

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 967 070**

21 Número de solicitud: 202230840

51 Int. Cl.:

A61K 31/5377 (2006.01)

A61K 31/352 (2006.01)

A61P 39/06 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

29.09.2022

43 Fecha de publicación de la solicitud:

25.04.2024

71 Solicitantes:

**FUNDACION UNIVERSITARIA SAN ANTONIO
(UCAM) (41.0%)**

CAMPUS DE LOS JERONIMOS

30107 GUADALUPE (Murcia) ES;

FUNDACION PARA LA FORMACION E

INVESTIGACIÓN SANITARIAS (FFIS) (49.0%) y

UNIVERSIDAD DE MURCIA (10.0%)

72 Inventor/es:

CAYUELA FUENTES, Maria Luisa;

ALCARAZ PEREZ, Francisca;

HERNANDEZ SILVA, David;

PEREZ SANCHEZ, Horacio;

MULERO MENDEZ, Victoriano y

CANTON SANDOVAL, Joaquin

74 Agente/Representante:

DIAZ PACHECO, Maria Desamparados

54 Título: **COMPUESTOS ANTIENTVEJECIMIENTO**

57 Resumen:

Compuestos antienviejecimiento.

La invención proporciona compuestos antienviejecimiento, en particular polifenoles o senolíticos seleccionados entre navitoclax, narigenina, apigenina, sakuranetina y quercetina para su uso para frenar los efectos asociados con el envejecimiento natural o acelerado.

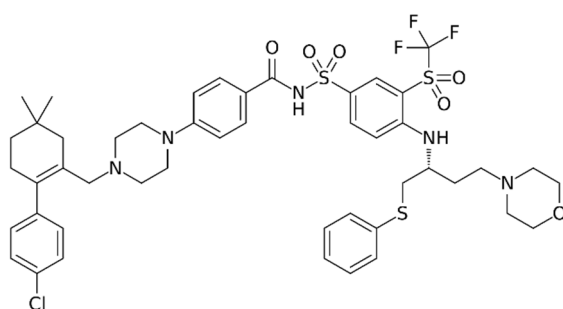
ES 2 967 070 A1

DESCRIPCIÓN

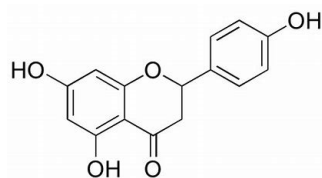
COMPUESTOS ANTIENVEJECIMIENTO

La presente invención se refiere a compuestos antienvjecimiento, en particular seleccionados entre polifenoles y senolíticos, útiles para frenar los efectos asociados con el envejecimiento producido por causas naturales o como consecuencia de los nuevos estilos de vida (estrés, dietas hiper calóricas, enfermedades, tratamientos terapéuticos agresivos, etc.).

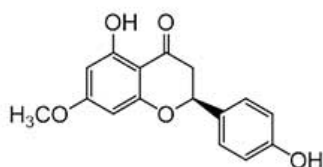
Más concretamente, los compuestos antienvjecimiento de la invención se seleccionan de entre el senolítico navitoclax (4-[4-[[2-(4-clorofenil)-5,5-dimetilciclohexen-1-il]metil]piperazin-1-il]-N-[4-[[[(2R)-4-morfolin-4-il-1-fenilsulfanilbutan-2-il]amino]-3-(trifluorometilsulfonil)fenil]sulfonil]benzamida y los polifenoles narigenina (5,7-dihidroxi-2-(4-hidroxifenil)croman-4-ona, apigenina (5,7-dihidroxi-2-(4-hidroxifenil)-4H-cromen-4-ona), sakuranetina ((S)-5-hidroxi-2-(4-hidroxifenil)-7-metoxichoman-4-ona) y quercetina (2-(3,4-dihidroxifenil)-3,5,7-trihidroxi-4H-cromen-4-ona), de las siguientes fórmulas:



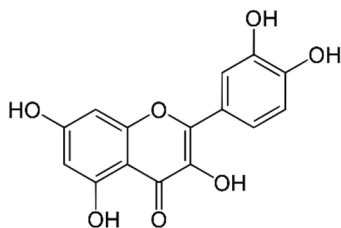
Navitoclax



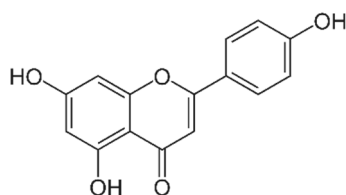
Narigenina



Sakuranetina



Quercetina



Apigenina

En los últimos 50 años la esperanza de vida ha mejorado considerablemente. Este incremento se debe a la mejora en la calidad de vida y fundamentalmente a los avances tecnológicos y biomédicos que se han producido en las últimas décadas. Los individuos

5 están alcanzando edades que eran impensables en épocas anteriores y ha aumentado significativamente el número de personas octogenarias. Como consecuencia, también ha aumentado la incidencia de enfermedades relacionadas con el envejecimiento, como las cardiovasculares, el cáncer o las enfermedades neurodegenerativas.

Y cuando todavía nos preguntamos cuál es nuestro límite biológico de supervivencia, los

10 cambios en los estilos de vida y de dietas (estrés, sedentarismo, contaminación, tratamientos médicos agresivos, comida ricas en grasas saturadas, azúcar, etc.), en las últimas décadas están haciendo que aparezcan prematuramente otras dolencias relacionadas con el envejecimiento.

Por tanto, se requieren actuaciones que, por un lado, aumenten el estado funcional en la

15 población mayor de 65 años (mejores niveles de actividad cognitiva, retraso de enfermedades crónicas, mayor independencia) y, por otro, paren/revertan el envejecimiento prematuro al que va desembocada parte de la población por las cuestiones ambientales mencionadas anteriormente.

Algunos de los procesos implicados en el envejecimiento son ya conocidos (véase por

20 ejemplo Cell, volumen 153, 6 de junio de 2013, páginas 1194-1217, "The Hallmarks of Aging", Carlos López-Otín et al., <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039>). De acuerdo con López-Otín et al., la situación actual de la investigación sobre el envejecimiento presenta muchos paralelismos con la investigación sobre el cáncer en décadas anteriores. El campo del cáncer cobró un gran impulso en el año 2000, con la publicación de un

25 documento histórico que enumeraba seis características del cáncer (Hanahan y Weinberg, 2000), recientemente ampliado a diez (Hanahan y Weinberg, 2011). Esta categorización ha ayudado a conceptualizar la esencia del cáncer y sus mecanismos subyacentes. A primera vista, el cáncer y el envejecimiento pueden parecer procesos opuestos: el cáncer es la consecuencia de una ganancia aberrante de aptitud celular, mientras que el

30 envejecimiento se caracteriza por una pérdida de aptitud. Sin embargo, a un nivel más profundo, el cáncer y el envejecimiento comparten orígenes comunes. Se considera ampliamente que la acumulación de daño celular dependiente del tiempo es la causa general del envejecimiento (Gems y Partridge, 2013, Genetics of longevity in model organisms: debates and paradigm shifts, Annu. Rev. Physiol., 75 (2013), pp. 621-644);

35 Kirkwood, 2005, Understanding the odd science of aging, Cell, 120 (2005), pp. 437-447; Vijg y Campisi, 2008, Puzzles, promises and a cure for ageing, Nature, 454 (2008), pp. 1065-1071). Al mismo tiempo, el daño celular puede ocasionalmente proporcionar ventajas aberrantes a ciertas células, lo que eventualmente puede producir cáncer. Por lo tanto, el cáncer y el envejecimiento pueden considerarse como dos manifestaciones diferentes del

mismo proceso subyacente, a saber, la acumulación de daño celular. Además, varias de las patologías asociadas al envejecimiento, como la aterosclerosis y la inflamación, implican un sobrecrecimiento celular descontrolado o hiperactividad (M.V. Blagosklonny, Aging: ROS or TOR, Cell Cycle, 7 (2008), pp. 3344-3354). A partir de este marco conceptual han surgido varias cuestiones críticas en el campo del envejecimiento en relación con las fuentes fisiológicas del daño que provoca el envejecimiento, las respuestas compensatorias que intentan restablecer la homeostasis, la interconexión entre los diferentes tipos de daño y las respuestas compensatorias, y las posibilidades de intervenir exógenamente para retrasar el envejecimiento.

- 5 De los múltiples procesos implicados, la presente invención se centra en el acortamiento telomérico, bien por deficiencia de telomerasa o bien inducido por exposición a estrés o agentes tóxicos, , la inflamación crónica de bajo grado y estéril, la senescencia celular y los tratamientos oncológicos como mecanismos del envejecimiento, llevándose a cabo un escrutinio de senolíticos y de polifenoles con esqueletos químicos derivados farmacológicamente de la estructura del resveratrol.

A este respecto, la senescencia celular es un proceso que resulta de una variedad de estímulos y que conduce a la detención irreversible de la división celular. Las células senescentes se acumulan durante el envejecimiento y están implicadas en la promoción de una variedad de enfermedades relacionadas con la edad. Aunque la senescencia celular tiene una función importante en el organismo (supresión de tumores, cicatrización de heridas y protección contra la fibrosis tisular), también existe evidencia acumulada de que las células senescentes pueden tener efectos dañinos *in vivo* y pueden contribuir al envejecimiento de los organismos y a numerosas enfermedades relacionadas con la edad.

Las células senescentes secretan numerosos factores biológicamente activos (senescence-associated secretory phenotype (SASP)) que tienen consecuencias fisiológicas y patológicas en los organismos. Las células senescentes se van acumulando en los tejidos conforme envejecemos, principalmente porque el sistema inmunitario va perdiendo su capacidad de eliminarlas. Por tanto, la eliminación de estas células puede evitar los SAPS ayudando a la mejora del organismo.

- 30 En este contexto, por ejemplo la EP3630125 proporciona un agente para su uso en la eliminación selectiva de células senescentes, seleccionándose dicho agente entre un glucósido cardíaco, un inhibidor de quinasa de adhesión focal (FAK), un inhibidor de HMG-CoA reductasa, JFD00244, Ciclosporina, Tirfostina AG879, cantaridina, cloruro de difenileniodonio, rottlerina, 2,3-dimetoxi-1,4-naftoquinona, LY-367,265, rotenona, idarubicina, cloruro de dequalinto, vincristina, nitazoxanida, nitrofurazona, temsirolimus, eltrombopag, adapaleno, azacilonol, enoxacina y raltegravir, y sus sales farmacéuticamente aceptables.

La acumulación de daño en el ADN con la edad parece afectar el genoma de forma casi aleatoria, pero hay algunas regiones cromosómicas, como los telómeros, que son particularmente susceptibles al deterioro relacionado con la edad (Blackburn et al., 2006, Telomeres and telomerase: the path from maize, Tetrahymena and yeast to human cancer and aging, Nat. Med., 12 (2006), pp. 1133-1138). Las ADN-polimerasas replicativas carecen de la capacidad de replicar completamente los extremos terminales de las moléculas de ADN lineal, una función que pertenece a una ADN-polimerasa especializada

conocida como telomerasa. Sin embargo, la mayoría de las células somáticas de los mamíferos no expresan la telomerasa y esto conduce a la pérdida progresiva y acumulativa de las secuencias protectoras de los telómeros de los extremos de los cromosomas. El agotamiento de los telómeros explica la limitada capacidad proliferativa de algunos tipos de células cultivadas *in vitro*, la denominada senescencia replicativa o límite de Hayflick (Hayflick y Moorhead, 1961, The serial cultivation of human diploid cell strains, Exp. Cell Res., 25 (1961), pp. 585-621; A.M. Olovnikov, Telomeres, telomerase, and aging: origin of the theory, Exp. Gerontol., 31 (1996), pp. 443-448). De hecho, la expresión ectópica de la telomerasa es suficiente para conferir la inmortalidad a células que de otro modo serían mortales sin causar una transformación oncogénica (Bodnar et al., 1998, Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells, Science, 279 (1998), pp. 349-352). Es importante destacar que el acortamiento de los telómeros también se observa durante el envejecimiento normal tanto en humanos como en ratones (M.A. Blasco, Telomere length, stem cells and aging, Nat. Chem. Biol., 3 (2007), pp. 640-649). Los telómeros están unidos por un complejo multiproteico característico conocido como refugio. Una función principal de este complejo es impedir el acceso de las proteínas reparadoras del ADN a los telómeros. De lo contrario, los telómeros serían "reparados" a medida que el ADN se rompe y conduce a fusiones cromosómicas. Debido a su reparación restringida del ADN, el daño del ADN en los telómeros es notablemente persistente y altamente eficiente para inducir la senescencia y/o la apoptosis (Fumagalli et al., 2012, Telomeric DNA damage is irreparable and causes persistent DNA-damage-response activation, Nat. Cell Biol., 14 (2012), pp. 355-365).

Los modelos animales modificados genéticamente han establecido vínculos causales entre la pérdida de telómeros, la senescencia celular y el envejecimiento del organismo. Por lo tanto, los ratones con telómeros acortados o alargados presentan una esperanza de vida disminuida o aumentada, respectivamente (Armanios et al., 2009, Short telomeres are sufficient to cause the degenerative defects associated with aging, Am. J. Hum. Genet., 85 (2009), pp. 823-832). La evidencia reciente también indica que el envejecimiento puede revertirse mediante la activación de la telomerasa. En particular, el envejecimiento prematuro de los ratones deficientes en telomerasa puede revertirse cuando la telomerasa se reactiva genéticamente en estos ratones envejecidos (Jaskelioff et al., 2011, Telomerase reactivation reverses tissue degeneration in aged telomerase-deficient mice, Nature, 469 (2011), pp. 102-106).

En este contexto, la EP2959005, se refiere a un compuesto que comprende un ácido ribonucleico sintético que comprende al menos un nucleósido modificado y codifica una transcriptasa inversa de telomerasa para su uso en un método de tratamiento o prevención de: (a) una enfermedad que involucra telómeros cortos seleccionados del grupo que consiste en síndrome metabólico, diabetes, úlceras diabéticas, enfermedades cardíacas, cáncer, demencia vascular, enfermedad de Alzheimer, accidente cerebrovascular, degeneración macular relacionada con la edad, inmunosenescencia, insuficiencia de la médula ósea, úlceras gastrointestinales, cirrosis, hernia, infección, infección crónica, deterioro cognitivo leve o grave, problemas de movilidad, osteoporosis, osteoartritis, artritis reumatoide, ansiedad relacionada con la edad, trastornos del equilibrio, tinnitus, parálisis de Bell, cataratas, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, abrasión corneal, arteria coronaria arteriopatía periférica, conjuntivitis, chalazión, deshidratación, depresión,

enfisema, enfermedad de los ojos, retraso del crecimiento, gripe, trastorno de ansiedad generalizada, glaucoma, pérdida de la audición, pérdida del sentido del gusto, pérdida del apetito, dislocación de la cadera, pérdida de la memoria, enfermedad de Parkinson, estenosis espinal, incontinencia urinaria y fractura vertebral; o (b) una enfermedad relacionada con la edad en un sujeto animal que padece o está en riesgo de padecer una enfermedad relacionada con la edad, en el que la enfermedad relacionada con la edad implica telómeros cortos; donde la transcriptasa inversa de la telomerasa se expresa transitoriamente en una célula; donde al menos un telómero se extiende dentro de la célula; y donde el al menos un nucleósido modificado comprendido en el ácido ribonucleico sintético confiere inmunogenicidad reducida al ácido ribonucleico sintético.

Una alteración prominente asociada con el envejecimiento en la comunicación intercelular es la inflamación crónica de bajo grado y estéril ("inflammaging"), es decir, un fenotipo proinflamatorio latente que acompaña al envejecimiento en los mamíferos. La inflamación puede deberse a múltiples causas, como la acumulación de daño tisular proinflamatorio, la falla de un sistema inmunitario cada vez más disfuncional para eliminar patógenos y células huésped disfuncionales de manera efectiva, la propensión de las células senescentes a secretar citocinas proinflamatorias, la activación mejorada del factor de transcripción NF- κ B o la aparición de una respuesta de autofagia defectuosa (Salminen et al., 2012, *Inflammaging: disturbed interplay between autophagy and inflammasomes*, *Aging* (Albany NY), 4 (2012), pp. 166-175). La inflamación también está involucrada en la patogénesis de la obesidad y la diabetes tipo 2, dos condiciones que contribuyen y se correlacionan con el envejecimiento de la población humana. El hallazgo reciente de que la inflamación asociada con la edad inhibe la función de las células madre epidérmicas (Doles et al., 2012, *Age-associated inflammation inhibits epidermal stem cell function*, *Genes Dev.*, 26 (2012), pp. 2144-2153) respalda aún más la intrincada concatenación de diferentes características que refuerzan el proceso de envejecimiento. Paralelamente a la inflamación, la función del sistema inmunitario adaptativo disminuye (Deeks, 2011, *HIV infection, inflammation, immunosenescence, and aging*, *Annu. Rev. Med.*, 62 (2011), pp. 141-155). Esta inmunosenescencia puede agravar el fenotipo de envejecimiento a nivel sistémico debido a la incapacidad del sistema inmunitario para eliminar los agentes infecciosos, las células infectadas y las células al borde de la transformación maligna. Además, una de las funciones del sistema inmunitario es reconocer y eliminar las células senescentes, así como las células hiperploides que se acumulan en los tejidos envejecidos y en las lesiones premalignas (Davoli y de Lange, 2011, *The causes and consequences of polyploidy in normal development and cancer*, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 27 (2011), pp. 585-610).

Finalmente, por ejemplo en el artículo de Andrew B. Smitherman MD et al. (*Cancer*, Volumen 126, noviembre 2020, *Accelerated aging among childhood, adolescent, and young adult cancer survivors is evidenced by increased expression of p16INK4a and frailty*, <https://doi.org/10.1002/cncr.33112>) explica que la senescencia celular, medida por la expresión del inhibidor de la quinasa del ciclo celular p16INK4a, puede contribuir al envejecimiento acelerado en los sobrevivientes de cáncer infantil, adolescente y adulto joven. Los autores midieron la expresión de p16INK4a de linfocitos T en sangre periférica entre sobrevivientes de cáncer pediátricos y adultos jóvenes, con la hipótesis de que la expresión de p16INK4a es mayor después de la quimioterapia y entre sobrevivientes frágiles, concluyendo que la quimioterapia se asocia con una mayor senescencia celular y

edad molecular en sobrevivientes de cáncer pediátricos y adultos jóvenes. Los sobrevivientes frágiles, en comparación con los sobrevivientes robustos, exhiben niveles más altos de p16INK4a, lo que sugiere que la senescencia celular puede estar asociada con el envejecimiento temprano en los sobrevivientes.

- 5 La presente invención proporciona compuestos antienvjecimiento, en particular polifenoles o senolíticos seleccionados entre navitoclax, narigenina, apigenina, sakuranetina y quercetina para su uso para frenar los efectos asociados con el envejecimiento, bien producido por causas naturales o como consecuencia de los nuevos estilos de vida (estrés, dietas hiper calóricas, enfermedades, tratamientos agresivos, etc.),
10 centrándose en el acortamiento telomérico, bien por deficiencia de telomerasa o bien inducido por diferentes estímulos (estrés, productos tóxicos) , la inflamación crónica de bajo grado y estéril, la senescencia celular y los tratamientos oncológicos como mecanismos del envejecimiento.

15 Con el fin de proporcionar los compuestos citados para el uso descrito, los presentes inventores han desarrollado un modelo de envejecimiento prematuro en el pez cebra, concretamente para el estudio de la acción de los compuestos indicados en el acortamiento telomérico, la inflamación crónica de bajo grado y estéril, la senescencia celular y los tratamientos quimioterapéuticos.

20 A continuación, se ilustra la invención en referencia a los siguientes ejemplos y figuras adjuntas, en las cuales:

Figura 1: Muestra el resultado de la administración de navitoclax a larvas de pez cebra con acortamiento telomérico provocado mediante cruces frente a una larva de control.

Figura 2: Muestra el resultado de la administración de navitoclax a larvas de pez cebra con inflamación crónica estéril frente a larvas sin tratar. Los parámetros de medida de la
25 inflamación son el número de neutrófilos y la dispersión de los mismos fuera del órgano hematopoyético medida por número de neutrófilos y su dispersión fuera del órgano hematopoyético frente a una larva de control.

Figura 3: Muestra el resultado de la administración de polifenoles a larvas de pez cebra con inflamación crónica estéril frente a larvas sin tratar. Los parámetros de medida
30 de la inflamación son el número de neutrófilos y la dispersión de los mismos fuera del órgano hematopoyético

Figura 4: Muestra la influencia de navitoclax en la capacidad cognitiva (test NOR/Novel Object Recognition) de peces cebra adultos frente a controles sin tratar.

Figura 5: Muestra el resultado de la administración de narigenina , (n1) , Sakuretin (n29, reseveratrol (n3) y Apigenina (n4) a larvas de pez cebra sometidas previamente a un
35 tratamiento quimioterapéutico (VCR = vincristina, DXM = dexametasona, MTX = metotrexato, ARAC = citarabina, DNR = daunovlastina, v = vehículo). Resultados parecidos son obtenidos; Eje X: Tiempo (días post fertilización), Eje Y: porcentaje de supervivencia.

Senolíticos: Navitoclax

Como se ha comentado anteriormente, se ha generado un modelo de envejecimiento prematuro donde se induce un acortamiento telomérico en larvas de pez cebra mediante sucesivos cruces entre peces de telómero corto. Como se observa en la figura 1, la adición de los senolíticos (navitoclax y dasatinib) a las larvas envejecidas prematuramente consiguió disminuir el nivel de senescencia de las larvas. No obstante, solo navitoclax consiguió aumentar la supervivencia de la larva (figura 2). El mecanismo exacto por el que se produce este efecto se desconoce, aunque se puede comprobar que no es por un aumento de la longitud telomérica o por un aumento de la actividad telomerasa, ya que no se observaron cambios tras su medición.

- 10 Curiosamente, tras el tratamiento se observó que las larvas tenían una ligera disminución de neutrófilos, por lo que se pensó que podría tener un efecto en la inflamación.

La inflamación crónica estéril está relacionada con el envejecimiento prematuro y enfermedades asociadas. Por tanto, se probaron los senolíticos en modelos de inflamación crónica, cuantificando el número de neutrófilos y su dispersión como medida del grado inflamación. Como se observa en la figura 3, los tratamientos con ambos senolíticos eran capaces de disminuir dicha inflamación y, por tanto, pueden emplearse para las enfermedades asociadas a la inflamación crónica estéril como consecuencia de la edad, de la dieta o de algún otro tipo de afectación (artritis, psoriasis, etc.).

Por otro lado, también se probaron los compuestos en un modelo de inflamación crónica /envejecimiento por dieta alta en colesterol. Las larvas fueron alimentadas con una dieta rica en colesterol (HCD, simulando las dietas occidentales "*western diet*") frente a controles, posteriormente se cuantificó la inflamación mediante el recuento de las células del sistema inmunitario innato (neutrófilos y macrófagos). En el caso de las larvas alimentadas con HCD y tratadas con Navitoclax se produjo una mejora en el efecto inflamatorio de la dieta, recuperando el fenotipo de la mayoría de las larvas de severo a medio. Se sabe que la inflamación crónica estéril es un estrés para el organismo, afectándolo de forma sistémica, y que también afecta a la longitud telomérica de las células, marcador del "edad" biológica de las células y por tanto de su nivel de proliferación y funcionalidad. La medida de la longitud telomérica de estas muestras indicó que navitoclax previene el acortamiento telomérico tras una dieta HCD.

Además, los compuestos fueron utilizados para proteger de los efectos deletéreos (envejecimiento prematuro) provocados por tratamiento quimioterapéutico. Aunque la fase experimental no ha concluido todavía, la tendencia es que el navitoclax protege también a las células del acortamiento telomérico provocado por los tratamientos oncológicos. Por tanto, prevendría del envejecimiento prematuro al que se ven abocados los supervivientes de cáncer (pediátrico o adulto)

Además, se realizaron pruebas para establecer la influencia del navitoclax en las capacidades cognitivas de peces adultos tratados y sin tratar con navitoclax. Es conocido que una de las primeras consecuencias del envejecimiento es la pérdida de memoria. Por ello se sometió a peces adultos tratados y control a un test de reconocimiento de objeto nuevo (Test NOR), que mide la memoria mediante un índice de preferencia, de forma que, cuanto mayor es dicho índice, mayor es la memoria. Como se puede observar en la figura 5, el tratamiento con navitoclax aumentó la memoria de los peces adultos. El mecanismo

por el que ocurre está siendo estudiado, si bien se sabe que se produce un aumento de factores de transcripción relacionados con la memoria.

En resumen, la adición de senolíticos, en concreto de navitoclax, mejora la supervivencia de las larvas de pez cebra con telómeros muy cortos, protege del acortamiento telomérico tras diferentes estímulos envejecedores, disminuye la inflamación crónica estéril producida por mutaciones inductoras, dietas hipercalóricas o tratamientos oncológicos y mejora los índices de memoria de peces adultos.

Polifenoles: narigenina, apigenina, sakuranetina y quercetina

Uno de los compuestos fenólicos más estudiados es el *resveratrol*. Esta molécula, presente de forma natural en algunos alimentos, muestra efectos beneficiosos sobre diversos procesos fisiológicos y bioquímicos, representando así una potencial herramienta para la prevención o tratamiento de enfermedades de alta prevalencia en nuestra sociedad. No obstante, hay controversia sobre su efectividad real.

Con el objetivo de encontrar compuestos más eficientes que el resveratrol en ese contexto, se aplicó una serie de técnicas de cribado virtual, utilizando como herramienta principal métodos farmacofóricos basados en ligando (LBVS en inglés) teniendo para ello en cuenta la estructura y características farmacofóricas del resveratrol. Entre las principales predicciones del método, se seleccionaron 11 compuestos (Apigenina, Genesteina, Herpercetina, Kaemferol, Liquecetina, Isoliquecetina, Narigenina, Quercetina, Sakurecina, Tricetina, Epigallocatequina) por presentar una alta similaridad farmacofórica con respecto al resveratrol.

A continuación, dichos compuestos se testaron en el laboratorio. Para los ensayos antienvjecimiento *in vivo* de los compuestos se cuenta con el modelo de pez cebra. Este ofrece diferentes ventajas entre las que se encuentran pequeño tamaño, desarrollo muy rápido y extrauterino, alta fecundidad de las hembras y administración de los compuestos en el agua, lo que hace posible hacer escrutinios a media/gran escala que reviertan un fenotipo fácilmente observable. El laboratorio lleva años estudiando el envejecimiento utilizando este modelo. En concreto el envejecimiento por acortamiento telomérico, por inducción de senescencia, por inflamación crónica y por compuestos que se utilizan para tratamientos oncológicos.

Por tanto, uno de los objetivos de la investigación ha sido la búsqueda de moléculas naturales (nutracéuticos) capaces de:

- i) Mejorar la actividad enzimática de TERT y la longitud telomérica.
- ii) Disminuir la senescencia, traduciéndose en un aumento de la supervivencia de larvas envejecidas de pez cebra.
- iii) Disminuir la inflamación.
- iv) Proteger y revertir de los efectos de envejecimiento prematuro y adversos que producen los tratamientos oncológicos y dietas altas en colesterol.
- v) Prevenir procesos inflamatorios.
- vi) Aumentar de capacidades cognitivas.

Tras probar los 11 compuestos se pudo comprobar que *narigenina*, *apigenina*, *sakureтина*, y *quercetina* tienen actividad antiinflamatoria y neuroprotectora (ver figura 4).

5 La actividad anti-inflamatoria fue comprobada en un modelo con inflamación crónica, que se caracteriza por un aumento en el número de neutrófilos y por una dispersión de los mismo fuera del órgano hematopoyético. Por tanto, el efecto anti-inflamatorio es observado cuando la dispersión de neutrófilos es menor tras el tratamiento. Así, apigenina, narigenina, sakureтина y tricetina son polifenoles con actividad anti-inflamatoria.

10 Además, cuando estas sustancias son administradas como coadyuvante de quimioterapéuticos, se observa un incremento en la supervivencia y una mejora en el estado fisiológico en el modelo de pez cebra.

Para estudiar dicho efecto, se administraron los siguientes quimioterapéuticos a las concentraciones indicadas:

- Metotrexato: 0,2 μM
- Vincristina: 2,5 μM
- 15 • Citarabina (Ara C): 50 μM
- Daunoblastina: 1 μM

La administración de estos fármacos se realiza a la concentración indicada en larvas de 3 días post fecundación (dpf) y se toman muestras a 5 y 7 dpf.

Se administraron a las larvas los siguientes polifenoles a la concentración indicada:

- 20 • Naringenina: 10 μM
- Sakuranetina: 10 μM
- Resveratrol: 10 μM
- Apigenina: 10 μM

25 Concretamente, el tratamiento consistió en cotratarse las larvas a 3 dpf con el quimioterapéutico junto con uno de los polifenoles. Tras el tratamiento (dos tratamientos a 3 y 5 dpf) se realizó una curva de supervivencia, comprobándose que ésta aumenta al ser cotratadas con los polifenoles en comparación con las larvas que solo fueron tratadas con el agente quimioterapéutico (figura 6).

REIVINDICACIONES

1. Compuestos antienvjecimiento, en particular polifenoles o senolíticos seleccionados entre navitoclax, narigenina, apigenina, sakuranetina y quercetina para su
5 uso para frenar los efectos asociados con el envejecimiento.
2. Compuestos antienvjecimiento para su uso según la reivindicación 1, donde los efectos asociados al envejecimiento se seleccionan entre acortamiento telomérico, inflamación crónica de bajo grado y estéril, senescencia celular, tratamientos quimioterapéuticos y combinaciones de los mismos como mecanismos de envejecimiento
- 10 3. Compuestos antivevejecimiento para su uso según la reivindicación 1, como moléculas protectoras antes de sufrir el envejecimiento prematuro inducido por los tratamientos quimioterapéuticos o de otra índole que sean muy agresivos para el organismo

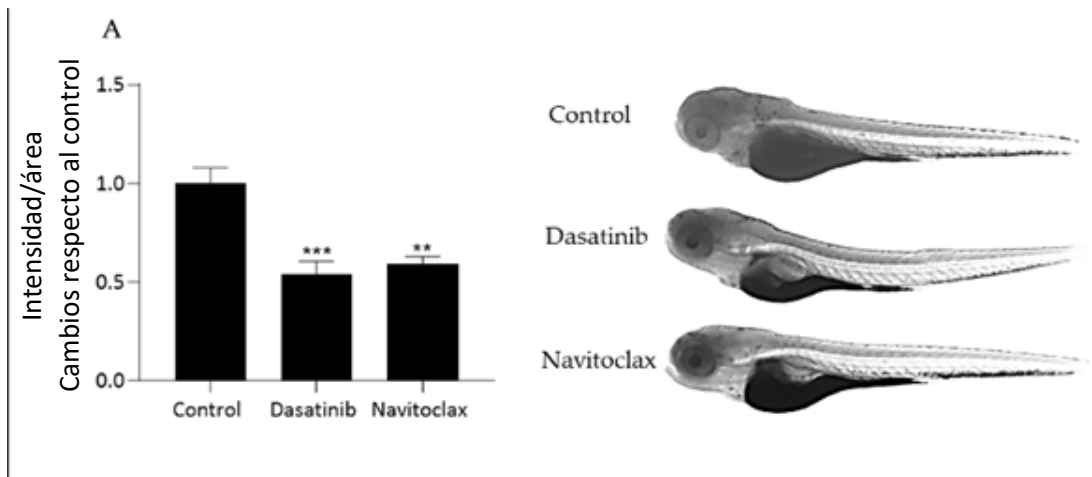


Figura 1

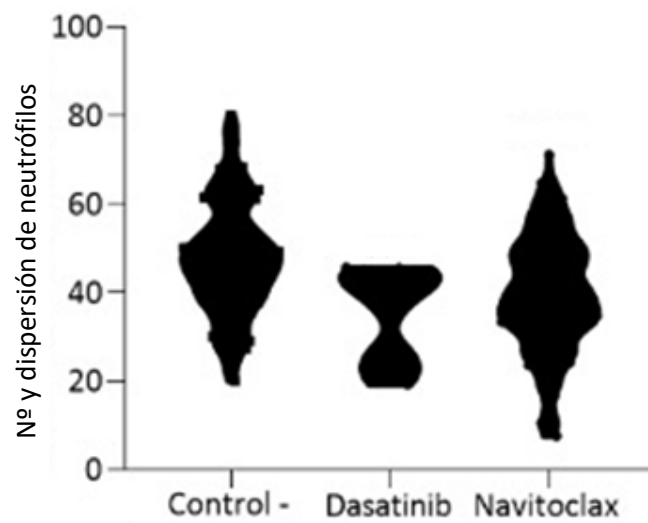
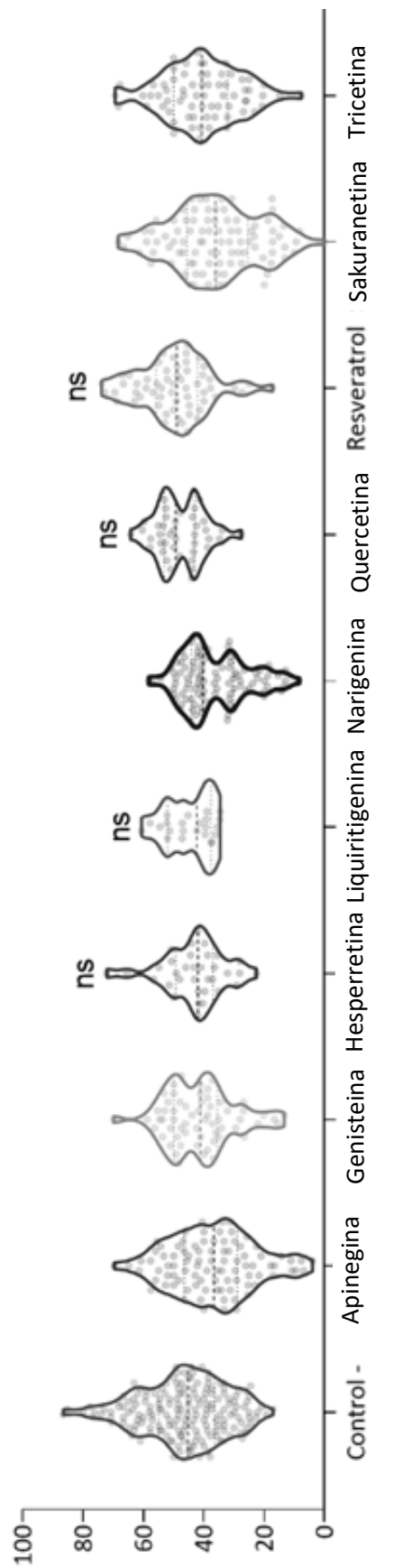


Figura 2

Figura 3



Test NOR (Test de memoria por reconocimiento de objeto nuevo)

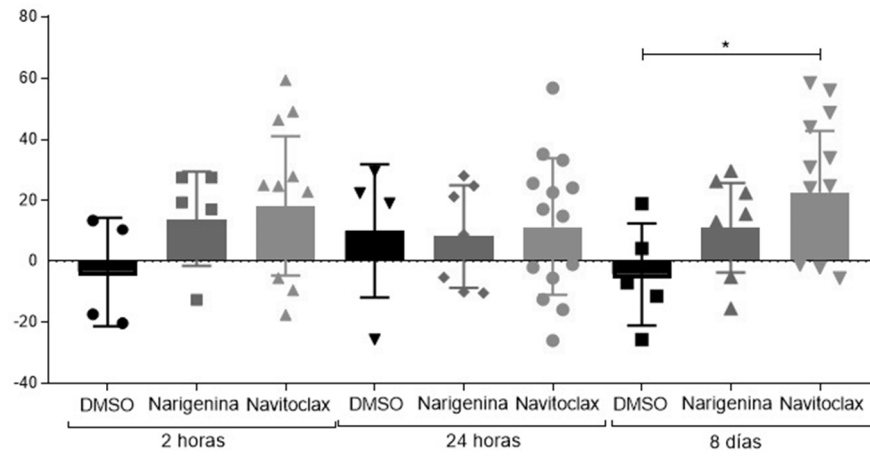


Figura 4

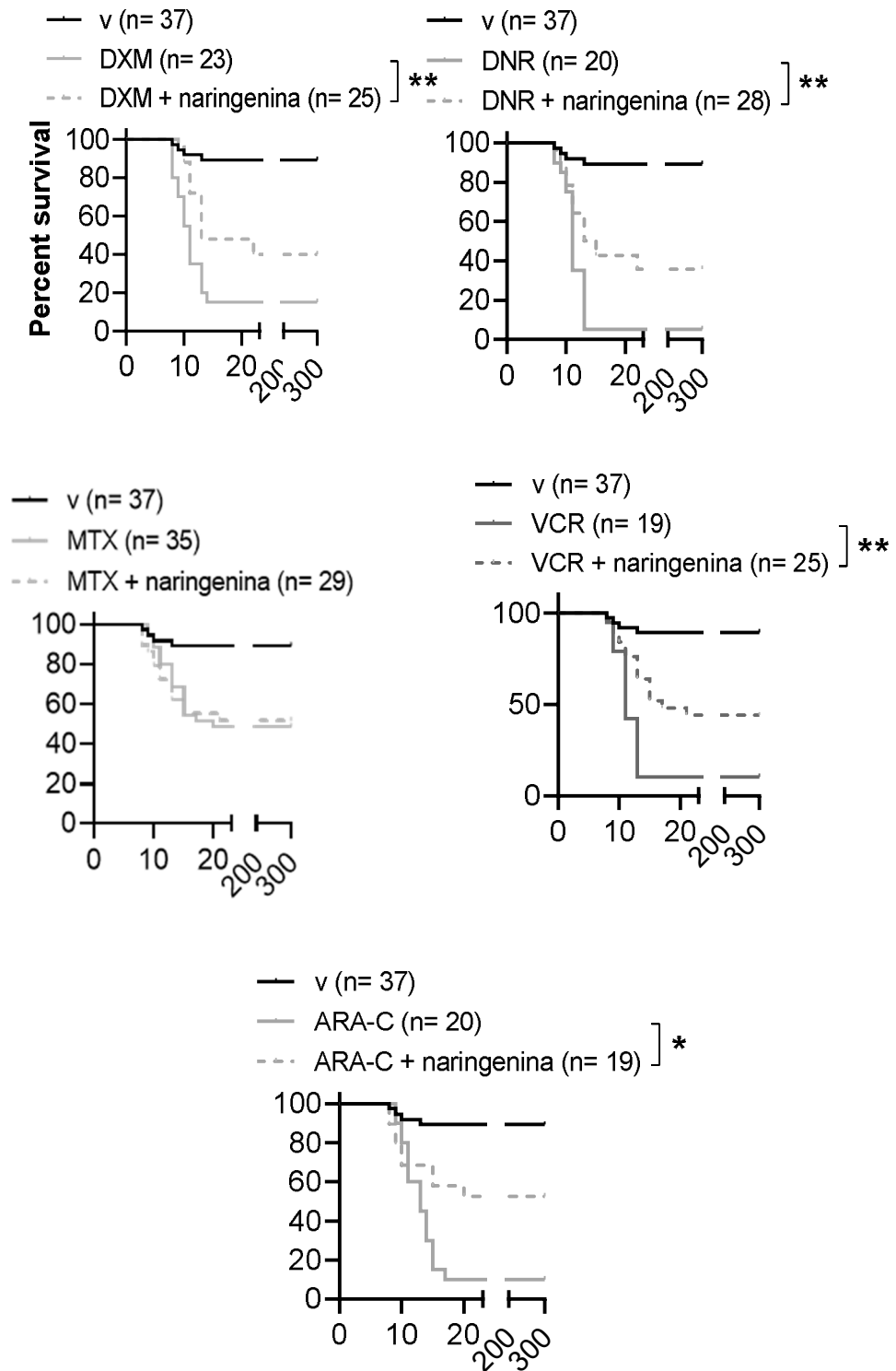


Figura 5

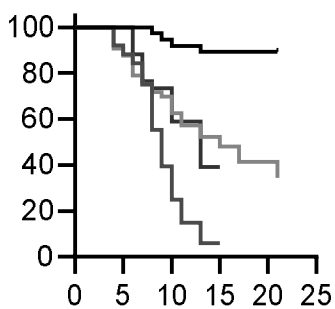
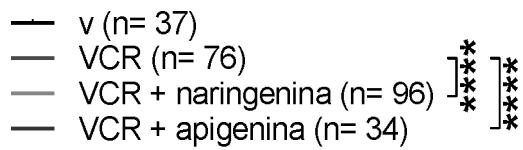
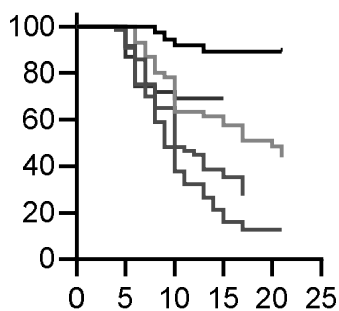
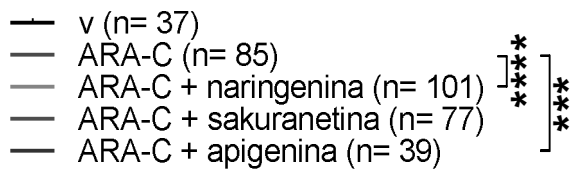
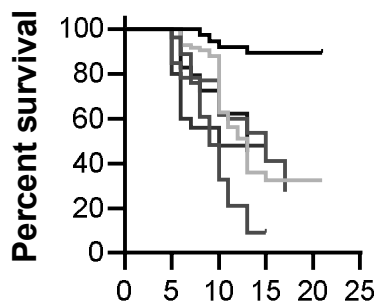
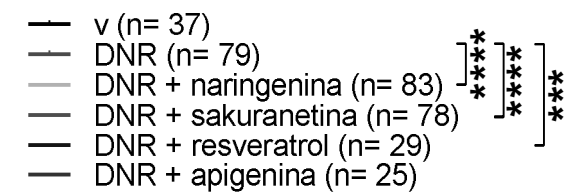


Figura 5 (continuación)



- ②¹ N.º solicitud: 202230840
②² Fecha de presentación de la solicitud: 29.09.2022
③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤¹ Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ ⁶ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	HERNANDEZ-SILVA DAVID <i>et al.</i> ; Senescence-Independent Anti-Inflammatory Activity of the Senolytic Drugs Dasatinib, Navitoclax, and Venetoclax in Zebrafish Models of Chronic Inflammation.. International Journal of Molecular Sciences Switzerland 09 Sep 2022, 09/09/2022, Vol. 23, N° 18, ISSN 1422-0067 (Electronic), <DOI: doi:10.3390/ijms231810468 pubmed:36142384>	1-3
X	SHAHBANDI ASHKAN <i>et al.</i> ; BH3 mimetics selectively eliminate chemotherapy-induced senescent cells and improve response in TP53 wild-type breast cancer.. Cell death and differentiation England 11 2020, 31/10/2020, Vol. 27, N° 11, Páginas 3097 - 3116, ISSN 1476-5403 (Electronic), <DOI: doi:10.1038/s41418-020-0564-6 pubmed:32457483>	1-3
X	SMIGIELSKA K <i>et al.</i> ; Skin anti-ageing effects of mitochondrial potassium channels regulation by naringenin. Journal of Investigative Dermatology SEP 2019, 31/08/2019, Vol. 139, N° 9, Suppl. S, Páginas S253, ISSN 0022-202X(print) ISSN 1523-1747(electronic)	1-3
X	TESTAI LARA <i>et al.</i> ; The Citrus Flavonoid Naringenin Protects the Myocardium from Ageing-Dependent Dysfunction: Potential Role of SIRT1. Oxidative medicine and cellular longevity United States 2020, 30/11/2019, Vol. 2020, Páginas 4650207, ISSN 1942-0994 (Electronic), <DOI: doi:10.1155/2020/4650207 pubmed:32047577>	1-3
X	ALI D <i>et al.</i> Apigenin and rutaecarpine target cellular senescence to prevent aging-bone phenotype in human mesenchymal skeletal stem cells. Free Radical Biology and Medicine - ABSTRACTS of SFRR-INTERNATIONAL 2021 VIRTUAL MEETING 20210301 Elsevier Inc. nld, 01/03/2021, Vol. 165, N° Supplement 1, Páginas 32, ISSN 0891-5849 (print) ISSN 1873-4596 (electronic), <DOI: doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2020.12.341>	1-3
X	LI BING SI <i>et al.</i> Apigenin Alleviates Oxidative Stress-Induced Cellular Senescence via Modulation of the SIRT1-NAD [Formula: see text]-CD38 Axis.. The American Journal of Chinese Medicine Singapore 2021, 30/11/2020, Vol. 49, N° 5, Páginas 1235 - 1250, ISSN 1793-6853 (Electronic), <DOI: doi:10.1142/S0192415X21500592 pubmed:34049472>	1-3

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
20.07.2023

Examinador
N. Vera Gutierrez

Página
1/3



- ②① N.º solicitud: 202230840
②② Fecha de presentación de la solicitud: 29.09.2022
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	KIM K -Y KANG H. Sakuranetin Inhibits Inflammatory Enzyme, Cytokine, and Costimulatory Molecule Expression in Macrophages through Modulation of JNK, p38, and STAT1. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine 2016 Hindawi Publishing Corporation usa, 30/11/2015, Vol. 2016, ISSN 1741-427X (print) ISSN 1741-4288 (electronic), <DOI: doi:10.1155/2016/9824203>	1-3
X	LEWINSKA ANNA <i>et al.</i> ; Senolysis-Based Elimination of Chemotherapy-Induced Senescent Breast Cancer Cells by Quercetin Derivative with Blocked Hydroxy Groups. Cancers FEB 2022, 31/01/2022, Vol. 14, Nº 3, Páginas Article No.: 605, ISSN 2072-6694(electronic), <DOI: doi:10.3390/cancers14030605>	1-3
X	US 2015290231 A1 (KIM JAE-RYONG <i>et al.</i>) 15/10/2015, párrafos [0007]-[0010], [0022].	1-3
X	CHANG J <i>et al.</i> ; Clearance of senescent cells by ABT263 rejuvenates aged hematopoietic stem cells in mice. Nature Medicine 20160101 Nature Publishing Group gbr, 01/01/2016, Vol. 22, Nº 1, Páginas 78 - 83, ISSN 1078-8956 (print) ISSN 1546-170X (electronic), <DOI: doi:10.1038/nm.4010 pubmed:26657143>	1-3
X	CHEN GUIPING <i>et al.</i> ; Long-term oral administration of naringenin counteracts aging-related retinal degeneration viaregulation of mitochondrial dynamics and autophagy.. Frontiers in pharmacology Switzerland 2022, 30/11/2021, Vol. 13, Páginas 919905, ISSN 1663-9812 (Print), <DOI: doi:10.3389/fphar.2022.919905 pubmed:35910364>	1-3
X	PERROTT K M <i>et al.</i> ; Apigenin suppresses the senescence-associated secretory phenotype and paracrine effects on breast cancer cells. GeroScience 20170401 Springer International Publishing che, 01/04/2017, Vol. 39, Nº 2, Páginas 161 - 173, ISSN 2509-2715 (print) ISSN 2509-2723 (electronic), <DOI: doi:10.1007/s11357-017-9970-1 pubmed:28378188>	1-3
X	CN 108774203 A (BEIJING WEILANSHIDAI TECH CO LTD) 09/11/2018 (resumen) [en línea] [recuperado el 14.07.2023]. Recuperado de: EPOQUE WPI Database, DW201882, nº acceso 2018-91009V.	1-3

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
20.07.2023

Examinador
N. Vera Gutierrez

Página
2/3

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K31/5377 (2006.01)

A61K31/352 (2006.01)

A61P39/06 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, EMBASE, BIOSIS, MEDLINE, NPL, XPESP