerá de la ubicación de las células senescentes y de la fisiopatología de la enfermedad.

Afecciones relacionadas con senescencia adecuadas para el tratamiento.

Los inhibidores de Bcl de esta divulgación pueden usarse para la prevención o el tratamiento de diversas afecciones relacionadas con senescencia. Tales condiciones se caracterizarán normalmente (aunque no necesariamente) por una sobreabundancia de células senescentes (tales como células que expresan p16 y otros marcadores de senescencia) en o alrededor del sitio de la afección, o una sobreabundancia de expresión de p16 y otros marcadores de senescencia, en comparación con la frecuencia de tales células o el nivel de tal expresión en tejido no afectado. Los ejemplos no limitativos de interés actual incluyen el tratamiento de osteoartritis, enfermedad ocular y enfermedad pulmonar, tal como se ilustra en las siguientes secciones.

Tratamiento de la osteoartritis

Cualquiera de los inhibidores de Bcl enumerados en esta divulgación puede desarrollarse para tratar la osteoartritis de acuerdo con esta divulgación. De manera similar, los inhibidores de Bcl enumerados en esta divulgación pueden desarrollarse para eliminar selectivamente células senescentes en o alrededor de una articulación de un sujeto que lo necesita, incluyendo, pero sin limitarse a, una articulación afectada por osteoartritis.

La osteoartritis, enfermedad degenerativa de las articulaciones, se caracteriza por fibrilación del cartílago en sitios de alto estrés mecánico, esclerosis ósea y engrosamiento de la membrana sinovial y la cápsula articular. La fibrilación es una desorganización local de la superficie que implica la división de las capas superficiales del cartílago. La división temprana es tangencial a la superficie del cartílago, siguiendo los ejes de los haces de colágeno predominantes. El colágeno dentro del cartílago se desorganiza y se pierden proteoglicanos de la superficie del cartílago. En ausencia de los efectos protectores y lubricantes de los proteoglicanos en una articulación, las fibras de colágeno se vuelven susceptibles a la degradación y sobreviene la destrucción mecánica. Los factores de riesgo que predisponen al desarrollo de osteoartritis incluyen edad avanzada, obesidad, lesión articular previa, uso excesivo de la articulación, debilidad de los músculos del muslo y la genética. Los síntomas de la osteoartritis incluyen dolor o rigidez en las articulaciones, particularmente en las caderas, las rodillas y la zona lumbar, después de inactividad o un uso excesivo; rigidez después del reposo que desaparece después del movimiento; y dolor que empeora después de la actividad o hacia el final del día.

Pueden usarse compuestos según esta divulgación para reducir o inhibir la pérdida o erosión de capas de proteoglicanos en una articulación, reducir la inflamación en la articulación afectada y promover, estimular, mejorar o inducir la producción de colágeno, por ejemplo, colágeno de tipo 2. El compuesto puede provocar una reducción en la cantidad o el nivel de citocinas inflamatorias, tales como IL-6, producidas en una articulación y se reduce la inflamación. Los compuestos pueden usarse para tratar la osteoartritis y/o inducir la producción de colágeno, por ejemplo, colágeno de tipo 2, en la articulación de un sujeto. También puede usarse un compuesto

para disminuir, inhibir o reducir la producción de metaloproteinasa 13 (MMP-13), que degrada el colágeno en una articulación, y para restaurar la capa de proteoglicano o inhibir la pérdida y/o degradación de la capa de proteoglicano. De ese modo, el tratamiento con un compuesto también puede reducir la probabilidad de, inhibir o disminuir la erosión o ralentizar la erosión del hueso. El compuesto puede administrarse directamente a una articulación osteoartítica, por ejemplo, por vía intraarticular, tópica, transdérmica, intradérmica o subcutánea. El compuesto también puede restaurar, mejorar o inhibir el deterioro de la resistencia de una unión y reducir el dolor articular.

Tratamiento de afecciones oftálmicas

Cualquiera de los inhibidores de Bcl enumerados en esta divulgación puede usarse para prevenir o tratar una afección oftálmica en un sujeto que lo necesita mediante la eliminación de células senescentes en o alrededor de un ojo del sujeto, mediante lo cual disminuye la gravedad de al menos un signo o síntoma de la enfermedad. Tales afecciones incluyen tanto enfermedades de la parte posterior del ojo como enfermedades del frente del ojo. De manera similar, los inhibidores de Bcl enumerados en esta divulgación pueden desarrollarse para eliminar selectivamente células senescentes en o alrededor del tejido ocular en un sujeto que lo necesita.

Las enfermedades del ojo que pueden tratarse según esta divulgación incluyen presbicia, degeneración macular (incluida DMAE húmeda o seca), retinopatía diabética y glaucoma.

La degeneración macular es una afección neurodegenerativa que puede caracterizarse como una enfermedad de la parte posterior del ojo. Provoca la pérdida de células fotorreceptoras en la parte central de la retina, denominada mácula. La degeneración macular puede ser seca o húmeda. La forma seca es más común que la húmeda, y a aproximadamente el 90 % de los pacientes con degeneración macular relacionada con la edad (DMAE) se les diagnostica la forma seca. La DMAE seca está asociada con atrofia de la capa del epitelio pigmentario de la retina (EPR), lo que provoca la pérdida de células fotorreceptoras. Con la DMAE húmeda, pueden crecer nuevos vasos sanguíneos debajo de la retina y perder sangre y líquido. La neovascularización coroidea anómalamente permeable puede provocar la muerte de las células de la retina, creando puntos ciegos en la visión central. La formación de exudados, o "drusas", debajo de la membrana de Bruch de la mácula puede ser un signo físico de que está surgiendo degeneración macular. Los síntomas de la degeneración macular incluyen, por ejemplo, distorsión percibida y cambios en la percepción de los colores.

Otra enfermedad de la parte posterior del ojo es la retinopatía diabética (RD). Según Wikipedia, la primera fase de la RD no es proliferativa y, normalmente, no presenta síntomas ni signos sustanciales. La NPDR es detectable mediante fotografía del fondo de ojo, en la que pueden observarse microaneurismas (protuberancias microscópicas llenas de sangre en las paredes de las arterias). Si hay visión reducida, puede realizarse una angiografía con fluoresceína para ver la parte posterior del ojo. Puede observarse claramente el estrechamiento o bloqueo de los vasos sanguíneos de la retina y esto se denomina isquemia retiniana (falta de flujo sanguíneo). El edema macular en el que los vasos sanguíneos pierden su contenido hacia la región macular puede producirse en cualquier etapa de la RDNP. Los síntomas del edema macular son visión borrosa e imágenes oscurecidas o distorsionadas que no son iguales en ambos ojos. La tomografía de coherencia óptica puede mostrar las áreas de engrosamiento de la retina (debido a la acumulación de líquido) del edema macular. En la segunda fase de la RD, se forman nuevos vasos sanguíneos anómalos (neovascularización) en la parte posterior del ojo como parte de la retinopatía diabética proliferativa (RDP), que pueden estallar y sangrar (hemorragia vítrea) y hacer borrosa la visión. En el examen fundoscópico, el médico verá manchas algodonosas, hemorragias en llamas (también se producen lesiones similares por la toxina alfa de *Clostridium novyi*) y hemorragias en manchas.

Los beneficios del tratamiento de la enfermedad de la parte posterior del ojo con un agente senolítico de esta divulgación pueden incluir la inhibición o el retraso de características adversas de la afección, tales como neovascularización anómala, angiogénesis patogénica, obstrucción de los vasos, sangrado intraocular, daño retiniano y pérdida de visión. El agente senolítico puede administrarse en o alrededor del ojo, por ejemplo, mediante inyección intraocular, intravítrea o retrobulbar. De manera óptima, habrá una reversión en parte de la fisiopatología, tal como restauración de la vasculatura funcional, angiogénesis funcional, recrecimiento o restauración de la retina, con un grado parcial de mejora de la visión.

La presbicia es una afección relacionada con la edad en la que el ojo muestra una capacidad progresivamente disminuida para enfocar objetos cercanos a medida que la velocidad y la amplitud de acomodación de un ojo normal disminuyen con la edad. La pérdida de elasticidad del cristalino y la pérdida de contractilidad de los músculos ciliares pueden provocar presbicia. Los cambios relacionados con la edad en las propiedades mecánicas de la cápsula anterior del cristalino y la cápsula posterior del cristalino sugieren que la resistencia mecánica de la cápsula posterior del cristalino disminuye significativamente con la edad como consecuencia del cambio en la composición del tejido. El principal componente estructural de la cápsula del cristalino es el colágeno de tipo IV de la membrana basal que está organizado en una red molecular tridimensional. La adhesión del colágeno IV, la fibronectina y la lámina al cristalino intraocular puede inhibir la migración celular y puede reducir el riesgo de PCO.

Los agentes senolíticos proporcionados por esta divulgación pueden ralentizar la desorganización de la red de colágeno de tipo IV, disminuir o inhibir la migración de células epiteliales y también pueden retrasar la aparición de presbicia o disminuir o ralentizar la gravedad progresiva de la afección. También pueden ser útiles para la cirugía posterior a cataratas para reducir la probabilidad de aparición de PCO.

El glaucoma y otras enfermedades de la parte frontal del ojo también pueden ser susceptibles de tratamiento con los agentes senolíticos proporcionados en esta divulgación. Normalmente, un líquido claro entra y sale de la parte frontal del ojo, conocida como cámara anterior. En individuos que tienen glaucoma abierto/de ángulo amplio, el líquido transparente drena demasiado lentamente, conduciendo a un aumento de la presión dentro del ojo. Si no se trata, la alta presión en el ojo puede dañar posteriormente el nervio óptico y puede conducir a ceguera total. La pérdida de visión periférica está provocada por la muerte de las células ganglionares de la retina.

Los posibles beneficios de la terapia incluyen una reducción de la presión intraocular, un mejor drenaje del líquido ocular a través de la red trabecular y una inhibición o retraso de la pérdida de visión resultante. El agente senolítico puede administrarse en o alrededor del ojo, por ejemplo, mediante inyección intraocular o intracameral o en una formulación tópica. El efecto de la terapia puede monitorizarse mediante perimetría automatizada, gonioscopia, tecnología de obtención de imágenes, tomografía láser de barrido, HRT3, polarimetría láser, GDX, tomografía de coherencia ocular, oftalmoscopia y mediciones con paquímetro que determinan el grosor de la córnea central.

Tratamiento de afecciones pulmonares

Cualquiera de los inhibidores de Bcl enumerados en esta divulgación puede desarrollarse para tratar enfermedades pulmonares de acuerdo con esta divulgación. De manera similar, los inhibidores de Bcl enumerados en esta divulgación pueden desarrollarse para eliminar selectivamente células senescentes en o alrededor de un pulmón de un sujeto que lo necesite. Las afecciones pulmonares que pueden tratarse incluyen fibrosis pulmonar idiopática (FPI), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), asma, fibrosis quística, bronquiectasia y enfisema.

La EPOC es una enfermedad pulmonar definida por un flujo de aire persistentemente deficiente resultante de la degradación del tejido pulmonar, el enfisema y disfunción de las vías respiratorias pequeñas, bronquiolitis obstructiva. Los síntomas primarios de la EPOC incluyen dificultad para respirar, sibilancias, opresión en el pecho, tos crónica y producción de esputos en exceso. La elastasa de los neutrófilos y macrófagos activados por el humo de los cigarrillos puede desintegrar la matriz extracelular de las estructuras alveolares, dando como resultado el agrandamiento de los espacios aéreos y pérdida de la capacidad respiratoria. La EPOC puede estar provocada, por ejemplo, por el humo del tabaco, el humo de los cigarrillos, el humo de los cigarros, el tabaquismo pasivo, el humo de pipas, exposición ocupacional, exposición al polvo, humo, vapores y contaminación, que producen durante décadas, lo que implica de ese modo que el envejecimiento es un factor de riesgo para el desarrollo de EPOC.

Los procesos que provocan daño pulmonar incluyen, por ejemplo, estrés oxidativo producido por las altas concentraciones de radicales libres en el humo del tabaco, la liberación de citocinas debido a la respuesta inflamatoria a los irritantes en las vías respiratorias y la alteración de las enzimas antiproteasas por el humo del tabaco y los radicales libres, lo que permite que las proteasas dañen los pulmones. La susceptibilidad genética también puede contribuir a la enfermedad. En aproximadamente el 1 % de las personas con EPOC, la enfermedad es el resultado de un trastorno genético que provoca un bajo nivel de producción de alfa-1-antitripsina en el hígado. La alfa-1-antitripsina normalmente se secreta en el torrente sanguíneo para ayudar a proteger los pulmones.

La fibrosis pulmonar es una enfermedad pulmonar crónica y progresiva caracterizada por endurecimiento y cicatrización del pulmón, lo que puede conducir a insuficiencia respiratoria, cáncer de pulmón e insuficiencia cardíaca. La fibrosis se asocia con la reparación del epitelio. Los fibroblastos se activan, aumenta la producción de proteínas de la matriz extracelular y la transdiferenciación a miofibroblastos contráctiles contribuye a la contracción de la herida. Una matriz provisional tapa el epitelio lesionado y proporciona un andamio para la migración de células epiteliales, lo que implica una transición epitelial-mesenquimatosa (EMT). La pérdida de sangre asociada con la lesión epitelial induce la activación plaquetaria, la producción de factores de crecimiento y una respuesta inflamatoria aguda. Normalmente, la barrera epitelial se cura y la respuesta inflamatoria se resuelve. Sin embargo, en la enfermedad fibrótica, la respuesta de fibroblastos continúa, dando como resultado una cicatrización de heridas no resuelta. La formación de focos fibroblásticos es una característica de la enfermedad, que refleja ubicaciones de fibrogénesis en curso.

Los sujetos en riesgo de desarrollar fibrosis pulmonar incluyen, por ejemplo, sujetos que han estado expuestos a contaminantes ambientales u ocupacionales, tales como asbestosis y silicosis; los que fuman cigarrillos; los que padecen enfermedades del tejido conjuntivo tales como AR, LES, esclerodermia, sarcoidosis o granulomatosis

de Wegener; los que tienen infecciones; los que toman ciertos medicamentos, incluidos, por ejemplo, amiodarona, bleomicina, busulfán, metotrexato y nitrofurantoína; los sujetos a radioterapia en el pecho; y aquellos cuyo familiar tenga fibrosis pulmonar.

- 5 Otras afecciones pulmonares que pueden tratarse usando un compuesto según esta afección incluyen enfisema, asma, bronquiectasia y fibrosis quística. Las enfermedades pulmonares también pueden verse exacerbadas por el humo del tabaco, la exposición ocupacional a polvo, humo o vapores, infecciones o contaminantes que contribuyen a la inflamación.
- 10 Los síntomas de la enfermedad pulmonar pueden incluir dificultad para respirar, sibilancias, opresión en el pecho, la necesidad de aclarar la garganta a primera hora de la mañana debido al exceso de moco en los pulmones, tos crónica que produce esputo que puede ser claro, blanco, amarillo o verdoso, cianosis, infecciones respiratorias frecuentes, falta de energía y pérdida de peso involuntaria. Los síntomas de la fibrosis pulmonar pueden incluir dificultad para respirar, especialmente durante el ejercicio; tos seca y persistente; respiración
- 15 rápida y superficial; pérdida de peso gradual e involuntaria; fatiga; dolor en articulaciones y músculos; y dedos de las manos o de los pies en palillo de tambor.

La función pulmonar antes, durante y después del tratamiento puede determinarse, por ejemplo, midiendo el volumen de reserva espiratorio (ERV), la capacidad vital forzada (FVC), el volumen espiratorio forzado (FEV), la capacidad pulmonar total (TLC), la capacidad vital (VC), el volumen residual (RV) y la capacidad residual funcional (FRC). El intercambio de gases a través de la membrana capilar alveolar puede medirse usando la capacidad de difusión de monóxido de carbono (DLCO). La capacidad de ejercicio puede medirse como una aproximación. También puede medirse la saturación de oxígeno capilar periférica (SpO₂): los niveles normales de oxígeno están normalmente entre el 95 % y el 100 %. Un nivel de SpO₂ por debajo del 90 % sugiere que el

20 sujeto tiene hipoxemia. Valores por debajo del 80 % se consideran críticos y requieren intervención para mantener la función cerebral y cardíaca y evitar un paro cardíaco o respiratorio.

25

Los beneficios del tratamiento pueden incluir inhibir la progresión o revertir cualquiera de estos efectos. La administración del agente senolítico puede ser sistémica o local en un sitio en o alrededor del pulmón: por ejemplo, mediante inhalación como un aerosol o polvo, o mediante intubación. De manera óptima, el agente mejorará el nivel de SpO₂ y la capacidad de ejercicio.

30

Tratamiento de la aterosclerosis

- 35 Pueden usarse compuestos senolíticos para el tratamiento de la aterosclerosis: por ejemplo, inhibiendo la formación, el agrandamiento o la progresión de placas ateroscleróticas en un sujeto. Los compuestos senolíticos también pueden usarse para mejorar la estabilidad de las placas ateroscleróticas que están presentes en uno o más vasos sanguíneos de un sujeto, inhibiendo de ese modo su ruptura y oclusión de los vasos.
- 40 La aterosclerosis se caracteriza por placas de la íntima en parches, ateromas, que invaden la luz de las arterias de tamaño mediano y grande; las placas contienen lípidos, células inflamatorias, células de músculo liso y tejido conjuntivo. La aterosclerosis puede afectar a arterias de tamaño grande y mediano, incluidas las arterias coronaria, carótida y cerebral, la aorta y ramas de la misma, y las arterias principales de las extremidades.
- 45 La aterosclerosis puede conducir a un aumento del grosor de la pared arterial. Los síntomas se desarrollan cuando el crecimiento o la rotura de la placa reduce u obstruye el flujo sanguíneo; y los síntomas pueden variar dependiendo de la arteria que se ve afectada. Las placas ateroscleróticas pueden ser estables o inestables. Las placas estables retroceden, permanecen estáticas o crecen lentamente, a veces durante varias décadas, hasta que pueden provocar estenosis u oclusión. Las placas inestables son vulnerables a la erosión, fisura o rotura
- 50 espontánea, provocando trombosis aguda, oclusión e infarto mucho antes de provocar estenosis hemodinámicamente significativa. Los eventos clínicos pueden resultar de placas inestables, que no parecen graves en la angiografía; por tanto, la estabilización de las placas puede ser una forma de reducir la morbilidad y la mortalidad. La rotura o erosión de las placas puede conducir a eventos cardiovasculares importantes tales como síndrome coronario agudo y accidente cerebrovascular. Las placas rotas pueden tener un mayor contenido
- 55 de lípidos, macrófagos y tener una capa fibrosa más delgada que las placas intactas.

El diagnóstico de la aterosclerosis y otras enfermedades cardiovasculares puede basarse en síntomas, por ejemplo, angina de pecho, presión en el pecho, entumecimiento o debilidad en brazos o piernas, dificultad para hablar o habla farfullante, músculos caídos de la cara, dolor en las piernas, tensión arterial alta, insuficiencia renal y/o disfunción eréctil, historial médico y/o examen físico de un paciente. El diagnóstico puede confirmarse mediante angiografía, ecografía u otras pruebas de obtención de imágenes. Los sujetos en riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular incluyen aquellos que tienen uno o más factores predisponentes, tales como antecedentes familiares de enfermedad cardiovascular y aquellos que tienen otros factores de riesgo, por ejemplo, factores predisponentes incluidos tensión arterial alta, dislipidemia, colesterol alto, diabetes, obesidad y

60 tabaquismo, sedentarismo e hipertensión. La afección puede evaluarse, por ejemplo, mediante angiografía, electrocardiografía o prueba de esfuerzo.

65

Los posibles beneficios del tratamiento con un agente senolítico incluyen aliviar o detener la progresión de uno o más signos o síntomas de la afección, tales como la frecuencia de las placas, el área de superficie de los vasos cubierta por placas, angina de pecho y tolerancia reducida al ejercicio.

5
Definiciones

10
15
Generalmente se cree que una “célula senescente” se deriva de un tipo de célula que normalmente se replica, pero que, como resultado del envejecimiento u otro evento que provoca un cambio en el estado de la célula, ya no puede replicarse. Dependiendo del contexto, puede identificarse que las células senescentes expresan p16, o al menos un marcador seleccionado de p16, β-galactosidasa asociada a senescencia y lipofuscina; a veces dos o más de estos marcadores, y otros marcadores del perfil secretor asociado a senescencia (SASP), tales como, pero sin limitarse a, interleucina 6 y proteínas inflamatorias, angiogénicas y modificadoras de la matriz extracelular. A menos que se indique explícitamente lo contrario, las células senescentes a las que se hace referencia en las reivindicaciones no incluyen células cancerosas.

20
25
Una enfermedad, trastorno o afección “asociada a senescencia”, “relacionada con senescencia” o “relacionada con la edad” es una afección fisiológica que se presenta con uno o más síntomas o signos que son adversos para el sujeto. La afección está “asociada a senescencia” si está “provocada o mediada al menos en parte por células senescentes”. Esto significa que al menos un componente del SASP en o alrededor del tejido afectado desempeña un papel en la fisiopatología de la afección, de manera que la eliminación de al menos algunas de las células senescentes en el tejido afectado da como resultado un alivio o una disminución sustancial de los síntomas o signos adversos, en beneficio del paciente. Los trastornos asociados a senescencia que potencialmente pueden tratarse o gestionarse usando los métodos y productos según esta divulgación incluyen trastornos a los que se hace referencia en esta divulgación y en divulgaciones anteriores a las que se hace referencia en la discusión. A menos que se indique explícitamente lo contrario, el término no incluye cáncer.

30
35
Un inhibidor de la función proteica o función de Bcl es un compuesto que, en un grado sustancial, impide que la proteína diana ya expresada en una célula diana realice una función enzimática, de unión o reguladora que la proteína o el miembro de la familia Bcl normalmente realiza en la célula diana. Esto da como resultado la eliminación de la célula diana o hacer que la célula sea más susceptible a la toxicidad de otro compuesto o evento. Un compuesto califica como “inhibidor de Bcl” o un compuesto que “inhibe la actividad de Bcl” en esta divulgación si tiene una CI_{50} cuando se somete a prueba en un ensayo según el ejemplo 1 a continuación que es inferior a 1.000 nM (1,0 μM). A menudo se prefiere una actividad que es inferior a 100 nM o 10 nM, o entre 100 nM y 1 nM, dependiendo del contexto.

40
45
El término “Bcl” o “proteína Bcl” se refiere a la familia de proteínas Bcl, ejemplificadas por Bcl-2, Bcl-xL y Bcl-w. Un inhibidor de Bcl de esta divulgación será capaz de inhibir al menos una de Bcl-2, Bcl-xL y Bcl-w. Normalmente, pero no necesariamente, un inhibidor de una de estas proteínas Bcl inhibirá en algún grado las otras dos. Los compuestos proporcionados en esta divulgación pueden someterse a prueba para determinar la actividad de cualquier miembro de la familia Bcl, para identificar compuestos que tienen actividad inhibitora y son potencialmente específicos para Bcl-2, Bcl-xL o Bcl-w. Un inhibidor de este tipo tendrá una CI_{50} para una Bcl diana de esta lista que es al menos 10 veces mejor que su CI_{50} para los otros dos miembros de la familia Bcl en la lista.

50
55
Un compuesto, composición o agente normalmente se denomina “senolítico” si elimina células senescentes, preferentemente células replicativas del mismo tipo de tejido, o células quiescentes que carecen de marcadores de SASP. Alternativamente o además, puede usarse eficazmente un compuesto o combinación si disminuye la liberación de factores o mediadores patológicos solubles como parte del fenotipo secretor asociado a senescencia que desempeñan un papel en la presentación inicial o la patología en curso de una afección, o inhiben su resolución. A este respecto, el término “senolítico” se refiere a la inhibición funcional, de modo que los compuestos que funcionan principalmente inhibiendo en lugar de eliminando las células senescentes (inhibidores de células senescentes) pueden usarse de manera similar con los consiguientes beneficios. Las composiciones y agentes senolíticos modelo en esta divulgación tienen una CE_{50} cuando se someten a prueba en un ensayo según el ejemplo 2 a continuación que es inferior a 1 μM. Puede preferirse una actividad que es inferior a 0,1 μM, o entre 1 μM y 0,1 μM. El índice de selectividad (SI) (CE_{50} de células senescentes en comparación con células no senescentes del mismo tipo de tejido) puede ser mejor de 1, 2, 5 o 10, dependiendo del contexto.

60
La retirada o “eliminación” selectiva de células senescentes de una población celular mixta o tejido no requiere que se eliminen todas las células que presentan un fenotipo de senescencia: sólo que la proporción de células senescentes inicialmente en el tejido que permanecen después del tratamiento sea sustancialmente mayor que la proporción de células no senescentes inicialmente en el tejido que quedan después del tratamiento.

65
El “tratamiento” exitoso de una afección según esta divulgación puede tener cualquier efecto que sea beneficioso para el sujeto que está tratándose. Esto incluye la disminución de la gravedad, la duración o la progresión de una afección, o de cualquier signo o síntoma adverso que resulte de la misma. El tratamiento también puede no tener

éxito y no dar como resultado ninguna mejora en los signos y síntomas típicos de la afección. Un objetivo concurrente de la terapia es minimizar los efectos adversos en el tejido diana o en cualquier otra parte del sujeto tratado. En algunas circunstancias, también pueden usarse agentes senolíticos para prevenir o inhibir la presentación de una afección para la que un sujeto es susceptible, por ejemplo, debido a una susceptibilidad heredada o debido a un historial médico.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" es una cantidad de un compuesto de la presente divulgación que (i) trata la enfermedad, afección o trastorno particular, (ii) atenúa, mejora o elimina uno o más síntomas de la enfermedad, afección o trastorno particular, (iii) previene o retrasa la aparición de uno o más síntomas de la enfermedad, afección o trastorno particular descrito en el presente documento, (iv) previene o retrasa la progresión de la enfermedad, afección o trastorno particular, o (v) revierte al menos parcialmente el daño provocado por la afección antes del tratamiento.

Una forma "fosforilada" de un compuesto es un compuesto que lleva uno o más grupos fosfato unidos covalentemente a la estructura central a través de un átomo de oxígeno, que normalmente, pero no necesariamente, estaba presente en la molécula antes de la fosforilación. Por ejemplo, uno o más grupos -OH o -COOH pueden haberse sustituido en lugar del hidrógeno con un grupo fosfato que es o bien -OPO₃H₂ o bien -C_nPO₃H₂ (donde n es de 1 a 4). En algunas formas fosforiladas, el grupo fosfato puede eliminarse *in vivo* (por ejemplo, mediante enzimólisis), en cuyo caso la forma fosforilada puede ser un profármaco de la forma no fosforilada. Una forma no fosforilada no tiene tal grupo fosfato. Una forma desfosforilada es un derivado de una molécula fosforilada después de que se ha eliminado al menos un grupo fosfato.

Los inhibidores de Bcl de "molécula pequeña" según esta divulgación tienen pesos moleculares inferiores a 20.000 daltons y, a menudo, son inferiores a 10.000, 5.000 o 2.000 daltons. Los inhibidores de molécula pequeña no son moléculas de anticuerpos ni oligonucleótidos y normalmente no tienen más de cinco donadores de enlaces de hidrógeno (el número total de enlaces nitrógeno-hidrógeno y oxígeno-hidrógeno) y no más de 10 aceptores de enlaces de hidrógeno (todos átomos de nitrógeno u oxígeno).

"Profármaco" se refiere a un derivado de un agente activo que requiere una transformación dentro del cuerpo para liberar el agente activo. La transformación puede ser una transformación enzimática. A veces, la transformación es una transformación de ciclación, o una combinación de una transformación enzimática y una transformación de ciclación. Los profármacos son frecuentemente, aunque no necesariamente, inactivos farmacológicamente hasta que se convierten en el agente activo.

A menos que se indique o requiera lo contrario, cada una de las estructuras de compuestos a las que se hace referencia en la divulgación incluye ácidos y bases conjugados que tienen la misma estructura, formas cristalinas y amorfas de esos compuestos, sales farmacéuticamente aceptables y profármacos. Esto incluye, por ejemplo, polimorfos, solvatos, hidratos, polimorfos no solvatados (incluidos anhidratos) y formas fosforiladas y no fosforiladas de los compuestos.

Ejemplos

Ejemplo 1: Medición de la inhibición de Bcl

La capacidad de los compuestos candidatos para inhibir la actividad de Bcl-2 y Bcl-xL puede medirse a nivel molecular mediante unión directa. Este ensayo usa una tecnología de ensayo homogénea basada en la canalización de oxígeno comercializada por PerkinElmer Inc., Waltham, Massachusetts: véase Eglin *et al.*, Current Chemical Genomics, 2008, 1, 2-10. El compuesto de prueba se combina con la proteína Bcl diana y un péptido que representa el ligando afín correspondiente, marcado con biotina. La mezcla se combina entonces con perlas donadoras luminiscentes que llevan estreptavidina y perlas aceptoras luminiscentes, lo que reduce proporcionalmente la luminiscencia si el compuesto ha inhibido la unión del péptido a la proteína Bcl. Bcl-2, Bcl-xL y Bcl-w están disponibles de Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Missouri. Se describen péptido BIM (ligando para Bcl-2) y péptido BAD (ligando para Bcl-xL) biotinilados en el documento US 2016/0038503 A1. Están disponibles perlas donadoras de estreptavidina AlphaScreen® y perlas aceptoras anti-6XHis AlphaLISA® de PerkinElmer.

Para realizar el ensayo, se prepara una serie de dilución 1:4 del compuesto en DMSO, y luego se diluye 1:100 en tampón de ensayo. En una placa de PCR de 96 pocillos, se combina lo siguiente en orden: 10 µl de péptido (BIM 120 nM o BIM 60 nM), 10 µl de compuesto de prueba y 10 µl de proteína Bcl (Bcl-2/W 0,8 nM o Bcl-xL 0,4 nM). La placa de ensayo se incuba en la oscuridad a temperatura ambiente durante 24 h. El día siguiente, se combinan perlas donadoras y perlas aceptoras, y se añaden 5 µl a cada pocillo. Después de incubar en la oscuridad durante 30 minutos, se mide la luminiscencia usando un lector de placas, y se determina la afinidad o el grado de inhibición por cada compuesto de prueba.

Ejemplo 2: Medición de la actividad senolítica en fibroblastos

Pueden obtenerse células de fibroblastos humanos IMR90 de la Colección americana de cultivos tipo (ATCC®)

con la designación CCL-186. Las células se mantienen a <75 % de confluencia en DMEM que contiene FBS y pen./estrep. en una atmósfera del 3 % de O₂, el 10 % de CO₂ y -95 % de humedad. Las células se dividen en grupos: células irradiadas (cultivadas durante 14 días después de la irradiación antes de su uso) y células quiescentes (cultivadas a alta densidad durante cuatro días antes de su uso).

5 El día 0, las células irradiadas se preparan tal como sigue. Se lavan las células IMR90, se colocan en frascos T175 a una densidad de 50.000 células por ml y se irradian a 10-15 Gy. Tras la irradiación, las células se siembran en placas de 96 pocillos a 100 µl. Los días 1, 3, 6, 10 y 13, se aspira el medio en cada pocillo y se reemplaza con medio nuevo.

10 El día 10, las células sanas quiescentes se preparan tal como sigue. Se lavan las células IMR90, se combinan con 3 ml de reactivo que contiene tripsina TrypLE (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts) y se cultivan durante 5 min hasta que las células han redondeado y comienzan a desprenderse de la placa. Las células se dispersan, se cuentan y se preparan en medio a una concentración de 50.000 células por ml. Se siembran 100 µl de las células en cada pocillo de una placa de 96 pocillos. Se cambia el medio el día 13. El día 14, se combinan compuestos inhibidores de prueba con las células tal como sigue. Se prepara una serie de dilución en DMSO de cada compuesto de prueba a 200 veces la concentración deseada final en una placa de PCR de 96 pocillos. Inmediatamente antes de su uso, las disoluciones madre en DMSO se diluyen 1:200 en medio completo precalentado. Se aspira el medio de las células en cada pocillo, y se añaden 100 µl/pocillo del medio que contiene compuestos.

25 Los agentes senolíticos candidatos para las pruebas se cultivan con las células durante 6 días, reemplazando el medio de cultivo con medio nuevo y la misma concentración de compuesto el día 17. Los inhibidores de Bcl 2 se cultivan con las células durante 3 días. El sistema de ensayo usa las propiedades de una luciferasa termoestable para permitir condiciones de reacción que generan una señal luminiscente estable al tiempo que inhiben simultáneamente la ATPasa endógena liberada durante la lisis celular. Al final del periodo de cultivo, se añaden 100 µl de reactivo CellTiter-Glo® (Promega Corp., Madison, Wisconsin) a cada uno de los pocillos. Las placas de células se colocan durante 30 segundos sobre un agitador orbital y se mide la luminiscencia.

30 Ejemplo 3: Medición de la actividad senolítica en células HUVEC y otras células senescentes

35 Se expandieron células de vena umbilical humana (HUVEC) de un solo lote en medios basales de células vasculares complementados con el kit de crecimiento de células endoteliales™-VEGF de la ATCC hasta aproximadamente ocho duplicaciones de la población y luego se crioconservaron. Nueve días antes del inicio del ensayo, las células de la población senescente se descongelaron y se sembraron a aproximadamente 27.000/cm². Todas las células se cultivaron en incubadoras humidificadas con el 5 % de CO₂ y el 3 % O₂ y los medios se cambiaron cada 48 horas. Dos días después de la siembra, las células se irradian, administrando 12 Gy de radiación desde una fuente de rayos X. Tres días antes del inicio del ensayo, las células de las poblaciones no senescentes se descongelan y se sembraron como para la población senescente. Un día antes del ensayo, todas las células se tripsinizaron y se sembraron en placas de 384 pocillos, 5.000 células senescentes/pocillo y 10.000 células no senescentes/pocillo en placas separadas en un volumen final de 55 µl/pocillo. En cada placa, los 308 pocillos centrales contenían células y el perímetro exterior de los pocillos se llenó con 70 µl/pocillo de agua desionizada.

45 El día del ensayo, los compuestos se diluyeron a partir de disoluciones madre de 10 mM en medios para proporcionar la disolución madre de trabajo con la concentración más alta, y de la cual se diluyeron luego adicionalmente alícuotas en medios para proporcionar las dos disoluciones madre de trabajo restantes. Para iniciar el ensayo, se añadieron 5 µl de la disolución madre de trabajo a las placas de células. Las concentraciones de prueba finales fueron 20, 2 y 0,2 µM. En cada placa, se sometieron a ensayo 100 compuestos de prueba por triplicado a una única concentración junto con tres pocillos de un control positivo y cinco controles sin tratamiento (DMSO). Después de la adición del compuesto, las placas se devuelven a las incubadoras durante tres días.

55 La supervivencia celular se evaluó indirectamente midiendo la concentración total de ATP usando el reactivo CellTiter-Glo™ (Promega). La luminiscencia resultante se cuantificó usando un lector de placas EnSpire™ (Perkin Elmer). La viabilidad celular relativa para cada concentración de un compuesto se calculó como un porcentaje en relación con los controles sin tratamiento para la misma placa.

60 Para las respuestas a las dosis de seguimiento de posibles compuestos principales, se prepararon placas de 384 pocillos de células senescentes y no senescentes tal como se describió anteriormente. Los compuestos se prepararon como una serie de dilución 1:3 de 10 puntos en DMSO y luego se diluyeron hasta 12X en medio. Entonces se añadieron cinco microlitros de esta disolución madre de trabajo a las placas de células. Después de tres días de incubación, se calculó la supervivencia celular en relación con el control de DMSO tal como se describió anteriormente. Todas las mediciones se realizaron por cuadruplicado.

65

5 Como alternativa a fibroblastos IMR90 o células HUVEC pueden usarse otras líneas celulares y cultivos celulares primarios que están en consonancia con el tejido diana previsto *in vivo*. Un ejemplo es el uso de células endoteliales microvasculares de la retina humana (HRMEC) cultivadas para examinar compuestos destinados al tratamiento de enfermedades oculares. Las células se cultivan según protocolos conocidos para la línea celular elegida y se irradian de manera similar para volverlas senescentes.

Ejemplo 4: Eficacia de agentes senolíticos en un modelo de osteoartritis

10 Este ejemplo ilustra las pruebas de un inhibidor de MDM2 en un modelo de ratón para el tratamiento de la osteoartritis. Puede adaptarse cambiando lo que corresponda para someter a prueba y desarrollar inhibidores de Bcl para su uso en terapia clínica.

15 El modelo se implementó tal como sigue. Se sometieron ratones C57BL/6J a cirugía para cortar el ligamento cruzado anterior de una extremidad trasera para inducir osteoartritis en la articulación de esa extremidad. Durante la semana 3 y la semana 4 después de la cirugía, los ratones se trataron con 5,8 µg de Nutlin-3A (n=7) por rodilla operada mediante inyección intraarticular, cada dos días durante 2 semanas. Al final de las 4 semanas posteriores a la cirugía, se monitorizaron las articulaciones de los ratones para detectar la presencia de células senescentes, se evaluó su función, se monitorizaron los marcadores de inflamación y se sometieron a evaluación histológica.

20 En los estudios realizados se incluyeron dos grupos de control de ratones: un grupo que comprendía ratones C57BL/6J o 3MR que se habían sometido a una cirugía simulada (n = 3) (es decir, se siguieron los procedimientos quirúrgicos excepto el corte del LCA) e inyecciones intraarticulares de vehículo en paralelo al grupo tratado con GCV (ganciclovir); y un grupo que comprendía ratones C57BL/6J o 3MR que se habían sometido a una cirugía del LCA y recibieron inyecciones intraarticulares de vehículo (n=5) en paralelo al grupo tratado con GCV. Se analizó el ARN de las articulaciones operadas de los ratones tratados con Nutlin-3A para detectar la expresión de factores de SASP (mmp3, IL-6) y marcadores de senescencia (p16). Se realizó qRT-PCR para detectar los niveles de ARNm.

30 Las figuras 2A, 2B y 2C muestran la expresión de p16, IL-6 y MMP13 en el tejido, respectivamente. La cirugía inductora de OA estaba asociada con una expresión aumentada de estos marcadores. El tratamiento con Nutlin-3A redujo la expresión hasta que se encuentra de nuevo por debajo del nivel de los controles. El tratamiento con Nutlin-3A eliminó las células senescentes de la articulación.

35 La función de las extremidades se evaluó 4 semanas después de la cirugía mediante una prueba de carga de peso para determinar qué pata preferían los ratones. Se permitió que los ratones se aclimataran a la cámara al menos tres veces antes de tomar las mediciones. Se maniobró a los ratones dentro de la cámara para que se pararan con una pata trasera sobre cada balanza. El peso que se colocó sobre cada extremidad trasera se midió durante un período de tres segundos. Se realizaron al menos tres mediciones separadas para cada animal en cada punto de tiempo. Los resultados se expresaron como el porcentaje del peso colocado sobre la extremidad operada frente a la extremidad contralateral no operada.

45 La figura 3A muestra los resultados del estudio funcional. Los ratones no tratados que se sometieron a cirugía inductora de osteoartritis prefirieron la extremidad trasera no operada con respecto a la extremidad trasera operada (Δ). Sin embargo, la eliminación de las células senescentes con Nutlin-3A anuló este efecto en ratones sometidos a cirugía (V).

50 Las figuras 3B, 3C y 3D muestran la histopatología del tejido articular de estos experimentos. La osteoartritis inducida por cirugía del LCA provocó que se destruyera la capa de proteoglicanos. La eliminación de células senescentes usando Nutlin-3A anuló por completo este efecto.

Ejemplo 5: Eficacia de agentes senolíticos en modelos de retinopatía diabética

55 Este ejemplo ilustra las pruebas de un inhibidor de Bcl en un modelo de ratón para el tratamiento de una enfermedad de la parte posterior del ojo, específicamente retinopatía diabética. Puede adaptarse cambiando lo que corresponda para someter a prueba agentes senolíticos para su uso en terapia clínica.

60 La eficacia del compuesto modelo UBX1967 (un inhibidor de Bcl-xL) se estudió en el modelo de retinopatía inducida por oxígeno (OIR) de ratón (Scott y Fruttiger, *Eye* (2010) 24, 416-421, Oubaha *et al.*, 2016). Se expusieron crías de ratón C57Bl/6 y sus madres adoptivas CD1 a un entorno con alto contenido de oxígeno (75 % de O₂) desde el día posnatal 7 (P7) hasta P12. En P12, a los animales se les inyectó por vía intravítrea 1 µl del compuesto de prueba (200, 20 o 2 µM) formulado en el 1 % de DMSO, el 10 % de Tween-80, el 20 % de PEG-400 y se devolvieron al aire ambiente hasta P17. Los ojos se enuclearon en P17 y las retinas se diseccionaron para o bien tinción vascular o bien qRT-PCR. Para determinar el área avascular o neovascular, las retinas se montaron planas y se tiñeron con isolectina B4 (IB4) diluida 1:100 en CaCl₂ 1 mM. Para la medición cuantitativa de marcadores de senescencia (por ejemplo, *Cdkn2a*, *Cdkn1a*, *Il6*, *Vegfa*), se realizó qPCR. Se aisló

ARN y se generó ADNc mediante transcripción inversa, que se usó para qRT-PCR de los transcritos seleccionados.

5 Las figuras 4A y 4B muestran que la administración intravítrea (ITT) de UBX1967 dio como resultado una mejora estadísticamente significativa en el grado de neovascularización y obstrucción de vasos en todos los niveles de dosis.

10 La eficacia de UBX1967 también se estudió en el modelo de estreptozotocina (STZ). Se pesaron ratones C57BL/6J de 6 a 7 semanas y se midió su glucemia basal (Accu-Chek™, Roche). A los ratones se les inyectó por vía intraperitoneal STZ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) durante 5 días consecutivos a 55 mg/kg. A los controles de la misma edad se les inyectó únicamente tampón. La glucemia se midió nuevamente una semana después de la última inyección de STZ y los ratones se consideraron diabéticos si su glucemia sin ayunas era superior a 17 mM (300 mg/l). A ratones diabéticos C57BL/6J tratados con STZ se les inyectó por vía intravítrea 1 µl de UBX1967 (2 µM o 20 µM, formulado como una suspensión en polisorbato-80 al 0,015 %, fosfato de sodio al 0,2 %, cloruro de sodio al 0,75 %, pH 7,2) a las 8 y 9 semanas después de la administración de STZ. Se realizó un ensayo de permeación retiniana del azul de Evans 10 semanas después del tratamiento con STZ.

20 Las figuras 4C y 4D muestran resultados para este protocolo. La fuga vascular retiniana y coroidea después de la administración intravítrea (IVT) de UBX1967 mejoró la permeabilidad vascular en ambos niveles de dosis.

25 Pueden usarse otros modelos de daño de las células ganglionares de la retina en pruebas que son relevantes para el glaucoma, donde se cree que el aumento de la presión intraocular (PIO) provoca pérdida de células ganglionares de la retina y daño del nervio óptico. En especies preclínicas, el aumento de la presión de la cámara anterior puede dar como resultado la pérdida de neuronas de la retina, como se notifica en varios modelos establecidos, incluida la oclusión con microperlas magnéticas (Ito *et al.*, *Vis Exp.* 2016 (109): 53731) y otros modelos de glaucoma (Almasieh y Levin, *Annu Rev Vis Sci.* 2017). Además, se ha demostrado que la isquemia-reperfusión provoca lesión de la retina que puede dar como resultado senescencia celular. La presencia de senescencia de la retina en tales modelos puede usarse para monitorizar el impacto de la senólisis después de la inyección intravítrea de los compuestos de prueba.

30 Ejemplo 6: Eficacia de agentes senolíticos en un modelo de enfermedad pulmonar

35 Este ejemplo ilustra las pruebas de inhibidores en un modelo de ratón para el tratamiento de enfermedades pulmonares: específicamente, un modelo para fibrosis pulmonar idiopática (FPI). Puede adaptarse cambiando lo que corresponda para someter a prueba y desarrollar inhibidores de Bcl para su uso en terapia clínica. Como modelo para la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), se expuso a ratones al humo de cigarrillos.

40 El efecto de un agente senolítico sobre los ratones expuestos al humo se evalúa mediante la eliminación de células senescentes, la función pulmonar y la histopatología.

45 Los ratones usados en este estudio incluyen la raza 3MR, descrita en el documento US 2017/0027139 A1 y en Demaria *et al.*, *Dev Cell.* 22 de diciembre de 2014; 31(6): 722-733. El ratón 3MR tiene un transgén que codifica para la timidina cinasa que convierte el profármaco ganciclovir (GCV) en un compuesto letal para las células. La enzima en el transgén se coloca bajo el control del promotor p16, lo que hace que se exprese específicamente en células senescentes. El tratamiento de los ratones con GCV elimina las células senescentes.

50 Otros ratones usados en este estudio incluyen la raza INK-ATTAC, descrita en el documento US 2015/0296755 A1 y en Baker *et al.*, *Nature* 2 de noviembre de 2011; 479 (7372): 232-236. El ratón INK-ATTAC tiene un transgén que codifica para la caspasa 8 conmutable bajo el control del promotor p16. La caspasa 8 puede activarse tratando a los ratones con el compuesto interruptor AP20187, tras lo cual la caspasa 8 induce directamente la apoptosis en células senescentes, eliminándolas del ratón.

55 Para realizar el experimento, ratones 3MR (n=35) o INK-ATTAC (n=35) de seis semanas de edad se expusieron de manera crónica al humo de cigarrillos generado por un sistema Teague TE-10, una máquina de fumar de cigarrillos controlada automáticamente que produce una combinación de humo de cigarrillos secundario y principal en una cámara, que se transporta a una cámara de recogida y mezclado donde se mezclan cantidades variables de aire con la mezcla de humo. El protocolo de EPOC se adaptó de las instalaciones centrales de EPOC de la Universidad Johns Hopkins (Rangasamy *et al.*, 2004, *J. Clin. Invest.* 114:1248-1259; Yao *et al.*, 2012, *J. Clin. Invest.* 122:2032-2045).

60 Los ratones recibieron un total de 6 horas de exposición al humo de cigarrillos al día, 5 días a la semana durante 6 meses. Se dieron caladas de cada cigarrillo encendido (cigarrillos de investigación 3R4F que contienen 10,9 mg de materia particulada total (TPM), 9,4 mg de alquitrán y 0,726 mg de nicotina y 11,9 mg de monóxido de carbono por cigarrillo [Universidad de Kentucky, Lexington, KY]) durante 2 segundos y una vez cada minuto para un total de 8 caladas, con una velocidad de flujo de 1,05 l/min, para proporcionar una calada convencional de 35 cm³. La máquina de humo se ajustó para producir una mezcla de humo secundario (89 %) y humo principal

(11 %) al quemar 2 cigarrillos a la vez. Se monitorizó la atmósfera de la cámara de humo para determinar las partículas suspendidas totales (80-120 mg/m³) y el monóxido de carbono (350 ppm).

5 Comenzando el día 7, se trataron (10) ratones INK-ATTAC y (10) 3MR con AP20187 (3 veces por semana) o ganciclovir (5 días consecutivos de tratamiento seguidos de 16 días sin fármaco, repetido hasta el final del experimento), respectivamente. Un número igual de ratones recibió el vehículo correspondiente. Los 30 ratones restantes (15 INK-ATTAC y 15 3MR) se dividieron uniformemente y se colocaron 5 de cada raza genéticamente modificada en tres grupos de tratamiento diferentes. Un grupo (n=10) recibió Nutlin-3A (25 mg/kg disueltos en DMSO al 10 %/Tween-20™ al 3 % en PBS, tratados 14 días consecutivos seguidos de 14 días sin fármaco, repetidos hasta el final del experimento). Un grupo (n=10) recibió ABT-263 (Navitoclax) (100 mg/kg disueltos en DMSO al 15 %/Tween-20 al 5 %, tratados durante 7 días consecutivos seguidos de 14 días sin fármaco, repetido hasta el final del experimento) y el último grupo (n=10) recibió solo el vehículo usado para ABT-263 (DMSO al 15 %/Tween-20 al 5 %), siguiendo el mismo régimen de tratamiento que ABT-263. Otros 70 animales que no recibieron exposición al humo del cigarrillo se usaron como controles para el experimento.

15 Después de dos meses de exposición al humo de cigarrillos (CS), se evaluó la función pulmonar monitorizando la saturación de oxígeno mediante el oxímetro de pulso MouseSTAT PhysioSuite™ (Kent Scientific). Los animales se anestesiaron con isoflurano (1,5 %) y se les aplicó la pinza del dedo. Los ratones se monitorizaron durante 30 segundos y se calculó la medición promedio de la saturación de oxígeno capilar periférica (SpO₂) durante este período.

20 La figura 5 muestra los resultados. La eliminación de células senescentes mediante AP2018, ganciclovir, ABT-263 (Navitoclax) o Nutlin-3A dio como resultado aumentos estadísticamente significativos en los niveles de SpO₂ en ratones después de dos meses de exposición al humo de cigarrillos, en comparación con los controles no tratados.

Ejemplo 7: Eficacia de agentes senolíticos en aterosclerosis cuando se administran sistémicamente

30 Este ejemplo ilustra las pruebas de un inhibidor de MDM2 en un modelo de ratón para el tratamiento de la aterosclerosis. Los compuestos de prueba se administran sistémicamente en lugar de localmente. El modelo se realiza en una raza de ratones LDLR^{-/-}, que son deficientes en el receptor de lipoproteínas de baja densidad. Los experimentos descritos en el presente documento pueden adaptarse cambiando lo que corresponda para someter a prueba y desarrollar otros tipos de inhibidores para su uso en terapia clínica.

35 A dos grupos de ratones LDLR^{-/-} (10 semanas) se les alimenta con una dieta alta en grasas (HFD) (Harlan Teklad TD.88137) que tiene un 42 % de calorías procedentes de grasas, comenzando en la semana 0 y durante todo el estudio. A dos grupos de ratones LDLR^{-/-} (10 semanas) se les alimenta con comida normal (-HFD). Desde las semanas 0-2, un grupo de ratones con HFD y ratones -HFD se tratan con Nutlin-3A (25 mg/kg, por vía intraperitoneal). Un ciclo de tratamiento equivale a 14 días de tratamiento, 14 días de descanso. Se administra vehículo a un grupo de ratones con HFD y a un grupo de ratones -HFD. En la semana 4 (punto de tiempo 1), se sacrifica un grupo de ratones para evaluar la presencia de células senescentes en las placas. Para algunos de los ratones restantes, la administración de Nutlin-3A y el vehículo se repite desde las semanas 4-6. En la semana 8 (punto de tiempo 2), los ratones se sacrifican y se evalúa la presencia de células senescentes en las placas. Los ratones restantes se tratan con Nutlin-3A o vehículo desde las semanas 8-10. En la semana 12 (punto de tiempo 3), los ratones se sacrifican y se evalúa el nivel de placa y el número de células senescentes en las placas.

50 Se midieron los niveles de lípidos en plasma en ratones LDLR^{-/-} alimentados con HFD y tratados con Nutlin-3A o vehículo en el punto de tiempo 1 en comparación con ratones alimentados con -HFD (n = 3 por grupo). Se recogió plasma a media tarde y se analizó para determinar lípidos y lipoproteínas circulantes.

55 Al final del punto de tiempo 1, se sacrificaron los ratones LDLR^{-/-} alimentados con HFD y tratados con Nutlin-3A o vehículo (n=3, todos los grupos) y se diseccionaron los arcos aórticos para el análisis por RT-PCR de factores de SASP y marcadores de células senescentes. Los valores se normalizaron a GAPDH y se expresaron como cambio en veces frente a ratones LDLR^{-/-} tratados con vehículo de la misma edad con una dieta normal. Los datos muestran que la eliminación de células senescentes con Nutlin-3A en ratones LDLR^{-/-} alimentados con HFD redujo la expresión de varios factores de SASP y marcadores de células senescentes, MMP3, MMP13, PAI1, p21, IGFBP2, IL-1A e IL-1B después de un ciclo de tratamiento.

60 Al final del punto de tiempo 2, se sacrificaron ratones LDLR^{-/-} alimentados con HFD y tratados con Nutlin-3A o vehículo (n=3 para todos los grupos), y se diseccionaron los arcos aórticos para el análisis por RT-PCR de factores de SASP y marcadores de células senescentes. Los valores se normalizaron a GAPDH y se expresaron como cambio en veces frente a ratones LDLR^{-/-} tratados con vehículo de la misma edad con una dieta normal. Los datos muestran la expresión de algunos factores de SASP y marcadores de células senescentes en el arco aórtico dentro de ratones con HFD. La eliminación de células senescentes con múltiples ciclos de tratamiento de Nutlin-3A en ratones LDLR^{-/-} alimentados con HFD redujo la expresión de la mayoría de los marcadores.

Al final del punto de tiempo 3, se sacrificaron ratones LDLR^{-/-} alimentados con HFD y tratados con Nutlin-3A o vehículo (n = 3 para todos los grupos), y las aortas se diseccionaron y se tñieron con Sudán IV para detectar la presencia de lípidos. La composición corporal de los ratones se analizó mediante resonancia magnética y contaron las células sanguíneas circulantes mediante Hemavet™.

La figura 6 muestra los resultados. El tratamiento con Nutlin-3A redujo el área de superficie cubierta por placas en la aorta descendente en aproximadamente un 45 %. Los recuentos de plaquetas y linfocitos fueron equivalentes entre los ratones tratados con Nutlin-3A y con vehículo. El tratamiento con Nutlin-3A también disminuyó la masa y la composición de grasa corporal en ratones alimentados con una dieta alta en grasas.

Ejemplo 8: Medición de la citotoxicidad para células cancerosas *in vitro* e *in vivo*

La actividad celular de los compuestos puede evaluarse en la línea celular murina prolinfocítica FL5.12 dependiente de interleucina-3 (IL-3). La retirada de IL-3 induce la apoptosis de FL5.12, mediante la regulación por incremento de los factores proapoptóticos Bim y Puma. La sobreexpresión de Bcl-2 (FL5.12-Bcl-2) o Bcl-xL (FL5.12-Bcl-xL) protege contra los efectos de la retirada de IL-3 mediante el secuestro de Bim y Puma. Los compuestos revierten la protección proporcionada por la sobreexpresión de Bcl-2 o Bcl-xL. Los compuestos son ineficaces para provocar muerte celular en presencia de IL-3 donde las células FL5.12 no están sujetas a estímulos proapoptóticos. La capacidad de los compuestos para destruir células FL5.12-Bcl-2 o FL5.12-Bcl-xL bajo la retirada de IL-3 puede atenuarse en presencia del inhibidor de caspasa ZVAD, lo que indica que la destrucción celular depende de la caspasa.

Pueden realizarse estudios de coimmunoprecipitación para determinar si la citotoxicidad inducida por miméticos de BH3 puede atribuirse a la alteración de las interacciones intracelulares proteína-proteína de la familia Bcl-2. Los compuestos inducen una disminución dependiente de la dosis en las interacciones Bim:Bcl-xL en células FL5.12-Bcl-xL. También se observan resultados similares para la alteración de los complejos Bim:Bcl-2 en células FL5.12-Bcl-2, lo que indica que los compuestos restauran la muerte celular dependiente de IL-3 al atenuar la capacidad de Bcl-xL y Bcl-2 para secuestrar factores proapoptóticos tales como Bim.

Las pruebas de la capacidad de los compuestos enumerados en esta divulgación para destruir específicamente células cancerosas pueden someterse a prueba en ensayos similares usando otras líneas celulares establecidas. Estas incluyen células HeLa, OVCAR-3, LNCaP y cualquiera de las líneas celulares cancerosas autenticadas disponibles de Millipore Sigma, Burlington MA, EE. UU. Los compuestos destruyen específicamente las células cancerosas si son letales para las células en una concentración que es al menos 5 veces más baja, y preferiblemente 25 o 100 veces más baja que una célula no cancerosa del mismo tipo de tejido. La célula de control tiene características morfológicas y marcadores de superficie celular similares a los de la línea celular cancerosa que está sometiéndose a prueba, pero sin signos de cáncer.

In vivo, los compuestos se evalúan en modelos de xenoinjerto en el costado establecidos a partir de líneas celulares SCLC (H889) y hematológicas (RS4;11) sensibles, o usando otras líneas celulares cancerosas formadoras de tumores, según el tipo de cáncer que sea de particular interés para el usuario. Cuando se dosifican por vía oral o intravenosa, los compuestos inducen respuestas tumorales rápidas y completas (CR) que son duraderas durante varias semanas después del final del tratamiento en todos los animales con tumores H889 (SCLC) o RS4;11 (ALL). Un tratamiento similar de ratones portadores de tumores SCLC H146 puede inducir regresiones rápidas en los animales.

Ejemplo 9: Síntesis

Los compuestos de esta invención pueden prepararse usando o adaptando el esquema de síntesis mostrado en la figura 1.

Ejemplo 10: Actividad bioquímica y celular de compuestos modelo.

Se evaluó la inhibición de la unión del ligando a Bcl-2 de los compuestos en un ensayo *in vitro*. Se evaluó la inhibición de la actividad de Bcl-xL de los compuestos en un ensayo de unión directa según el método descrito en el ejemplo 1, un ensayo homogéneo para determinar la inhibición de la unión de un ligando peptídico a las isoformas de Bcl. Los valores de CE₅₀ obtenidos para un compuesto seleccionado se muestran en la TABLA 1.

TABLA 1			
Compuesto	CI50 de Bcl-xL (nM)	CI50 de Bcl-2 (nM)	CI50 de Bcl-w (nM)
RJH01325	0,067	3,089	3,32

Se evaluó la actividad de destrucción de células senescentes de los compuestos en células humanas según el método descrito en los ejemplos 2 y 3. Las líneas celulares eran células epiteliales bronquiales (HBE) humanas, células epiteliales de las vías respiratorias pequeñas (SAE) y células endoteliales microvasculares de la retina

humana (HRMEC). Tales tipos de células están disponibles de la Colección americana de cultivos tipo (ATCC) con los números de registro CRL-2741, PCS-301-010 y PCS-1101-010, respectivamente.

5 Los valores de LD₅₀ obtenidos para un compuesto seleccionado en las tres líneas celulares diferentes se muestran en la TABLA 2.

TABLA 2			
Compuesto	pEC50 de HBE	pEC50 de SAE	pEC50 de HRMEC
RJH01325	5,91	5,57	6,12

10 Las varias hipótesis presentadas en esta divulgación proporcionan una premisa mediante la cual el lector puede comprender diversos aspectos de la invención. Esta premisa se proporciona para el enriquecimiento intelectual del lector. La práctica de la invención no requiere una comprensión o aplicación detallada de la hipótesis. Excepto cuando se indique lo contrario, las características de la hipótesis presentada en esta divulgación no limitan la aplicación o la práctica de la invención reivindicada.

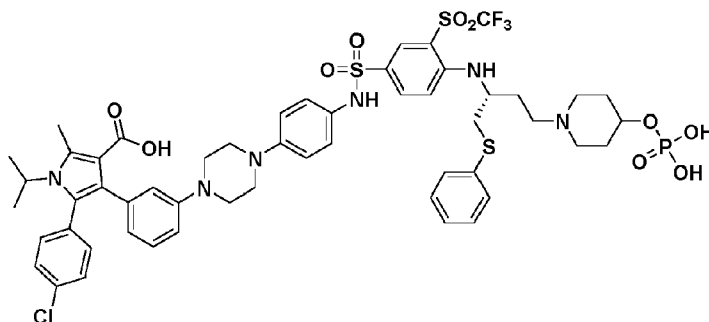
15 Por ejemplo, excepto cuando se requiera explícitamente la eliminación de células senescentes, los compuestos pueden usarse para tratar las afecciones descritas independientemente de su efecto sobre las células senescentes. Aunque muchas de las afecciones relacionadas con senescencia a las que se hace referencia en esta divulgación se producen predominantemente en pacientes mayores, la aparición de células senescentes y la fisiopatología que median pueden resultar de otros eventos, tales como irradiación, otros tipos de daño tisular, otros tipos de enfermedades y anomalías genéticas. La invención puede ponerse en práctica en pacientes de cualquier edad que tengan la afección indicada, a menos que se indique o requiera explícitamente lo contrario.

20 Las discusiones sobre el mecanismo de acción de los compuestos de la divulgación también se proporcionan para el enriquecimiento intelectual del lector y no implican ninguna limitación. Excepto cuando se indique lo contrario, los compuestos pueden usarse para eliminar células senescentes o cancerosas o para el tratamiento de estados patológicos tal como se reivindica a continuación, independientemente de cómo funcionen dentro de las células diana o en el sujeto tratado.

30 Aunque los compuestos y las composiciones a los que se hace referencia en esta divulgación se ilustran en el contexto de la eliminación de células senescentes y el tratamiento de afecciones asociados a senescencia y cáncer, los compuestos y sus derivados descritos en el presente documento que son novedosos pueden prepararse para cualquier propósito adecuado, incluido, pero sin limitarse a, uso en laboratorio, tratamiento de afecciones relacionadas con senescencia, como lubricante de automóviles y para diagnóstico.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto, que es:



5

ácido (R)-5-(4-clorofenil)-1-isopropil-2-metil-4-(3-(4-(4-((1-(feniltio)-4-(4-(fosfonooxi)piperidin-1-il)butan-2-il)amino)-3-(trifluorometil)sulfonyl)fenil)sulfonamido)fenil)piperazin-1-il)fenil)-1H-pirrol-3-carboxílico,

10 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

2. Composición farmacéutica que comprende un compuesto según la reivindicación 1 en un excipiente farmacéuticamente compatible.

15 3. Dosis unitaria de una composición farmacéutica que comprende:

una cantidad de un compuesto que inhibe la función de Bcl configurada para su uso en el tratamiento de una afección asociada a senescencia que está provocada o mediada al menos en parte por células senescentes,

20 en donde el compuesto es un compuesto según la reivindicación 1,

en donde la composición contiene una formulación del compuesto configurada para su administración a un tejido diana en un sujeto que manifiesta la afección asociada a senescencia,

25 en donde la formulación y la cantidad del compuesto en la dosis unitaria configuran la dosis unitaria para que sea eficaz en la eliminación selectiva de células senescentes en o alrededor del tejido en el sujeto, disminuyendo de ese modo la gravedad de uno o más signos o síntomas de la afección sin provocar efectos adversos en el sujeto cuando se administra al tejido como una sola dosis, opcionalmente en donde la dosis unitaria se envasa con un folleto informativo que describe el uso y los beneficios asociados de los fármacos en el tratamiento de la afección
30 asociada con células senescentes.

4. Compuesto según la reivindicación 1 o composición farmacéutica según la reivindicación 2 para su uso en uno de:

35 - eliminar selectivamente células senescentes de un tejido o una población celular mixta,

- tratar una afección relacionada con senescencia, opcionalmente en donde la afección relacionada con senescencia se selecciona del grupo que consiste en osteoartritis, una afección oftálmica y una afección pulmonar,

40

- eliminar selectivamente células cancerosas de un tejido o una población celular mixta, o

- tratar cáncer.

FIG. 2A

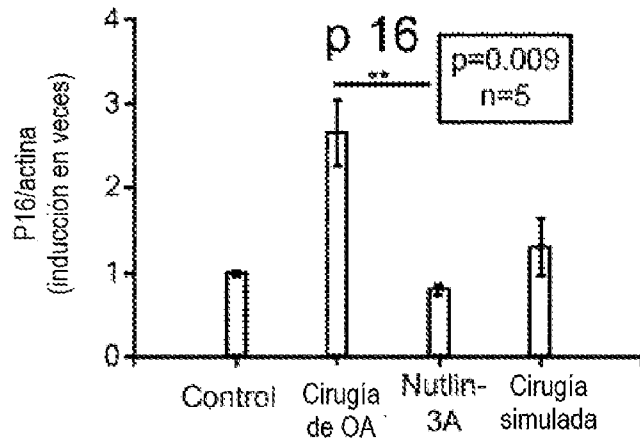


FIG. 2B

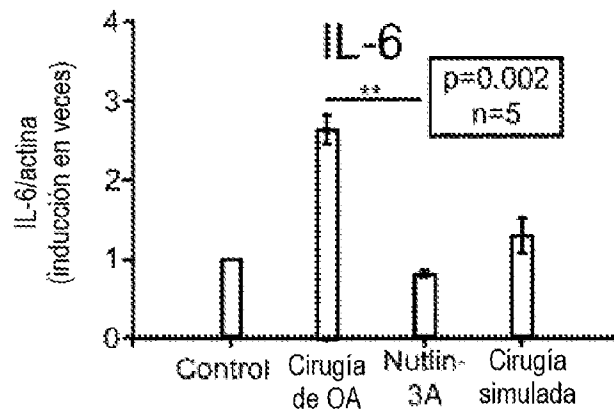


FIG. 2C

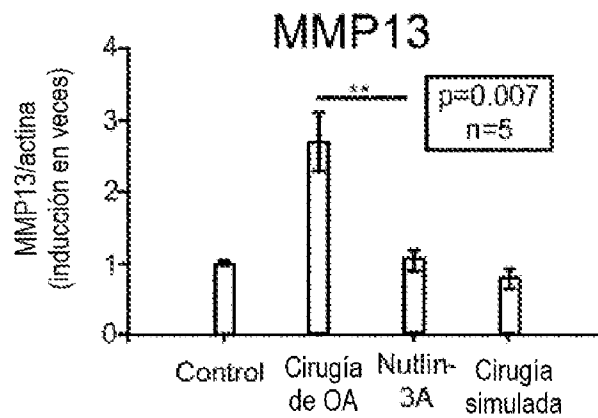


FIG. 3A

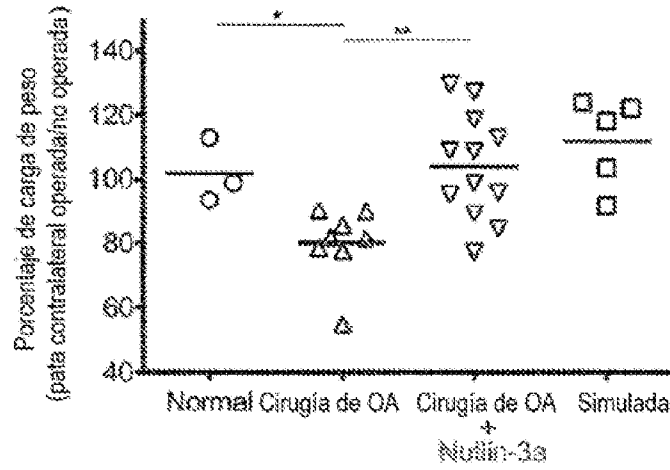


FIG. 3B

FIG. 3C

FIG. 3D

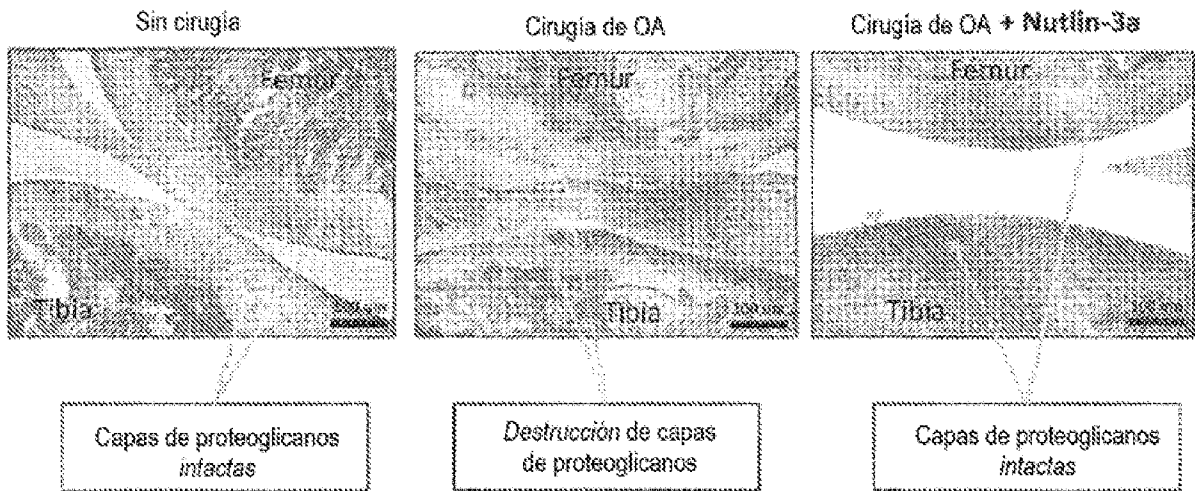
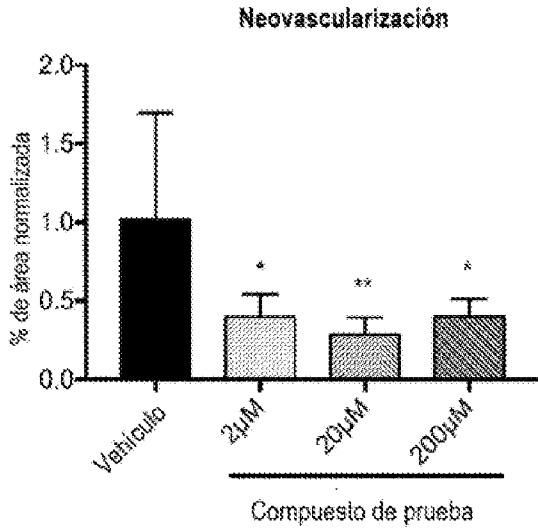
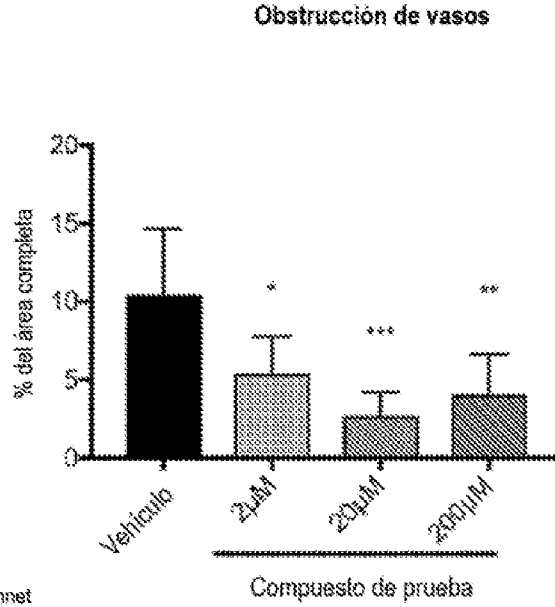


FIG. 4A



*p<0.05, **p<0.01 frente a vehículo
Anova unifactorial, con prueba de comparaciones múltiples de Dunnet

FIG. 4B



*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 frente a vehículo
Anova unifactorial, con prueba de comparaciones múltiples de Dunnet

FIG. 4C

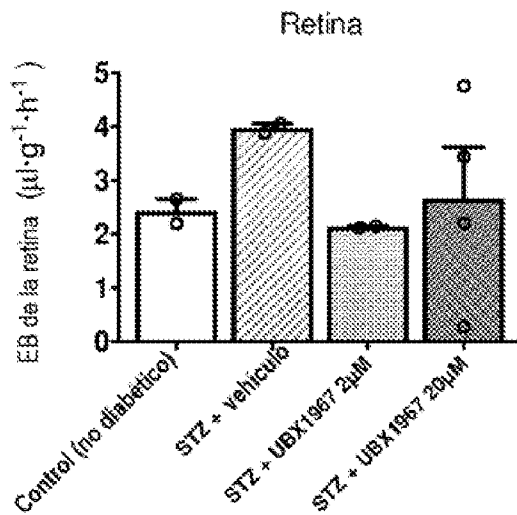


FIG. 4D

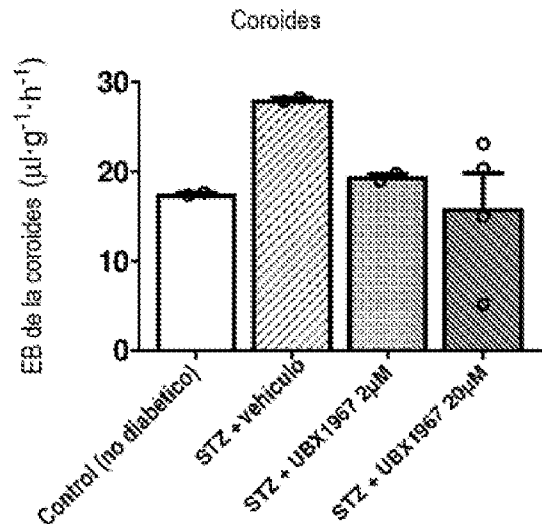


FIG. 5

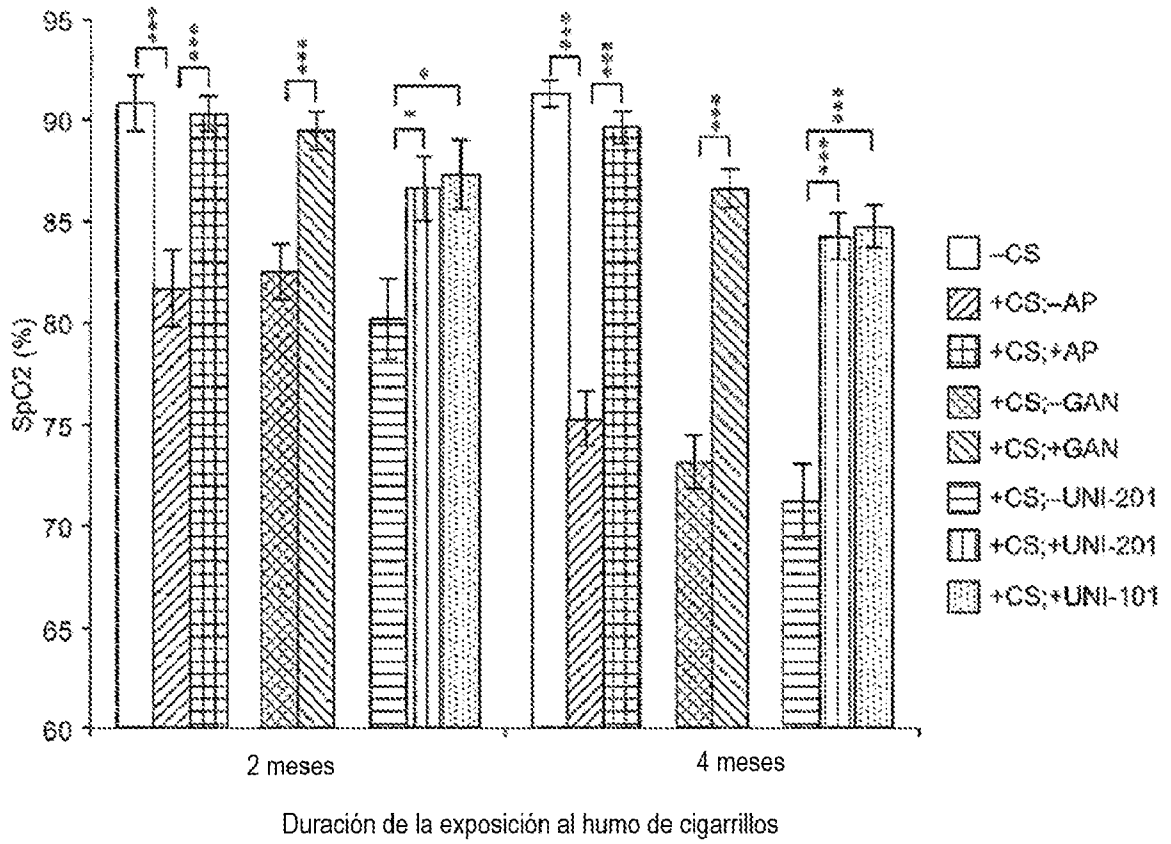


FIG. 6

