

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 380 248**

51 Int. Cl.:  
**C12N 9/00** (2006.01)  
**G01N 33/50** (2006.01)  
**G01N 33/573** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07809490 .1**
- 96 Fecha de presentación: **12.06.2007**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **2029731**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **04.03.2009**

54 Título: **Regulación de la actividad de las proteínas por acetilación reversible**

30 Prioridad:  
**12.06.2006 US 813275 P**  
**11.06.2007 US 761198**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**09.05.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**09.05.2012**

73 Titular/es:  
**THE J. DAVID GLADSTONE INSTITUTES**  
**1650 OWENS STREET**  
**SAN FRANCISCO, CA 94158, US**

72 Inventor/es:  
**SCHWER, Bjoern y**  
**VERDIN, Eric**

74 Agente/Representante:  
**Lehmann Novo, Isabel**

ES 2 380 248 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

Regulación de la actividad de las proteínas por acetilación reversible

## 5 Campo de la invención

Esta invención da a conocer la primera proteína celular acetilada sustrato de SIRT3, Acetil-CoA sintetasa 2 (AceCS2), que es una proteína de matriz mitocondrial. La sirtuina mitocondrial SIRT3 interactúa con AceCS2 y controla directamente la actividad de esta enzima metabólica mediante acetilación reversible de lisina. Los moduladores del estado de acetilación o la actividad de AceCS2 son útiles para el tratamiento de patologías, como diabetes tipo II, hipercolesterolemia, hiperlipidemia y obesidad.

Antecedentes de la invención

15 La acetilación reversible de lisina es una modificación post traduccional de la proteína altamente regulada, que es controlada por desacetilasas y acetiltransferasas de proteínas (Han y Martinage, 1992, *Int J Biochem* 24:19-28; Yang, 2004, *Bioessays* 26:1076-87). Mientras originalmente se vinculaba a la transcripción y la dinámica de la cromatina, la acetilación reversible de lisina está emergiendo como un regulador de las funciones celulares como motilidad celular, formación de sinapsis inmunitarias, muerte celular programada y tráfico de proteínas (Hubbert et al., 2002, *Nature* 417:455-458; Kawaguchi et al., 2003, *Cell* 115:727-38; Serrador et al., 2004, *Immunity* 20:417-28; Cohen et al., 2004, *Science* 305:390-2; Cohen et al., 2004, *Mol Cell* 13:627-38). Si bien la importancia de la acetilación reversible de lisina de las proteínas nucleares histona y no histona está bien establecida, el rol de la modificación de la proteína mediante acetilación reversible de lisina en la mitocondria es desconocido. Sin embargo, la importancia de la modificación post traduccional de las proteínas mitocondriales como fosforilación y ADP-ribosilación se está volviendo cada vez más clara y es probable que la acetilación reversible de las proteínas mitocondriales también desempeñe un papel importante en la regulación de las funciones mitocondriales.

20 La desacetilasa dependiente de NAD<sup>+</sup> nicotinamida (NAM) adenina dinucleótido, regulador de información silencioso 2 (Sir2), es un mediador importante de la longevidad en respuesta a las señales de restricción calóricas (CR) en *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans* y *Drosophila melanogaster* (Kaeberlein et al., 1999, *Genes Dev* 13:2570-80; Tissenbaum y Guarente, 2001, *Nature* 410:227-30; Lin et al., 2000, *Science* 289:2126-8; Rogina y Helfand, 2004, *Proc Natl Acad Sci USA* 101:15998-6003; Lin et al., 2004, *Genes Dev* 18:12-6; Lin et al., 2002, *Nature* 418:344-8; Anderson et al., 2003, *Nature* 423:181-5). Se conocen siete homólogos de Sir2 en mamíferos (SIRT1-7) (Frye, 1999, *Biochem Biophys Res Commun* 260:273-9; Frye, 2000 *Biochem Biophys Res Commun* 273:793-8; Blander y Guarente, 2004, *Annu Rev Biochem* 73:417-35; North and Verdin, 2004, *Genome Biol* 5:224). El descubrimiento reciente de que SIRT3, SIRT4 y SIRT5 se encuentran en la mitocondria (Shi et al., 2005, *J Biol Chem* 280:13560-7; Michishita et al., 2005, *Mol Biol Cell* 16:4623-35; Onyango et al., 2002, *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 13653-8; Schwer et al., 2002, *J Cell Biol* 158:647-57) sugieren la existencia de proteínas sustrato de las sirtuinas mitocondriales.

40 La presente invención da a conocer la identificación de la primera proteína celular acetilada sustrato de SIRT3, la Acetil-CoA sintetasa 2 (AceCS2), que es una proteína de matriz mitocondrial.

AceCS cataliza la unión de acetato con CoA para producir acetil-CoA, una molécula esencial utilizada en varias rutas metabólicas que incluyen la síntesis de ácidos grasos y colesterol y el ciclo del ácido tricarbóxico (TCA) (por una reseña, véase, Bremer y Osmundsen, 1984, en *Fatty Acid Metabolism and Its Regulation* (Numa, S. ed), 113-154, Elsevier Science Publisher, Amsterdam).

45 AceCS de diversos microorganismos y organismos superiores indica una súper familia (Toh, 1990, *Protein Sequences Data Anal* 3:517-521; Toh, 1991, *Protein Sequences Data Anal* 4:111-117), que incluye las acil-CoA sintetasas de cadena larga de mamífero, ACS1-ACS5 (Fujino y Yamamoto, 1992, *J Biochem* 111:197-203; Fujino et al., *J Biol Chem* 271:16748-16752; Kang et al., 1997, *Proc Natl. Acad Sci USA* 94:2880-2884; Suzuki et al., 1990, *J Biol Chem* 265:8681-8685; Oikawa et al., 1998, *J Biochem* 124:679-685). Todas las enzimas de esta súper familia tienen un motivo de secuencia común Ser-Gly-(residuo hidrófilo pequeño)<sub>2</sub>-Gly-(cualquier residuo)-Pro-Lys-Gly (SEC. ID N°: 1) y catalizan reacciones de dos pasos comunes: la adenilación de sustratos y la subsiguiente formación de tioéster (Toh, 1990, *Protein Sequences Data Anal* 3:517-521; Toh, 1991, *Protein Sequences Data Anal* 4:111-117).

55 Recientemente se clonaron y caracterizaron ADNc de AceCS bovina y murina. Se describieron dos AceCS murinas funcionalmente diferentes: una AceCS cardíaca y una AceCS hepática. La enzima de tipo hepático, denominada AceCS1, es una enzima citosólica, en tanto la enzima cardíaca, denominada AceCS2, se localiza en la matriz mitocondrial (Fujino et al., 2001, *J Biol Chem* 276:11420-11426). Basándose en el descubrimiento de que el ARNm de AceCS2 es inducido después del ayuno, se sugirió que AceCS2 proporciona acetil-CoA que se utiliza fundamentalmente para la oxidación en afecciones cetogénicas, como la inanición y la diabetes (Fujino et al., 2001, *J Biol Chem* 276:11420-11426). Esta sugerencia es respaldada por el descubrimiento de que el nivel de ARNm de AceCS2 en ratas Zucker diabéticas está aumentado (Fujino et al., 2001, *J Biol Chem* 276:11420-11426). Si bien Fujino et al. describieron la inducción de AceCS2 bajo determinadas circunstancias, no investigaron la función

precisa y la regulación de AceCS2 (Fujino *et al.*, 2001, *J Biol Chem* 276:11420-11426).

Para comprender y tratar mejor las patologías, como las afecciones cetogénicas, caracterizadas por niveles elevados de acetato, un sustrato de AceCS2, es importante elucidar esos mecanismos reguladores. La presente invención proporciona uno de dichos mecanismos reguladores mediante la identificación de acetil-CoA sintetasa 2 (AceCS2) con una enzima mitocondrial y como un sustrato celular acetilado de la sirtuina mitocondrial SIRT3. AceCS2 es acetilada reversiblemente en la lisina 642 (Lys 642) en el sitio activo de la enzima. SIRT3 interactúa con AceCS2 y desacetila Lys 642 tanto *in vitro* como *in vivo*. La desacetilación de AceCS2 por SIRT3 activa la actividad de acetil-CoA sintetasa de AceCS2.

Sería ventajoso identificar agentes que activaran un nivel o una actividad desacetilasa de SIRT3 o agentes que modularan un nivel, un estado de acetilación, o una actividad de AceCS2. Dichos agentes tendrían utilidad terapéutica en el tratamiento de patologías caracterizadas por niveles elevados de acetato y otras enfermedades o trastornos que son causados, al menos parcialmente, por dichos niveles elevados de acetato. Por consiguiente, la presente invención proporciona métodos para la identificación de dichos agentes, composiciones que los contienen y métodos que usan dichos agentes para el tratamiento de diabetes tipo II, hipercolesterolemia, hiperlipidemia y obesidad.

#### Breve resumen de la invención

La presente invención da a conocer una sirtuina de mamífero, SIRT3, que controla directamente la actividad de una enzima metabólica, la acetil-CoA sintetasa 2 (AceCS2), mediante acetilación reversible de lisina. Más adelante se describen métodos, composiciones y juegos de reactivos para identificar agentes que aumentan un nivel de o una actividad desacetilasa de un polipéptido SIRT3. La invención también describe métodos, composiciones y juegos de reactivos para identificar agentes que modulan un nivel, un estado de acetilación, o una actividad de un polipéptido acetil-CoA sintetasa 2 (AceCS2). También se describe en este documento el uso de dichos agentes en métodos, composiciones y juegos de reactivos para reducir niveles de acetato en un individuo, y para el tratamiento de un trastorno caracterizado por niveles de acetato elevados, como diabetes tipo II, hipercolesterolemia, hiperlipidemia u obesidad.

La presente invención proporciona un método para identificar un agente que aumente la actividad desacetilasa de un polipéptido SIRT3, donde el método comprende los pasos de (a) poner en contacto una célula que expresa un polipéptido SIRT3 y un polipéptido AceCS2 con un agente con potencial terapéutico *in vitro*; y (b) determinar el efecto, si lo hubiera, del agente con potencial terapéutico sobre el nivel de AceCS2 acetilado en la célula; donde una disminución en un primer nivel de AceCS2 acetilado en la célula en comparación con un segundo nivel de AceCS2 acetilado en una célula que no ha sido tratada con el agente con potencial terapéutico, es indicativa de un agente que aumenta la actividad desacetilasa de un polipéptido SIRT3. El paso (b) puede comprender un ensayo inmunológico que usa un anticuerpo específico para AceCS2 acetilado. Opcionalmente, este método comprende el paso de identificar una estructura o secuencia del agente con potencial terapéutico.

Una célula preferida es una célula de mamífero, preferentemente una célula humana. En algunas realizaciones, la célula de mamífero se selecciona del grupo que consiste en una célula cardíaca, una célula muscular y una célula cerebral.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para identificar un agente que aumente la actividad desacetilasa de un polipéptido SIRT3, donde el método comprende los pasos de (a) poner en contacto un polipéptido SIRT3 y un polipéptido acetil-CoA sintetasa 2 (AceCS2) acetilado, en una mezcla de ensayo que contiene NAD<sup>+</sup>, con un agente con potencial terapéutico; y (b) determinar el efecto, si lo hubiera, del agente con potencial terapéutico sobre el nivel de AceCS2 acetilado en la mezcla de ensayo; donde una disminución en un primer nivel de AceCS2 acetilado en la mezcla de ensayo con respecto a un segundo nivel de AceCS2 acetilado en la mezcla de ensayo que no ha sido tratada con el agente con potencial terapéutico, es indicativa de un agente que aumenta la actividad desacetilasa del polipéptido SIRT3.

En una realización preferida de este método, el polipéptido AceCS2 acetilado comprende un grupo acetilo marcado con <sup>14</sup>C y el paso (b) se realiza midiendo la liberación del grupo acetilo marcado con <sup>14</sup>C.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para identificar un agente que module un estado de acetilación o una actividad de un polipéptido Acetil-CoA sintetasa 2, (AceCS2), donde el método comprende los pasos de (a) poner en contacto una célula que expresa un polipéptido AceCS2 con un agente con potencial terapéutico *in vitro*; y (b) determinar el efecto, si lo hubiera, del agente con potencial terapéutico sobre el estado de acetilación o la actividad del polipéptido AceCS2 en la célula.

Otros aspectos de la invención se definen en las reivindicaciones adjuntas.

También se describe en este documento un método para identificar un agente que module un nivel, un estado de acetilación, o una actividad de un polipéptido AceCS2 que comprende los pasos de (a) poner en contacto un

polipéptido AceCS2 en una mezcla de ensayo con un agente con potencial terapéutico y (b) determinar el efecto, si lo hubiera, del agente con potencial terapéutico sobre el nivel, el estado de acetilación, o la actividad de AceCS2 en la mezcla de ensayo.

- 5 También se describen en este documento agentes biológicamente activos identificados por uno de los métodos de detección sistemática de la presente invención.

10 También se describe en este documento un método para modular el estado de acetilación de un polipéptido AceCS2. En una realización este método comprende el paso de poner en contacto una célula que expresa un polipéptido AceCS2 con un agente que se puede obtener de acuerdo con un método descrito en este documento, como un método para identificar un agente que aumente un nivel o una actividad desacetilasa de un polipéptido SIRT3 o un método para identificar un agente que module un nivel, un estado de acetilación, o una actividad de un polipéptido AceCS2.

15 También se describe en este documento un método para el tratamiento de una patología en un individuo, donde la patología se caracteriza por un nivel elevado de acetato. En una realización preferida, este método comprende el paso de administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente que aumenta un nivel o una actividad desacetilasa de un polipéptido SIRT3 que desacetila a AceCS2. De esa manera la patología es tratada. La patología mencionada antes se selecciona del grupo que consiste en diabetes tipo II, hipercolesterolemia, hiperlipidemia y obesidad.

20 Preferentemente el individuo tratado es un animal humano o no humano.

25 También se describe en este documento una composición farmacéutica para aumentar un nivel o una actividad desacetilasa de SIRT3. En una realización preferida, una composición farmacéutica contiene (i) un agente que se puede obtener de acuerdo con un método descrito antes, como un método para identificar un agente que aumente un nivel o una actividad desacetilasa de un polipéptido SIRT3, y (ii) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

30 También se describen en este documento composiciones farmacéuticas para modular un nivel, un estado de acetilación o una actividad de un polipéptido AceCS2. En una realización preferida, una composición farmacéutica contiene (i) un agente que se puede obtener de acuerdo con un método descrito antes, como un método para identificar un agente que module un nivel, un estado de acetilación, o una actividad de un polipéptido AceCS2, y (ii) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

35 También se describen en este documento juegos de reactivos. Un juego de reactivos preferido para aumentar un nivel o una actividad desacetilasa de SIRT3 comprende (i) un envase que contiene un agente que se puede obtener de acuerdo con un método descrito antes, como un método para identificar un agente que aumente un nivel o una actividad desacetilasa de un polipéptido SIRT3, e (ii) instrucciones para poner en contacto el agente con una célula que expresa un polipéptido SIRT3 y un polipéptido AceCS2 y determinar el efecto, si lo hubiera, del agente sobre el nivel de AceCS2 acetilado en la célula.

40 También se describe en este documento un juego de reactivos para modular un nivel, un estado de acetilación o una actividad de un polipéptido AceCS2. En una realización preferida, el juego de reactivos comprende (i) un envase que contiene un agente que se puede obtener de acuerdo con un método descrito antes, como un método para identificar un agente que module un nivel, un estado de acetilación, o una actividad de un polipéptido AceCS2, e (ii) instrucciones para poner en contacto una célula que expresa un polipéptido AceCS2 y determinar el efecto, si lo hubiera, del agente sobre el nivel, el estado de acetilación, o la actividad de AceCS2.

45 Los agentes útiles para incluir en las composiciones farmacéuticas y los juegos de reactivos son agentes que aumentan un nivel o una actividad desacetilasa de un polipéptido SIRT3 y agentes que modulan un nivel, un estado de acetilación, o una actividad de un polipéptido AceCS2.

50 Los métodos, las composiciones y los juegos de reactivos de la presente divulgación abarcan los detalles específicos como los descritos completamente en este documento.

55 Breve descripción de las figuras

60 FIG. 1: muestra que la acetil-CoA sintetasa 2 (AceCS2) humana es una proteína mitocondrial soluble. (A) Se transfectó AceCS2<sup>Flag</sup> humana en células Hela. Las células se tiñeron conjuntamente con anticuerpos anti-Flag y anticuerpos contra la proteína marcadora mitocondrial endógena MnSOD y se analizaron por microscopía de barrido láser confocal. Se muestran las señales fluorescentes de AceCS2<sup>Flag</sup> (izquierda) y MnSOD (medio) en el mismo plano focal. (Derecha) la imagen fusionada demuestra que AceCS2<sup>Flag</sup> se localiza en la mitocondria. (B) Se prepararon fracciones subcelulares de células HEK293 que expresan establemente AceCS2<sup>Flag</sup>. Se analizaron cantidades iguales (30 µg) de extracto celular total (total), mitocondria, membranas livianas (LM) y proteínas citosólicas por inmunotransferencia usando los anticuerpos indicados. (C) Localización submitocondrial de AceCS2<sup>Flag</sup>. Las mitocondrias de células HEK293 que expresan establemente AceCS2<sup>Flag</sup> se convirtieron en

mitoplastos mediante dilatación hipotónica y se trataron con proteinasa K. Luego de la incubación (20 min a 0 °C), los mitoplastos se volvieron a aislar mediante centrifugación y se analizaron por inmunotransferencia usando los anticuerpos indicados. La ruptura de la membrana mitocondrial externa se confirmó por inmunotransferencia frente a la proteína citocromo c (Cit. C) del espacio intermembrana. La integridad de la membrana mitocondrial interna se confirmó por inmunotransferencia frente a las proteínas marcadoras de matriz SIRT3 y GDH. AceCS2<sup>Flag</sup> se detectó con anticuerpos anti-Flag. (D) AceCS2<sup>Flag</sup> es una proteína soluble. Se aislaron mitocondrias de células HEK293 que expresan establemente AceCS2<sup>Flag</sup> y se solubilizaron directamente en tampón de muestra SDS (T, total) o se extrajeron con carbonato de sodio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 11.5). El extracto alcalino se separó en una fracción de membrana (P, sedimento) y una fracción que contenía proteínas solubles en carbonato de sodio (S, sobrenadante) mediante ultracentrifugación. La eficacia de la extracción alcalina se siguió o controló por inmunotransferencia de las diferentes fracciones para determinar la presencia de las proteínas marcadoras bien caracterizadas COX-IV, MnSOD y SIRT3. Los detalles se presentan en el ejemplo 3.

FIG. 2: muestra la identificación de la secuencia N-terminal de la AceCS2 humana. (A) El extremo N-terminal de la AceCS2 humana contiene una  $\alpha$ -hélice anfipática. Una región de AceCS2 (residuos de aminoácidos 3-20; SEC. ID N°: 2) que se predijo mediante análisis informático de la estructura secundaria que formaba una  $\alpha$ -hélice se graficó como una rueda helicoidal. R, residuos básicos; T, L, V, y A, residuos hidrófobos; G y S, residuos neutros. (B) Ilustración de la presecuencia mitocondrial y el sitio de escisión de la AceCS2 humana determinados por secuenciación N-terminal de la proteína y análisis LC/MS-MS. MPP, peptidasa de procesamiento de la matriz mitocondrial. Los detalles se presentan en el ejemplo 4.

FIG. 3: muestra que la mutación de la Lys642 conservada en AceCS2 suprime la actividad enzimática de AceCS2. (A) Alineamiento múltiple de secuencias de la región del sitio activo de acetil-CoA sintetasas de especies diferentes (ACS de *S. enterica*, SEC. ID N°: 3; ACS2p de *S. cerevisiae*, SEC. ID N°: 4; ACS de *C. elegans*, SEC. ID N°: 5; ACS de *D. melanogaster*, SEC. ID N°: 6; AceCS2 de *R. norvegicus* y AceCS2 de *M. musculus*, SEC. ID N°: 7) y AceCS2 humana (SEC. ID N°: 7). El sitio activo lisina está marcado con un triángulo abierto. (B) Lys642 es fundamental para la función de AceCS2. La mutación de Lys642 de AceCS2 inactiva a la enzima. AceCS2<sup>HA</sup> o AceCS2-K642Q<sup>HA</sup> (un mutante de AceCS2 en el cual Lys642 ha sido reemplazada por glutamina (Q)) se expresaron en células HEK293, se inmunoprecipitaron y se determinó la actividad específica de la acetil-CoA sintetasa (ACS). Los datos son medias  $\pm$  DE de tres ensayos independientes de actividad de acetil-CoA sintetasa. (C) Tinción con azul de Coomassie de AceCS2<sup>HA</sup> y AceCS2-K642Q<sup>HA</sup> inmunoprecipitadas. AceCS2<sup>HA</sup> o AceCS2-K642Q<sup>HA</sup> fueron indistinguibles por la tinción con azul de Coomassie y se expresaron en iguales niveles. Los detalles se presentan en el ejemplo 5.

FIG. 4: muestra que la AceCS2 humana se acetila *in vivo* en Lys642. Se transinfectaron células HEK293 que expresan establemente AceCS2<sup>Flag</sup> con ARNip específico para SIRT3 y se inmunoprecipitó AceCS2<sup>FLAG</sup> cinco días después. Se separó la AceCS2<sup>Flag</sup> inmunoprecipitada mediante SDS-PAGE y se preparó para espectrometría de masas. Se realizó una cromatografía líquida acoplada con espectrometría de masas en tándem (LC/MS-MS) sobre digeridos tripticos para identificar sitios de acetilación de lisina. acK, lisina acetilada. SGackVoxMR, SEC. ID N°: 8. Los detalles se presentan en el ejemplo 6.

FIG. 5: muestra que la AceCS2 humana expresada en *E. coli* que carece del gen o la proteína sirtuina CobB está hiperacetilada. (A) La eliminación o inhibición de la sirtuina CobB bacteriana produce la hiperacetilación del sitio activo lisina de la AceCS2 humana en bacterias. Se usaron *E. coli* K-12 tipo nativo o el mutante inactivado para expresar AceCS2 humana recombinante etiquetada myc-His (myc-His-tagged) en el extremo C-terminal (AceCS2:KR). Se analizaron cantidades iguales de AceCS2 etiquetada myc-His (WT) humana recombinante purificada o AceCS2-K642R (KR) de *E. coli* CobB<sup>-</sup> o CobB<sup>+</sup> por inmunotransferencia con un anticuerpo específico para acetil-lisina (Ac-AceCS2<sup>myc-His</sup>). Las membranas se despojaron de los anticuerpos y se volvieron a hibridar con anticuerpos  $\alpha$ -myc para mostrar los niveles totales de AceCS2 (AceCS2<sup>myc-His</sup>). (B) El anticuerpo anti-acetil-lisina reconoce específicamente un péptido sintético de AceCS2 que contiene un residuo de Lys642 acetilada (acK642) pero no tiene reacción cruzada con un péptido que contiene Lys642 no acetilada (K642). Se acoplaron péptidos sintéticos (Elim Biopharmaceuticals, Inc., Hayward, Calif.) a la proteína transportadora CP39 usando un juego de acoplamiento de péptidos (NEB). Los péptidos de AceCS2 utilizados fueron: NH<sub>2</sub>-CPKTRSG(ac)KVMRRL-CONH<sub>2</sub> (acK642, SEC. ID N°: 9) y NH<sub>2</sub>-CPKTRSGKVMRRL-CONH<sub>2</sub> (K642, SEC. ID N°: 10). El residuo de cisteína N-terminal se agregó a efectos del acoplamiento. Se resolvieron 150 ng de K642 acoplada a CP39 o acK642 mediante SDS-PAGE y se analizaron por inmunotransferencia usando un anticuerpo policlonal anti-acetil-lisina (*Cell Signaling Technology*, Beverly, Mass.). Los detalles se presentan en el ejemplo 7.

FIG. 6: muestra que la inhibición de la actividad de sirtuina por la nicotinamida (NAM) produce la hiperacetilación de la AceCS2 humana recombinante. (A) La inhibición de las sirtuinas bacterianas por la nicotinamida durante la expresión de la proteína AceCS2 humana recombinante causa hiperacetilación de la AceCS2 humana en Lys642. Se usaron bacterias *E. coli* DH5 $\alpha$  para expresar AceCS2 etiquetada myc-His:WT o AceCS2:KR. Se analizaron cantidades iguales de proteínas recombinantes purificadas como en (5A). (B) La cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem de los digeridos tripticos de AceCS2:WT recombinantes purificada de *E. coli* tratada con nicotinamida confirmó la acetilación de Lys642 (acK). Se muestra el espectro de masas en tándem del

ión doblemente cargado en m/z 368.1948. SGackVoxMR, SEC. ID N°: 8. Los detalles se presentan en el ejemplo 8.

FIG. 7: muestra que la reducción de los niveles de SIRT3 endógeno por agotamiento mediado por ARNip aumenta el nivel de acetilación de AceCS2<sup>Flag</sup>. Se transfectaron ARNip dirigidos contra SIRT3 (SIRT3pi) humano o GL3 de luciferasa de luciérnaga (Controlip) en células HEK293 que expresan establemente AceCS2<sup>Flag</sup>. Se lisaron las células y se analizó la acetilación de AceCS2<sup>Flag</sup> inmunoprecipitada mediante inmunotransferencia con anticuerpos contra lisina acetilada (Ac-AceCS2<sup>Flag</sup>). Las membranas se despojaron de los anticuerpos y se volvieron a hibridar para determinar las cantidades totales de AceCS2 (AceCS2<sup>Flag</sup>). La inmunotransferencia de todos los extractos celulares con anticuerpos anti-SIRT3 y anti-actina confirmó la eficacia y especificidad del tratamiento con ARNip. Los detalles se presentan en el ejemplo 9.

FIG. 8: muestra que SIRT3 pero no SIRT5 desacetila a AceCS2 *in vitro*. (A) La AceCS2<sup>myc-His</sup> humana recombinante purificada de *E. coli* tratada con nicotinamida se incubó con SIRT3 o SIRT5 etiquetados con Flag inmunoprecipitado de células HEK293. Como control, se usaron en las reacciones anti-Flag inmunoprecipitados de células HEK293 que expresan pcDNA<sup>Flag</sup> (carril izquierdo). Las reacciones de desacetilación se incubaron durante 3 h a 32° C en presencia o ausencia de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD<sup>+</sup>; 1 mM). Todas las reacciones se llevaron a cabo en presencia de tricostatina A (TSA, 500 nM). Las reacciones se detuvieron mediante agregado de tampón de muestra SDS, se llevaron a ebullición y se analizaron por inmunotransferencia. La AceCS2<sup>myc-His</sup> acetilada se detectó con anticuerpos específicos para acetil-lisina (Ac-AceCS2<sup>myc-His</sup>). Las membranas se despojaron de los anticuerpos y se volvieron a hibridar para determinar los niveles totales de AceCS2 con anticuerpos α-myc (AceCS2<sup>myc-His</sup>). La presencia de SIRT3 y SIRT5 etiquetados con Flag se verificó por inmunotransferencia con anticuerpos anti-Flag (panel inferior; entrada (Sirtuinas)). (B) La AceCS2 humana recombinante purificada de *E. coli* tratada con nicotinamida se incubó con sirtuinas recombinantes purificadas en presencia o ausencia de NAD<sup>+</sup> (1 mM) y en presencia de TSA (500 nM) durante 3 h a 32 °C y se analizó según se describe en (A). Las proteínas SIRT3 o SIRT5 recombinantes se detectaron mediante hibridación con anticuerpos anti-myc (panel inferior; entrada (Sirtuinas)). (C) SIRT3, pero no un mutante de SIRT3 catalíticamente inactivo, desacetila a AceCS2 *in vitro*. Los ensayos de desacetilación se realizaron y analizaron según se describe antes. Donde se indica, se incluyó nicotinamida (NAM; 10 mM) durante la incubación. Los detalles se presentan en el ejemplo 10.

FIG. 9: muestra que SIRT3 coimmunoprecipita con AceCS2 y desacetila a AceCS2 en las células. (A) La sobreexpresión de SIRT3 disminuye la acetilación de la AceCS2 expresada ectópicamente. Se cotransfectaron células COS-1 con AceCS2<sup>HA</sup> y o bien pcDNA<sup>Flag</sup>, SIRT3<sup>Flag</sup> o SIRT5<sup>Flag</sup>. Se analizó la acetilación de la AceCS2<sup>HA</sup> inmunoprecipitada mediante inmunotransferencia con anticuerpos para lisina acetilada (Ac-AceCS2<sup>HA</sup>). Las membranas se despojaron de los anticuerpos y se volvieron a hibridar para determinar las cantidades totales de AceCS2 (AceCS2<sup>HA</sup>) hibridando con un anticuerpo anti-HA. La expresión de SIRT3<sup>Flag</sup> y SIRT5<sup>Flag</sup> en el lisado celular total se verificó por inmunotransferencia con anticuerpos anti-Flag (Sirtuinas (Flag)). (B) AceCS2 y SIRT3 coimmunoprecipitaron de las células. Los complejos inmunitarios anti-Flag de las líneas celulares HEK293 que expresan establemente AceCS2<sup>Flag</sup> o un vector de control Flag vacío (pcDNA<sup>Flag</sup>) se analizaron para determinar la presencia de SIRT3 endógeno. Los detalles se presentan en el ejemplo 11.

FIG. 10: muestra que la acetilación de Lys642 controla la actividad de acetil-CoA sintetasa de la AceCS2 humana. (A) Se expresó la AceCS2 humana recombinante en bacterias en presencia o ausencia de nicotinamida (NAM). Se analizaron los niveles de acetilación y las cantidades totales de AceCS2 por inmunotransferencia con anticuerpos específicos para acetil-lisina o anticuerpos anti-myc. (B) Actividad específica de AceCS2 purificada expresada en presencia o ausencia de NAM. Los datos son medias ± DE SD de tres experimentos independientes. (C) Desacetilación dependiente de NAD<sup>+</sup> de AceCS2 por SIRT3 pero no por SIRT3-H248Y. El panel inferior indica que se agregaron cantidades iguales de SIRT3 o SIRT3-H248Y a las reacciones de desacetilación. (D) La desacetilación de AceCS2 por SIRT3 activa su actividad de acetil-CoA sintetasa. Se incubaron cantidades iguales de AceCS2 en presencia o ausencia de SIRT3 o un mutante de SIRT3 catalíticamente inactivo (SIRT3-H248Y). Donde se indica, se agregó NAD<sup>+</sup> (1 mM) durante la incubación. Después de 3 h a 32 °C, la reacción de desacetilación se detuvo mediante adición de nicotinamida (NAM; 10 mM) y se determinó la actividad específica de AceCS2. Los datos son medias ± DE de tres determinaciones de actividad independientes. (E) Activación dependiente del tiempo de AceCS2 por SIRT3. Se incubó AceCS2 humana recombinante purificada de bacterias tratadas con NAM, con SIRT3 recombinante o SIRT3-H248Y. Las muestras se llevaron a 32 °C y se les agregó NAD<sup>+</sup> (1 mM). En los tiempos indicados, se extrajeron alícuotas de la reacción, se mezclaron con NAM y se incubaron en hielo. (F) Las inmunotransferencias muestran la desacetilación progresiva de AceCS2 por SIRT3 pero no por SIRT3-H248Y. (G) Se determinó la actividad específica de AceCS2 después de la incubación con SIRT3 recombinante o SIRT3-H248Y para el tiempo indicado. Se muestran las medias ± DE de tres ensayos de actividad independientes. Los detalles se presentan en el ejemplo 12.

FIG. 11 muestra una ilustración esquemática de la regulación de AceCS2 mediante la acetilación reversible de lisina de Lys642. La desacetilación de AceCS2 por SIRT3 activa su actividad de acetil-CoA sintetasa. La identidad de la proteína acetiltransferasa de AceCS2 es desconocida y por consiguiente está marcada como acetiltransferasa X. Los detalles se presentan en el ejemplo 13.

## Descripción detallada de la invención

## I. Definiciones

5 A menos que se indique algo diferente, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el significado comúnmente comprendido por un experto en el área a la cual pertenece la invención. La bibliografía siguiente proporciona al experto una definición general de muchos de los términos utilizados en esta invención: Singleton *et al.*, *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology* (2ª ed. 1994); *The Cambridge Dictionary of Science and Technology* (Walker ed., 1988); *The Glossary of Genetics*, 5ª Ed., R. Rieger *et al.* (eds.), Springer Verlag (1991); y Hale & Marham, *The Harper Collins Dictionary of Biology* (1991). Según se usa en este documento, los términos siguientes tienen los significados que se les han atribuido a menos que se indique lo contrario.

Según se usa en este documento “AceCS2” significa acetil-CoA sintetasa 2.

15 Según se usa en este documento, “AceCS2” o “acetil-CoA sintetasa 2” se refiere a, e incluye los polipéptidos AceCS2 de mamífero y los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos AceCS2 de mamífero. En ciertas realizaciones, un polipéptido AceCS2 o ácido nucleico de AceCS2 es de levadura, *Drosophila*, pez cebra, tripanosoma, *C. elegans*, y otras. Se pueden encontrar secuencias de polipéptido de ejemplo de AceCS2 en GenBank, por ejemplo, humana (GenBank número de registro Q9NUB1; de ratón (GenBank número de registro BAB21612); bovina (GenBank número de registro BAB21611). Se pueden encontrar secuencias de ácidos nucleicos de ejemplo de AceCS2 en GenBank, por ejemplo, humana (GenBank número de registro BC039261; de ratón (GenBank número de registro AB046742) y bovina (GenBank número de registro AB046741).

25 Según se usa en este documento, “estado de acetilación” se refiere a la presencia o ausencia de un grupo acetilo en un polipéptido, preferentemente un polipéptido acetil-CoA sintetasa 2 (AceCS2).

Según se usa en este documento, “activador” se refiere a un agente que, p. ej., induce o activa la expresión de un polipéptido de la invención o se une a, estimula, aumenta, abre, activa, facilita, o mejora la activación, sensibiliza o aumenta la actividad de un polipéptido de la invención. Los activadores incluyen los ácidos nucleicos que codifican a SIRT3 o AceCS2, así como compuestos o agentes naturales o sintéticos, moléculas químicas pequeñas y análogos.

30 Los ensayos para activadores incluyen, p. ej., aplicar un agente con potencial terapéutico a una célula que expresa SIRT3 o AceCS2 y después determinar los efectos funcionales. Las muestras o ensayos que comprenden SIRT3 o AceCS2 que son tratados con un activador potencial se comparan con muestras de control sin el activador para examinar la magnitud del efecto. A las muestras de control (sin tratar con los agentes con potencial terapéutico) se les asigna un valor de actividad relativa de 100%. La activación del polipéptido se logra cuando el valor de actividad relativa del polipéptido respecto al control es 110%, opcionalmente 130%, 150%, opcionalmente 200%, 300%, 400%, 500% o 1000-3000% o mucho mayor.

40 Según se usa en este documento, “actividad de AceCS2” o “actividad de un polipéptido AceCS2” se refiere a (i) la unión de AceCS2 a un polipéptido o péptido, preferentemente un polipéptido SIRT3, (ii) la interacción de AceCS2 con un polipéptido o péptido, preferentemente un polipéptido SIRT3, (iii) el ensamblaje de AceCS2 en un complejo multiproteína, que contiene un polipéptido SIRT3, (iv) la localización de AceCS2 en la mitocondria, o (v) la conversión enzimática de acetato, ATP y CoA en acetil-CoA y AMP (monofosfato de adenosina), es decir, usando acetato, ATP y CoA como sustrato para generar acetil-CoA y AMP.

45 Según se usa en este documento, “actividad de SIRT3” o “actividad de un polipéptido SIRT3” se refiere a (i) la unión de SIRT3 a un polipéptido o péptido, preferentemente un polipéptido AceCS2, (ii) la interacción de un SIRT3 con un polipéptido o péptido, preferentemente un polipéptido AceCS2, (iii) el ensamblaje de SIRT3 en un complejo multiproteína, que contiene un polipéptido AceCS2, (iv) la localización de SIRT3 en la mitocondria, (v) la desacetilación de un polipéptido o péptido, preferentemente un polipéptido AceCS2, o (vi) la ADP-ribosilación de un polipéptido o péptido, preferentemente un polipéptido AceCS2.

50 Según se usa en este documento, un “agente” o “agente con potencial terapéutico” puede ser cualquier compuesto químico, por ejemplo, una macromolécula o una molécula pequeña. El agente con potencial terapéutico puede tener un peso de fórmula menor de 10 000 gramos por mol, menor de 5000 gramos por mol, menor de 1000 gramos por mol, o menor de aproximadamente 500 gramos por mol. El agente con potencial terapéutico puede ser de origen natural (e.g., una hierba medicinal un producto natural), sintético o ambos. Los ejemplos de macromolécula son las proteínas, los complejos de proteínas y las glucoproteínas, los ácidos nucleicos, p. ej. ADN, ARN y ANP (ácido nucleico peptídico). Los ejemplos de moléculas pequeñas son péptidos, peptidomiméticos (p. ej. peptoides), aminoácidos, análogos de aminoácidos, polinucleótidos, análogos de polinucleótidos, nucleótidos, análogos de nucleótidos, compuestos orgánicos o inorgánicos p. ej. compuestos heteroorgánicos u organometálicos. Un agente con potencial terapéutico puede ser la única sustancia ensayada por el método descrito en este documento.

Alternativamente, se puede ensayar una colección de agentes con potencial terapéutico ya sea consecutivamente o

concurrentemente por los métodos descritos en este documento.

Los agentes con potencial terapéutico abarcan muchas clases de moléculas químicas, típicamente moléculas orgánicas o inorgánicas sintéticas, semisintéticas o de origen natural. Los agentes con potencial terapéutico pueden ser compuestos orgánicos pequeños con un peso molecular de más de 50 y menos de aproximadamente 2500 Dalton. Los agentes con potencial terapéutico pueden contener grupos funcionales necesarios para la interacción estructural con proteínas, particularmente que se unen a hidrógeno, y pueden incluir al menos un grupo amina, carbonilo, hidroxilo o carboxilo, y puede contener al menos dos de los grupos químicos funcionales. Los agentes con potencial terapéutico pueden contener estructuras de carbono cíclicas o heterocíclicas y/o estructuras aromáticas o poliaromáticas sustituidas con uno o más de los grupos funcionales anteriores. También se encuentran entre las biomoléculas agentes con potencial terapéutico que incluyen péptidos, sacáridos, ácidos grasos, esteroides, purinas, pirimidinas, derivados, análogos estructurales o sus combinaciones.

Según se usa en este documento, “antagonista” significa una sustancia química que disminuye, suprime, o interfiere con, la acción fisiológica de un polipéptido. El antagonista puede ser, por ejemplo, un antagonista químico, un antagonista farmacocinético, un antagonista no competitivo o un antagonista fisiológico, como una biomolécula, p. ej. un polipéptido. Un antagonista preferido disminuye, suprime, o interfiere con, la acción fisiológica de un polipéptido AceCS2.

Específicamente, un antagonista puede actuar al nivel de interacción entre un primer polipéptido, p. ej. un polipéptido SIRT3 y un segundo polipéptido, por ejemplo, una molécula de unión, como un polipéptido AceCS2. El antagonista, por ejemplo, puede inhibir competitivamente o no competitivamente (p. ej., alostéricamente) la unión del primer polipéptido al segundo polipéptido. Un “antagonista farmacocinético” reduce eficazmente la concentración del principio activo en su sitio de acción, p. ej., aumentando la velocidad de degradación metabólica del primer polipéptido. Un “antagonista competitivo” es una molécula que se une directamente al primer polipéptido de manera que interfiere estéricamente con la interacción del primer polipéptido con el segundo polipéptido. El antagonismo no competitivo describe una situación en la que el antagonista no compite directamente con la unión, pero en vez de eso bloquea un punto en la vía de transducción de la señal a continuación de la unión del primer polipéptido con el segundo polipéptido. El antagonismo fisiológico describe en términos generales la interacción de dos sustancias cuyas acciones opuestas en el organismo tienden a cancelarse entre sí. Un antagonista también puede ser una sustancia que disminuye o suprime la expresión de un primer polipéptido. Por lo tanto un antagonista de AceCS2 puede ser, por ejemplo, una sustancia que disminuye o suprime: (i) la expresión del gen que codifica a AceCS2, (ii) la traducción del ARNm de AceCS2, (iii) la modificación post traduccional de AceCS2, o (iv) la interacción de AceCS2 con otros polipéptido en la formación de un complejo multiproteína.

La expresión “oligonucleótidos antisentido” según se usa en este documento abarca tanto los nucleótidos que son totalmente complementarios de una secuencia diana como los que tienen falta de complementariedad en uno o más nucleótidos, en la medida en que los nucleótidos antisentido se puedan hibridar específicamente a la secuencia diana. Por ejemplo, los oligonucleótidos antisentido de la presente invención incluyen polinucleótidos que tienen una homología (también denominada identidad de secuencia) de al menos 70% o superior, preferentemente 80% o superior, más preferentemente 90% o superior, aún más preferentemente 95% o superior en un tramo de al menos 15 nucleótidos continuos hasta la longitud total de la secuencia de cualquiera de las secuencias de nucleótidos de un gen de AceCS2. Se pueden usar los algoritmos conocidos en el área para determinar la homología. Por otra parte, los derivados o productos modificados de los oligonucleótidos antisentido se pueden usar como oligonucleótidos antisentido en la presente invención. Son ejemplos de dichos productos modificados las modificaciones fosfonato de alquilo inferior como el tipo metil fosfonato o el tipo etil fosfonato, modificaciones fosforotioato y las modificaciones fosforoamidato.

Según se usa en este documento, “asociado a” significa en contacto con, que interactúa con, o se une a.

Según se usa en este documento, la expresión “biológicamente activo” al referirse a un agente es conocida en el área y se refiere a una forma de un agente que permite que éste, o una porción de la cantidad del agente administrado, sea absorbido(a) por, incorporado(a) a, o esté fisiológicamente disponible de otra manera, para un sujeto o paciente al cual se administra.

Según se usa en este documento, “muestra biológica” significa una muestra de tejido o líquido biológico que contiene ácidos nucleicos o polipéptidos. Dichas muestras son típicamente humanas, pero incluyen tejidos aislados de primates no humanos o roedores, p. ej., ratones y ratas. Las muestras biológicas pueden también incluir cortes de tejidos como muestras de biopsia o autopsia, cortes congelados extraídos a efectos histológicos, líquido cefalorraquídeo, sangre, plasma, suero, esputo, heces, lágrimas, mucus, cabello, piel, etc. Las muestras biológicas también pueden incluir explantes y cultivos de células primarias y/o transformadas derivadas de los tejidos de los pacientes. Una “muestra biológica” también se refiere a una célula o población de células o a una cantidad de tejido o líquido de un animal. Muy a menudo, la muestra biológica fue extraída de un animal pero la expresión, “muestra biológica” también se puede referir a células o tejido analizados *in vivo*, es decir, sin extraer del animal. Típicamente,



una “muestra biológica” contendrá células del animal, pero la expresión también puede referirse a material biológico no celular, como fracciones no celulares de sangre, suero, saliva, líquido cefalorraquídeo u orina, que se pueden usar para medir el nivel de expresión de un polinucleótido o polipéptido. Numerosos tipos de muestras biológicas se pueden usar en la presente invención, incluidas, pero no exclusivamente, una biopsia de tejido o una muestra de sangre. Según se usa en este documento, una “biopsia del tejido” se refiere a una cantidad de tejido extraído de un animal, preferentemente un humano, para análisis de diagnóstico. “Biopsia de tejido” se puede referir a cualquier tipo de biopsia, como biopsia con una aguja, biopsia con aguja fina, biopsia quirúrgica, etc.

“Proporcionar una muestra biológica” significa obtener una muestra biológica para usar en los métodos descritos en esta invención. Muy a menudo, esto se hará extrayendo una muestra de células de un sujeto, pero también se puede llevar a cabo usando células aisladas previamente (p. ej., aisladas por otra persona, en otro momento, y/o con otro propósito), o llevando a cabo los métodos de la invención *in vivo*. Archivar los tejidos, tener una historia del tratamiento o el resultado, será particularmente útil.

Según se usa en este documento, “CoA” significa coenzima A.

Según se usa en este documento, una “biblioteca química combinatoria” se refiere a una colección de distintos compuestos químicos generados por síntesis química o síntesis biológica, combinando un número de “bloques constructivos” químicos como reactivos. Por ejemplo, una biblioteca química combinatoria lineal como una biblioteca de polipéptidos se forma combinando un conjunto de bloques constructivos químicos (aminoácidos) de todas las maneras posibles para una longitud de un compuesto dada (es decir, el número de aminoácidos en un compuesto polipeptídico). Millones de compuestos químicos se pueden sintetizar a través de dicha mezcla combinatoria de bloques constructivos químicos.

Según se usa en este documento, “expresión disminuida” se refiere al nivel de un producto de expresión génica que es menor y/o la actividad del producto de expresión génica está disminuida. Preferentemente, la disminución es de al menos 20%, más preferentemente, la disminución es de al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80% o al menos 90% y muy preferentemente, la disminución es de al menos 100%, con respecto a un control.

Los sinónimos del término, “determinar” están contemplados en el alcance de la presente invención e incluyen, pero no exclusivamente, detectar, medir, ensayar o probar la presencia, ausencia, cantidad o concentración de una molécula, como un AceCS2, un SIRT3, un marcador o una molécula pequeña de la invención, y análogos. Los términos se refieren tanto a determinaciones cualitativas como cuantitativas.

Según se usa en este documento, “determinar el efecto” o “determinar el efecto funcional” significa ensayar un agente que aumenta o disminuye un parámetro que está directa o indirectamente bajo la influencia del agente, p. ej. efectos funcionales, enzimáticos, físicos y químicos. Dichos efectos se pueden medir por cualquier medio conocido por los expertos, p. ej., cambios en las características espectroscópicas (p. ej., fluorescencia, absorbancia, índice de refracción), propiedades hidrodinámicas (p. ej., forma), cromatográficas o propiedades de solubilidad para la proteína, medir marcadores inducibles o la activación transcripcional de un gen, como SIRT3 o AceCS2; medir la actividad de unión, p. ej., la unión de un SIRT3 a un AceCS2; ensayar la actividad de desacetilación de SIRT3; determinar el estado de acetilación de un AceCS2; medir la proliferación celular, medir la apoptosis, medir la localización subcelular de un polipéptido, como SIRT3 o AceCS2; medir la producción de acetil-CoA o AMP; medir la reducción de un nivel de acetato, un nivel de ATP o un nivel de CoA, o similares. La determinación del efecto funcional de un agente sobre una enfermedad, trastorno, cáncer u otra patología también se puede realizar usando ensayos conocidos por los expertos como ensayos *in vitro*, p. ej., proliferación celular; factor de crecimiento o dependencia del suero, ARNm y expresión de proteínas en las células, y otras características de las células. Los efectos pueden ser evaluados por muchos medios conocidos por los expertos, p. ej., microscopia para mediciones cuantitativas o cualitativas de alteraciones en las características morfológicas, mediciones de cambios en el ARN o los niveles de proteína, medición de la estabilidad del ARN, identificación de la expresión génica corriente abajo o la expresión del gen reportero (CAT, luciferasa, -gal, GFP y análogos), p. ej., a través de quimioluminiscencia, fluorescencia, reacciones colorimétricas, unión de anticuerpos, marcadores inducibles, ensayos de unión al ligando, ensayos de apoptosis, medición de la producción de acetil-CoA y AMP, y similares. “Efectos funcionales” incluyen actividades *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo*.

Según se usan en este documento, “trastorno”, “enfermedad” o “patología” se usan inclusivamente y se refieren a cualquier desviación de la estructura o función normal de cualquier parte, órgano o sistema del organismo (o cualquiera de sus combinaciones). Una enfermedad específica se manifiesta por síntomas y signos característicos, que incluyen cambios biológicos, químicos y físicos, y a menudo se asocia a una diversidad de otros factores incluidos, pero no exclusivamente, factores demográficos, ambientales, laborales, genéticos y antecedentes médicos. Ciertos signos y síntomas característicos, y factores relacionados se pueden cuantificar a través de diversos métodos para producir información diagnóstica importante.

Según se usa en este documento, “cantidad eficaz”, “dosis eficaz”, “cantidad suficiente”, “cantidad eficaz para”, “cantidad terapéuticamente eficaz” o sus equivalentes gramaticales significan una dosis suficiente para producir un resultado deseado, para mejorar, o de alguna manera, reducir un síntoma o detener o revertir el empeoramiento de una afección. En algunas realizaciones, el resultado deseado es un aumento en la localización mitocondrial de un SIRT3. En otras realizaciones, el resultado deseado es un aumento en la localización mitocondrial de un AceCS2.

En aún otras realizaciones, el resultado deseado es un aumento en la actividad de desacetilación de SIRT3. En otra realización, el resultado deseado es un aumento o una disminución en el estado de acetilación de AceCS2. En aún otras realizaciones, el resultado deseado es un aumento o una disminución en la generación de acetil-CoA y AMP usando acetato, ATP y CoA como sustrato (véase FIG. 11). En todavía otra realización, el resultado deseado es una disminución en el nivel de acetato. El mejoramiento de un síntoma o de una afección particular por administración de una composición farmacéutica descrita en este documento se refiere a cualquier reducción, ya sea permanente o temporal, duradera o transitoria que se pueda asociar a la administración de la composición farmacéutica. Una “cantidad eficaz” se puede administrar *in vivo* e *in vitro*.

Un polipéptido o ácido nucleico “entero” se refiere a una secuencia de polipéptidos o polinucleótidos, o a una de sus variantes, que contiene todos los elementos contenidos normalmente en una o más secuencias de polinucleótidos o polipéptidos de origen natural. “Enterito” puede ser antes o después de varias etapas de procesamiento post traducción o corte y empalme, incluidos corte y empalme alternativo y escisión del péptido señal.

El término “heterólogo” cuando se usa con referencia a porciones de un ácido nucleico indica que el ácido nucleico comprende dos o más subsecuencias que no se encuentran en la misma relación que otra en la naturaleza. Por ejemplo, el ácido nucleico se produce típicamente de manera recombinante, con dos o más secuencias de genes que no están relacionados dispuestas para hacer un nuevo ácido nucleico funcional, p. ej., un promotor de una fuente y una región de codificación de otra fuente. De manera similar, una proteína heteróloga indica que la proteína comprende dos o más subsecuencias que no se encuentran en la misma relación entre sí en la naturaleza (p. ej., una proteína de fusión).

Una “célula huésped” es una célula de origen natural o una célula transformada que contiene un vector de expresión y soporta la replicación o expresión del vector de expresión. Las células huésped pueden ser células cultivadas, explantes, células *in vivo*, y análogos. Las células huésped pueden ser células procariotas como *E. coli*, o células eucariotas como levaduras, células de insectos, células de anfibios, o células de mamíferos como CHO, 293, 3T3, HeLa, y análogos (véase, p. ej., el catálogo de la American Type Culture Collection).

Para los fines de esta invención los términos “se hibrida” o “se hibrida específicamente” se usa para referirse a la capacidad de dos moléculas de ácido nucleico para hibridarse en “condiciones de hibridación rigurosas”. La frase “condiciones de hibridación rigurosas” se refiere a las condiciones bajo la cuales una molécula de ácido nucleico se hibridará a su secuencia diana, típicamente en una mezcla compleja de ácidos nucleicos, pero no detectablemente a otras secuencias. Las condiciones rigurosas son dependientes de las secuencias y serán diferentes en las diferentes circunstancias. Las secuencias más largas se hibridan específicamente a mayores temperaturas. Una guía exhaustiva de la hibridación de ácidos nucleicos se encuentra en Tijssen, *Techniques in Biochemistry and Molecular Biology—Hybridization with Nucleic Probes*, “Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays” (1993). Generalmente, las condiciones rigurosas se seleccionan para ser aproximadamente 5 a 10 °C inferiores a la temperatura de fusión térmica ( $T_m$ ) para la secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos. La  $T_m$  es la temperatura (bajo la fuerza iónica, el pH y la concentración nucleica definidas) a la cual 50% de las sondas complementarias de la diana se hibridan a la secuencia diana en el equilibrio (puesto que las secuencias diana están presentes en exceso, a la  $T_m$ , 50% de las sondas están ocupadas en el equilibrio). Las condiciones rigurosas también se pueden lograr con la adición de un agente desestabilizante como formamida. Para una hibridación selectiva o específica, una señal positiva es al menos dos veces la hibridación de fondo, preferentemente 10 veces la hibridación de fondo. Las condiciones de hibridación rigurosas de ejemplo pueden ser las siguientes: 50% de formamida, 5 × SSC, y 1% de SDS, incubando a 42 °C o, 5 × SSC, 1% de SDS, incubando a 65 °C, con lavado en 0.2 × SSC, y 0.1% de SDS a 50 °C. Los oligonucleótidos antisentido y sus derivados actúan sobre células que producen, p. ej., una proteína codificada por un gen de AceCS2, mediante la unión del ADN o el ARNm que codifica la proteína, la inhibición de su transcripción o traducción, la promoción de la degradación del ARNm y la inhibición de la expresión de la proteína, resultando de esa manera la inhibición de la función de la proteína.

El término “hipercolesterolemia” se refiere a un estado en un sujeto en el cual el nivel de colesterol en la circulación sanguínea es anormalmente elevado.

El término “hiperlipidemia” se refiere a un estado en un sujeto en el cual el nivel de sustancias grasas en la sangre es el mayor de la normal. Las sustancias grasas incluyen colesterol, ésteres de colesterol, fosfolípidos y triglicéridos. Los términos “individuo”, “sujeto”, “huésped” y “paciente” utilizados intercambiamente en este documento, se refieren a un mamífero, incluidos, pero no exclusivamente, murinos, simios, felinos, caninos, equinos, bovinos, animales mamíferos de granja, animales mamíferos para deporte, mascotas mamíferas y humanos. Se prefiere un

humano. En ciertas realizaciones, los términos también incluyen *Xenopus*, pez cebra, tripanosoma, *C. elegans*, *Drosophila*, y levadura.

Según se usa en este documento, “inhibidor” se refiere a un agente que, p. ej., reprime o inactiva la expresión de un polipéptido de la invención o se une a, disminuye, cierra, inactiva, impide, o reduce la activación, desensibiliza o disminuye la actividad de un polipéptido de la invención. Los inhibidores incluyen ácidos nucleicos como ARNip, ARN antisentido y ribozimas que interfieren con la expresión de, p. ej., AceCS2 así como compuestos y agentes de origen natural y sintético, moléculas químicas pequeñas y análogos. Los ensayos para activadores (véase precedentemente y en este documento) también se pueden usar como ensayos para inhibidores. Las muestras o ensayos que comprenden AceCS2 que son tratados con un inhibidor potencial se comparan con muestras de control sin el inhibidor para examinar la magnitud del efecto. A las muestras de control (sin tratar con los agentes con potencial terapéutico) se les asigna un valor de actividad relativa de 100%. La inhibición del polipéptido se logra cuando el valor de la actividad en comparación con la del control se reduce en 10%, opcionalmente en 20%, opcionalmente en 30%, opcionalmente en 40%, opcionalmente en 50%, 60%, 70%, 80% o 90 a 100%.

Según se usa en este documento, “*in vitro*” significa fuera del cuerpo del organismo del cual se obtiene una célula o células o del cual se aísla una línea celular.

Según se usa en este documento, “*in vivo*” significa dentro del cuerpo del organismo del cual se obtiene una célula o células o del cual se aísla una línea celular.

Según se usa en este documento, la expresión “afección cetogénica” se refiere a una afección en un individuo caracterizada por la liberación hepática de cantidades sustanciales de acetato a la circulación sanguínea (Buckley y Williamson, 1977, *Biochem J* 166:539-45; Seufert *et al.*, 1974, *Biochem Biophys Res Commun* 57:901-9; Yamashita *et al.*, 2001, *Biochim Biophys Acta* 1532:79-87). Una afección cetogénica puede ser el efecto de un ayuno prolongado o diabetes. Además, la acetil-CoA hidrolasa hepática, que produce acetato, se activa en afecciones cetogénicas (Matsunaga *et al.*, 1985, *Eur J Biochem* 152, 331-6).

Un “marcador” o una “porción detectable” es una composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, químicos u otros medios físicos. Por ejemplo, los marcadores útiles incluyen <sup>3</sup>H, <sup>125</sup>I, <sup>32</sup>P, <sup>14</sup>C, tinturas fluorescentes, reactivos electrodenso, enzimas (p. ej., como las utilizadas comúnmente en ELISA), biotina, digoxigenina o haptenos y proteínas u otras entidades que se pueden tornar detectables, p. ej., incorporando un radiomarcador en un SIRT3, un AceCS2, un sustrato de SIRT3 (p. ej., NAD o un polipéptido) o un sustrato de AceCS2 (p. ej., acetato), o un compuesto de molécula pequeña. Un marcador preferido es <sup>14</sup>C, preferentemente en un grupo acetilo.

Según se usa en este documento, “nivel de un ARNm” en una muestra biológica se refiere a la cantidad de ARNm transcrito de un gen que está presente en una célula o una muestra biológica. El ARNm codifica generalmente una proteína funcional, aunque puede haber mutaciones presentes que alteren o eliminen la función de la proteína codificada. Un “nivel de ARNm” no necesita ser cuantificado, sino simplemente detectado, p. ej., una detección visual, subjetiva, por un humano, con o sin comparación con un nivel de una muestra de control o un nivel esperado de una muestra de control. Un ARNm preferido es un ARNm de SIRT3 o un ARNm de AceCS2.

Según se usa en este documento, “nivel de un polipéptido” en una muestra biológica se refiere a la cantidad de polipéptido traducido de un ARNm que está presente en una célula o una muestra biológica. El polipéptido puede tener o no actividad de proteína. Un “nivel de polipéptido” no necesita ser cuantificado, sino simplemente detectado, p. ej., una detección visual, subjetiva, por un humano, con o sin comparación con un nivel de una muestra de control o un nivel esperado de una muestra de control. Un polipéptido preferido es un polipéptido SIRT3 o un AceCS2.

Según se usa en este documento, “mamífero” significa o se refiere a la clase mamífero que incluyen las órdenes carnívoros (p. ej., perros y gatos), roedores (p. ej., ratones, cobayos y ratas), y primates (p. ej., humano, chimpancés y monos).

Los términos “modular”, “modulación” o “que modula” son conocidos en el área y se refieren al aumento regulado (es decir, activación, estimulación, incremento), o la disminución regulada (es decir, inhibición, supresión, reducción, o disminución) de una respuesta, o las dos en combinación o separadas.

Según se usa en ese documento, un “modulador” del nivel o la actividad de un polipéptido, como un AceCS2, incluye un activador y/o inhibidor de ese polipéptido y se usa para referirse a agentes que activan o inhiben el nivel de expresión del polipéptido o una actividad del polipéptido. Un polipéptido preferido es AceCS2.

Según se usa en este documento, un “complejo multiproteína” se refiere al enlace y la unión no covalente de dos o más polipéptidos entre sí.

Según se usa en este documento, una molécula de ácido nucleico “de origen natural” se refiere a una molécula de ARN o ADN que tiene una secuencia de nucleótidos que se encuentra en la naturaleza. Por ejemplo una molécula de ácido nucleico de origen natural puede codificar una proteína natural.

Según se usa en este documento, un polipéptido “de origen natural” se refiere a una molécula de polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que se encuentra en la naturaleza.

5 Según se usa en este documento, “ácido nucleico” u “oligonucleótido” o “polinucleótido” o sus equivalentes gramaticales, significa al menos dos nucleótidos enlazados covalentemente entre sí. Los oligonucleótidos tienen típicamente aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 25, 30, 40, 50 o más nucleótidos de longitud, hasta aproximadamente 100 nucleótidos de longitud. Los ácidos nucleicos y los polinucleótidos son polímeros de cualquier longitud, que incluye longitudes mayores, p. ej., 200, 300, 500, 1000, 2000, 3000, 5000, 7000, 10 000, etc. un ácido nucleico de la presente invención contendrá generalmente enlaces fosfodiéster, aunque en algunos casos, se incluyen análogos de ácidos nucleicos que pueden tener esqueletos alternativos, que comprenden, p. ej., uniones fosforoamidato, fosforotioato, fosforoditioato u O-metilfosforoamidita (véase, Eckstein, *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, Oxford University Press); y esqueletos y uniones de ácidos nucleicos peptídicos.

15 Otros ácidos nucleicos análogos incluyen aquellos con esqueletos positivos, esqueletos no iónicos y esqueletos no ribosa, incluidos los descritos en las patentes de los Estados Unidos N° 5,235,033 y 5,034,506, y los capítulos 6 y 7, ASC Symposium Series 580, *Carbohydrate Modifications in Antisense Research*, Sanghui & Cook, eds. Los ácidos nucleicos que contienen uno o más azúcares carbocíclicos también están incluidos en la definición de ácidos nucleicos. Las modificaciones del esqueleto ribosa-fosfato se pueden hacer por diversas razones, p. ej. para aumentar la estabilidad y la semivida de dichas moléculas en ambientes fisiológicos o como sondas en un biochip. Se pueden preparar mezclas de ácidos nucleicos de origen natural y análogos; alternativamente, se pueden preparar mezclas de diferentes análogos de ácidos nucleicos, y mezclas de ácidos nucleicos de origen natural y análogos.

25 Diversas referencias dan a conocer dichos análogos de ácidos nucleicos, incluidas por ejemplo, uniones fosforamidato (Beaucage *et al.*, *Tetrahedron* 49(10):1925 (1993) y sus referencias; Letsinger, *J. Org. Chem.* 35:3800 (1970); Sprinzl *et al.*, *Eur. J. Biochem.* 81:579 (1977); Letsinger *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 14:3487 (1986); Sawai *et al.*, *Chem. Lett.* 805 (1984), Letsinger *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 110:4470 (1988); y Pauwels *et al.*, *Chemica Scripta* 26:141 91986)), fosforotioato (Mag *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 19:1437 (1991); y la patente de los Estados Unidos N° 5,644,048), fosforoditioato (Briu *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 111:2321 (1989), O-metilfosforoamidita (véase, Eckstein, *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, Oxford University Press) y esqueletos y uniones de ácidos nucleicos peptídicos (véase, Egholm, *J. Am. Chem. Soc.* 114:1895 (1992); Meier *et al.*, *Chem. Int. Ed. Engl.* 31:1008 (1992); Nielsen, *Nature* 365:566 (1993); Carlson *et al.*, *Nature* 380:207 (1996), todas las cuales se incorporan aquí por referencia). Otros ácidos nucleicos análogos incluyen los que tienen esqueletos positivos (Denpcy *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:6097 (1995), esqueletos no iónicos (Patente de los Estados Unidos N° 5,386,023, 5,637,684, 5,602,240, 5,216,141 y 4,469,863; Kiedrowski *et al.*, *Angew. Chem. Intl. Ed. English* 30:423 (1991); Letsinger *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 110:4470 (1988); Letsinger *et al.*, *Nucleoside & Nucleotide* 13:1597 (1994); capítulos 2 y 3, ASC Symposium Series 580, “*Carbohydrate Modifications in Antisense Research*”, Ed. Y. S. Sanghui y P. Dan Cook; Mesmaeker *et al.*, *Bioorganic & Medicinal Chem. Lett.* 4:395 (1994); Jeffs *et al.*, *J. Biomolecular NMR* 34:17 (1994); *Tetrahedron Lett.* 37:743 (1996)) y esqueletos no ribosa, incluidos los descritos en las patentes de los Estados Unidos N° 5,235,033 y 5,034,506, y en los capítulos 6 y 7, ASC Symposium Series 580, “*Carbohydrate Modifications in Antisense Research*”, Ed. Y. S. Sanghui y P. Dan Cook. Los ácidos nucleicos que contienen uno o más azúcares carbocíclicos también están incluidos en una definición de ácidos nucleicos (véase, Jenkins *et al.*, *Chem. Soc. Rev.* pp 169 176 (1995)). Varios análogos de ácidos nucleicos se describen en Rawls, *C & E News* Jun. 2, 1997 página 35.

Otros análogos incluyen ácidos nucleicos peptídicos (ANP) que son análogos de ácidos nucleicos peptídicos. Esos esqueletos son sustancialmente no iónicos en condiciones neutras, en contraste con el esqueleto fosfodiéster altamente cargado de los ácidos nucleicos de origen natural. Esto da lugar a dos ventajas. Primero, el esqueleto del APN presenta una cinética de hibridación mejorada. Los APN tienen cambios más grandes en la temperatura de fusión ( $T_m$ ) para los pares de bases que no se corresponden frente a los pares de bases que se corresponden perfectamente. El ADN y el ARN tienen una caída de 2 a 4 °C en la  $T_m$  para una no correspondencia interna. Con el esqueleto no iónico del APN, la caída es próxima a 7 a 9 °C. De manera similar, debido a su naturaleza no iónica, la hibridación de las bases unidas a esos esqueletos es relativamente insensible a la concentración de sal. Además, los APN no son degradados por las enzimas celulares, y por consiguiente pueden ser más estables.

Los ácidos nucleicos pueden ser monocatenarios o bicatenarios, según se especifica, o contener porciones tanto de una secuencia bicatenaria como monocatenaria. Como entenderán los expertos, la descripción de una sola hebra también definen la secuencia de la hebra complementaria; por lo tanto las secuencias descritas en este documento también proporcionan el complemento de la secuencia. El ácido nucleico puede ser ADN, tanto genómico como ADNc, ARN o un híbrido, donde el ácido nucleico puede contener combinaciones de desoxirribo- y ribo-nucleótidos, y combinaciones de bases, incluidas uracilo, adenina, timina, citosina, guanina, inosina, xantina, hipoxantina, isocitosina, isoguanina, etc. “Transcrito” se refiere típicamente a ARN de origen natural, p. ej., a pre-ARNm, ARNhn o ARNm. Según se usa en este documento el término “nucleósido” incluye nucleótidos y nucleósidos y análogos de

nucleótidos, y nucleósidos modificados como nucleósidos modificados con amino. Además, “nucleósido” incluye estructuras análogas que no son de origen natural. Por lo tanto, p. ej., a las unidades individuales de un ácido nucleico peptídico, que cada una contiene una base, se hace referencia en este documento como nucleósido.

5 Según se usa en este documento, “farmacéuticamente aceptable” se refiere a composiciones que son fisiológicamente tolerables y que no producen típicamente una reacción alérgica o similar perjudicial cuando se la administra a un sujeto, preferentemente un sujeto humano. Preferentemente, según se usa en este documento, la expresión “farmacéuticamente aceptable” significa aprobada por un organismo regulador de un gobierno federal o estatal listada en la farmacopea de los Estados Unidos (USP) u otra farmacopea reconocida en general para usar en animales, y más particularmente en humanos.

10 Según se usa en este documento, “polipéptido” y “proteína” se usan de manera intercambiable para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. Los términos también se aplican a polímeros de aminoácidos en los cuales uno o más residuos de aminoácidos es una imitación química artificial del correspondiente aminoácido de origen natural, además de los polímeros de aminoácidos de origen natural, los que contienen residuos modificados, y los polímeros de aminoácidos que no son de origen natural. Los polipéptidos preferidos son SIRT3 y AceCS2.

15 El término “promotor” se refiere a una secuencia de ácido nucleico que comprende una o más regiones reguladoras que controlan la transcripción de un gen de SIRT3 o un gen de AceCS2. En algunas realizaciones, un promotor es un promotor humano.

20 Un polipéptido o una proteína “purificado(a)” o “aislado(a)” está sustancialmente exento(a) de material celular u otras proteínas contaminantes de la célula o el tejido de los cuales deriva la proteína, o sustancialmente exento(a) de precursores químicos u otros productos químicos cuando es sintetizada químicamente. “Sustancialmente exenta” significa que la proteína de interés en la preparación es al menos 100% pura. En una realización, la preparación de la proteína tiene menos de aproximadamente 30%, 20%, 10% y más preferentemente 5% (en peso seco), de un componente contaminante (p. ej., una proteína que no es de interés, precursores químicos, etc.). Cuando la proteína o su porción biológicamente activa es producida recombinantemente, también está preferentemente exenta de medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menos de aproximadamente 20%, más preferentemente menos de aproximadamente 10%, y muy preferentemente menos de aproximadamente 5% del volumen de la preparación de proteína.

25 El término “recombinante” cuando se usa con referencia a, p. ej., una célula, un ácido nucleico, una proteína o un vector, indica que la célula, el ácido nucleico, la proteína o el vector fue modificado mediante la introducción de un ácido nucleico o una proteína heterólogos o la alteración de un ácido nucleico o una proteína nativos, o que la célula deriva de una célula modificada de esa manera. Por lo tanto, p. ej., las células recombinantes expresan genes que no se encuentran en la forma nativa (no recombinante) de la célula o expresan genes nativos que de otra forma son expresados anormalmente, expresados por debajo de lo normal o no son expresados en absoluto. Mediante la expresión “ácido nucleico recombinante” se quiere dar a entender un ácido nucleico, originalmente formado *in vitro*, en general, mediante la manipulación de ácido nucleico, p. ej., usando polimerasas y endonucleasas, en una forma que no se encuentra normalmente en la naturaleza. De esta manera, se logra una unión operable de diferentes secuencias. Por lo tanto un ácido nucleico aislado, en forma lineal, o un vector de expresión formado *in vitro* ligando moléculas de ADN que normalmente no se unen, ambos se consideran recombinantes a los efectos de esta invención. Se entiende que una vez que se prepara un ácido nucleico y se reintroduce en una célula u organismo huésped, no se replicará de manera no recombinante, es decir, usando la maquinaria celular *in vivo* de la célula huésped en vez de manipulaciones *in vitro*, no obstante, dichos ácidos nucleicos, una vez producido de manera recombinante, aunque sean replicados subsiguientemente de manera no recombinante, se siguen considerando recombinantes a los efectos de la invención. De manera similar, una “proteína recombinante” es una proteína preparada usando técnicas de recombinación, es decir, a través de la expresión de un ácido nucleico recombinante según se describió antes.

35 Según se usa en este documento, el término “sales” se refiere a sales de un principio activo o agente de la presente invención, como un activador de SIRT3 o un modulador de AceCS2, que se preparan con ácidos o bases relativamente atóxicos, dependiendo de los sustituyentes particulares encontrados en los compuestos descritos en este documento. Cuando los compuestos, agentes y moléculas pequeñas de la presente invención contienen funcionalidades relativamente ácidas, se pueden obtener sales de adición de base poniendo en contacto la forma neutra de dichos compuestos con una cantidad suficiente de la base deseada, sola o en un solvente inerte adecuado. Los ejemplos de sales de adición de base farmacéuticamente aceptables incluyen sales de sodio, potasio, calcio, amonio, amino orgánico o magnesio, o una sal similar. Cuando los compuestos, agentes y moléculas pequeñas de la presente invención contienen funcionalidades relativamente básicas, se pueden obtener sales de adición de ácido poniendo en contacto la forma neutra de dichos compuestos con una cantidad suficiente del ácido deseado, sola o en un solvente inerte adecuado. Los ejemplos de las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos como ácido clorhídrico, bromhídrico, nítrico, carbónico, monohidrogenocarbónico, fosfórico, monohidrogenofosfórico, dihidrogenofosfórico, sulfúrico,

monohidrogenosulfúrico, yodhídrico, o ácidos fosforosos y análogos, así como las sales derivadas de ácidos orgánicos relativamente atóxicos como el ácido acético, propiónico, isobutírico, maleico, malónico, benzoico, succínico, subérico, fumárico, mandélico, ftálico, benzenosulfónico, p-tolilsulfónico, cítrico, tartárico, metanosulfónico y análogos. También están incluidas las sales de aminoácidos como arginato y análogos, y sales de ácidos orgánicos como glucurónico o galacturónico y análogos (véase, p. ej., Berge *et al.*, 1977, *J Pharm Science* 66:1-19). Ciertos agentes específicos de la presente invención contienen funcionalidades tanto básicas como ácidas que permiten a los agentes ser convertidos en sales de adición de ácido o de base.

Las formas neutras de los agentes y las moléculas pequeñas de la presente invención pueden ser regeneradas poniendo en contacto la sal con una base o ácido y aislando el compuesto generador de manera convencional. La forma generadora del agente y de la molécula pequeña difiere de las diversas sales en ciertas propiedades físicas, como la solubilidad en solventes polares, pero por lo demás las sales son equivalentes a la forma generadora del compuesto, el agente y la molécula pequeña para los fines de la presente invención.

Según se usa en este documento, el término "sirtuina" se refiere a un miembro de la familia de las proteínas sirtuinas desacetilasa, preferentemente la familia Sir2, que incluye la Sir2 de levadura (p. ej., GenBank N° de registro P53685), Sir-2.1 de *C. elegans* (p. ej., GenBank N° de registro NP\_01912), y las proteínas SIRT1 humana (p. ej., GenBank N° de registro Q96EB6, NP\_036370, y AAD40849), y SIRT2 humana (p. ej., GenBank N° de registro NM\_030593, AF083107, AAD40850, CAD43717, ABB72675, NP\_085096, AAH03547). Otros miembros de la familia incluyen los cuatro genes adicionales semejantes a la Sir2 de levadura denominados "genes HST" (homólogos de Sir2) HST1, HST2, HST3 y HST4, y los otros cinco homólogos humanos hSIRT3 (p. ej., GenBank N° de registro NP\_036371, AAH01042, AAD40851 y Q9NTG7), hSIRT4 (p. ej., GenBank N° de registro NP\_036372, AAI09321, AA109320, AAD40852 y Q9Y6E7), hSIRT5 (p. ej., GenBank N° de registro CA119838, CA119837, NP\_112534, NP\_036373 y AAH001216), hSIRT6 (p. ej., GenBank N° de registro NP\_057623, AAH05026, AAH04218 y AAH28220), y hSIRT7 (p. ej., GenBank N° de registro NP\_057622, AAH17305, AAI01794 y AAI01792) (Brachmann *et al.*, 1995, *Genes Dev* 9:2888-902 y Frye, 1999, *Biochem Biophys Res Commun* 260(1):273-279; Frye, 2000, *Biochem Biophys Res Commun* 273(2):793-798). Las sirtuinas preferidas son las que comparten más similitudes con SIRT3, más preferentemente una hSIRT3.

Según se usa en este documento, el término "SIRT3" se refiere a ácidos nucleicos, polipéptidos y variantes polimórficas, alelos, mutantes y sus homólogos interespecie y como se describe en más detalle en este documento, que: (1) tienen una secuencia de aminoácidos que tiene más de aproximadamente 60% de identidad de aminoácidos, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, preferentemente 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% o más de identidad de secuencia de aminoácidos, preferentemente en una región de al menos aproximadamente 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, o 400 o más aminoácidos, a una secuencia SIRT3 como la depositada en GenBank N° de registro NP\_036371, AAH01042, AAD40851, NM\_001017524 o Q9NTG7; (2) se une a anticuerpos, p. ej., anticuerpos policlonales, generados contra un inmunógeno que comprende una secuencia de aminoácidos como la depositada en GenBank N° de registro NP\_036371, AAH01042, AAD40851, NM\_001017524 o Q9NTG7 o sus variantes modificadas conservadoramente o uno de sus fragmentos; (3) se une a un polipéptido AceCS2; (4) modula al menos parcialmente e indirectamente la producción de acetil-CoA y AMP; (5) desacetila un polipéptido AceCS2 acetilado, (6) se hibrida específicamente en condiciones de hibridación rigurosas a una secuencia de ácido nucleico como la depositada en GenBank N° de registro NP\_036371, AAH01042, AAD40851 y Q9NTG7, o sus variantes modificadas conservadoramente; (7) tiene una secuencia de ácido nucleico que tiene más de aproximadamente 90%, preferentemente más de aproximadamente 96%, 97%, 98%, 99%, o más de identidad de secuencia de nucleótidos, preferentemente en una región de al menos aproximadamente 30, 50, 100, 200, 500, 1000, 1500, 2000 o más nucleótidos, a secuencias de ácidos nucleicos como las depositadas en GenBank N° de registro NM-012239, BC001042 o AF083108; (8) tiene al menos 25, a menudo 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350 o 400 residuos de aminoácidos contiguos de un polipéptido cuya secuencia está depositada en GenBank N° de registro NP\_036371, AAH01042, AAD40851 o Q9NTG7; y/o al menos 25, a menudo 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1500, 2000 o más nucleótidos contiguos de una secuencia de ácidos nucleicos como la depositada en GenBank N° de registro NM\_012239, BC001042 o AF083108.

Un polinucleótido SIRT3 o una secuencia de polipéptido es típicamente de un humano, pero puede ser de otros mamíferos como, pero no exclusivamente, un primate no humano, un roedor, p. ej., una rata, un ratón o un hámster; una vaca, un cerdo, un caballo, una oveja u otro mamífero. En ciertas realizaciones, es deseable usar un SIRT3 de levadura, *Drosophila*, tripanosoma, pollo, *C. elegans* o *Xenopus*. Un polipéptido y un polinucleótido "SIRT3" incluye tanto la forma de origen natural como recombinante. Por consiguiente, en algunas realizaciones, un polipéptido SIRT3 y un polipéptido con subdominio SIRT3 como los descritos en este documento pueden comprender una secuencia que corresponde a una secuencia de polipéptido SIRT3 humana. Por lo tanto, secuencias de polipéptidos SIRT3 de ejemplo se proporcionan en este documento y se conocen en el área. Por ejemplo, los números de registro GenBank para polipéptidos SIRT3 humanos son NP\_036371, AAH01042, AAD40851, NM\_001017524 y Q9NTG7. Los números de registro GenBank para polipéptidos SIRT3 de ratón son, por ejemplo, CAJ18608, Q8R104, AAH25878 y NP\_071878; para SIRT3 de rata, XP\_215124; para SIRT3 bovino, XP\_869883 y XP\_879073; para SIRT3 canino, XP\_848300, XP\_855809, y XP\_856096; para SIRT3 de pez cebra, XP\_684225 y XP690925.

Secuencias de polinucleótidos SIRT3 de ejemplo se proporcionan en este documento y se conocen en el área. Por ejemplo, los números de registro GenBank para ácidos nucleicos SIRT3 humanos son NM\_012239, BC001042, NM\_001017524 y AF083108. Los números de registro GenBank para ácidos nucleicos SIRT3 de ratón son, por ejemplo, CT010402, BC025878 y NM\_022433; para SIRT3 de rata, XM\_215124; para SIRT3 bovino, XM\_864790 y XM\_873980; para SIRT3 canino, XM\_843207, XM\_850716 y XM\_851003; y para SIRT3 de pez cebra, XM\_679133 y XM\_685833.

En algunas realizaciones el polipéptido SIRT3 puede ser un polipéptido SIRT3 “entero”. El término “entero” según se usa en este documento se refiere a un polipéptido que tiene al menos la longitud de un polipéptido SIRT3 de origen natural. Un polipéptido SIRT3 “entero” o uno de sus fragmentos puede también incluir otras secuencias por ejemplo una etiqueta de purificación (como FLAG o HA), u otros compuestos unidos (como un fluoróforo, un marcador o un cofactor unidos).

Por “ARN interferente pequeño”, “ARN interferente corto”, o “ARNip” se quiere dar a entender una molécula de ARN aislada, preferentemente mayor de 10 nucleótidos de longitud, más preferentemente mayor de 15 nucleótidos de longitud, y muy preferentemente de 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos de longitud que funciona como un producto intermedio clave para disparar la degradación del ARN específico de secuencia. Un tramo de 19 a 25 nucleótidos es el tamaño que más se prefiere para los ARNip. Los ARNip también pueden incluir ARN horquillado corto (ARNhc) en el cual ambas hebras de un ARNip bicatenario están incluidas en una molécula de ARN monocatenario. Los ARNip bicatenarios constan generalmente de una hebra sentido y una antisentido. Los ARNip monocatenarios constan de una sola hebra antisentido que es complementaria del gen o ARNm diana. El ARNip incluye cualquier forma de ARN, preferentemente ARNbc (productos escindidos proteolíticamente de ARNbc más largo, ARN parcialmente purificado, ARN esencialmente puro, ARN sintético, ARN producido recombinantemente) así como ARN modificado que difiere del ARN de origen natural por adición, delección, sustitución y/o alteración de uno o más nucleótidos.

Una “molécula pequeña” es una molécula que tiene un peso molecular de menos de 5, 2, 1 o 0,5 kDa. En muchas realizaciones, dichas moléculas pequeñas no incluyen un enlace peptídico o un enlace fosfodiéster. Por ejemplo, pueden no ser poliméricas. En algunas realizaciones, la molécula tiene un peso molecular de al menos 50, 100, 200 o 400 Dalton.

Los términos “subdominio”, “dominio”, “dominio funcional”, o equivalentes gramaticales en el contexto de una proteína, como una SIRT3 o una AceCS2, se refieren a un fragmento de esa proteína, como un fragmento de SIRT3 o de AceCS2, que participa en una interacción, p. ej., una interacción intramolecular o intermolecular, p. ej., una interacción de unión o catalítica. Una interacción intermolecular puede ser una interacción de unión específica o una interacción enzimática (p. ej., la interacción puede ser transitoria y se forma o se rompe un enlace covalente). Una interacción intermolecular puede ser entre la proteína y otra proteína, entre la proteína y otro compuesto, o entre una primera molécula y una segunda molécula de la proteína (p. ej., una interacción de dimerización). Las porciones biológicamente activas/los dominios funcionales de una proteína incluyen péptidos que contienen secuencias de aminoácidos suficientemente homólogas a, o derivadas de, la secuencia de aminoácidos de la proteína, que incluye menos aminoácidos que la proteína natural entera y tiene al menos una actividad de la proteína natural. Las porciones biológicamente activas/los dominios funcionales pueden ser identificados mediante una diversidad de técnicas que incluyen análisis de truncamiento, mutagénesis dirigida al sitio y proteólisis. Los mutantes o fragmentos proteolíticos se pueden analizar para determinar su actividad mediante un ensayo bioquímico o biológico (p. ej., genético) adecuado. En algunas realizaciones, un dominio funcional está plegado independientemente. Típicamente, los fragmentos biológicamente activos contienen un dominio o un motivo con al menos una actividad de las proteínas, p. ej., un dominio catalítico central de SIRT3 o AceCS2. Una porción biológicamente activa/un dominio funcional de una proteína puede ser un polipéptido que tenga, por ejemplo, 10, 25, 50, 100, 200 o más aminoácidos de longitud. Las porciones biológicamente activas/el dominio funcional de una proteína, como SIRT3 (i) se pueden unir a un polipéptido AceCS2, (ii) tener actividad de desacetilación, (iii) ensamblarse en un complejo multiproteína, que comprenda p. ej., AceCS2 o (iv) pueden desacetilar a AceCS2. Las porciones biológicamente activas/el dominio funcional de una proteína, como una AceCS2 (i) se pueden unir a un polipéptido SIRT3, (ii) tener actividad enzimática, (iii) ensamblarse en un complejo multiproteína, que contenga p. ej., SIRT3, (iv) generar acetil-CoA y AMP usando acetato, ATP y CoA como sustrato, o localizarse en la mitocondria.

Un polipéptido “relacionado” según se usa en este documento, se refiere a un homólogo, una isoforma, un ortólogo, una proteína de fusión o fragmentos de un polipéptido o cualquiera de sus combinaciones.

Un “homólogo de SIRT3” o “un homólogo de AceCS2” se refiere a un polipéptido que contiene una secuencia de aminoácidos similar a la de SIRT3 o AceCS2, respectivamente, pero que no necesariamente posee una función similar o idéntica a la de SIRT3 o AceCS2.

Una “isoforma de SIRT3” o “isoforma de AceCS2” se refiere a una variante de SIRT3 o de AceCS2, respectivamente, que es codificada por el mismo gen, pero difiere en su pl o PM, o en ambos. Dichas isoformas

pueden diferir en su composición de aminoácidos (p. ej. como resultado de corte y empalme alternativo o proteólisis limitada) y además, o alternativamente, pueden surgir de modificaciones post traduccionales diferenciales (p. ej., glucosilación, acetilación o fosforilación).

5 Un “ortólogo de SIRT3” o “ortólogo de AceCS2” según se usa en este documento se refiere a un polipéptido no humano que (i) comprende una secuencia de aminoácidos similar a la de SIRT3 humana o AceCS2 humana, respectivamente, y (ii) posee una función similar o idéntica a la de SIRT3 humana o la de AceCS2 humana, respectivamente.

10 Una “proteína de fusión de SIRT3 ” según se usa en este documento se refiere a un polipéptido que contiene (i) una secuencia de aminoácidos de un SIRT3, un fragmento de SIRT3, un polipéptido con subdominio de SIRT3, un polipéptido relacionado a SIRT3 o un fragmento de un polipéptido relacionado a SIRT3 y (ii) una secuencia de aminoácidos de un polipéptido heterólogo (es decir un no-SIRT3, un fragmento de no-SIRT3 o un polipéptido relacionado no-SIRT3). De manera similar, una “proteína de fusión de AceCS2” según se usa en este documento se refiere a un polipéptido que contiene (i) una secuencia de aminoácidos de una AceCS2, un fragmento de AceCS2, un polipéptido con subdominio AceCS2, un polipéptido relacionado a AceCS2 o un fragmento de un polipéptido relacionado a AceCS2 y (ii) una secuencia de aminoácidos de un polipéptido heterólogo (es decir un no-AceCS2, un fragmento no-AceCS2o un polipéptido relacionado no-AceCS2).

20 Según se usa en este documento, el término “solvato” se refiere a compuestos, agentes y moléculas pequeñas de la presente invención que son complejados a un solvente. Los solventes que pueden formar solvatos con los compuestos, agentes y moléculas pequeñas de la presente invención incluyen solventes orgánicos comunes como alcoholes (metanol, etanol, etc.), éteres, acetona, acetato de etilo, solventes halogenados (cloruro de metileno, cloroformo, etc.), hexano y pentano. Otro solventes incluyen agua. Cuando el agua es el solvente complejante, el  
25 complejo se denomina un “hidrato.”

Según se usa en este documento, “sujeto” o “paciente” que va a ser tratado por una patología, trastorno o enfermedad por uno de los métodos en cuestión significa un humano o un animal no humano que necesita tratamiento para una patología, un trastorno o una enfermedad. La expresión “animal no humano” incluye todos los vertebrados, p. ej., mamíferos, como primates no humanos (particularmente primates superiores), oveja, perro, roedor (p. ej., ratón o rata), cobayo, cabra, cerdo, gato, conejo, vaca, y no mamíferos, como pollos, anfibios, reptiles, etc. En una realización preferida, el sujeto es un humano En otra realización, el sujeto es un animal de laboratorio o un animal adecuado como modelo de una enfermedad.

35 Según se usa en este documento, los términos “tratar”, “que trata” y “tratamiento” incluyen : (1) prevenir una patología, un trastorno o una enfermedad, es decir evitar que los síntomas clínicos de la patología, el trastorno o la enfermedad aparezcan en un sujeto que puede estar predispuesto a dicha patología, dicho trastorno o dicha enfermedad pero que aún no presenta ningún síntoma de la patología, el trastorno o la enfermedad; (2) inhibir la patología, el trastorno o la enfermedad es decir detener o reducir la evolución de la patología, el trastorno o la enfermedad o sus síntomas clínicos; o (3) aliviar la patología, el trastorno o la enfermedad, es decir causar el retroceso de la patología, el trastorno o la enfermedad o sus síntomas clínicos. Esos términos abarcan también profilaxis, tratamiento y cura. Tratamiento significa cualquier manera en la cual los síntomas de una patología, un trastorno o una enfermedad se mejoran o se alteran beneficiosamente. Preferentemente, el sujeto que necesita dicho tratamiento es un mamífero, más preferentemente un humano.

45 II. Identificación y análisis de activadores de SIRT3 y moduladores de AceCS2

La presente invención identificó a AceCS2 como la primera diana celular de SIRT3. Además, la presente invención también da a conocer que SIRT3 desacetila a AceCS2 *in vitro* e *in vivo*. Por otra parte, se describe que el estado de acetilación de AceCS2 determina la actividad enzimática de AceCS2, es decir, la generación de acetil-CoA y AMP usando acetato, ATP y CoA como sustrato. Basándose en los descubrimientos descritos en este documento, los inventores de la presente han concebido diversos métodos para identificar agentes que aumenten un nivel o una actividad de SIRT3 y agentes que modulen un nivel, un estado de acetilación o una actividad de AceCS2.

55 Los agentes que activan un SIRT3 o los agentes que modulan un AceCS2 se identifican usando los métodos conocidos en el área y descritos en este documento. Se pueden utilizar varios protocolos de detección sistemática diferentes para identificar agentes que aumentan un nivel o una actividad de un SIRT3 o modulan un nivel o una actividad de un AceCS2. Los términos “identificar” y “detección sistemática” se usan en este documento de manera intercambiable.

60 Se prefieren los agentes que aumentan selectivamente, activan selectivamente o modulan selectivamente un nivel, un estado de acetilación o una actividad de un polipéptido en cuestión. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, un agente que es adecuado para usar en un método de tratamiento como los descritos en este documento y que aumenta (i) un nivel o una actividad de SIRT3 o (ii) modula un nivel, un estado de acetilación o una actividad de AceCS2, es un activador selectivo de SIRT3 o un modulador selectivo de AceCS2, respectivamente. Por



consiguiente, un agente que es un activador selectivo de SIRT3 es un agente que no inhibe ni activa sustancialmente otras enzimas, incluidas, p. ej., otras sirtuinas, p. ej., a la  $CI_{50}$  de SIRT3, el agente no causa más de 5%, más de aproximadamente 10% ni más de aproximadamente 25% de inhibición o activación de otra actividad enzimática de sirtuina. Además, un agente que es un modulador selectivo de AceCS2 es un agente que no inhibe ni activa sustancialmente otras enzimas, incluidas, p. ej., otras enzimas formadoras de AMP, p. ej., a la  $CI_{50}$  de AceCS2, el agente no causa más de aproximadamente 5%, más de aproximadamente 10% ni más de aproximadamente 25% de inhibición o activación de otras enzimas formadoras de AMP.

En ciertas realizaciones de la presente invención, se usa un protocolo de detección sistemática *in vitro*. Otros protocolos de detección sistemática preferidos se pueden usar en células, particularmente células de mamífero, y preferentemente en células humanas. Las células particularmente preferidas para usar en métodos de detección sistemática de la presente invención son una célula cardíaca, muscular o cerebral.

Los polipéptidos utilizados en el método de la presente invención pueden ser polipéptidos de origen natural o polipéptidos recombinantes. En ciertas realizaciones el polipéptido es un polipéptido relacionado a SIRT3 y/o un polipéptido AceCS2.

Según se describe en este documento, un polipéptido SIRT3 o AceCS2 para usar en un método en cuestión puede provenir de diferentes especies, incluidas, pero no exclusivamente, un ser humano, un ratón o una rata. Los polipéptidos SIRT3 y AceCS2 preferidos son los polipéptidos SIRT3 y AceCS2 humanos.

Según se describe más detalladamente en este documento, un polipéptido SIRT3 o AceCS2 puede ser un polipéptido SIRT3 o AceCS2 entero o uno de sus fragmentos o dominios. Además, se pueden usar un polipéptido relacionado a SIRT3 y AceCS2, homólogos de SIRT3 y AceCS2, isoformas de SIRT3 y AceCS2 u ortólogos de SIRT3 y AceCS2 para practicar los métodos y preparar las composiciones de la presente invención. Un fragmento de polipéptido AceCS2 preferido de la presente invención comprende la secuencia  $NH_2$ -KRLPKTRSGKVMRLLRKII-COOH (SEC. ID N°:7) (FIG. 3A). En otras realizaciones preferidas un polipéptido AceCS2 comprende la secuencia  $NH_2$ -CPKTRSG(ac)KVMRLL-COOH (SEC. ID N°:11) que tiene una lisina acetilada (acK642) o  $NH_2$ -CPKTRSGKVMRLL-COOH (SEC. ID N°:12).

Los ensayos de la invención incluyen generalmente uno o más controles. Por lo tanto, una muestra de prueba incluye un agente con potencial terapéutico, y una muestra de control tiene todos los componentes de la muestra de prueba excepto el agente con potencial terapéutico. Generalmente se analizan en paralelo varias mezclas de ensayo con diferentes concentraciones de agente para obtener una respuesta diferencial a las diversas concentraciones. Típicamente, una de esas concentraciones sirve como control negativo, es decir la concentración cero o por debajo del nivel de detección.

Como entenderá un experto, los ensayos de detección sistemática pueden contener diversos reactivos, aparte de los polipéptidos en cuestión. Esos reactivos incluyen tampones, sales, estabilizantes, detergentes, inhibidores de proteasa, inhibidores de nucleasa, antimicrobianos, etc. según se describe en los ejemplos de este documento y se conoce en el área.

Los agentes con potencial terapéutico para aumentar un nivel o una actividad de un SIRT3 o los agentes con potencial terapéutico que modulan un nivel, un estado de acetilación o una actividad de una AceCS2 como los descritos en este documento, se pueden identificar, probar y verificar usando diversos ensayos como los descritos en este documento. Esos ensayos incluyen, pero no exclusivamente, por ejemplo, (i) análisis de transferencia de Northern, (ii) hibridación *in situ*, (iii) análisis de transferencia tipo Western, (iv) ensayos de inmunoprecipitación, (v) inmunohistoquímica, (vi) ensayos basados en células, y (vii) un ensayo *in vivo*, y similares. Los ensayos *in vitro* pueden usar un polipéptido SIRT3 y/o AceCS2 purificado o un complejo multiproteína que contenga un polipéptido SIRT3 y/o AceCS2 según se describe detalladamente en este documento.

Los agentes que aumentan o disminuyen una actividad de un polipéptido en cuestión al grado deseado se pueden seleccionar para estudio posterior, y evaluarles su disponibilidad celular, citotoxicidad, biocompatibilidad, etc.

Un agente con potencial terapéutico se evalúa para determinar cualquier actividad citotóxica que pueda presentar contra la célula utilizada en el ensayo, usando ensayos bien conocidos como ensayo de exclusión del azul de tripano, un ensayo con MTT (bromuro de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazolio]) y similares. Se prefieren los agentes que no presentan actividad citotóxica o los agentes que no presentan una actividad citotóxica significativa.

Una vez que el agente con potencial terapéutico ha sido identificado en uno de los métodos de detección sistemática de la presente invención, y se usa posteriormente en un método, composición o juego de reactivos de la presente invención, típicamente se hace referencia a éste como un agente o un agente biológicamente activo en vez de un agente con potencial terapéutico.

En algunas realizaciones, es de particular interés un agente el cual (i) aumenta la actividad de SIRT3 (ii) aumenta un nivel de un polipéptido SIRT3 en una célula, o (iii) aumenta un nivel de un ARNm de SIRT3 en una célula. También es de particular interés un agente el cual (i) aumenta la actividad de AceCS2 (ii) aumenta un nivel de un polipéptido AceCS2 en una célula, o (iii) aumenta un nivel de un ARNm de AceCS2 en una célula. Dichos agentes son útiles para tratar patologías caracterizadas por un nivel elevado aberrante de acetato o un nivel bajo aberrante de acetil-CoA, p. ej., diabetes tipo II, hipercolesterolemia, hiperlipidemia y obesidad.

En algunas realizaciones, es de particular interés un agente el cual (i) disminuye la actividad de AceCS2 (ii) disminuye un nivel de un polipéptido AceCS2 en una célula, o (iii) disminuye un nivel de un ARNm de AceCS2 en una célula. Dichos agentes son útiles para tratar patologías caracterizadas por un nivel elevado aberrante de acetil-CoA.

#### A. Agentes que activan a SIRT3

En términos generales, los métodos de detección sistemática para identificar un agente que aumente la actividad desacetilasa de SIRT3, implica detectar sistemáticamente una diversidad de agentes. Un método de detección sistemática comprende generalmente los pasos de (a) poner en contacto un agente con potencial terapéutico con (i) un SIRT3 y/o un AceCS2, (ii) con una muestra biológica que contenga un SIRT3 y/o un AceCS2 o (iii) una célula de mamífero que exprese un SIRT3 y/o un AceCS2; y (b) ensayar la actividad del SIRT3 y/o la actividad de un AceCS2 en presencia del agente con potencial terapéutico. Un aumento en la actividad de SIRT3 medida en comparación con la actividad de SIRT3 en un control adecuado (p. ej., un SIRT3 en ausencia de un agente con potencial terapéutico, una muestra biológica que contenga un SIRT3 en ausencia del agente con potencial terapéutico o una célula de mamífero que exprese un SIRT3 en ausencia del compuesto con potencial terapéutico) es una indicación de que el agente con potencial terapéutico activa una actividad de SIRT3.

En un aspecto, los métodos de detección sistemática implican detectar sistemáticamente agentes con potencial terapéutico para identificar un agente que aumente la actividad desacetilasa de un SIRT3. La expresión "aumente un nivel o una actividad de un SIRT3" abarca un aumento en la actividad desacetilasa de SIRT3, cuando se compara con un control adecuado.

En un aspecto, la presente invención proporciona un método para identificar un agente que aumente la actividad desacetilasa de un polipéptido SIRT3. En una realización preferida de la presente invención, este método comprende los pasos de (a) poner en contacto una célula que expresa un polipéptido SIRT3 y un polipéptido AceCS2 con un agente con potencial terapéutico *in vitro* y (b) determinar el efecto, si lo hubiera, del agente con potencial terapéutico sobre el nivel de AceCS2 acetilado en la célula. De ese modo se identifica un agente con potencial terapéutico que aumenta un nivel o una actividad desacetilasa de un polipéptido SIRT3.

En otro aspecto de la presente invención, un método para identificar un agente que aumente la actividad desacetilasa de un polipéptido SIRT3 comprende los pasos de (a) poner en contacto un polipéptido SIRT3 y un polipéptido AceCS2 acetilado en una mezcla de ensayo con un agente con potencial terapéutico y (b) determinar el efecto, si lo hubiera, del agente con potencial terapéutico sobre el nivel de AceCS2 acetilado en la mezcla de ensayo. De ese modo se identifica un agente con potencial terapéutico que aumenta la actividad desacetilasa de un polipéptido SIRT3. Una disminución en un primer nivel de AceCS2 acetilado en la mezcla de ensayo en comparación con un segundo nivel de AceCS2 acetilado en una mezcla de ensayo, que no ha sido tratada con el agente con potencial terapéutico, es indicativa de un agente que aumenta la actividad desacetilasa del polipéptido SIRT3. La mezcla de ensayo comprende NAD<sup>+</sup>.

Determinar el efecto de un agente con potencial terapéutico sobre el nivel de AceCS2 acetilado en la célula o en una mezcla de ensayo se puede realizar de varias maneras. En una realización preferida, este paso comprende un ensayo inmunológico que usa un anticuerpo específico para AceCS2 acetilado según se describe en este documento. Una disminución de un polipéptido AceCS2 acetilado en presencia de un agente con potencial terapéutico es indicativa de un agente que activa un SIRT3.

En otra realización preferida de la presente invención, el AceCS2 contiene un marcador, como un grupo acetilo marcado, preferentemente un grupo acetilo marcado con <sup>14</sup>C. Por lo tanto, en esa realización, el paso de determinación del efecto del agente con potencial terapéutico sobre el nivel de AceCS2 acetilado en la célula o en una mezcla de ensayo se realiza midiendo la liberación del grupo acetilo marcado con <sup>14</sup>C del polipéptido AceCS2 marcado. La liberación del marcador <sup>14</sup>C se puede medir rutinariamente, p. ej., mediante cromatografía seguida de recuento de centelleo. Un aumento del marcador <sup>14</sup>C en presencia de un agente con potencial terapéutico es indicativo de un agente que activa un SIRT3.

Opcionalmente, el método para identificar un agente que aumente la actividad desacetilasa de un SIRT3 comprende el paso de identificar una estructura o secuencia del agente con potencial terapéutico.

Un agente con potencial terapéutico de interés es aquel que aumenta la actividad desacetilasa de SIRT3 en al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 100%, al menos aproximadamente 150%, al menos aproximadamente 200%, al menos aproximadamente 500% o más en comparación con un control adecuado, preferentemente un control en ausencia del agente con potencial terapéutico.

#### 10 B. Agentes que modulan la acetil-CoA sintetasa 2

Los inhibidores y activadores, a los que se hace referencia en este documento como moduladores del estado de acetilación o la actividad de AceCS2, se identifican usando métodos conocidos en el área y descritos en este documento. Se pueden usar una serie de protocolos de detección sistemática diferentes para identificar agentes que modulan un nivel, un estado de acetilación o una actividad de un AceCS2. El término "modular" abarca un aumento o una disminución en el estado de acetilación o la actividad de un AceCS2 cuando se compara con un control adecuado. Los preferidos son los activadores de AceCS2. Sin embargo, en ciertas realizaciones puede ser deseable inhibir un AceCS2.

20 En términos generales, los métodos de detección sistemática implican detectar sistemáticamente una diversidad de agentes para identificar un agente que module el estado de acetilación o la actividad de un AceCS2. El método comprende generalmente los pasos de (a) poner en contacto un agente con potencial terapéutico con (i) un AceCS2, (ii) con una muestra biológica que contenga un AceCS2 o (iii) una célula de mamífero que exprese un AceCS2; y (b) ensayar un estado de acetilación o una actividad de AceCS2 en presencia del agente con potencial terapéutico. Un aumento o una disminución en el estado de acetilación o la actividad medidos en comparación con el estado de acetilación o la actividad del AceCS2 en un control adecuado (p. ej., un AceCS2 en ausencia del agente con potencial terapéutico, una muestra biológica que contenga un AceCS2 en ausencia del agente con potencial terapéutico o una célula de mamífero que exprese un AceCS2 en ausencia del compuesto con potencial terapéutico) es una indicación de que el agente con potencial terapéutico modula un estado de acetilación o una actividad de AceCS2.

#### 30 1. Agentes que modulan un nivel, un estado de acetilación o una actividad de acetil-CoA sintetasa 2

35 En un aspecto de la presente invención, se proporciona un método para identificar un agente que module un estado de acetilación, o una actividad de un polipéptido AceCS2. En una realización preferida de la presente invención, este método comprende los pasos de (a) poner en contacto una célula que expresa un polipéptido AceCS2 con un agente con potencial terapéutico y (b) determinar el efecto, si lo hubiera, del agente con potencial terapéutico sobre el estado de acetilación, o la actividad de AceCS2 en la célula. De ese modo se identifica un agente con potencial terapéutico que modula un estado de acetilación o una actividad de un polipéptido AceCS2.

40 En otro aspecto de la presente invención, el método para identificar un agente que module un estado de acetilación, o una actividad de un polipéptido AceCS2 comprende los pasos de (a) poner en contacto un polipéptido AceCS2 en una mezcla de ensayo con un agente con potencial terapéutico y (b) determinar el efecto, si lo hubiera, del agente con potencial terapéutico sobre estado de acetilación, o la actividad de AceCS2 en la mezcla de ensayo. De ese modo se identifica un agente con potencial terapéutico que modula un estado de acetilación o una actividad de un polipéptido AceCS2.

50 En una realización preferida, la célula o mezcla de ensayo contiene un sustrato para el polipéptido AceCS2. Un sustrato preferido es acetato, que puede estar marcado. En dichas realizaciones, el paso de determinación del efecto del agente con potencial terapéutico sobre la actividad de la AceCS2 puede comprender medir el nivel de acetil-CoA y AMP sintetizados por la AceCS2.

55 Una actividad preferida de la AceCS2 es la conversión enzimática de acetato, ATP y CoA en acetil-CoA y AMP. Por lo tanto, en un aspecto, la presente invención proporciona un método para identificar un agente con potencial terapéutico que module una actividad enzimática de AceCS2. En una realización preferida, este método comprende los pasos de (a) poner en contacto un polipéptido AceCS2 en presencia de un sustrato con un agente con potencial terapéutico y (b) ensayar la actividad enzimática de AceCS2 para identificar el agente con potencial terapéutico que modula la actividad enzimática de AceCS2. De ese modo se identifica un agente con potencial terapéutico que modula una actividad enzimática de un polipéptido AceCS2.

60 Un sustrato preferido es acetato, ATP y/o CoA. En este documento se describen ensayos para determinar la actividad enzimática de AceCS2.

Los agentes que modulan un nivel de AceCS2 incluyen (i) agentes que modulan un nivel de ARNm de AceCS2, p.

ej., activando o inhibiendo la expresión génica de AceCS2 y (ii) agentes que modulan un nivel del polipéptido AceCS2. En este documento se proporcionan métodos para determinar niveles de ARNm y polipéptido.

## 2. Agentes que se unen a la acetil-CoA sintetasa 2

También se describen en este documento métodos para identificar un agente que se una a la acetil-CoA sintetasa 2 (AceCS2). En un aspecto se proporciona un método para identificar un agente que se una al polipéptido AceCS2. En una realización preferida este método comprende los pasos de (a) poner en contacto una célula que expresa un polipéptido AceCS2 con un agente con potencial terapéutico y (b) determinar si el agente con potencial terapéutico se une a AceCS2. De ese modo se identifica un agente con potencial terapéutico que se une a un polipéptido AceCS2.

En otro aspecto el método para identificar un agente que se une a un polipéptido AceCS2 comprende los pasos de (a) poner en contacto un polipéptido AceCS2 en una mezcla de ensayo con un agente con potencial terapéutico y (b) determinar si el agente con potencial terapéutico se une a AceCS2. De ese modo se identifica un agente con potencial terapéutico que se une a un polipéptido AceCS2.

Los polipéptidos AceCS2 útiles para practicar un método en cuestión son polipéptidos AceCS2 de origen natural o AceCS2 producidos recombinantemente.

La unión de un agente con potencial terapéutico a un polipéptido AceCS2 puede ser detectada usando diversos métodos como los descritos en este documento y conocidos en el área.

El polipéptido AceCS2 se puede unir a un soporte sólido antes de ponerse en contacto con el agente con potencial terapéutico. En este documento se describen el acoplamiento de los polipéptidos en cuestión a soportes sólidos, los soportes sólidos y su uso en los métodos.

## 3. Agentes que modulan la interacción entre AceCS2 y SIRT3

Los inventores de la presente han demostrado que AceCS2 interactúa con SIRT3. Por consiguiente, también se describe en este documento un método para identificar agentes que modulen la interacción entre un polipéptido AceCS2 y un polipéptido SIRT3.

En un aspecto, se proporciona un método para identificar un agente que module la interacción entre un polipéptido AceCS2 y un polipéptido SIRT3. En una realización preferida, este método comprende los pasos de (a) poner en contacto una célula que expresa un polipéptido AceCS2 y un polipéptido SIRT3 con un agente con potencial terapéutico y (b) determinar el efecto, si lo hubiera, del agente con potencial terapéutico sobre la interacción de AceCS2 y el polipéptido SIRT3. De esa manera se identifica un agente con potencial terapéutico que modula la interacción entre un polipéptido AceCS2 y un polipéptido SIRT3.

En otra realización, el método para identificar un agente que module la interacción entre un polipéptido AceCS2 y un polipéptido SIRT3 comprende los pasos de (a) poner en contacto una mezcla de ensayo que contiene un polipéptido AceCS2 y un polipéptido SIRT3 con un agente con potencial terapéutico y (b) determinar el efecto, si lo hubiera, del agente con potencial terapéutico sobre la interacción de AceCS2 y el polipéptido SIRT3. De esa manera se identifica un agente con potencial terapéutico que modula la interacción entre un polipéptido AceCS2 y un polipéptido SIRT3.

## 4. Agentes que modulan el ensamblaje de acetil-Co A sintetasa 2 en un complejo multiproteína

Los inventores de la presente han demostrado que AceCS2 forma un complejo multiproteína que contiene SIRT3 (p. ej., Ejemplo 11, Figura 9). Por lo tanto, también se describe en este documento un método para identificar agentes que modulen el ensamblaje de AceCS2 en un complejo multiproteína. Preferentemente el complejo multiproteína contiene un polipéptido SIRT3.

En un aspecto, se proporciona un método para identificar un agente que module el ensamblaje de un AceCS2 en un complejo multiproteína. En una realización preferida, este método comprende los pasos de (a) poner en contacto una célula que expresa un polipéptido AceCS2 y un polipéptido SIRT3 con un agente con potencial terapéutico y (b) determinar el efecto, si lo hubiera, del agente con potencial terapéutico sobre el ensamblaje de AceCS2 en un complejo multiproteína que contiene el polipéptido SIRT3. De esa manera se identifica un agente con potencial terapéutico que modula el ensamblaje de un polipéptido AceCS2 en un complejo multiproteína.

En otro aspecto de la presente divulgación, se proporciona un método para identificar un agente que module el ensamblaje de un polipéptido AceCS2 en un complejo multiproteína que contiene el polipéptido AceCS2 y al menos un segundo polipéptido. Este método comprende los pasos de (a) poner en contacto una mezcla de ensayo que contiene un polipéptido AceCS2 y un segundo polipéptido con un agente con potencial terapéutico y (b) determinar

el efecto, si lo hubiera, del agente con potencial terapéutico sobre el ensamblaje del polipéptido AceCS2 en un complejo multiproteína en la mezcla de ensayo. De esa manera se identifica un agente con potencial terapéutico que modula el ensamblaje de un polipéptido AceCS2 en un complejo multiproteína.

5 En una realización preferida de este método, el segundo polipéptido es un polipéptido SIRT3.

10 En otra realización preferida de la presente invención, la AceCS2 comprende un epítipo-etiqueta, como Flag, hemaglutinina (HA) o una etiqueta 6XHis (SEC. ID N°: 13), según se describe en este documento. En otras realizaciones, un polipéptido SIRT3 comprende un epítipo etiqueta. Los epítopos etiqueta permiten una fácil detección y purificación de los polipéptidos unidos a esas etiquetas. La detección y purificación se realiza usando un anticuerpo anti-Flag, un anticuerpo anti-HA o un anticuerpo anti-6XHis y métodos de rutina conocidos en el área.

15 Determinar el efecto del agente con potencial terapéutico sobre el ensamblaje de AceCS2 en un complejo multiproteína en la mezcla de ensayo se puede llevar a cabo usando diversos métodos. Un método preferido es cromatografía en columna o inmunoprecipitación según se describe en este documento. En este método un anticuerpo, como un anti-AceCS2 se usa para inmunoprecipitar AceCS2 y cualquier otro polipéptido unido a éste. Los polipéptidos que se unen a AceCS2, y así forman un complejo multiproteína con AceCS2, pueden ser visualizados mediante p. ej., SDS-PAGE, espectrometría de masas o inmunotransferencia. La unión de un polipéptido SIRT3 a AceCS2 puede ser determinada usando un anticuerpo anti-SIRT3.

20 El método para identificar un agente que modula el ensamblaje de AceCS2 en un complejo multiproteína también se puede usar para identificar proteínas celulares distintas de SIRT3 que se unan a AceCS2. Por ejemplo, se pueden usar anticuerpos que inmunoprecipitan AceCS2 o un epítipo etiquetado de AceCS2 de células, para detectar y purificar polipéptidos celulares que se unen a AceCS2. Los polipéptidos que según en a AceCS2 son detectados mediante, p. ej., SDS-PAGE o espectrometría de masas y pueden ser identificados posteriormente por la huella del péptido según se describe en este documento y se conoce en el área. Uno de dichos polipéptidos que puede ser identificado usando este método es un polipéptido acetiltransferasa que acetila a un polipéptido AceCS2.

30 En una realización preferida, el agente para (i) modular un nivel, un estado de acetilación o una actividad de un polipéptido AceCS2, (ii) unirse a un polipéptido AceCS2, (iii) modular el ensamblaje de AceCS2 en un complejo multiproteína, o (iv) modular la localización celular de AceCS2, es un polipéptido SIRT3. El polipéptido SIRT3 puede ser un polipéptido SIRT3 de origen natural o uno de sus fragmentos. El polipéptido SIRT3 también puede ser un polipéptido SIRT3 expresado recombinantemente o uno de sus fragmentos. Por otra parte, el polipéptido SIRT3 puede ser un polipéptido relacionado a SIRT3 o uno de sus fragmentos.

35 5. Agentes que modulan la localización celular de acetil-CoA sintetasa 2

Los inventores de la presente demostraron en este documento que AceCS2 y SIRT3 se localizan en la mitocondria. Debido al importante papel de SIRT3 en la desacetilación de AceCS2, modular la localización de AceCS2 y/o SIRT3 en la mitocondria puede ser importante para controlar la actividad enzimática de AceCS2.

45 Por lo tanto, también se describe en este documento un método para identificar un agente que module la localización celular de un polipéptido SIRT3 o un polipéptido AceCS2. En una realización preferida, este método comprende los pasos de (a) poner en contacto una célula que expresa un polipéptido SIRT3 y/o un polipéptido AceCS2 con un agente con potencial terapéutico y (b) determinar la localización celular del polipéptido SIRT3 y/o el polipéptido AceCS2 donde se identifica un agente que modula la localización celular del polipéptido SIRT3 y/o el polipéptido AceCS2.

50 Un agente preferido es un agente que aumenta la localización de un polipéptido SIRT3 y/o un polipéptido AceCS2 en la mitocondria. Aumentar la localización de un polipéptido SIRT3 y/o un polipéptido AceCS2 incluye la retención prolongada de un polipéptido SIRT3 y/o un polipéptido AceCS2 en la localización celular deseada.

55 La localización celular de un polipéptido SIRT3 o AceCS2 puede ser determinada por diversos métodos conocidos en el área. Un método preferido es inmunohistoquímica o análisis de fracciones mitocondriales mediante inmunotransferencia usando anticuerpos anti-SIRT3 y anticuerpos anti-AceCS2 (p. ej., véase Figura 1 y el Ejemplo correspondiente).

60 El efecto de un agente con potencial terapéutico sobre (i) el nivel, el estado de acetilación o la actividad de un polipéptido AceCS2, (ii) la unión a un polipéptido AceCS2, (iii) la interacción entre un polipéptido AceCS2 y un polipéptido SIRT3, (iv) el ensamblaje de AceCS2 en un complejo multiproteína o (v) la localización celular de un polipéptido AceCS2 puede ser determinado usando diversos métodos como los que se describen en este documento y se conocen en el área.

Un agente con potencial terapéutico de interés es aquel que aumenta un estado de acetilación o una actividad de

5 AceCS2 en al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 100%, al menos aproximadamente 150%, al menos aproximadamente 200%, al menos aproximadamente 500% o más, en comparación con un control adecuado, preferentemente un control en ausencia del agente con potencial terapéutico.

C. Ensayos que usan proteínas purificadas o complejos multiproteína

10 Los ensayos para identificar agentes de activación de SIRT3 selectivos o agentes de modulación de AceCS2 selectivos (agentes activadores o inhibidores) frente a los activadores o inhibidores generales se puede llevar a cabo en un ensayo en un formato a base de células o exento de células. Por ejemplo, un ensayo puede comprender  
15 incubarse (o poner en contacto) un polipéptido o un ácido nucleico en cuestión, con un agente de prueba en condiciones en las cuales se activa un nivel o una actividad del polipéptido en cuestión o del ácido nucleico en cuestión, y controlar o determinar el nivel de activación en presencia del agente de prueba en comparación con el nivel en ausencia del agente de prueba

20 AceCS2 puede ser un AceCS2 de origen natural o un AceCS2 recombinante. Asimismo, un SIRT3 puede ser un SIRT3 de origen natural o un SIRT3 recombinante. Un AceCS2 o SIRT3 de origen natural se puede purificar, p. ej., de tejido humano o de ratón o, p. ej., de células humanas o de ratón. Un AceCS2 y SIRT3 recombinantes se pueden purificar de cualquier sistema de expresión adecuado como los conocidos en el área, p. ej., purificación de proteínas recombinantes de una célula huésped, preferentemente una célula huésped de mamífero.

25 AceCS2 y SIRT3 se pueden purificar hasta una pureza sustancial mediante técnicas estándar, p. ej., incluidas, pero no exclusivamente, cromatografía en columna, métodos de inmunopurificación, precipitación selectiva usando sulfato de amonio y otras.

30 En ciertas realizaciones de la presente invención, los métodos de detección sistemática y los ensayos de prueba comprenden el uso de un complejo multiproteína que contiene (i) al menos AceCS2 y SIRT3, o (ii) AceCS2 y un segundo polipéptido, o (iii) SIRT3 y un segundo polipéptido. Al igual que para las proteínas aisladas, las proteínas de dichos complejos multiproteína se pueden obtener de, p. ej., tejidos humanos o de ratón, células humanas o de ratón, o prepararse recombinantemente. Cuando se preparan recombinantemente, las proteínas en cuestión se ensamblan típicamente en un complejo multiproteína antes de usarlas en uno de los métodos en cuestión. Esto se  
35 puede hacer usando diversos métodos conocidos en el área.

40 Para los ensayos *in vitro*, los polipéptidos en cuestión pueden ser, pero no necesariamente, purificados. La purificación de las proteínas en cuestión se hace usando métodos conocidos en el área. La purificación de los polipéptidos en cuestión de células o células huéspedes puede ser parcial, se prefiere, sin embargo, los polipéptidos en cuestión que son al menos 90% puros según se determina por SDS-PAGE estándar.

D. Ensayos basados en células

45 La identificación de, y la prueba para determinar, agentes con potencial terapéutico que activen un nivel o una actividad de un SIRT3 y agentes que modulen un nivel, un estado de acetilación o una actividad de AceCS2 también se pueden llevar a cabo usando ensayos basados en células (p. ej., véase Ejemplos 5, 6, 9 y 11). Además, se pueden usar ensayos basados en *E. coli*, como los descritos en este documento, para identificar y/o probar agentes con potencial terapéutico (véase Ejemplos 7, 8 y 12).

50 Para los ensayos basados en células, se usan típicamente células eucariotas, como células de mamífero. En ciertas realizaciones, se pueden usar células de levadura. La célula puede ser una célula primaria aislada de una muestra biológica de un donante. Alternativamente, la célula puede ser una línea celular establecida como las que se pueden obtener de American Type Culture Collection.

55 Según se describe en este documento (véase los Ejemplos), una célula también puede ser una célula que es transinfectada transitoriamente o establemente con un constructo de expresión, como un constructo de expresión de AceCS2 o un constructo de expresión de SIRT3.

E. Ensayos *in vivo*

60 La identificación de, y la prueba para determinar, agentes con potencial terapéutico que activen un nivel o una actividad de un SIRT3 y agentes que modulen un nivel, un estado de acetilación o una actividad de un AceCS2 también se puede realizar *in vivo*. En este método, se administra un agente a un animal, preferentemente un ratón, y se extraen muestras de sangre o tejido del animal en diversos momentos luego de la administración del agente y se analizan para determinar la presencia p. ej. de (i) un nivel de acetil-CoA, (ii) un nivel de ATP, (iii) un nivel, un estado

de acetilación o una actividad de AceCS2, o (iv) un nivel o una actividad de SIRT3.

#### F. Detección de ARNm

5 En este documento se proporcionan métodos para probar y ensayar compuestos, agentes o antagonistas identificados por los métodos descritos aquí, e implican una serie de pruebas aceptadas para determinar si un determinado agente con potencial terapéutico o una molécula pequeña dada es útil para practicar un método de la presente invención. Los métodos de la presente invención pueden comprender opcionalmente el paso de detectar un ácido nucleico, como un ARNm o un polipéptido. En una realización, dicho método comprende determinar o  
10 detectar un ARNm, preferentemente un ARNm de SIRT3 o un ARNm de AceCS2. Otros ARNm que codifican polipéptidos descritos en este documento también se pueden determinar usando los métodos siguientes. Los métodos de evaluación de la expresión del ARNm de un gen particular son bien conocidos por los expertos e incluyen, entre otros, ensayos basados en hibridación y amplificación.

#### 15 1. Ensayos basados en hibridación directa

Los métodos de detección y/o cuantificación del nivel de un transcrito génico (ARNm o ADNc preparado a partir de éste) usando técnicas de hibridación de ácido nucleico son conocidos por los expertos. Por ejemplo, un método para evaluar la presencia, ausencia o cantidad de un polinucleótido implica una inmunotransferencia tipo Northern. Los  
20 niveles de expresión génica también se pueden analizar mediante técnicas conocidas en el área, p. ej., transferencia puntual, hibridación in situ, protección de ARNasa, micromatriz de ADN, y similares (p. ej., véase Sambrook, J., Fritsch, E. F., y Maniatis, "Molecular Cloning A Laboratory Manual" published by Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª edición, 1989).

#### 25 2. Ensayos basados en amplificación

En otra realización, se usan ensayos basados en amplificación para medir el nivel de expresión de un gen. En un ensayo de ese tipo, las secuencias de ácido nucleico actúan como molde en una reacción de amplificación (p. ej., reacción en cadena de la polimerasa o PCR). En una amplificación cuantitativa, la cantidad de producto de la  
30 amplificación será proporcional a la cantidad de molde en la muestra original. La comparación con controles adecuados proporciona una medida del nivel de ARNm en la muestra. Los métodos de amplificación cuantitativa son bien conocidos por los expertos. Se proporcionan protocolos detallados para PCR cuantitativa, p. ej., en Innis *et al.* (1990) PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications, Academic Press, Inc. N.Y.).

35 En una realización, se usa un ensayo basado en TaqMan para cuantificar un polinucleótido. Los ensayos basados en TaqMan usan una sonda de oligonucleótido fluorogénico que contiene una tintura 5' fluorescente y un agente extinción 3'. La sonda se hibrida al producto de la PCR, pero ella misma no puede extenderse debido a un agente bloqueante en el extremo 3'. Cuando el producto de la PCR se amplifica en ciclos consecutivos, la actividad 5' nucleasa de la polimerasa, p. ej., AmpliTaq, produce la escisión de la sonda TaqMan. Esta escisión separa la tintura fluorescente 5' y el agente de extinción 3', dando como resultado de ese modo un aumento en la fluorescencia como función de la amplificación (véase, por ejemplo, Heid *et al.*, 1996, *Genome Res* 6(10):986-94; Morris *et al.*, 1996, *J Clin Microbiol* 34(12):2933-6).

45 Otros métodos de amplificación adecuados incluyen, pero no exclusivamente, la reacción en cadena de la ligasa (LCR) (véase, Wu y Wallace, 1989, *Genomics* 4:560; Landegren *et al.*, 1988, *Science* 241 : 1077; y Barringer *et al.*, 1990, *Gene* 89: 117), amplificación de la transcripción (Kwoh *et al.*, 1989, *Proc Natl Acad Sci USA* 86:1173), replicación de la secuencia autosustentada (Guatelli *et al.*, 1990, *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 1874), PCR puntual, PCR con ligamiento de adaptadores, etc.

#### 50 G. Detección de un polipéptido

Los métodos de la presente invención descritos antes, pueden comprender opcionalmente el paso de determinar o detectar un polipéptido, como un polipéptido AceCS2 o SIRT3. Otros polipéptidos descritos en este documento también se pueden determinar usando los métodos siguientes.

55 Determinar o detectar un polipéptido, como un AceCS2, un SIRT3 y otros se puede llevar a cabo de diversas maneras, que incluyen, pero no exclusivamente, detectar los polipéptidos respectivos en una muestra biológica, una célula, un órgano o un animal, incluidos animales humanos y no humanos.

60 El nivel de expresión de un polipéptido puede ser determinado por diversos métodos, que incluyen, pero no exclusivamente, captura por afinidad, espectrometría de masas, inmunoensayos tradicionales y ensayos de inmunoprecipitación, PAGE, transferencia tipo Western, RIA o HPLC como se describe más detalladamente en este documento (p. ej., véase Figs 1 y 3 a 10 y los Ejemplos correspondientes) o como los conocidos por los expertos.

Los paradigmas de detección que pueden ser empleados para este fin incluyen métodos ópticos, métodos electroquímicos (técnicas de voltametría y amperometría), microscopia de fuerza atómica y métodos de radiofrecuencia, p. ej., espectroscopía de resonancia multipolar. Métodos ópticos ilustrativos, además de la microscopia, tanto confocal como no confocal, son la detección de fluorescencia, luminiscencia, quimioluminiscencia, absorbancia, reflectancia, transmitancia, y birrefringencia o índice de refracción (p. ej., resonancia de plasmón de superficie, elipsometría, un método de resonancia de espejo, un método de acoplador de red de difracción con guía de ondas o interferometría).

Usando, p. ej., anticuerpos como los anticuerpos anti-AceCS2 contra péptidos AceCS2 acetilados y descritos en este documento, se puede evaluar la modulación del estado de acetilación de un polipéptido AceCS2 en ausencia o presencia de un agente con potencial terapéutico (p. ej., véase Figura 5B y el Ejemplo correspondiente). Otros anticuerpos descritos en este documento son útiles para detectar el nivel de expresión de AceCS2 o el nivel de expresión de SIRT3.

H. Detección de actividad enzimática

#### 1. Detección de actividad desacetilasa de SIRT3

Se han descrito varios ensayos para detectar la actividad desacetilasa de la sirtuina. Por ejemplo, Imai *et al.*, y Frye informaron de ensayos para detectar la actividad desacetilasa dependiente de NAD de Sir2 de levadura y de SIRT2 humana usando histonas como sustrato (Imai *et al.*, 2000, *Nature* 403(6771):795-800; Frye 1999, *Biochem Biophys Res Comm* 260:212-219). Sin embargo, ni Imai *et al.* ni Frye probaron la actividad desacetilasa de la sirtuina sobre un polipéptido celular.

La presente invención describe el primer polipéptido celular diana de SIRT3, AceCS2, que es desacetilado tanto *in vitro* como *in vivo* por SIRT3. Como se describe más detalladamente en este documento, el polipéptido AceCS2 está asociado a SIRT3. Por lo tanto, en una realización preferida de la presente invención, se determina la actividad enzimática de un polipéptido SIRT3 en presencia del sustrato AceCS2 según se describe en este documento. Este ensayo se puede usar para evaluar la actividad desacetilasa de SIRT3 en ausencia o presencia de un agente con potencial terapéutico.

La actividad desacetilante de SIRT3 de AceCS2 puede ser controlada mediante, p. ej., inmunotransferencia usando un anticuerpo anti-AceCS2 que detecta tanto a AceCS2 acetilado como desacetilado y un anticuerpo que es específico para AceCS2 acetilado. Alternativamente, la actividad desacetilante de SIRT3 de AceCS2 también puede ser controlada determinando la actividad enzimática de AceCS2 según se describe en este documento. Asimismo, se puede usar análisis LC-MS/MS para determinar el estado de acetilación de AceCS2 según se describe en este documento (p. ej., Figs. 4 y 6; Ejemplos 6 y 8).

#### 2. Detección de la actividad enzimática de AceCS2

Los ensayos para probar la actividad de AceCS2 se describen en este documento (p. ej., véase Ejemplo 1) y son conocidos en el área. La actividad enzimática de AceCS2 también puede ser determinada, p. ej., por métodos isotópicos o espectrofotométricos (Fujino *et al.*, 2001, *J Biol Chem* 276:11420-1 1426).

La mezcla de reacción estándar para el método isotópico contiene Tris-HCl 100 mM, pH 8.5, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, ATP 10 mM, CoA 1 mM y [<sup>14</sup>C]acetato 10 mM (940 dpm/nmol) en un volumen total de 0.2 mL. Después de 1 min de preincubación a 37 °C, la reacción se inicia mediante adición de AceCS2. Después de 30 min de incubación, la reacción se finaliza agregando 50 µl de ácido acético glacial helado. El producto de la reacción ([<sup>14</sup>C]acetil-CoA) se aísla sembrando una mancha sobre un trozo de medio cromatográfico (tipo ITLC-SG, Gelman *Sciences*) y abundante lavado con éter saturado con agua/ácido fórmico (7:1) para medición de la radioactividad (Fujino *et al.*, 2001, *J Biol Chem* 276: 11420-11426).

El método espectrométrico se basa en la formación de AMP usando adenilato quinasa, piruvato quinasa y lactato deshidrogenasa. La mezcla de reacción estándar para el método espectrofotométrico contiene Tris-HCl 100 mM, pH 8.5, DTT 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 15 mM, ATP 10 mM, fosfoenolpiruvato de potasio 0.25 mM, acetato 1 mM, NADH 0.3 mM, 80 unidades de adenilato quinasa (Roche Molecular Biochemicals), 17 unidades de lactato deshidrogenasa (Roche Molecular Biochemicals) y 6 unidades de piruvato quinasa (Roche Molecular Biochemicals) en un volumen total de 1 mL. Después de 1 min de preincubación a 37 °C, la reacción se inicia agregando 24 µL de CoA 25 mM. La oxidación de NADH se mide a 340 nm en un espectrofotómetro registrador. La formación de 1 mol de ADP corresponde a la oxidación de 2 mol de NADH (Fujino *et al.*, 2001, *J Biol Chem* 276:11420-1 1426). Otros métodos espectrométricos adecuados son conocidos en el área (Jones & Lipmann, 1955, en *Methods in Enzymology* (Academic Press, Vol. 1, pp. 585-591; Barak *et al.*, 2004, *J Mol Biol* 342:383-401).

Otro ensayo útil para detectar la actividad enzimática de AceCS2 es la incubación de células con [<sup>14</sup>C]acetato y el análisis subsiguientes de <sup>14</sup>C en CO<sub>2</sub> y lípidos (Fujiirio *et al.*, 2001, *J Biol Chem* 276:1 1420-11426).



## I. Ensayos de dos híbridos

5 En otra realización de los métodos de detección sistemática de la presente invención, se puede usar un sistema de dos híbridos que utiliza células ("MATCHMAKER Two-Hybrid system", "Mammalian MATCHMAKER Two-Hybrid Assay Kit", "MATCHMAKER one-Hybrid system" (Clontech); "HybriZAP Two-Hybrid Vector System" (Stratagene); véase también Dalton y Treisman, 1992, *Cell* 68: 597-612; Fields y Sternglanz, 1994, *Trends Genet* 10:286-92).

10 En el sistema de dos híbridos, por ejemplo, un SIRT3, preferentemente un polipéptido SIRT3, se fusiona a la región de unión para SRF o la región de unión para GAL4 y se expresa en células de levadura. Un polipéptido AceCS2 que se une a un polipéptido SIRT3 se fusiona a la región de activación transcripcional VP16 o GAL4 y también se expresa en células de levadura en presencia de un compuesto de prueba. Alternativamente, el polipéptido AceCS2 que se une al polipéptido SIRT3 se puede fusionar a la región de unión para SRF o a la región de unión para GAL4, y el polipéptido SIRT3 a la región de activación transcripcional VP16 o GAL4. La unión de los dos polipéptidos activa un gen reportero, tornando detectables los clones positivos. Como gen reportero, por ejemplo, el gen Ade2, el gen lacZ, el gen CAT, el gen luciferase y otros como esos se pueden usar además del gen HI53.

20 Un agente con potencial terapéutico que no se una a SIRT3 o AceCS2 no afecta la activación del gen reportero. Sin embargo, un agente que aumente la unión de SIRT3 a AceCS2 produce una activación mayor del gen reportero. A la inversa, un agente con potencial terapéutico que inhiba la unión entre SIRT3 y AceCS2 produce una menor activación o ninguna activación del gen reportero.

/\*

## J. Detección de la interacción entre dos moléculas

25 La interacción entre dos moléculas, como AceCS2 y SIRT3, AceCS2 y un agente con potencial terapéutico o SIRT3 y un agente con potencial terapéutico también puede ser detectada usando, p. ej., un ensayo de fluorescencia en el cual al menos una molécula está marcada fluorescentemente. Un ejemplo de dicho ensayo incluye transferencia de energía de fluorescencia (FET o FRET transferencia de energía por resonancia de fluorescencia) (véase, por ejemplo, Lakowicz *et al.*, patente de los Estados Unidos N° 5,631,169; Stavrianopoulos *et al.*, patente de los Estados Unidos N° 4,868,103). Un marcador fluoróforo en la primera, molécula 'dadora' se selecciona de modo tal que su energía fluorescente emitida sea absorbida por el marcador fluorescente de una segunda molécula 'aceptora', la cual a su vez es capaz de fluorescer debido a la energía absorbida. Alternativamente, la molécula de proteína 'dadora' puede utilizar simplemente la energía fluorescente natural de los residuos de triptofano. Los marcadores se eligen para que emitan longitudes de onda de luz diferentes, de modo que el marcador de la molécula 'aceptora' pueda ser diferenciado del de la 'dadora'. Puesto que la eficiencia de la transferencia de energía entre los marcadores está relacionada a la distancia que separa las moléculas, se puede evaluar la relación espacial entre las moléculas. En una situación en la cual se produce la unión entre las moléculas, la emisión fluorescente del marcador de la molécula 'aceptora' en el ensayo debe ser máxima. Un evento de unión FET se puede medir convenientemente a través de medios de detección fluorimétricos estándar conocidos en el área (p. ej., usando un fluorímetro).

40 Otro ejemplo de un ensayo de fluorescencia es la polarización de fluorescencia (FP). Para la FP, sólo un componente necesita ser marcado. Una interacción de unión se detecta por un cambio en el tamaño molecular del componente marcado. El cambio de tamaño altera la velocidad de volteo del componente en solución y se detecta como un cambio en la FP (véase, p. ej., Nasir *et al.*, 1999, *Comb Chem HTS* 2:177-190; Jameson *et al.*, 1995, *Methods Enzymol* 246:283; Seethala *et al.*, 1998, *Anal Biochem* 255:257. La polarización de flores en la que puede controlar en placas multipocillo usando el lector Tecan Polarion.TM. (véase, p. ej., Parker *et al.*, 2000, *J Biomol Screen* 5:77-88; y Shoeman *et al.*, 1999, *Biochemistry* 38:16802-16809

50 En otra realización, determinar la capacidad de una proteína para unirse a una molécula diana o la capacidad de un agente con potencial terapéutico para unirse a un polipéptido en cuestión puede llevarse a cabo usando análisis de interacción biomolecular en tiempo real (BIA) (véase, p. ej., Sjolander y Urbaniczky, 1991, *Anal Chem* 63:2338-2345; Szabo *et al.*, 1995, *Curr Opin Struct Biol* 5:699-705). La "resonancia de plasmón de superficie" o el "BIA" detectan interacciones bioespecíficas en tiempo real, sin marcar a ninguno de los interactuantes (p. ej., BIAcore). Los cambios en la masa en la superficie de unión (indicativos de un evento de unión) producen alteraciones del índice refractivo de la luz cerca de la superficie (el fenómeno óptico de resonancia de plasmón de superficie (SPR)), dando lugar a una señal detectable que se puede usar como una indicación de reacciones en tiempo real entre moléculas biológicas.

## K. Ensayos basados en informática

60 También es posible usar relaciones estructura-actividad (SAR) y principios de diseño basados en la estructura para identificar agentes que aumenten un nivel o una actividad de SIRT3 o modulen un nivel, un estado de acetilación o una actividad de AceCS2. SAR proporciona información acerca de la actividad de agentes relacionados en al menos un ensayo de importancia. Las correlaciones se hacen entre características estructurales de un agente de interés y

una actividad. Por ejemplo, es posible mediante evaluación las SAR para una familia de agentes que interactúan con un polipéptido SIRT3 y/o un polipéptido AceCS2 identificar una o más características estructurales necesarias para la actividad. Se puede producir una biblioteca de agentes que varíe esas características y luego detectar sistemáticamente esa biblioteca. El diseño basado en la estructura puede incluir determinar un modelo estructural de la interacción física del agente y su diana, como un polipéptido SIRT3 y/o un polipéptido AceCS2. El modelo estructural puede indicar como un antagonista de la diana puede ser genomanipulado. Dicho antagonista puede ser útil para alterar la regulación de la vida útil.

Tanto el método SAR como el diseño basado en la estructura se pueden usar para identificar un farmacóforo. Los farmacóforos son un concepto muy valioso y útil en el descubrimiento de un fármaco y en la optimización que conduce a un fármaco. Un farmacóforo se define como un arreglo tridimensional (3D) definido de grupos químicos esencial para la actividad biológica. Puesto que una molécula farmacéuticamente activa debe interactuar con una o más estructuras moleculares dentro del organismo del sujeto para que sea eficaz, y las propiedades funcionales deseadas de la moléculas derivan de esas interacciones, cada principio activo debe contener un arreglo definido de grupos químicos que permitan que esa interacción ocurra. Los grupos químicos, comúnmente denominados centros descriptores, pueden ser representados por (a) un átomo o grupo de átomos; (b) pseudo-átomos, por ejemplo el centro de un anillo o el centro de masa de una molécula; (c) vectores, por ejemplo pares atómicos, direcciones de pares electrón-ión, o la normal a un plano. Una vez formulado un farmacóforo se puede usar para buscar compuestos químicos en una base de datos, p. ej., los que tienen una estructura compatible con el farmacóforo (véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos N° 6,343,257; Martin, 1992, *J Med Chem* 35, 2145-54). Las consultas de búsqueda en la base de datos se basan no sólo en la información de la propiedad química sino también en información geométrica precisa.

Los métodos basados en informática pueden usar búsquedas en bases de datos para encontrar moldes compatibles (Martin, 1992, *J Med Chem* 35:2145-54, que se incorpora en este documento por referencia). Se pueden aplicar los métodos existentes para búsquedas 2-D y 3-D en bases de datos. Lederle de American Cyanamid (Pearl River, N.Y.) marcó un nuevo rumbo en la búsqueda de la forma molecular, la búsqueda 3D y los vectores de tendencia de las bases de datos. Los vendedores comerciales y otros grupos de investigación también proporcionan capacidades de búsqueda (MACSS-3D, Molecular Design Ltd. (San Leandro, Calif); CAVEAT, Lauri, G *et al.*, University of California (Berkeley, Calif); CHEM-X, Chemical Design, Inc. (Mahwah, N.J.)). Se pueden usar programas informáticos para esas búsquedas para analizar bases de datos de compuestos farmacológicos potenciales indexados por sus estructuras química y geométrica significativas (p. ej., *the Standard Drugs File* (Derwent Publications Ltd., Londres, Inglaterra), la base de datos de Bielstein (Bielstein Information, Frankfurt, Alemania o Chicago) y la base de datos del Chemical Registry (CAS, Columbus, Ohio)).

Una vez que se identifica un compuesto que se corresponde con el farmacóforo, se puede probar su actividad, p. ej., de unión a un polipéptido y/o de modulación de una actividad biológica de un polipéptido, p. ej., de aumento de la actividad enzimática de un polipéptido SIRT3 y/o de un polipéptido AceCS2.

Además, se han determinado estructuras para tres enzimas de clase III, a saber *E. coli* CobB (Zhao *et al.* 2004, *J Mol Biol* 337:731-741) y ambas sirtuinas de *A. fliigidus*, Sir2-Afl (Min *et al.*, 2001, *Cell* 105:269-279) y Sir2-Af2 (Avalos, 2002, *Mol Cell* 10:523-535). Con respecto a SIRT5, la información sobre la estructura cristalina se depositó en GenBank N° de registro 2FZQA, 2FZQB, 2B4YA, 2B4YB, 2B4YC y 2B4YD. Se dispone de otros datos estructurales para Sir2-P53 Péptido-Nicotinamida (GenBank N° de registro 1YC5), Sir2af2-NAD-ADPribosa-Nicotinamida (GenBank N° de registro 1YC2), base estructural para la escisión de nicotinamida y la transferencia ADP-ribosa por la desacetilasa de proteínas histona Sir2 dependiente de NAD<sup>+</sup> (GenBank N° de registro 1SZD y 1SZC); base estructural para el mecanismo y la regulación de las enzimas Sir2 (GenBank N° de registro 1S7G); y la desacetilasa de histonas SIRT2 humana (1J8F). Una estructura cristalina 1.7 Å del centro catalítico aminoácido 323 de la SIRT2 humana, que revela un dominio de unión a NAD, que es una variante del pliegue de Rossmann, y un dominio más pequeño compuesto de un módulo helicoidal y un módulo de unión a zinc fue informado por Finnin *et al.* (Finnin *et al.* 2001, *Nat Struct Biol* 8(7):621-5). Finnin *et al.* también describieron un surco grande conservado en la interfase de los dos dominios y sugirieron que éste es el probable sitio de catálisis. Interceptando este gran surco, hay un bolsillo formado por el módulo helicoidal. Este bolsillo está forrado con residuos hidrófobos, los cuales de manera interesante están conservados en cada una de las cinco clases de Sir2, lo que sugiere que es un sitio de unión a la proteína específico de la clase (Finnin *et al.* 2001, *Nat Struct Biol* 8(7):621-5).

Una estructura cristalina del motivo de dimerización doble alfa-hélice de Sir4 de levadura, que interactúa con Sir3, se proporciona con el N° de registro GenBank 1NYHA. Además, Chang *et al.* publicaron la estructura de rayos X del motivo de dimerización doble alfa-hélice dentro del extremo C-terminal de Sir4 y mostraron que formaba un complejo estable 1:1 con un fragmento dimérico de Sir3 (residuos 464-978). (Chang *et al.*, 2003, *Structure* 11(6):637-649; incorporado aquí por referencia en su totalidad). Además, Murphy *et al.* proporcionaron una estructura cristalina de rayos X con una resolución de 2.5 Å de un fragmento CT de Sir4 (Sir4p 1217-1358) que revela una doble alfa-hélice paralela homodimérica de 72 residuos (GenBank N° de registro 1PL5S y 1 PL5A; Murphy *et al.*, 2003, *J Mol Biol* 334(4):769-80, incorporados aquí por referencia en su totalidad). Este conjunto de datos se puede usar para diseñar

agentes que se unan a un polipéptido SIRT3 y/o un polipéptido AceCS2, que interactúen con un polipéptido SIRT3 y/o un polipéptido AceCS2 o aumenten un nivel o una actividad de un polipéptido SIRT3 o modulen un nivel, un estado de acetilación o una actividad de un polipéptido AceCS2.

5 Por lo tanto, en un aspecto de la presente invención, se identifica un agente que es diseñado para interactuar con un polipéptido SIRT3 y/o un polipéptido AceCS2 o se una a un polipéptido SIRT3 o un polipéptido AceCS2 empleando una estructura de un polipéptido SIRT3 y/o un polipéptido AceCS2 o la de otra sirtuina o polipéptido AceCS2 que muestre homología con SIRT3 y/o AceCS2 en uno o más dominios.

10 Por consiguiente, la identificación de enzimas clase III estructuralmente definidas que tienen patrones de superposición de la activación proporciona una herramienta útil para identificar activadores de sirtuinas de mamífero, en particular SIRT3. Por ejemplo, SIRT3 puede ser cristalizada conjuntamente con un agente que active SIRT3 y se puede determinar la estructura tridimensional del complejo. La información relativa a las interacciones entre el agente que activa SIRT3 y los residuos de aminoácidos de SIRT3 y/o la forma del sitio de unión del modulador se pueden ingresar en programas informáticos de modelado para diseñar nuevos y más potentes activadores de SIRT3. Como comprenderán los expertos después de leer esta divulgación, los agentes que activan e inhiben AceCS2 se pueden diseñar de dicha manera.

20 Por consiguiente, otro ensayo para agentes con potencial terapéutico que activan el nivel o la actividad de un polipéptido SIRT3 o para agentes que modulan un nivel, un estado de acetilación o una actividad de un polipéptido AceCS2 implica el diseño de fármacos asistido por computadora, en el cual se usa un sistema informático para generar una estructura tridimensional de SIRT3 o AceCS2 basada en la información estructural codificada por su secuencia de aminoácidos. La secuencia de aminoácidos en entrada interactúa directamente y activamente con un algoritmo preestablecido en un programa informático para proporcionar modelos estructurales secundarios, terciarios y cuaternarios de la proteína. Los modelos de la estructura de la proteína se examinan después para identificar regiones de la estructura que tengan la capacidad de unirse, p. ej., a otro polipéptido o un agente con potencial terapéutico. Esas regiones se usan después para identificar activadores que activen un nivel o una actividad de SIRT3 o un modulador que module un nivel, un estado de acetilación o una actividad de un polipéptido AceCS2.

30 El modelo estructural tridimensional de la proteína se genera ingresando en el sistema informático secuencias de aminoácidos de la proteína de al menos 10 residuos de aminoácidos o las secuencias de ácidos nucleicos correspondientes que codifican un SIRT3 o AceCS2. Las secuencias de aminoácidos codificadas por las secuencias de ácidos nucleicos proporcionadas en este documento representan las secuencias primarias o subsecuencias de las proteínas, las cuales codifican la información estructural de las proteínas. Se ingresan en el sistema informático al menos 10 residuos de una secuencia de aminoácidos (o una secuencia de nucleótidos que codifica 10 aminoácidos) desde teclados, sustratos que puedan ser leídos en computadora que incluyen, pero no exclusivamente, medios de almacenamiento electrónicos (p. ej., disquetes magnéticos, cintas, cartuchos y chips), medios ópticos (p. ej., CD ROM), información distribuida por sitios de Internet, y mediante RAM. Después el modelo estructural tridimensional de la proteína se genera por interacción de la secuencia de aminoácidos y el sistema informático, usando un programa informático conocido por los expertos.

45 La secuencia de aminoácidos representa una estructura primaria que codifica la información necesaria para formar la estructura secundaria, terciaria y cuaternaria de la proteína de interés. El programa informático presta atención a ciertos parámetros codificados por la secuencia primaria para generar el modelo estructural. Se hace referencia a esos parámetros como "términos de energía" e incluyen principalmente potenciales electrostáticos, potenciales hidrófobos, superficies accesibles al solvente y enlaces de hidrógeno. Los términos de energía secundarios incluyen los potenciales de van der Waals. Las moléculas biológicas forman las estructuras que minimizan los términos de energía de manera acumulativa. El programa informático usa por consiguiente esos términos codificados por la estructura primaria o la secuencia de aminoácidos para crear el modelo estructural secundario.

50 La estructura terciaria de la proteína codificada por la estructura secundaria se forma después sobre la base de los términos de energía de la estructura secundaria. En este punto el usuario puede ingresar variables adicionales como si la proteína está unida a la membrana o es soluble, su localización en el organismo, su localización celular, p. ej., citoplasmática, superficial o nuclear. Esas variables junto con los términos de energía de la estructura secundaria se usan para formar el modelo de la estructura terciaria. Al modelar la estructura terciaria, el programa informático hace coincidir caras hidrófobas de la estructura secundaria con caras similares, y caras hidrófilas de la estructura secundaria con caras similares.

60 Una vez que se generó la estructura, se identifican las regiones de unión del modulador potencial mediante el sistema informático. Las estructuras tridimensionales de los moduladores potenciales se generan ingresando secuencias de aminoácidos o nucleótidos o fórmulas químicas de los compuestos, según se describe en este documento. La estructura tridimensional del ligando potencial se compara después con la de SIRT3 o AceCS2 para identificar los sitios de unión en SIRT3 o AceCS2. La afinidad de unión entre la proteína y los moduladores se determina usando términos de energía para determinar cuáles moduladores tiene una mayor probabilidad de unirse

a la proteína.

Los sistemas informáticos también se usan para detectar sistemáticamente mutaciones, variantes polimórficas, alelos y homólogos interespecie de genes que codifican un polipéptido SIRT3 o AceCS2 de la invención. Dichas mutaciones se pueden asociar a estados patológicos o características genéticas. Además, también se pueden usar GeneChip™ y la tecnología relacionada para detectar sistemáticamente mutaciones, variantes polimórficas, alelos y homólogos interespecie. Una vez que se han identificado las variantes, se pueden usar ensayos diagnósticos para identificar pacientes, p. ej., diabéticos o individuos que tienen riesgo de sufrir diabetes, hipercolesterolemia, hiperlipidemia u obesidad, que tienen dichos genes mutados o variantes alélicas. La identificación de dichos genes de SIRT3 y/o AceCS2 implica recibir entrada de una primera secuencia de aminoácidos de un SIRT3 o AceCS2 (o de una primera secuencia de ácido nucleico que codifica un SIRT3 o AceCS2). La secuencia se ingresa en el sistema informático como se describió antes.

La primera secuencia de ácidos nucleicos o aminoácidos se compara después con una segunda secuencia de ácidos nucleicos o aminoácidos que tenga una identidad sustancial con la primera secuencia. La segunda secuencia se ingresa en el sistema informático de la manera descrita antes. Una vez que se han comparado la primera y segunda secuencias, se identifican las diferencias de nucleótidos o aminoácidos entre las secuencias. Dichas secuencias pueden representar diferencias alélicas en diversos genes de SIRT3 o AceCS2, y mutaciones asociadas a enfermedades y características genéticas.

#### L. Ensayos de alta productividad

En una realización preferida, los métodos de detección sistemática de alta productividad implican proporcionar una biblioteca química o peptídica combinatoria que contenga un gran número de compuestos potencialmente terapéuticos (compuestos potencialmente moduladores o ligandos). Dichas "bibliotecas químicas combinatorias" o "bibliotecas de ligandos" se someten después a detección sistemática en uno o más ensayos, como los descritos en este documento, para identificar los miembros de la biblioteca (especies químicas particulares o subclases) que tengan una actividad característica deseada. Los agentes identificados de esa manera pueden servir como "agentes principales" convencionales o se pueden usar ellos mismos como productos terapéuticos potenciales o reales.

La preparación y la detección sistemática de bibliotecas químicas combinatoria es bien conocida por los expertos. Dichas bibliotecas químicas combinatorias incluyen, pero no exclusivamente, bibliotecas de péptidos (véase, p. ej., la patente de los Estados Unidos N° 5,010,175, Furka, 1991, *Int J Pept Prot Res* 37:487-493 (1991) y Houghton *et al.*, 1991, *Nature* 354:84-88). Se pueden usar otros compuestos químicos para generar diversas bibliotecas químicas. Dichos compuestos químicos incluyen, pero no exclusivamente, peptoides (p.ej., la publicación PCT N° WO 91/19735), péptidos codificados (p.ej., la publicación PCT N° WO 93/20242), bio-oligómeros aleatorios (p.ej., la publicación PCT N° WO 92/00091), benzodiazepinas (p.ej., la patente de los Estados Unidos N° 5,288,514), diversómeros como hidantoínas, benzodiazepinas y dipéptidos (Hobbs *et al.*, 1993, *Proc Natl Acad Sci USA* 90:6909-6913), polipéptidos de vinilo (Hagihara *et al.*, 1992, *J Amer Chem Soc* 114:6568), peptidomiméticos no peptídicos con andamiaje de glucosa (Hirschmann *et al.*, 1992, *J Amer Chem Soc* 114:9217-9218), síntesis orgánicas análogas de bibliotecas de compuestos pequeños (Chen *et al.*, 1994, *J Amer Chem Soc* 116:2661), oligocarbamatos (Cho *et al.*, 1993, *Science* 261:1303), y/o peptidilfosfonatos (Campbell *et al.*, 1994, *J Org Chem* 59:658), bibliotecas de ácidos nucleicos (véase Ausubel, Berger y Sambrook), bibliotecas de ácidos nucleicos peptídicos (véase, p. ej., la patente de los Estados Unidos N° 5,539,083), bibliotecas de anticuerpos (véase, p. ej., Vaughn *et al.*, 1996, *Nature Biotechnology* 14(3):309-314 y PCT/US96/10287), bibliotecas de carbohidratos (véase, p. ej., Liang *et al.*, 1996, *Science*, 274:1520-1522 y la patente de los Estados Unidos N° 5,593,853), bibliotecas de moléculas orgánicas pequeñas (véase, p. ej., benzodiazepinas, Baum C&EN, 18 enero de 1993, página 33; isoprenoides, patente de los Estados Unidos N° 5,569,588; tiazolidinonas y metatiazanonas, patente de los Estados Unidos N° 5,549,974; pirrolidinas, patente de los Estados Unidos N° 5,525,735 y 5,519,134; compuestos morfolino, patente de los Estados Unidos N° 5,506,337; benzodiazepinas, patente de los Estados Unidos N° 5,288,514, y análogos). Otros ejemplos de métodos de síntesis de bibliotecas moleculares se pueden encontrar en el área por ejemplo en: DeWitt *et al.*, 1993, *Proc Natl Acad Sci USA* 90:6909; Erb *et al.*, 1994, *Proc Natl Acad Sci USA* 91:1 1422; Zuckermann *et al.*, 1994, *J Med Chem* 37:2678; Cho *et al.*, 1993, *Science* 261: 1303; Carrell *et al.*, 1994, *Angew Chem Int Ed Engl* 33:2059; Carell *et al.*, 1994, *Angew Chem Int Ed Engl.* 33:2061; y Gallop *et al.*, 1994, *J Med. Chem* 37:1233.

Los ensayos de alta productividad se usan a menudo para la detección sistemática de moduladores. Por lo tanto, en los ensayos de alta productividad para identificar (i) activadores de SIRT3 y (ii) moduladores de AceCS2, es posible detectar sistemáticamente varios miles de agentes con potencial terapéutico o ligandos en un solo día. En particular, se puede usar cada pocillo de una placa de microtitulación para llevar a cabo un ensayo diferente contra un agente potencial seleccionado, o si se observan efectos de la concentración o el tiempo de incubación, se puede probar un único agente cada 5 a 10 pocillos. Por lo tanto, una única placa de microtitulación estándar puede ensayar aproximadamente 100 (p. ej., 96) agentes. Si se usan placas de 1536 pocillos, entonces una única placa puede ensayar fácilmente entre aproximadamente 100 y aproximadamente 1500 agentes diferentes. Es posible ensayar

varias placas diferentes por día; son posibles ensayos de detección sistemática de hasta aproximadamente 6000 a 20 000 agentes diferentes usando los sistemas integrados de la invención. Más recientemente, se han desarrollado métodos microfluídicos para la manipulación de reactivos.

5 La molécula de interés se puede unir al componente en estado sólido, directa o indirectamente, mediante un enlace covalente o no covalente, p. ej., a través de una etiqueta. La etiqueta puede ser cualquiera de una diversidad de componentes. En general, una molécula que une la etiqueta (un ligador de etiqueta) se fija a un soporte sólido, y la molécula etiquetada de interés (p. ej., SIRT3 o AceCS2) se une al soporte sólido por interacción de la etiqueta y el ligador de etiqueta.

10 Se pueden usar varias etiquetas y ligadores de etiquetas, basándose en las interacciones moleculares conocidas bien descritas en la bibliografía. Por ejemplo, cuando una etiqueta tiene un ligador natural, por ejemplo, biotina, proteína A o proteína G, se puede usar junto con los ligadores adecuados (avidina, estreptavidina, neutravidina, la región Fc de una inmunoglobulina, etc.). También se dispone ampliamente de anticuerpos para moléculas con ligadores naturales como biotina y ligadores de etiquetas adecuados (véase, SIGMA Immunochemicals 1998 catalogue SIGMA, St. Louis Mo).

20 De manera similar, se puede usar cualquier compuesto hapténico o antigénico en combinación con un anticuerpo adecuado para formar un par etiqueta/ligador de etiqueta. Se dispone comercialmente de miles de anticuerpos específicos y muchos otros anticuerpos se describen en la bibliografía. Por ejemplo, en una configuración común, la etiqueta es un primer anticuerpo y el ligador de etiqueta es un segundo anticuerpo que reconoce el primer anticuerpo. Además de las interacciones antígeno-anticuerpo, también son adecuadas las interacciones receptor-ligando como pares etiqueta y ligador de etiqueta, como agonistas y antagonistas de los receptores de la membrana celular (p. ej., interacciones receptor celular-ligando como transferrina, c-kit, ligandos del receptor viral, receptores de citocina, receptores de quimiocina, receptores de interleucina, receptores de inmunoglobulina y anticuerpos, la familia de las cadherinas, la familia de las integrinas, la familia de las selectinas y análogos; véase, p. ej., Pigott & Power, *The Adhesion Molecule Facts Book I* (1993)). De manera similar, toxinas y venenos, epítomos virales, hormonas (p. ej., opiáceos, esteroides, etc.), receptores intracelulares (p. ej., que actúan de mediadores de los efectos de varios ligandos pequeños, incluidos esteroides, hormonas tiroideas, retinoides y vitamina D; péptidos), fármacos, lectinas, azúcares, ácidos nucleicos (configuraciones de polímeros lineales y cíclicas), oligosacáridos, proteínas, fosfolípidos y anticuerpos todos pueden interactuar con diversos receptores celulares.

35 Los polímeros sintéticos, como poliuretanos, poliésteres, policarbonatos, poliureas, poliamidas, polietilenoiminas, sulfuros de poliarilenos, polisiloxanos, poliimidias y poliacetatos también pueden formar una etiqueta o un ligador de etiqueta adecuado. Muchos otros pares de etiqueta/ligador de etiqueta también son útiles en sistemas de ensayo descritos en este documento, como resultará evidente a los expertos luego de la revisión de esta divulgación.

40 Los ligadores comunes como los péptidos, poliéteres y análogos también pueden servir como etiquetas, e incluyen secuencias de polipéptidos, como secuencias poli Gly de aproximadamente 5 a 200 aminoácidos (SEC. ID N°: 14). Dichos ligadores flexibles son conocidos por los expertos. Por ejemplo, los ligadores poli(etilenglicol) se pueden obtener de Shearwater Polymers, Inc., Huntsville, Ala. Estos ligadores tienen opcionalmente uniones amida, uniones sulfhidrilo o uniones heterofuncionales.

45 Los ligadores de etiquetas se fijan a soportes sólidos usando cualquiera de una diversidad de métodos disponibles en la actualidad. Los sustratos sólidos se derivatizan o funcionalizan comúnmente mediante exposición de todo o una parte del sustrato a un reactivo químico el cual fija un grupo químico a la superficie que es reactiva con una porción del ligador de etiqueta. Por ejemplo, los grupos que son adecuados para unirse a una porción de cadena más larga incluirían grupos aminas, hidroxilo, tiol y carboxilo. Se pueden usar aminoalquilsilanos e hidroxialquilsilanos para funcionalizar diversas superficies, como superficies de vidrio. La construcción de dichas matrices biopoliméricas de fase sólida está bien descrita en la bibliografía (véase, p. ej., Merrifield, 1965, *Endeavour* 24:37; Merrifield, 1964, *Biochemistry* 3:1385-90; Merrifield y Stewart, 1965, *Nature* 207(996):522-3; Merrifield, 1965, *Science* 150(693): 178-85 (que describe síntesis de fase sólida de, p. ej., péptidos); Geysen *et al.*, 1987, *J Immun Meth* 102:259-274 (que describe la síntesis de componentes de fase sólida sobre alfileres); Frank y Doring, 1988, *Tetrahedron* 44:6031-6040 (que describe síntesis de diversas secuencias de péptidos sobre discos de celulosa); Fodor *et al.*, 1991, *Science* 251 :767-777; Sheldon *et al.*, 1993, *Clinical Chemistry* 39(4):718-719; y Kozal *et al.*, 1996, *Nature Medicine* 2(7):753-759 (todos describen matrices de biopolímeros fijadas a sustratos sólidos). Los métodos no químicos para fijar ligadores de etiquetas a sustratos incluyen otros métodos comunes, como calor, reticulación por radiación UV y similares.

60 La invención proporciona ensayos *in vitro* para identificar, en un formato de alta productividad, agentes que puedan aumentar un nivel o una actividad de SIRT3 o agentes que modulen un nivel, un estado de acetilación o una actividad de AceCS2. Las reacciones de control que miden un nivel o una actividad de SIRT3 o un nivel, un estado de acetilación o una actividad de AceCS2 en una reacción que no incluye un activador/modulador potencial son opcionales, puesto que los ensayos son sumamente uniformes. Dichas reacciones de control opcionales son

adecuadas y aumentan la confiabilidad del ensayo. Concordantemente, en algunas realizaciones, los métodos de la invención incluyen una reacción de control de ese tipo. Para cada uno de los formatos de ensayo descritos, reacciones de control "sin activador" o "sin modulador" que no incluyen un activador de SIRT3 ni un modulador de AceCS2 proporcionan un nivel de base de la actividad de unión.

### III. Activadores de SIRT3 y moduladores de AceCS2

Cualquier agente con potencial terapéutico, por ejemplo, extractos celulares, sobrenadantes de cultivos celulares, productos de microorganismos fermentadores, extractos de organismos marinos, extractos de plantas, proteínas crudas o purificadas, péptidos, compuestos no peptídicos, ácidos nucleicos, sacáridos, lípidos, compuestos micromoleculares sintéticos, compuestos naturales y análogos, se pueden usar en los métodos de detección sistemática de la presente invención. El agente con potencial terapéutico de la presente invención también se puede obtener usando cualquiera de los numerosos métodos de búsqueda en bibliotecas combinatorias descritos en este documento y métodos conocidos en el área, que incluyen (1) bibliotecas biológicas, (2) bibliotecas espacialmente direccionables en fase sólida paralela o en fase solución, (3) métodos de bibliotecas sintéticas que requieren deconvolución, (4) el método de la biblioteca "una perla-un compuesto" y (5) métodos de biblioteca sintéticas que usan selección mediante cromatografía por afinidad. Los métodos de biblioteca biológica que usan selección mediante cromatografía por afinidad se limitan a las bibliotecas de péptidos, mientras que los otros cuatro métodos se pueden aplicar a bibliotecas de péptidos, oligómeros no peptídicos o compuestos de molécula pequeña (Lam, 1997, *Anticancer Drug Des.* 12:145).

Se pueden encontrar en el área ejemplos de métodos para la síntesis de bibliotecas moleculares (DeWitt *et al.*, 1993, *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 6909; Erb *et al.*, 1994, *Proc. Natl Acad Sci USA* 91: 11422; Zuckermann *et al.*, 1994, *J Med Chem* 37:2678; Cho *et al.*, 1993, *Science* 261:1303; Carell *et al.*, 1994, *Angew Chem Int. Ed Engl.* 33:2059; Carell *et al.*, 1994, *Angew Chem Int Ed. Engl.* 33:2061; Gallop *et al.*, 1994, *J Med Chem* 37:1233). Los dispositivos para la preparación de bibliotecas combinatorias están disponibles en el comercio (véase, p. ej., 357 MPS, 390 MPS, Advanced Chem Tech, Louisville Ky., Symphony, Rainin, Woburn, Mass., 433A Applied Biosystems, Foster City, Calif., 9050 Plus, Millipore, Bedford, Mass.). Además, numerosas bibliotecas combinatorias están ellas mismas disponibles en el comercio (véase, p. ej., ComGenex, Princeton, N. J., Asinex, Moscow, Ru, Tripos, Inc., St. Louis, Mo., ChemStar, Ltd, Moscú, RU, 3D Pharmaceuticals, Exton, Pa., Martek BioSciences, Columbia, Md., etc.).

Las bibliotecas de los compuestos se pueden presentar en solución (véase Houghten, 1992, *Bio/Techniques* 13:412) o sobre perlas (Lam, 1991, *Nature* 354: 82), chips (Fodor, 1993, *Nature* 364:555), bacterias (patente de los Estados Unidos N° 5,223,409), esporas (patente de los Estados Unidos N° 5,571, 698; 5,403,484 y 5,223,409), plásmidos (Cull *et al.*, 1992, *Proc Natl Acad Sci USA* 89:1865) o fagos (Scott y Smith, 1990, *Science* 249:386; Devlin, 1990, *Science* 249:404; Cwirlla *et al.*, 1990, *Proc Natl Acad Sci USA* 87:6378; Felici, 1991, *J Mol Biol* 222 301; solicitud de patente de los Estados Unidos 20020103360). El agente con potencial terapéutico expuesto a una célula o proteína de acuerdo con los métodos de detección sistemática de la presente invención puede ser un único agente o una combinación de agentes. Cuando se usa una combinación de agentes en los métodos de detección sistemática de la invención, el agente se puede poner en contacto con la célula o la proteína, secuencialmente o simultáneamente.

Un agente aislado por los métodos de detección sistemática de la presente invención es un posible fármaco para activar un nivel o una actividad de un SIRT3 o es un posible fármaco para modular un nivel, un estado de acetilación o una actividad de un AceCS2. Los fármacos con potencial terapéutico son útiles para tratar o prevenir una patología, un trastorno o una enfermedad como los descritos en este documento. Un agente en el cual una parte de su estructura obtenida por un método de detección sistemática de la presente invención se convierte por adición, deleción y/o reemplazo, se incluye en los agentes obtenidos por los métodos de detección sistemática de la presente invención. A un agente eficaz para activar un nivel o una actividad de un SIRT3 o un agente que module un nivel, un estado de acetilación o una actividad de un AceCS2 se le puede probar su capacidad para tratar o prevenir un trastorno, una enfermedad o una patología en modelos animales o sujetos de prueba.

Los agentes identificados por cualquiera de los métodos descritos en este documento son útiles como agentes biológicamente activos. En una realización preferida el agente biológicamente activo activa un nivel o una actividad de un SIRT3 según se describe en este documento. En otra realización preferida el agente biológicamente activo modula un nivel, un estado de acetilación o una actividad de un AceCS2, según se describe en este documento.

Además, los profármacos también están incluidos en el contexto de esta invención. Los profármacos son cualquier portador unido covalentemente que libere un agente de la presente invención *in vivo* cuando dicho profármaco se administra a un paciente. Los profármacos se preparan generalmente modificando grupos funcionales de manera tal que la modificación es escindida, ya sea por manipulación de rutina o *in vivo*, produciendo el agente generador.

Se pueden usar diversos agentes que modulen uno o más de un nivel, un estado de acetilación o una actividad de un AceCS2 como los descritos en este documento. Éstos incluyen ARNip, ARN antisentido, ribozimas, moléculas pequeñas y proteínas dominantes negativas. Las moléculas pequeñas también son útiles como agentes para la

activación de un nivel o una actividad de un SIRT3.

Según se describe en este documento, los moduladores de AceCS2 incluyen activadores e inhibidores (p. ej., un antagonista) de AceCS2. El ARNip, el ARN antisentido, las ribozimas y las proteínas dominantes negativas son particularmente útiles para inhibir una actividad de un ácido nucleico o polipéptido. Por lo tanto, en una realización, la presente invención proporciona composiciones que contienen ARNip, ARN antisentido, ribozimas y proteínas dominantes negativas para inhibir un ácido nucleico AceCS2 o un polipéptido AceCS2 y métodos para usar ARNip, ARN antisentido, ribozimas y proteínas dominantes negativas para inhibir un ácido nucleico AceCS2 o un polipéptido AceCS2 tanto *in vitro* como *in vivo*. Esos métodos y esas composiciones son útiles para tratar patologías, trastornos o enfermedades e interferir con la actividad de AceCS2. Una patología, un trastorno o una enfermedad preferida se caracteriza por ser causada por, o estar asociada a, un nivel elevado de acetil-CoA con respecto al normal. Luego de la administración de un ARNip, un ARN antisentido, una ribozima o una proteína dominante negativa para inhibir un ácido nucleico AceCS2 o un polipéptido AceCS2 como los descritos en este documento a un individuo que tenga dicha patología, dicho trastorno o dicha enfermedad, el nivel elevado de acetil-CoA en el individuo se reduce, preferentemente a un nivel normal.

#### A. Moléculas pequeñas

En una realización preferida el agente es una molécula pequeña que puede ser identificada según se describe en este documento. En este documento se describen moléculas pequeñas útiles y las bibliotecas combinatorias que las contienen. Son particularmente útiles los agentes de molécula pequeña que activan un nivel o una actividad de SIRT3 o que modulan un nivel, un estado de acetilación o una actividad de una AceCS2m según se describe en este documento.

#### B. ARNip

En una realización preferida de la presente invención, un agente que modula uno o más de un nivel, un estado de acetilación o una actividad de AceCS2 según se describe en este documento es un ARN interferente pequeño (ARNip). Véase, p. ej., las solicitudes PCT WOO/44895, WO99/32619, WO01/75164, WO01/92513, WO01/29058, WO01/89304, WO02/16620 y WO02/29858; y la publicación de patente de los Estados Unidos N° 20040023390 por descripciones de la tecnología del ARNip.

En una realización preferida el agente es un ARNip dirigido contra un ARNm de AceCS2.

Por consiguiente, los agentes de la presente invención que son útiles para practicar los métodos de la presente invención incluyen, pero no exclusivamente, ARNip de AceCS2. Típicamente, dichos agentes son capaces de (i) unirse al ARNm de AceCS2, (ii) interferir con la traducción del ARNm de AceCS2 o (iii) conducir a la degradación del ARNm de AceCS2. La presente invención proporciona composiciones y métodos que usan interferencia por ARN para modular la expresión de AceCS2.

En muchas especies, la introducción de ARN bicatenario (ARNbc) que puede ser denominado alternativamente en este documento como ARN de interferencia pequeño (ARNip), induce un potente y específico silenciamiento génico, un fenómeno denominado interferencia por ARN o iARN. Este fenómeno ha sido exhaustivamente documentado en el nemátodo *C. elegans* (Fire *et al*, 1998, *Nature*, 391 :806-811), pero está generalizado en otros organismos, que van de los tripanosomas al ratón. Dependiendo del organismo que se está tratando, la interferencia por ARN ha sido denominada "cosupresión", "silenciamiento génico post transcripcional", "supresión de sentido" y "extinción". La iARN es una herramienta biotecnológica atractiva porque proporciona medios para inactivar la actividad de genes específicos. Es particularmente útil para inactivar la expresión génica en especies que no fueron consideradas previamente como factibles de análisis o manipulación genética.

La iARN se describe usualmente como un fenómeno de silenciamiento génico post transcripcional (PTGS) en el cual el ARNbc desencadena la degradación del ARNm homólogo en el citoplasma. El proceso básico implica un ARNbc que es procesado en unidades más cortas (denominado ARN interferente corto o pequeño (ARNip)) que guía el reconocimiento y la escisión dirigida del ARN mensajero homólogo (ARNm). El ARNbc que (después del procesamiento) desencadena iARN/PTGS se puede preparar en el núcleo o el citoplasma de varias maneras. El procesamiento de los ARNbc en ARNip, los cuales a su vez degrada el ARNm, es un proceso de degradación del ARN en dos pasos. El primer paso implica una actividad de endonucleasa de ARNbc (ribonucleasa tipo III; RNasa tipo III) que procesa el ARNbc en ARN sentido y antisentido que tienen 21 a 25 nucleótidos (nt) de longitud (es decir, ARNip). En *Drosophila*, esta proteína tipo RNasa III se denomina Dicer. En el segundo paso, los ARNip antisentido producidos se combinan con, y sirven como guías para, un complejo ribonucleasa diferente denominado complejo silenciador inducido por ARN (RISC), que escinde los ARNm monocatenarios homólogos. El RISC corta del ARNm aproximadamente en el medio de la región apareada con el ARNip sentido, luego de lo cual el ARNm es degradado aún más. Los ARNbc de diferentes fuentes pueden entrar en la vía de procesamiento llevando a iARN/PTGS.

Por consiguiente, en una realización preferida de la presente invención, el agente para usar en los métodos de la

presente invención es un ARNip de AceCS2. El ARNip se puede usar para reducir el nivel de expresión de AceCS2. Un ARNip de AceCS2 se hibrida a un ARNm de AceCS2 y de ese modo disminuye o inhibe la producción de polipéptidos AceCS2.

5 Al diseñar experimentos de iARN hay varios factores que necesitan ser considerados como la naturaleza del ARNip, la durabilidad del efecto de silenciamiento, y la elección del sistema de suministro. Para producir un efecto de iARN, el ARNip que se introduce en el organismo debe contener preferentemente secuencias exónicas. Sin embargo, también se pueden elegir ARNip dirigidos contra, p. ej., secuencias de corte y empalme exón/intrón. Por otra parte, el proceso de iARN es dependiente de la homología, de modo que las secuencias se deben seleccionar  
10 cuidadosamente para maximizar la especificidad génica minimizando simultáneamente la posibilidad de interferencia cruzada entre secuencias homólogas pero no específicas del gen. Preferentemente el ARNip tiene más de 90% o incluso 100% de identidad entre la secuencia del ARNip y el gen que se va a inhibir. Las secuencias menos de 80% idénticas al gen diana son sustancialmente menos eficaces. Por lo tanto, cuanto mayor la homología entre el ARNip de AceCS2 y el gen de AceCS2 cuya expresión se va a inhibir, menor la probabilidad de que la expresión de genes  
15 no relacionados sea afectada.

Además, el tamaño del ARNip es importante. Generalmente, la presente invención se refiere a moléculas de ARNip de AceCS2, que son monocatenarias o bicatenarias y contienen al menos aproximadamente 19 a 25 nucleótidos, y son capaces de modular la expresión génica de AceCS2. En el contexto de la presente invención, el ARNip tiene preferentemente menos de 500, 200, 100, 50 o 25 nucleótidos de longitud. Más preferentemente, el ARNip tiene entre aproximadamente 19 nucleótidos y aproximadamente 25 nucleótidos de longitud.

En un aspecto, la invención caracteriza generalmente una molécula de ARNip aislada de al menos 19 nucleótidos, que tiene al menos una hebra que es sustancialmente complementaria de al menos diez pero no más de treinta nucleótidos consecutivos de AceCS2 y que reduce la expresión del gen de o la proteína AceCS2.

Por consiguiente, una composición que contenga un ARNip como el descrito en este documento es útil en un método para modular un nivel, un estado de acetilación o una actividad de un AceCS2 en una célula de mamífero o en un método para el tratamiento de una patología, un trastorno o una enfermedad como los descritos en este documento.

#### 1. Selección de los sitios diana del ARNip

Las secuencias de ácidos nucleicos que codifican a AceCS2 están descritas en el área y están disponibles en GenBank. Por ejemplo, se pueden encontrar secuencias de ácidos nucleicos para AceCS2 humano p. ej., en GenBank N° de registro BC039261; se pueden encontrar secuencias de ácidos nucleicos de AceCS2 de ratón, p. ej., en GenBank N° de registro AB046742; y se pueden encontrar secuencias de ácidos nucleicos de AceCS2 bovina, p. ej., en GenBank N° de registro AB046741.

40 Se pueden encontrar secuencias de ácidos nucleicos para SIRT3 humano p. ej. en GenBank N° de registro NM\_001017524, NM\_012239, BC001042 y AF083108; se pueden encontrar secuencias de ácidos nucleicos de SIRT3 de ratón, p. ej., en GenBank N° de registro CT01142, BC025878 y NM\_022433; se pueden encontrar secuencias de ácidos nucleicos de SIRT3 de rata, p. ej., en GenBank N° de registro XM\_215124; se pueden encontrar secuencias de ácidos nucleicos de SIRT3 bovino p. ej., en GenBank N° de registro XM 864790 y  
45 XM\_873980; se pueden encontrar secuencias de ácidos nucleicos de SIRT3 de perro, p. ej., en GenBank N° de registro XM 843207, XM\_850716 y XM 851003; y se pueden encontrar secuencias de ácidos nucleicos de SIRT3 de pez cebra, p. ej., en GenBank N° de registro XM 679133 y XM\_685833.

Con esas secuencias a mano un experto puede identificar fácilmente sin excesiva experimentación usando, p. ej., los conocimientos proporcionados en este documento, los ARNip para practicar los métodos y preparar las composiciones de la presente invención.

En una realización preferida de la presente invención, la molécula de ARNip tiene al menos una hebra que es sustancialmente complementaria de al menos diez pero no más de treinta nucleótidos consecutivos de un AceCS2. Usando dichos oligonucleótidos, la expresión de AceCS2 puede ser reducida drásticamente. En otras realizaciones de la presente invención, un ARNip para inhibir la expresión de AceCS2 desde un ARNm de AceCS2 comprende un ARNip obtenido a partir de cualquiera de las secuencias de AceCS2 dadas a conocer en este documento (véase los números de registro GenBank proporcionados en este documento).

60 Sin una excesiva experimentación y usando los conocimientos de esta invención, se entiende que se pueden diseñar otros ARNip de AceCS2 que modulen la expresión de AceCS2 y usar para practicar los métodos de la invención.

Un ARNip preferible utilizado en la presente invención tiene la fórmula general:



5'-[A]-[B]-[A']-3'

donde [A] es una secuencia de ribonucleótidos correspondiente a una secuencia diana de un gen de AceCS2; [B] es una secuencia de ribonucleótidos que consta de aproximadamente 3 a aproximadamente 23 nucleótidos; y [A'] es una secuencia de ribonucleótidos complementaria de [A]. En este documento, la frase "una secuencia diana de un gen de AceCS2" se refiere a una secuencia que, cuando se introduce en una célula de mamífero, es eficaz para inhibir o reducir la traducción de un ARNm de AceCS2.

Otros ARNip diferentes de los dados a conocer en este documento, útiles para practicar un método de la presente invención pueden ser identificados de la manera siguiente. Comenzando con el codón de inicio AUG del transcrito (p. ej., un ARNm de AceCS2), el transcrito se explora corriente abajo en busca de secuencias de dinucleótido AA. Se registran la aparición de cada AA y los 19 nucleótidos adyacentes a 3' como potenciales sitios diana del ARNip. Pueden no ser recomendable diseñar ARNip contra las regiones sin traducir (UTR) 5' y 3' y las regiones próximas al codón de inicio (entre 75 bases) porque pueden ser más ricas en sitios de unión a la proteína reguladora, y por lo tanto el complejo de endonucleasa y de los ARNip que fueron diseñados contra esas regiones pueden interferir con la unión de UTR-proteínas de unión y/o los complejos de iniciación de la traducción (Tuschl, *et al.* 1999, *Genes Dev* 13(24):3191-7). Los potenciales sitios diana se comparan después con la base de datos del genoma humano u otras secuencias de mamífero, dependiendo de la especie en la cual se va a modular la expresión de AceCS2. Todas las secuencias diana con homología significativa con otras secuencias de codificación son eliminadas de la consideración. La búsqueda de homología se puede llevar a cabo usando BLAST (Altschul *et al.*, 1997, *Nucleic Acids Res* 25:3389-402; Altschul *et al.*, 1990, *J Mol Biol* 215:403-10). A continuación, se seleccionan las secuencias diana que califican para la síntesis. En el sitio web de Ambion, se pueden seleccionar varias secuencias diana preferibles junto con la longitud del gen para evaluación.

La molécula bicatenaria de la presente invención comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, donde la hebra sentido comprende una secuencia de ribonucleótidos correspondiente a una secuencia diana de AceCS2, y donde la hebra antisentido comprende la secuencia de ribonucleótidos que es complementaria de dicha hebra sentido, donde dichas hebra sentido y hebra antisentido se hibridan entre sí para formar dicha molécula bicatenaria, y donde dicha molécula bicatenaria, cuando se la introduce en una célula que expresa un gen de AceCS2, inhibe la expresión de dicho gen.

La molécula bicatenaria de la presente invención puede ser un polinucleótido derivado de su ambiente original (es decir cuando es una molécula de origen natural, el ambiente natural), alterado física o químicamente de su estado natural, o sintetizado químicamente. De acuerdo con la presente invención, dichas moléculas bicatenarias incluyen las compuestas por ADN, ARN y sus derivados. Un ADN está adecuadamente compuesto de bases como A, T, C Y G, y T es reemplazada por U en un ARN.

El ARNip puede ser expresado de un vector. El vector contiene preferentemente una secuencia reguladora adyacente a la región que codifica la molécula bicatenaria de la presente que dirige la expresión de la molécula en una célula adecuada. Por ejemplo, las moléculas bicatenarias de la presente invención se transcriben intracelularmente mediante clonación de sus secuencias de codificación en un vector que contiene, p. ej. una unidad de transcripción ARN polimerasa III del ARN nuclear pequeño (ARNnp) U6 o el promotor H1 ARN humano.

Alternativamente, los vectores de la presente se producen, por ejemplo, clonando la secuencia diana en un vector de expresión de modo que la secuencia objetivo sea ligada operativamente a una secuencia reguladora del vector de manera de permitir su expresión (transcripción de la molécula de ADN) (Lee *et al.*, 2002, *Nature Biotechnology* 20:500-505). Por ejemplo, la transcripción de una molécula de ARN que tenga una secuencia antisentido respecto a la secuencia diana es conducida por un primer promotor (p. ej., una secuencia promotora ligada al extremo 3' del ADN clonado) y que tenga una hebra sentido con respecto a la secuencia diana por un segundo promotor (p. ej., una secuencia promotora ligada al extremo 5' del ADN clonado). Las hebras sentido y antisentido expresadas se hibridarán entre sí *in vivo* para generar un constructo de ARNip para silenciar un gen que contiene la secuencia diana. Por otra parte, se pueden utilizar dos constructos (vectores) para producir respectivamente las hebras sentido y antisentido de un constructo de ARNip.

Para introducir los vectores en una célula, se puede usar un agente que potencie la transfección. FuGENEó (Roche Diagnostics), Lipofectamina 2000 (Invitrogen), Oligofectamina (Invitrogen) y Nucleofector (Wako pure Chemical) son útiles como el agente potenciador de la transfección. Se puede usar la transfección de vectores que expresan polinucleótidos de ARNip de la invención para inhibir un AceCS2 en una célula de mamífero. Por lo tanto, es otro aspecto de la presente invención proporcionar una molécula bicatenaria que tenga una hebra sentido y una hebra antisentido, donde dicha molécula funciona como un ARNip para AceCS2, y un vector que codifique la molécula bicatenaria.

El ARNip también puede contener una alteración de uno o más nucleótidos. Dichas alteraciones pueden incluir la adición de un material no nucleotídico, como en uno o los dos extremos del ARN de 19 a 25 nucleótidos o internamente (en uno o más nucleótidos del ARN). En una realización preferida, la molécula de ARN contiene un

grupo 3'-hidroxilo. Los nucleótidos de las moléculas de ARN de la presente invención también pueden contener nucleótidos no estándar, incluidos nucleótidos que no son de origen natural o desoxirribonucleótidos. El oligonucleótido bicatenario puede contener un esqueleto modificado, por ejemplo, fosforotioato, fosforoditioato, u otros esqueletos modificados conocidos en el área, o puede contener uniones internucleósidos no naturales. Se pueden encontrar modificaciones adicionales de los ARNip (p. ej., 2'-O-metil ribonucleótidos, 2'-desoxi-2'-fluoro ribonucleótidos, nucleótidos "base universal", 5-C-metil nucleótidos, una o más uniones fosforotioato internucleótidos, e incorporación desoxiabásica invertida de residuos ) en la solicitud de patente de los Estados Unidos N° 20040019001 y en la patente de los Estados Unidos: N° 6,673,611 (incorporada por referencia). Colectivamente, todos dichos ARN alterados descritos antes se denominan ARNip modificados.

Preferentemente, la iARN es capaz de reducir la expresión de AceCS2 en una célula en al menos 10%, 20%, 30% o 40%, más preferentemente en al menos 50%, 60% o 70%, y muy preferentemente en al menos 75%, 80%, 90%, 95% o más.

La introducción de ARNip en las células se puede lograr mediante métodos conocidos en el área y dados a conocer en este documento, incluidos por ejemplo, microinyección, electroporación o transfección de un vector que contiene un ácido nucleico a partir del cual se puede transcribir el ARNip. Alternativamente, se puede introducir un ARNip para AceCS2 directamente en una célula de forma que sea capaz de unirse a un transcrito de ARNm de AceCS2. Para aumentar la durabilidad y la permeabilidad de la membrana del ARNip se puede combinar o modificar con liposomas, poli-L-lisina, lípidos, colesterol, lipofectina o sus derivados. Se prefieren los ARNip conjugados a colesterol para AceCS2 (véase, Song *et al.*, *Nature Med.* 9:347-351 (2003)).

Los ARNip y los vectores que comprenden secuencias de ácidos nucleicos de ARNip y métodos para preparar y usar los mismos se describen, por ejemplo en la solicitud de patente de los Estados Unidos N° 20060051815, que se incorpora en este documento por referencia en su totalidad.

#### C. ARN antisentido y ribozimas

Se pueden usar diversos agentes para modular el nivel, el estado de acetilación o la actividad de una AceCS2 como los descritos en este documento. Por ejemplo, la expresión de AceCS2 puede ser modulada, preferentemente inhibida, mediante administración, a una célula o un sujeto, de un ácido nucleico que inhiba o antagonice la expresión de un gen de AceCS2. Además de los ARNip, descritos antes, se pueden usar oligonucleótidos antisentido o ribozimas que alteren la expresión de un gen de AceCS2 para modular el nivel o la actividad de un AceCS2. En una realización preferida el modulador, preferentemente un inhibidor, es un ARN antisentido, el cual se puede identificar según se describe en este documento.

Como se indicó antes, se pueden usar los oligonucleótidos antisentido correspondientes a cualquiera de las secuencias de nucleótidos de un gen de AceCS2 para reducir el nivel de expresión del gen. Específicamente, un oligonucleótido antisentido contra un gen de AceCS2 puede actuar uniéndose a cualquiera de los ARNm de AceCS2, inhibiendo de ese modo la transcripción o traducción de un gen de AceCS2, promoviendo la degradación de un ARNm de AceCS2, y/o inhibiendo la expresión de proteínas codificadas por un gen de AceCS2, y finalmente inhibiendo la función de una proteína AceCS2.

Los oligonucleótidos antisentido y los ARNip de la invención también pueden ser definidos por su capacidad para hibridarse específicamente al ARNm o el ADNc de los genes dados a conocer en este documento.

Un oligonucleótido antisentido y sus derivados se pueden elaborar como una preparación externa, como un linimento o un emplasto, mezclándolos con un material de base adecuado que sea inactivo frente al derivado.

Los oligonucleótidos antisentido de la invención inhiben la expresión de una proteína codificada por un gen de AceCS2, y por lo tanto son útiles para suprimir la actividad biológica de un AceCS2 o de un complejo multiproteína que contenga uno de los polipéptidos AceCS2 o SIRT3.

Generalmente, las ribozimas se clasifican en ribozimas grandes y ribozimas pequeñas. Una ribozima grande es conocida como una enzima que escinde el enlace éster fosfato de los ácidos nucleicos.

Después de la reacción con la ribozima grande, el sitio que reaccionó consta de un grupo 5'-fosfato y 3'-hidroxilo. La ribozima grande se clasifica además en (1) ARN intrón del grupo I que cataliza la transesterificación en el sitio de corte y empalme 5' por la guanosina; (2) ARN del intrón del grupo II que cataliza el auto corte y empalme a través de una reacción en dos pasos a través estructura lariat; y (3) componente ARN de la ribonucleasa P que escinde el precursor del ARNt en el sitio 5' a través de hidrólisis. Por otra parte, las ribozimas pequeñas tienen un tamaño menor (aproximadamente 40 bp) en comparación con las ribozimas grandes y escinden los ARN para generar un grupo 5'-hidroxilo y un fosfato 2'-3' cíclico. Las ribozimas tipo cabeza de martillo (hammerhead) (Koizumi *et al.*, 1988, *FEBS Lett.* 228:225) y ribozimas tipo horquilla (hairpina) (Buzayan, 1986, *Nature* 323:349; Kikuchi y Sasaki, 1991, *Nucleic Acids Res.* 19: 6751) están incluidas en las ribozimas pequeñas. Los métodos para diseñar y construir

ribozimas son conocidos en el área (véase Koizumi *et al.*, 1988, *FEBS Lett.* 228:225; Koizumi *et al.*, 1989, *Nucleic Acids Res.* 17:7059; Kikuchi y Sasaki, 1991, *Nucleic Acids Res.* 19: 6751) y las ribozimas que inhiben la expresión de un polipéptido AceCS2 se pueden construir basándose en la información de secuencia de la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido AceCS2 de acuerdo con métodos convencionales para producir ribozimas.

#### D. Proteínas dominantes negativas

Se pueden usar diversos agentes para inhibir un nivel, un estado de acetilación o una actividad de una AceCS2. En una realización preferida el inhibidor es una proteína dominante negativa que puede ser identificada según se describe en este documento.

Según describen los inventores de la presente, un polipéptido AceCS2 se ensambla en un complejo multiproteína. Por lo tanto, en una realización preferida, una proteína dominante negativa que inhibe el nivel, el estado de acetilación o la actividad de un AceCS2 o uno de sus fragmentos activos que modula, preferentemente que inhibe, el ensamblaje de un polipéptido AceCS2 en un complejo multiproteína biológicamente activo. Luego de la inhibición del ensamblaje del complejo biológicamente activo, una más actividades de un polipéptido AceCS2 pueden ser inhibidas o reducidas, como la actividad enzimática de convertir acetato, ATP y CoA en acetil-CoA y AMP o la localización en la mitocondria.

Se pueden identificar otras proteínas dominantes negativas para AceCS2 usando métodos conocidos en el área y los ensayos dados a conocer en este documento.

Cuando el compuesto con potencial terapéutico es una proteína, la secuencia de aminoácidos de la proteína obtenida se analiza, se sintetiza un oligo ADN basado en la secuencia y se detectan sistemáticamente bibliotecas de ADNc usando el oligo ADN como una sonda para obtener un ADN que codifique la proteína.

#### IV. Métodos para usar los agentes

Los agentes identificados en este documento encuentran uso en diversos métodos, por ejemplo se pueden usar para (i) activar un nivel o una actividad de SIRT3, (ii) modular un nivel, un estado de acetilación o una actividad de AceCS2, o (iii) tratar una patología, un trastorno o una enfermedad. Esos métodos se pueden practicar *in vitro* e *in vivo*. Preferentemente, los pacientes tratados por cualquiera de los métodos son animales humanos y no humanos.

##### A. Aumento de un nivel o de una actividad de SIRT3

Usando agentes identificados o identificables por un método de detección sistemática de la presente invención, se puede aumentar un nivel o una actividad de SIRT3, es decir estimular o activar, *in vitro* o *in vivo*. Por consiguiente, en un aspecto de la presente invención, se proporciona un método para aumentar un nivel o una actividad de un SIRT3. En una realización preferida de la presente invención, este método comprende el paso de poner en contacto un SIRT3 con un agente obtenido u obtenible mediante un método de detección sistemática de la presente invención, donde el nivel o la actividad de SIRT3 es aumentado.

El SIRT3 puede estar en una célula, preferentemente en una célula de mamífero y más preferentemente en una célula humana. Una actividad preferida de SIRT3 es la actividad desacetilasa de SIRT3, preferentemente la desacetilación de AceCS2.

El efecto de los agentes *in vitro* o *in vivo* se puede ensayar según se describe en este documento.

##### B. Modulación del nivel, el estado de acetilación o la actividad de acetil-CoA sintetasa 2

Aún en otro aspecto, se describe en este documento un método para modular un nivel, un estado de acetilación o una actividad de un AceCS2. En una realización preferida de la presente invención, este método comprende el paso de poner en contacto un polipéptido AceCS2 con un agente obtenido u obtenible mediante un método de detección sistemática de la presente invención, como un método para identificar un agente que aumente un nivel, un estado de acetilación o una actividad de AceCS2, donde el nivel, el estado de acetilación o la actividad de un AceCS2 es modulado.

El AceCS2 puede estar en una célula, preferentemente en una célula de mamífero y más preferentemente en una célula humana. Una actividad preferida de AceCS2 es una actividad enzimática, preferentemente la generación de acetil-CoA según se describe en este documento.

El efecto de los agentes *in vitro* o *in vivo* se puede ensayar según se describe en este documento.

##### C. Tratamiento de una patología

También se describen en este documento métodos para el tratamiento de una patología, un trastorno o una enfermedad.

5 En algunas circunstancias, en mamíferos, se producen grandes cantidades de acetato que necesitan ser activadas por acetil-CoA sintetasa. Por ejemplo, en las afecciones cetogénicas como ayuno prolongado o diabetes, el hígado libera cantidades sustanciales de acetato a la circulación sanguínea (Buckley y Williamson, 1977, *Biochem J* 166:539-45; Seufert *et al.*, 1974, *Biochem Biophys Res Commun* 57:901-9; Yamashita *et al.*, 2001, *Biochim Biophys Acta* 1532:79-87). Además, la acetil-CoA hidrolasa hepática, que produce acetato, se activa en afecciones cetogénicas (Matsunaga *et al.*, 1985, *Eur J Biochem* 152, 331-6). La utilización del acetato liberado en tejidos extrahepáticos requiere la acción de acetil-CoA sintetasas. El descubrimiento de que AceCS2 es abundante en el corazón y el músculo esquelético pero que está ausente en el hígado y es inducida por afecciones cetogénicas, sugiere que AceCS2 desempeña un papel importante en la conversión de acetato para la producción de energía en afecciones cetogénicas (Fujino *et al.*, 2001, *J Biol Chem* 276, 11420-6). Por lo tanto, una patología, un trastorno o una enfermedad preferida que puede ser tratada de acuerdo con la presente invención es una afección cetogénica. Además, los trastornos relacionados con, asociados a, o causados (directa o indirectamente) por, una afección cetogénica, también son factibles de ser tratados usando un método de acuerdo con la presente invención.

20 Por consiguiente, en un aspecto, se describe en este documento un método para el tratamiento de un individuo que tiene una afección cetogénica. En una realización preferida, este método comprende el paso de administrar a un individuo que tiene una afección cetogénica una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente que aumenta un nivel o una actividad desacetilasa de SIRT3, donde SIRT3 desacetila a AceCS2, y donde el individuo que tiene la afección cetogénica es tratado. El agente que aumenta un nivel o una actividad desacetilasa de SIRT3 se obtiene o es obtenible usando un método de detección sistemática de la presente invención.

25 En otra realización, el método para el tratamiento de un individuo que tiene una afección cetogénica comprende el paso de administrar a un individuo que tiene una afección cetogénica una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente que aumenta un nivel, un estado de acetilación o una actividad de AceCS2, donde el individuo que tiene la afección cetogénica es tratado. El agente que aumenta un nivel, un estado de acetilación o una actividad de AceCS2 se obtiene o es obtenible usando un método de detección sistemática de la presente invención.

30 En otra realización preferida, el método para el tratamiento de un individuo que tiene una afección cetogénica comprende el paso de administrar al individuo una composición farmacéutica; donde la composición farmacéutica contiene un agente biológicamente activo que se puede obtener de acuerdo con un método en cuestión para identificar dicho agente y donde la afección cetogénica es tratada.

35 Un agente preferido para el tratamiento de una afección cetogénica, y en particular para reducir un nivel mayor que el normal de acetato en la sangre del individuo, es un agente que aumenta la afinidad AceCS2 por el acetato, es decir, un agente que disminuye la  $K_m$ .

40 Sin adherir a ninguna teoría, se cree que la actividad mitocondrial aumentada de AceCS2 puede canalizar el acetato hacia la oxidación y lejos de AceCS1 citosólica y podría por consiguiente reducir la síntesis de lípidos y colesterol mediada por AceCS1, mejorando de ese modo las afecciones, incluidas, pero no exclusivamente, hipercolesterolemia, hiperlipidemia, obesidad y posiblemente diabetes tipo II.

45 El tratamiento de una afección cetogénica según se describe en este documento puede dar como resultado un menor nivel de acetato en la circulación sanguínea de un individuo. Por lo tanto, el tratamiento de una afección cetogénica según se describe en este documento puede ser controlado midiendo el nivel de acetato en la sangre de un individuo tratado de acuerdo con la presente invención.

50 Preferentemente el nivel de acetato elevado en la sangre de un individuo al que se le diagnosticó una afección cetogénica se reduce en al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 90% o más con respecto al nivel de acetato elevado en el individuo antes del tratamiento. Preferentemente el nivel de acetato elevado en el paciente se reduce al nivel de acetato en la sangre de un individuo sano.

#### 60 1. Diabetes tipo II

La diabetes tipo II aparece generalmente en la adultez y se caracteriza por un nivel de insulina en sangre menor que el normal originando mayores niveles de glucosa en sangre, Buckley y Williamson informaron que ratas diabéticas también tenían una concentración de acetato sanguínea elevada (Buckley y Williamson, 1977, *Biochem J* 166:5239-545). Además, Fujino *et al.* informaron que el nivel de ARNm de AceCS2 en ratas Zucker diabéticas está aumentado

(Fujino *et al.*, 2001, *J Biol Chem* 276:11420-1 1426).

Por consiguiente; en un aspecto, se describe en este documento un método para el tratamiento de la diabetes tipo II. En una realización preferida, este método comprende el paso de administrar a un individuo que tiene diabetes tipo II una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente que aumenta un nivel o una actividad desacetilasa de SIRT3, donde SIRT3 desacetila a AceCS2, y donde el individuo que tiene la diabetes tipo II es tratado. El agente que aumenta un nivel o una actividad desacetilasa de SIRT3 se obtiene o es obtenible usando un método de detección sistemática de la presente invención.

En otra realización de la presente invención, el método para el tratamiento de un individuo que tiene diabetes tipo II comprende el paso de administrar a un individuo que tiene diabetes tipo II una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente que aumenta un nivel, un estado de acetilación o una actividad de AceCS2, donde el individuo que tiene diabetes tipo II es tratado. El agente que aumenta un nivel, un estado de acetilación o una actividad de AceCS2 se obtiene o es obtenible usando un método de detección sistemática de la presente invención.

Opcionalmente, los métodos para tratar la diabetes comprenden el paso de administrar a un individuo un hipoglucemiante existente, es decir un agente que disminuye las concentraciones de glucosa circulantes. Si bien los agentes actuales para tratar la diabetes tipo II pueden reducir los niveles de glucosa sanguínea sin corregir los defectos bioquímicos subyacentes en esta enfermedad, puede ser deseable en ciertos casos combinar un agente identificado en este documento con un hipoglucemiante existente. Dichos agentes son conocidos en el área y, por ejemplo, incluyen, (i) un agente de la clase sulfonilurea (ii) un agente de la clase más recientemente desarrollada de agentes no sulfonilurea que cierran el canal de potasio/ATP, (iii) un agente que suministra sustratos para el metabolismo mitocondrial (p. ej., KCl, ácido -cetoisocaproico o leucina), sensibilizadores de insulina (p. ej., tiazolidinonas), inhibidores de la producción hepática de glucosa (p. ej., metformina) o (iv) bloqueadores de la absorción de glucosa (p. ej., acarbosa).

## 2. Hipercolesterolemia

La hipercolesterolemia se refiere a una concentración anormalmente elevada de colesterol en la circulación sanguínea. Los individuos que sufren de hipercolesterolemia, tienen elevados niveles de colesterol que pueden causar enfermedad cardíaca, endurecimiento de las arterias, ataques cardíacos y accidentes cerebrovasculares. Para el colesterol total, un nivel sanguíneo de colesterol de más de 240 mg/dL se considera anormalmente alto. Un nivel sanguíneo de colesterol entre 200 y 239 mg/dL se considera en el límite de lo elevado. Es deseable un nivel de colesterol sanguíneo por debajo de 200 mg/dL.

También los individuos que tienen hipercolesterolemia familiar pueden ser tratados con los agentes identificados en este documento. Las personas afectadas tienen niveles concordantemente elevados de lipoproteínas de baja densidad (LDL o colesterol "malo"), que lleva a una aterosclerosis prematura de las arterias coronarias. Típicamente en los hombres afectados, se producen ataques cardíacos entre los 40 y los 50 años de edad, y 85% de los hombres con este trastorno han sufrido un ataque cardíaco a los 60 años de edad. La incidencia de ataques cardíacos en las mujeres con este trastorno también es mayor, pero ocurre 10 años más tarde que en los hombres.

Por lo tanto, en un aspecto, en este documento se describe un método para el tratamiento de la hipercolesterolemia. En una realización preferida, este método comprende el paso de administrar a un individuo que tiene hipercolesterolemia una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente que aumente un nivel o una actividad desacetilasa de SIRT3, donde SIRT3 desacetila a AceCS2, y donde el individuo que tiene hipercolesterolemia es tratado. El agente que aumenta un nivel o una actividad desacetilasa de SIRT3 se obtiene o es obtenible usando un método de detección sistemática de la presente invención.

En otra realización, el método para el tratamiento de hipercolesterolemia comprende el paso de administrar a un individuo que tiene hipercolesterolemia una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente que aumente un nivel, un estado de acetilación o una actividad de AceCS2, donde el individuo que tiene hipercolesterolemia es tratado. El agente que aumenta un nivel, un estado de acetilación o una actividad de AceCS2 se obtiene o es obtenible usando un método de detección sistemática de la presente invención.

El tratamiento de hipercolesterolemia según se describe en este documento da como resultado un menor nivel de colesterol en la circulación sanguínea de un individuo. preferentemente el nivel sanguíneo de colesterol se reduce de más de 240 mg/dL a un nivel entre 200 y 239 mg/dL, más preferentemente a un nivel por debajo de 200 mg/dL.

## 3. Hiperlipidemia

La hiperlipidemia, también conocida como hiperlipoproteinemia, es un trastorno lipídico caracterizado por un elevado nivel de sustancias grasas, como colesterol y triglicéridos, en la sangre. Los individuos que sufren de hiperlipidemia tienen mayor probabilidad de sufrir aterosclerosis y enfermedad cardíaca. Por ejemplo, niveles de triglicéridos

menores de 150 mg/dL se consideran normales, niveles de triglicéridos entre 150 y 199 mg/dL se consideran en el límite de lo elevado, niveles de triglicéridos entre 200 y 499 mg/dL se consideran elevados y niveles de triglicéridos de 500 mg/dL o por encima se consideran muy elevados.

5 Por consiguiente, en otro aspecto, en este documento se describe un método para el tratamiento de hiperlipidemia. En una realización preferida, este método comprende el paso de administrar a un individuo que tiene hiperlipidemia una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente que aumente un nivel o una actividad desacetilasa de SIRT3, donde SIRT3 desacetila a AceCS2, y donde el individuo que tiene hiperlipidemia es tratado. El agente que aumenta un nivel o una actividad desacetilasa de SIRT3 se obtiene o es obtenible usando un método de detección sistemática de la presente invención.

10 En otra realización, el método para el tratamiento de un individuo que tiene hiperlipidemia comprende el paso de administrar a un individuo que tiene hiperlipidemia una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente que aumente un nivel, un estado de acetilación o una actividad de AceCS2, donde el individuo que tiene hiperlipidemia es tratado. El agente que aumenta un nivel, un estado de acetilación o una actividad de AceCS2 se obtiene o es obtenible usando un método de detección sistemática de la presente invención.

15 El tratamiento de hiperlipidemia según se describe en este documento da como resultado un menor nivel de triglicéridos en la circulación sanguínea de un individuo. Preferentemente el nivel sanguíneo de colesterol se reduce de un nivel por encima de 500 mg/dL a un nivel entre 200 y 499 mg/dL, más preferentemente a un nivel entre 150 y 199 mg/dL, y muy preferentemente a un nivel por debajo de 150 mg/dL.

#### 4. Obesidad

25 La obesidad se define como un IMC (índice de masa corporal) por encima de  $30 \text{ kg/m}^2$ . Los pacientes con un IMC entre 25 y 29.9 se consideran con sobrepeso, pero no obesos. Un IMC entre 18.5 y 24.9 se considera normal y un IMC de 18.5 o menor se consideraría por debajo del peso normal. Más de la mitad de la población de los Estados Unidos tiene sobrepeso y las tasas de obesidad están creciendo. La obesidad aumenta el riesgo de una persona de sufrir enfermedad y muerte debido a diabetes, accidente cerebrovascular, coronariopatía, hipertensión, colesterol elevado y trastornos renales y de la vesícula. La obesidad puede aumentar el riesgo de algunos cánceres y también es un factor de riesgo para el desarrollo de osteoartritis y apnea del sueño.

30 Por lo tanto, en este documento se describe un método para el tratamiento de la obesidad. En una realización preferida, este método comprende el paso de administrar a un individuo al que se le diagnosticó obesidad una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente que aumente un nivel o una actividad desacetilasa de SIRT3, donde SIRT3 desacetila a AceCS2, y donde el individuo al que se le diagnosticó obesidad es tratado. El agente que aumenta un nivel o una actividad desacetilasa de SIRT3 se obtiene o es obtenible usando un método de detección sistemática de la presente invención.

35 En otra realización, el método para el tratamiento de la obesidad comprende el paso de administrar a un individuo al que se le diagnosticó obesidad una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente que aumente un nivel, un estado de acetilación o una actividad de AceCS2, donde el individuo al que se le diagnosticó obesidad es tratado. El agente que aumenta un nivel, un estado de acetilación o una actividad de AceCS2 se obtiene o es obtenible usando un método de detección sistemática de la presente invención.

40 El tratamiento de la obesidad según se describe en este documento da como resultado un menor IMC. Preferentemente el IMC se reduce de un nivel por encima de  $30 \text{ kg/m}^2$  a un nivel entre 25 y  $29.9 \text{ kg/m}^2$ , más preferentemente a un nivel entre 18.5 y  $24.9 \text{ kg/m}^2$ .

#### 50 V. Composiciones farmacéuticas

En un aspecto, se describe una composición farmacéutica o un medicamento que contiene al menos un agente que modula el nivel, el estado de acetilación o la actividad de AceCS2 y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización preferida, el agente aumenta el nivel, o la actividad de un AceCS2 o reduce el estado de acetilación de AceCS2.

En otro aspecto, se describe una composición farmacéutica o un medicamento que contiene al menos un agente que aumenta el nivel o la actividad, preferentemente la actividad desacetilasa de SIRT3 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

60 Una composición farmacéutica o un medicamento se puede administrar a un sujeto para el tratamiento de, por ejemplo, una patología o una enfermedad como las descritas en este documento.

#### A. Formulación y administración

Los compuestos, los agentes y las moléculas pequeñas identificados por un método de presente invención, son útiles en la fabricación de una composición farmacéutica o un medicamento que contenga una cantidad eficaz de éstos junto o mezclada con excipientes o vehículos adecuados para aplicación enteral o parenteral.

Una composición farmacéutica preferida para (i) aumentar un nivel o una actividad de SIRT3 o (ii) modular un nivel, un estado de acetilación o una actividad de AceCS2 comprende (i) un agente obtenido u obtenible de acuerdo con un método de detección sistemática descrito en este documento, y (ii) un vehículo farmacéuticamente aceptable. El agente se puede proporcionar en una dosis terapéuticamente eficaz para usar en un método de tratamiento como se describe en este documento.

Las composiciones farmacéuticas o los medicamentos para dicho uso se pueden formular mediante técnicas estándar usando uno o más vehículos o excipientes fisiológicamente aceptables. Los vehículos farmacéuticos adecuados están descritos en este documento y en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E.W. Martin. Los compuestos, los agentes y las moléculas pequeñas de la presente invención y sus sales y solvatos fisiológicamente aceptables se pueden formular para administración por cualquier vía adecuada, incluyendo inhalación, tópica, nasal, oral, parenteral o rectal. Por consiguiente, la administración de la composición farmacéutica se puede hacer mediante inyección intradérmica, subdérmica, intravenosa, intramuscular, intranasal, intracerebral, intratraqueal, intraarterial, intraperitoneal, intravesical, intrapleural, intracoronaria o intratumoral con una jeringa u otros dispositivos. La administración transdérmica también está contemplada al igual que la inhalación o la administración en aerosol. Los comprimidos y las cápsulas también se pueden administrar por vía oral, rectal o vaginal.

Para la administración oral, una composición farmacéutica o un medicamento puede tomar la forma, por ejemplo, de un comprimido o una cápsula preparados por medios convencionales con un excipiente farmacéuticamente aceptable. Se prefieren los comprimidos y las cápsulas de gelatina que contienen el principio activo, es decir, un compuesto de molécula pequeña de la presente invención, junto con (a) diluyentes o rellenos, p. ej., lactosa, dextrosa, sacarosa, manitol, sorbitol, celulosa (p. ej., etilcelulosa, celulosa microcristalina), glicina, pectina, poliácridatos y/o fosfato mono ácido de calcio, sulfato de calcio, (b) lubricantes, p. ej., sílice, talco, ácido esteárico, su sal de magnesio o calcio, estearatos metálicos, dióxido de silicio coloidal, aceite vegetal hidrogenado, almidón de maíz, benzoato de sodio, acetato de sodio y/o polietilenglicol; para los comprimidos también (c) aglutinantes, p. ej., silicato de magnesio y aluminio, pasta de almidón, gelatina, tragacanto, metilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, polivinilpirrolidona y/o hidroxipropilmetilcelulosa; si se desea (d) desintegrantes, p. ej., almidones (p. ej., almidón de patata o almidón sódico), glicolato, agar, ácido algínico o su sal de sodio, o mezclas efervescentes; (e) humectante, p. ej., laurilsulfato de sodio y/o (f) absorbentes, colorantes, saborizantes y edulcorantes.

Los comprimidos pueden recubrirse con película o recubrimiento entérico de acuerdo con los métodos conocidos en el área. Las preparaciones líquidas para administración oral pueden adoptar la forma de, por ejemplo, soluciones, jarabes o suspensiones, o se pueden presentar como un producto seco para ser reconstituido con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Dichas preparaciones líquidas se pueden elaborar por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, suspendentes, por ejemplo, jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o aceites comestibles hidrogenados; emulsionantes, por ejemplo, lecitina o acacia; vehículos no acuosos, por ejemplo, aceite de almendras, ésteres oleosos, alcohol etílico, o aceites vegetales fraccionados; y conservantes, por ejemplo, p-hidroxibenzoatos de metilo o propilo o ácido sórbico. Las preparaciones también pueden contener sales amortiguadoras, saborizantes, colorantes y/o edulcorantes según sea adecuado. Si se desea, las preparaciones para administración oral se pueden formular adecuadamente para producir una liberación controlada del principio activo.

Los compuestos, los agentes y las moléculas pequeñas de la presente invención se pueden formular para administración parenteral mediante inyección, por ejemplo mediante inyección en bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección se pueden presentar en formas farmacéuticas, por ejemplo, en ampollas o envases multidosis, que incluyen el agregado de un conservante. Las composiciones inyectables son preferentemente soluciones o suspensiones isotónicas acuosas, y los supositorios se preparan preferentemente a partir de emulsiones o suspensiones grasas. Las composiciones se pueden esterilizar y/o contener adyuvantes, como conservantes, estabilizantes, humectantes o emulsionantes, promotores de solución, sales para regular la presión osmótica y/o tampones. Alternativamente, el principio activo puede estar en forma de polvo para reconstituir con un vehículo adecuado, p. ej. agua estéril apirógena, antes de su uso. Además, también pueden contener otras sustancias terapéuticamente valiosas. Las composiciones se preparan de acuerdo con los métodos de mezcla, granulación o recubrimiento, respectivamente, y contienen entre aproximadamente 0.1 y 75%, preferentemente entre aproximadamente 1 y 50%, del principio activo.

Para la administración por inhalación, los compuestos, los agentes y las moléculas pequeñas se pueden suministrar convenientemente en forma de una presentación de pulverizador de aerosol desde envases presurizados o un nebulizador, con el uso de un propelente adecuado, p. ej. diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado la unidad de

dosificación puede ser determinada proveyendo de una válvula para administrar una cantidad medida. Las cápsulas y los cartuchos por ejemplo de gelatina para usar en un inhalador o insuflador se pueden formular de modo que contengan una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada, por ejemplo, lactosa o almidón.

5 Las formulaciones adecuadas para aplicación transdérmica incluyen una cantidad eficaz de un compuesto, un agente y moléculas pequeñas de la presente invención con vehículo. Los vehículos preferidos incluyen solventes absorbibles, farmacológicamente aceptables para facilitar el pasaje a través de la piel del huésped. Por ejemplo, los dispositivos transdérmicos están en forma de un vendaje que contiene una parte de soporte, un depósito que contiene el compuesto opcionalmente con vehículos, opcionalmente una barrera que controla la velocidad para  
10 suministrar el compuesto a la piel del huésped a una velocidad controlada y predeterminada durante un período prolongado, y medios para asegurar el dispositivo a la piel. También se pueden usar formulaciones de matriz transdérmica.

15 Las formulaciones adecuadas para aplicación tópica, p. ej., a la piel y los ojos, son preferentemente soluciones acuosas, pomadas o geles bien conocidos en el área. Estos pueden contener solubilizantes, estabilizantes, potenciadores de la tonicidad, tampones y conservantes.

20 Los compuestos, los agentes y las moléculas pequeñas también se pueden formular en composiciones rectales, por ejemplo, supositorios o enemas de retención, que contengan, por ejemplo, bases de supositorio convencionales como manteca de cacao y otros glicéridos.

25 Además, los compuestos, los agentes y las moléculas pequeñas se pueden formular como una preparación en depot. Tales formulaciones de acción prolongada se pueden administrar mediante implantación (por ejemplo, subcutáneamente o intramuscularmente) o por inyección intramuscular. Por lo tanto, por ejemplo, los compuestos se pueden formular con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados, por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable, o resinas de intercambio iónico, o como derivados moderadamente solubles, por ejemplo, como una sal moderadamente soluble.

30 Las composiciones pueden, si se desea, presentarse en un envase o dispositivo dispensador que puede contener una o más formas farmacéuticas que contengan el principio activo. El envase puede, por ejemplo, comprender una lámina metálica o plástica, por ejemplo un envase tipo blíster. El envase o el dispositivo dispensador pueden ir acompañados de instrucciones para la administración.

35 En una realización, una composición farmacéutica o un medicamento contiene una cantidad eficaz de un agente que (i) aumenta un nivel o una actividad de SIRT3 o (ii) modula un nivel, un estado de acetilación o una actividad de AceCS2 según se describe en este documento, y otro agente terapéutico. Cuando se usa con un compuesto, un agente o una molécula pequeña de la presente invención, dicho agente terapéutico se puede usar individualmente, secuencialmente o en combinación con uno o más de otros agentes terapéuticos (p. ej., un primer agente terapéutico, un segundo agente terapéutico y un compuesto de la presente invención). La administración puede ser  
40 por la misma vía o por una vía de administración diferente o juntos en la misma formulación farmacéutica.

#### B. Cantidad terapéuticamente eficaz y dosis

45 En una realización de la divulgación, se administra una composición farmacéutica o un medicamento a un sujeto, preferentemente un animal humano o no humano, a una dosis terapéuticamente eficaz para prevenir, tratar o controlar una patología o una enfermedad como las descritas en este documento. La composición farmacéutica o el medicamento se administra a un sujeto en una cantidad suficiente para provocar una respuesta terapéutica eficaz en el sujeto. Una respuesta terapéutica eficaz es una respuesta que al menos parcialmente detiene o enlentece los síntomas o las complicaciones de la patología, el trastorno o la enfermedad. Una cantidad adecuada para lograr esto  
50 se define como "dosis terapéuticamente eficaz" también denominada "cantidad terapéuticamente eficaz".

55 La dosis de principios activos administrada depende de la especie del animal de sangre caliente (mamífero), el peso corporal, la edad, la afección individual, el área superficial o el volumen del área que se va a tratar y de la forma de administración. El tamaño de la dosis también será determinado por la existencia, la naturaleza y la magnitud de cualquier efecto adverso que acompañe la administración de un compuesto de molécula pequeña particular en un sujeto particular. Una forma farmacéutica para administración oral a un mamífero de aproximadamente 50 a 70 kg puede contener entre aproximadamente 5 y 500 mg de principio activo. Típicamente, una dosis de los principios activos de la presente invención, es una dosis suficiente para lograr el efecto deseado. Los programas de dosificación óptimos se pueden calcular mediante mediciones de la acumulación del agente en el organismo de un  
60 sujeto. En general, la dosis se puede administrar una vez o más al día, semanalmente o mensualmente. Los expertos pueden determinar fácilmente dosis óptimas, metodologías de administración y tasas de repetición.

La dosis de los principios activos administrados también depende de la naturaleza del agente. Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de proteína o polipéptido (es decir, una dosis eficaz) varía entre aproximadamente



0.001 y 30 mg/kg de peso corporal, preferentemente aproximadamente entre 0.01 y 25 mg/kg de peso corporal, más preferentemente aproximadamente 0.1 y 20 mg/kg de peso corporal, y aún más preferentemente entre aproximadamente 1 y 10 mg/kg, 2 y 9 mg/kg, 3 y 8 mg/kg, 4 y 7 mg/kg, o 5 y 6 mg/kg de peso corporal. La proteína o polipéptido se puede administrar una vez por semana durante aproximadamente 1 a 10 semanas, preferentemente 2 a 8 semanas, más preferentemente 3 a 7 semanas, y aún más preferentemente durante aproximadamente 4, 5 o 6 semanas.

Las dosis de ejemplo de moléculas pequeñas incluyen cantidades miligramo o microgramo de la molécula pequeña por kilogramo de peso del sujeto o la muestra (p. ej., de aproximadamente 1 microgramo por kilogramo a aproximadamente 500 miligramos por kilogramo, de aproximadamente 100 microgramos por kilogramo a aproximadamente 5 miligramos por kilogramo, o de aproximadamente 1 microgramo por kilogramo a aproximadamente 50 microgramos por kilogramo. Se comprenderá además que la dosis adecuada de la molécula pequeña depende de la potencia de la molécula pequeña con respecto a la expresión o la actividad que se va a modular. Cuando se va a administrar una o más de esas moléculas pequeñas a un animal (p. ej., un humano) para modular un nivel, un estado de acetilación o una actividad de un polipéptido o ácido nucleico AceCS2 o para activar un nivel o una actividad de un polipéptido o ácido nucleico SIRT3, un médico, un veterinario o un investigador pueden prescribir una dosis relativamente baja al comienzo y a continuación ir aumentando la dosis hasta obtener la respuesta adecuada. Además, se comprenderá que el nivel de dosificación específico para cualquier sujeto animal particular, dependerá de diversos factores incluidos la actividad del compuesto específico empleado, la edad, el peso corporal, el estado de salud general, el género y la dieta del sujeto, la hora de administración, la vía de administración y la velocidad de excreción, la combinación con cualquier fármaco y el grado de expresión o la actividad que se va a modular.

En una realización de la presente divulgación, una composición farmacéutica o un medicamento que contiene los compuestos, los agentes o las moléculas pequeñas obtenidos mediante la presente invención, se administra en una dosis diaria en el rango entre aproximadamente 1 mg de cada compuesto por kg de peso del sujeto (1 mg/kg) y aproximadamente 1 g/kg durante varios días. En otra realización, la dosis diaria es una dosis en el rango entre aproximadamente 5 mg/kg y aproximadamente 500 mg/kg. Aún en otra realización, la dosis diaria es entre aproximadamente 10 mg/kg y aproximadamente 250 mg/kg. En otra realización la dosis diaria es entre aproximadamente 25 mg/kg y aproximadamente 150 mg/kg. Una dosis preferida es de aproximadamente 10 mg/kg. La dosis diaria se puede administrar una vez por día o fraccionada en varias subdosis y administrada en múltiples dosis, p. ej., dos veces, tres veces o cuatro veces por día. No obstante, como comprenderá un experto, los compuestos, los agentes o las moléculas pequeñas identificados por los métodos de la presente invención se pueden administrar en diferentes cantidades y en diferentes momentos. Los expertos también comprenderán que ciertos factores pueden influir en la dosis y el tiempo requerido para tratar eficazmente a un sujeto, incluidos, pero no exclusivamente, la gravedad de la enfermedad o el trastorno, los tratamientos previos, el estado general de salud y/o la edad del sujeto, y otras enfermedades presentes. Por otra parte, el tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto puede incluir un único tratamiento o, preferentemente, puede incluir una serie de tratamientos.

Para lograr el efecto terapéutico deseado, los compuestos, los agentes o las moléculas pequeñas se pueden administrar durante varios días a la dosis diaria terapéuticamente eficaz. Por consiguiente, la administración terapéuticamente eficaz de los compuestos para tratar una patología o una enfermedad descritas en este documento, en un sujeto, requiere la administración periódica (p. ej., diaria) que continúe durante un período que varía entre tres días y dos semanas, o más. Típicamente, los agentes se administrarán durante al menos tres días consecutivos, a menudo durante al menos cinco días consecutivos, más a menudo durante al menos diez, y a veces durante 20, 30, 40 o más días consecutivos. Si bien las dosis en días consecutivos son una ruta preferida para lograr una dosis terapéuticamente eficaz, se puede lograr un efecto terapéuticamente beneficioso si los agentes no se administran diariamente, siempre que la administración se repita con la suficiente frecuencia para mantener una concentración terapéuticamente eficaz de los agentes en el sujeto. Por ejemplo, se pueden administrar los agentes día por medio, cada tres días, o si se emplean rangos de dosis superiores y son tolerados por el sujeto, una vez por semana.

Las dosis óptimas, la toxicidad, y la eficacia terapéutica de dichos compuestos, agentes y moléculas pequeñas pueden variar dependiendo de la potencia relativa de los compuestos, los agentes o las moléculas pequeñas individuales y se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales de laboratorio, por ejemplo, determinando la DL<sub>50</sub> (la dosis letal para el 50% de la población) y la DE<sub>50</sub> (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y se puede expresar como el cociente, DL<sub>50</sub>/DE<sub>50</sub>. Se prefieren los agentes que tienen índices terapéuticos grandes. Si bien se pueden usar agentes que tienen efectos secundarios tóxicos, se debe tener cuidado al diseñar un sistema de administración que dirige a dichos agentes al sitio del tejido afectado para minimizar el daño potencial a las células normales y, de esa manera, reducir los efectos secundarios.

Los datos obtenidos, por ejemplo, de ensayos de cultivos celulares y estudios en animales se pueden usar para

formular un rango de dosis para usar en humanos. La dosis de dichos agentes de molécula pequeña se encuentra preferentemente en un rango de concentraciones circulantes que incluye la DE<sub>50</sub> con poca o ninguna toxicidad. La dosis puede variar dentro de este rango dependiendo de la forma farmacéutica empleada y de la vía de administración utilizada. Para cualquier agente utilizado en los métodos de la invención, la dosis terapéuticamente eficaz se puede calcular inicialmente a partir de ensayos de cultivos celulares. Se puede formular una dosis en modelos animales para alcanzar un rango de concentración plasmática circulante que incluya la CI50 (la concentración del agente que logra la mitad de la inhibición máxima de los síntomas) determinada en cultivo celular. Dicha información se puede usar para determinar con mayor exactitud las dosis útiles en humanos. Los niveles plasmáticos se pueden medir, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alta productividad (HPLC). En general, la dosis equivalente de agentes es entre aproximadamente 1 ng/kg y 100 mg/kg para un sujeto típico.

Luego de un tratamiento exitoso, puede ser deseable que el sujeto se mantenga en tratamiento para prevenir la recaída de la afección o enfermedad tratada.

#### C. Alimentos, bebidas y piensos

Además, la presente divulgación se refiere a alimentos, bebidas o piensos con una actividad para modular un nivel, un estado de acetilación o una actividad de un AceCS2 o con una actividad para aumentar un nivel o una actividad de un SIRT3. Dichos alimentos, bebidas o piensos se pueden elaborar mediante un método general para elaborar alimentos y bebidas o piensos, que incluye, agregar un principio activo, p. ej., un agente que module un nivel, un estado de acetilación o una actividad de un AceCS2 o un nivel o una actividad de un SIRT3, a un material crudo o cocido del alimento, la bebida o el pienso. El alimento, la bebida o el pienso de acuerdo con la presente invención se puede moldear o granular de la misma manera en que se hace generalmente para alimentos, bebidas o piensos.

La concentración del principio activo es preferentemente de 0.001 a 10% en peso, más preferentemente de 0.01 a 10% en peso y muy preferentemente de 0.1 a 10% en peso del alimento, la bebida o el pienso que contiene dicho principio activo.

Los alimentos o bebidas específicos, a los cuales se les agrega el principio activo, incluyen, por ejemplo, jugos, bebidas refrescantes, sopas, té, bebidas de leche ácida, productos lácteos como leches fermentadas, helados, manteca, queso, yogurt, leche procesada y leche descremada, productos cárnicos como jamón, salchicha y hamburguesa, carne de pescado, cereal, salvado, tortas, productos de huevo como rollos de huevo condimentados y cuajada de huevo, productos de confitería como galletitas, gelatina, aperitivos, y goma de mascar, panes, fideos, pickles, productos ahumados, pescados desecados, alimentos hervidos condimentados con salsa de soja y condimentos.

Los alimentos, las bebidas y los piensos con actividad para modular un nivel, un estado de acetilación o una actividad de un AceCS2 o con actividad para aumentar un nivel o una actividad de un SIRT3 se pueden complementar con una composición nutritiva (proteína, lípido, sacárido, vitaminas y/o minerales).

#### VI. Juegos de reactivos

Para usar en diagnóstico, investigación y aplicaciones terapéuticas descritas antes, la presente divulgación también proporciona juegos de reactivos. En las aplicaciones diagnósticas y de investigación dichos juegos de reactivos pueden incluir alguno o todos los siguientes: reactivos de ensayo, tampones, un compuesto, un agente o una molécula pequeña de la presente invención, un polipéptido SIRT3, un polipéptido AceCS2 o cualquier otro polipéptido descrito en este documento, un ácido nucleico SIRT3, un ácido nucleico AceCS2 o cualquier otro ácido nucleico descrito en este documento, un anticuerpo anti-SIRT3, un anticuerpo anti-AceCS2, un anticuerpo anti-acetil-lisina o cualquier otro anticuerpo descrito en este documento, sondas de hibridación y/o cebadores que detectan un ácido nucleico SIRT3, un ácido nucleico AceCS2 o cualquier otro ácido nucleico descrito en este documento, un constructo de expresión SIRT3, un constructo de expresión de AceCS2 o cualquier constructo de expresión para cualquier otro polipéptido descrito en este documento, acetato, NAD o cualquier otro compuesto o composición descritos en este documento, etc. un producto terapéutico puede incluir solución salina estéril u otra base en emulsión y suspensión farmacéuticamente aceptable.

Las referencias a tampones, medios, reactivos, células, condiciones de cultivo y similares, particulares, o a ciertas subclases de los mismos, no pretenden ser limitantes, y se debe entender que incluyen todos dichos materiales relacionados que un experto reconocería como de interés o valiosos en el contexto particular en el cual se presentan. Por ejemplo, a menudo es posible sustituir un sistema de tampón o un medio de cultivo por otro, de modo de usar una manera diferente pero conocida de alcanzar las mismas metas a las cuales apunta el uso de un método, material o composición sugeridos.

Típicamente, los componentes de un juego de reactivos se proporcionan en un envase. En una realización preferida de la presente invención, un juego de reactivos para aumentar un nivel o una actividad de un SIRT3 o un juego de

reactivos para modular un nivel, un estado de acetilación o una actividad de un AceCS2 comprende un envase que contiene un agente obtenido u obtenible de acuerdo con un método de detección sistemática.

Además, un juego de reactivos puede incluir materiales instructivos que contengan indicaciones (es decir, protocolos) para la práctica de los métodos de esta invención. Las instrucciones pueden estar presentes en los juegos de reactivos en cuestión de diversas formas, una o más de las cuales puede estar presente en el juego de reactivos. Si bien los materiales instructivos comprenden típicamente materiales escritos o impresos no están limitados a estos. Cualquier medio capaz de almacenar dichas instrucciones y comunicarlas al usuario final es contemplado por esta invención. Dichos medios incluyen, pero no exclusivamente, medios de almacenamiento electrónicos (p. ej., discos magnéticos, cintas, cartuchos, chips) medios ópticos (p. ej., CD ROM) y análogos. Dichos medios pueden incluir direcciones para sitios de Internet que proporcionen dichos materiales instructivos.

En una realización preferida, el juego de reactivos comprende una instrucción para poner en contacto el agente con una célula de mamífero para aumentar un nivel o una actividad de un SIRT3 o una instrucción para poner en contacto el agente con una célula de un mamífero para modular un nivel, un estado de acetilación o una actividad de AceCS2. En una realización preferida, un agente estimula un nivel, un estado de acetilación o una actividad de un AceCS2. En otra realización preferida, un agente inhibe un nivel, un estado de acetilación o una actividad de un AceCS2.

Opcionalmente, la instrucción comprende advertencias sobre posibles efectos secundarios e interacciones fármaco-fármaco o fármaco-alimento.

Se pueden preparar una amplia variedad de juegos de reactivos y componentes, dependiendo del usuario al que está destinado el juego de reactivos y las necesidades particulares del usuario.

En una realización preferida, el juego de reactivos es un juego farmacéutico y comprende una composición farmacéutica que contiene (i) un agente que aumenta un nivel o una actividad de un SIRT3, y (ii) un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra realización preferida de la presente invención, el juego de reactivos es un juego farmacéutico y comprende una composición farmacéutica que contiene (i) un agente que modula un nivel, un estado de acetilación o una actividad de un AceCS2, y (ii) un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los juegos de reactivos farmacéuticos comprenden opcionalmente una instrucción que establece que la composición farmacéutica puede o debe ser usada para tratar una patología, un trastorno o una enfermedad o cualquier otro método descrito en este documento.

Otras realizaciones de juegos de reactivos incluyen componentes funcionales opcionales que permitirían a un experto realizar cualquiera de las variaciones de los métodos descritos en este documento.

Si bien cada uno de los elementos de la presente invención se describe como conteniendo múltiples realizaciones, se debe comprender que, a menos que se indique lo contrario, cada una de las realizaciones de un elemento dado de la presente invención es capaz de ser utilizada con cada una de las realizaciones de los otros elementos de la presente invención y cada uno de dichos usos pretende formar una realización diferente de la presente invención.

Como se puede apreciar a partir de la divulgación anterior, la presente invención tiene una amplia diversidad de aplicaciones. La invención se ilustra más detalladamente mediante los ejemplos siguientes, que son sólo ilustrativos y no pretenden limitar la definición en el alcance de la invención en modo alguno.

## VII. Ejemplos

### Ejemplo 1: Métodos generales

#### A. Cultivo celular y transfección

Se cultivaron células HEK293, COS-1 y HeLa en medio DMEM complementado con 10% de FCS, L-glutamina 2 mM, 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina y se incubaron en 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C. Se usó transfección con fosfato de calcio para transfectar células HEK293 (Chen & Okayama, 1987, *Mol Cell Biol* 7:2745-52). Las células HeLa y Cos-1 se transfectaron con Fugene 6 (Roche). Las líneas celulares HEK293 que expresan establemente AceCS2<sup>Flag</sup>, SIRT3<sup>Flag</sup>, SIRT3-H248Y<sup>Flag</sup> o SIRT5<sup>Flag</sup> o que contienen el vector de control<sup>Flag</sup> vacío pcDNA<sup>Flag</sup> se generaron mediante selección en medio de cultivo DME completo que contenía 100 µg/mL de geneticina (Invitrogen).

#### B. Plásmidos y mutagénesis

Todos los constructos de expresión se generaron usando estrategias de clonación estándar basadas en PCR y todos los constructos de expresión se verificaron mediante secuenciación del ADN. La secuencia de codificación de

AceCS2 humana se amplificó por PCR a partir de ADNc humano entero de una colección de genes de mamífero (MGC) (Genbank número de registro BC039261; obtenido a través de Open Biosystems) usando los cebadores de PCR 5'-CGGAATTCCATGGCGGCGGCACCCTGGGC-3' (SEC. ID N°: 15) y 5'-CGGAATTCCTTAGCAGCAGCCTGCTTGTCCTTGC-3' (SEC. ID N°: 16) (que cada uno contiene un sitio de restricción EcoRI (subrayado)). El producto de PCR se clonó después en los vectores derivados de pcDNA3.1+ (Invitrogen) pcDNA<sup>tag</sup> o pcDNA<sup>HA</sup> para obtener AceCS2 con una etiqueta Flag o hemaglutinina (HA) C-terminal Basándose en los resultados de la secuenciación N-terminal de la proteína, el marco de lectura abierto correspondiente a AceCS2 madura (residuos de aminoácidos 38 a 689) se clonó en pTrcHis2C (Invitrogen). Se construyeron los vectores de expresión recombinante que codifican a SIRT3 humano maduro (residuos de aminoácidos 102-399, (Schwer *et al.*, 2002, *J Cell Biol* 158:647-57) o SIRT5 (residuos de aminoácidos 12-310 o residuos de aminoácidos 39-310) mediante amplificación por PCR y clonación en pTrcHis2C. Los moldes utilizados para la amplificación por PCR de las secuencias que codifican a SIRT3 y SIRT5 fueron las descritas (Schwer *et al.*, 2002, *J Cell Biol* 158:647-57; North *et al.*, 2003, *Mol Cell* 1 1437-44). Los cebadores para la amplificación por PCR distintos de los descritos en este documento, pueden ser deducidos por un experto de las secuencias de ácido nucleico correspondientes depositadas en GenBank y descritas en este documento.

Se usó mutagénesis dirigida al sitio (QuickChange™ Mutagenesis Kit; Stratagene) para construir AceCS2-K642Q-HA, pTrcHis2C-AceCS2-K642R y pTrcHis2C-SIRT3-H248Y(102-399).

#### 20 C. Expresión y purificación de proteínas recombinantes

Las bacterias *E. coli* DH5α (Invitrogen), transformadas p. ej., con pTrcHis2C-SIRT3(102-399), pTrcHis2C-SIRT3-H248Y(102-399), pTrcHis2C-SIRT5(12-310), pTrcHis2C-SIRT5(39-310) o pTrcHis2C-AceCS2(38-689) se cultivaron hasta una  $A_{600\text{ nm}} = 0.4$ , y se indujeron con isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) 0.5 mM a 25 °C durante 16 h. Las proteínas etiquetadas 6XHis se purificaron en condiciones naturales a 4 °C usando Ni-NTA agarosa (Qiagen, Valencia, CA). Las proteínas purificadas se dializaron (p. ej., con tampón de almacenamiento de sirutina [Tris-HCl 50 mM (pH 9.0), MgCl<sub>2</sub> 4 mM, NaCl 50 mM, DTT 0.5 mM, glicerol al 5% (v/v) o tampón de almacenamiento de AceCS2 [Tris-HCl 50 mM (pH 8.0), MgCl<sub>2</sub> 4 mM, glicerol al 10% (v/v)], se ajustaron a 0.5 g/L y se almacenaron congeladas a -80 °C. Para inducir la acetilación de AceCS2 recombinante, se agregó nicotinamida (50 mM) durante la expresión de la proteína (16 h, 25 °C).

Se obtuvieron *E. coli* K-12 BW25113 generadora y un mutante con un único gen inactivo (KO) que carece de CobB (JWI 106) de la misma cepa (Datsenko & Wanner, 2000, *Proc Natl Acad Sci USA* 97:6640-5) obtenidas de la Colección Systematic Knock Out Strains of *E. coli* K-12 de GenoBase. El mutante inactivo KO que carece de CobB se purificó una vez de la colonia no selectivamente a 37 °C y después se probó su sensibilidad a la ampicilina para determinar la pérdida del plásmido cooperador que le confiere la resistencia a la ampicilina utilizado en el procedimiento de inactivación de un solo gen (Datsenko & Wanner, 2000, *Proc Natl Acad Sci USA* 97:6640-5). Las colonias sensibles a la ampicilina se expandieron, se hicieron químicamente competentes (Sambrook y Russell, 2001, en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor), Vol. 1, pp. 1.116-1.118) y se transformaron con pTrcHis2C-AceCS2(38-689) o pTrcHis2C-AceCS2-K642R(38-689), que contenían un gen de resistencia a la ampicilina. Las proteínas etiquetadas 6XHis se expresaron y purificaron según se describió antes.

#### 45 D. Anticuerpos

Los anticuerpos utilizados para la inmunotransferencia y las inmunoprecipitaciones fueron anti-mtHsp70 (Clone JGI ; Affinity Bioreagents, Neshanic Station, NJ), anti-Hsp90α (StressGen) y anti-manganeso superóxido dismutasa (MnSOD) (StressGen Biotechnologies, Victoria, Canada), anti-citocromo c oxidasa subunidad IV (Clone 20E8-C12; Molecular Probes), anti-Flag M2 o anti-Flag policlonal de ratón (Sigma-Aldrich), anti-HA (12CA5 and 3F10; Roche Diagnostics), anticuerpo policlonal para lisina acetilada (*Cell Signaling Technology*, Beverly, MA), anti-actina C4 (ICN Biomedicals), anti-citocromo c (clone 7H8.2C12; Pharmingen), anti-BRG-1 (H88; Santa Cruz Biotechnology) y anti-c-myc (9E10; Santa Cruz Biotechnology). El antisuero SIRT3 se generó según se describe (Schwer *et al.*, 2002, *J Cell Biol* 158:647-57).

#### 55 E. SDS-PAGE y transferencia tipo Western

Las inmunotransferencia se llevaron a cabo con quimioluminiscencia potenciada (Amersham Pharmacia BioSciences) o reactivo West SuperSignal (Pierce). Las membranas fueron de nitrocelulosa o de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (Immun-Blot; Bio-Rad Laboratories).

#### 60 F. Inmunoprecipitación

Las células se lisaron en tampón NP1 helado (1% de NP-40, NaCl 150 mM, EDTA 0.5 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 7.4) que contenía cóctel inhibidor de proteasa (Roche). Los lisados se centrifugaron a 16 200 x g durante 10 min a 4 °C,

y se les agregó anticuerpo monoclonal anti-FLAG M2 acoplado covalentemente a agarosa. Las proteínas etiquetadas con Flag se inmunoprecipitaron y se lavaron cuatro veces en tampón NP1.

5 En experimentos de coimmunoprecipitación, se usó tampón NP1 que contenía NaCl 300 mM. Las sirtuinas etiquetadas con Flag inmunoprecipitadas que se van a usar en los ensayos de desacetilación se lavaron tres veces en tampón NP1 que contenía NaCl 500 mM y dos veces en tampón de sirtuina desacetilasa (SDAC) (Tris-HCl 50 mM (pH 9.0), MgCl<sub>2</sub> 4 mM, NaCl 50 mM, DTT 0.5 mM). Las proteínas etiquetadas con Flag se eluyeron de las perlas en tampón SDAC con Flag-péptido (Sigma) durante 1 h a 4 °C.

#### 10 G. Microscopia confocal

Se cultivaron células HeLa sobre cubreobjetos, se transfectaron con Fugene 6 (Roche) y 48 h más tarde se fijaron en formaldehído al 3,7%/PBS. Las células se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,5%/PBS durante 5 min a temperatura ambiente (Schwer *et al.*, 2002, *J Cell Biol* 158:647-57). Las células se bloquearon con albúmina de suero bovino al 1% y se tiñeron conjuntamente con anticuerpos anti-Flag M2 monoclonal (1:500) y anti-MnSOD policlonal (1:300), luego de la incubación con anticuerpos secundarios anti-inmunoglobulina G de ratón conjugada con anti-Cy2 de ratón y anti-inmunoglobulina G de conejo conjugada con anti-Cy5 adecuados para experimentos de multi marcado (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Los cubreobjetos se montaron sobre portaobjetos y se obtuvieron imágenes en un microscopio de barrido láser BioRad Radiance 2000 equipado con un microscopio Olympus Bx60 y un objetivo para aceite Olympus PlanApo 60x/1.40.

#### H. Fraccionamiento subcelular y localización submitocondrial

25 El fraccionamiento subcelular se realizó según se describe (Schwer *et al.*, 2002, *J Cell Biol* 158:647-57; Yang *et al.*, 1997, *Science* 275:1 129-32). Todos los pasos se realizaron a 4 °C. En resumen, las células se homogeneizaron en tampón A helado (sacarosa 250 mM, KCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, ditiotreitól 1 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 0,1 mM, Hepes 20 mM-KOH, pH 7.5) y se homogeneizaron en un homogeneizador Dounce (Wheaton). La homogeneización se verificó mediante microscopia de contraste de fase. El homogeneizado se centrifugó dos veces durante 5 min a 960 x g para eliminar todos los núcleos y las células sin romper. Las 30 mitocondrias se aislaron por centrifugación (7000 x g, 15 min) se lavaron 2 veces con tampón A, y finalmente se lisaron en tampón NP 1/150 (NP-40 al 1% (v/v), NaCl 150 mM, EDTA 0,5 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 7.4) complementado con inhibidores de proteasa. El sobrenadante post mitocondrial se fraccionó en la fracción de membrana liviana (LM, sedimento) y una fracción citosólica (S-100, sobrenadante) por ultracentrifugación a 100 000 x g durante 30 min. Se determinó la concentración de proteína en cada fracción (DC Protein Assay Bio-Rad 35 Laboratoiroies) y se analizaron cantidades iguales de cada fracción por inmunotransferencia.

Se realizaron experimentos de formación de mitoplastos y accesibilidad de proteasa de acuerdo con protocolos publicados (Schwer *et al.*, 2002, *J Cell Biol* 158:647-57; Ryan *et al.*, 2001, en *Mitochondria*, eds. Pon & Schon (Academic Press, Vol. 65, pp. 190-213). Los mitoplastos se trataron con proteinasa K (150 µg/mL) durante 15 min a 0 °C. La digestión con proteasa se detuvo agregando PMSF 2 mM, y los mitoplastos se volvieron a aislar por 40 centrifugación, se lavaron y se lisaron en tampón de muestra.

El fraccionamiento de las proteínas mitocondriales por tratamiento alcalino se realizó según se describe (Schwer *et al.*, 2002, *J Cell Biol* 158:647-57; Fujiki *et al.*, 1982, *J Biol Chem* 93, 97-102). Los sedimentos mitocondriales lavados se volvieron a suspender en carbonato de sodio 0,1 M recién preparado (pH 11.5) a una concentración de 250 µg/mL y se incubaron a 0 °C durante 30 min. Las membranas mitocondriales sedimentaron por ultracentrifugación (100 000 x g, 30 min, 4 °C). El sedimento se volvió a suspender en tampón de muestra SDS, y las proteínas solubles del sobrenadante se concentraron por precipitación en tricloroacetato y se volvieron a suspender en tampón de muestra SDS (Schwer *et al.*, 2002, *J Cell Biol* 158:647-57; Fujiki *et al.*, 1982, *J Cell Biol* 93:97-102).

#### 50 I. Secuenciación N-terminal de proteínas

Se lisaron células HEK293 que expresan establemente AceCS2<sup>Flag</sup> y se sometieron a inmunoprecipitación con anti-Flag. Después de lavar, el AceCS2<sup>Flag</sup> inmunoprecipitado se sometió a SDS-PAGE, se transfirió a una membrana de poli(difluoruro de vinilideno) (PVDF), se visualizó mediante tinción con Ponceau S (Sigma), se cortó y se envió a las instalaciones de Stanford PAN para secuenciación N-terminal mediante degradación de Edman de acuerdo con los 55 protocolos estándar.

#### J. Ensayos enzimáticos de proteína

##### 60 1. Ensayos de desacetilación *in vitro*

Se incubaron cantidades equimolares de AceCS2 recombinante purificada y sirtuinas recombinantes purificadas en tampón de desacetilación SDAC (Tris-HCl 50 mM (pH 9.0), MgCl<sub>2</sub> 4 mM, NaCl 50 mM, DTT 0,5 mM) en presencia o

ausencia de  $\text{NAD}^+$  (1 mM), en presencia o ausencia de nicotinamida (NAM, 10 mM), en presencia de tricostatina A (500 nM) durante 3 h a 32 °C. En el transcurso de los experimentos de desacetilación, se extrajeron alícuotas de la reacción de desacetilación en los momentos indicados, se mezclaron con nicotinamida 10 mM y se incubaron en hielo hasta el análisis posterior. Las reacciones se analizaron mediante SDS-PAGE e inmunotransferencia.

## 2. Actividad de acetil-CoA sintetasa

La actividad de AceCS2 purificada se midió según se describe (Jones & Lipmann, 1955, en *Methods in Enzymology* (Academic Press, Vol. 1, pp. 585-591; Barak et al., 2004, *J Mol Biol* 342:383-401). Cada reacción (0.5 mL) contenía hidroxilamina 100 mM (pre-neutralizada con KOH), Tris-HCl 50 mM (pH 8.0), acetato de potasio 20 mM,  $\text{MgCl}_2$  10 mM, ATP 10 mM, DTT 2 mM y CoA 1 mM. Todos los productos químicos (Sigma) fueron de la pureza más alta disponible. Las reacciones se preincubaron a 35 °C durante 5 min antes de la adición de AceCS2 purificada (6  $\mu\text{g}$ ). Luego de 30 min de incubación se agregaron 0.5 mL de solución de parada (10% (p/v) de  $\text{FeCl}_3$ , ácido tricloroacético al 3.3% (p/v) en HCl 2 N) y las reacciones se incubaron en hielo durante 2 min. Las muestras se centrifugaron durante 2 min a 16 200 x g para eliminar la turbidez y el color generado se midió a 540 nm. Las muestras sin AceCS2 sirvieron como blanco y la formación de acetilhidroxamato por acetil-fosfato (Sigma) sirvió como estándar (Barak et al., 2004, *J Mol Biol* 342:383-401). No hubo actividad de acetil-CoA sintetasa detectable en ausencia de CoA.

## K. Inhibición de ARNip - Agotamiento de SIRT3

ARNip bicatenarios (100 nM; Dharmacon; Individual siGENOME duplex D-004827-04-0050, Human SIRT3, NM\_012239) dirigidos contra SIRT3 humano o ARNip de control de GL3 de luciferasa de luciérnaga se transinfectaron en HEK293 usando oligofectamina (Invitrogen) según las recomendaciones del fabricante. Cinco días después de la transfección, las células se lisaron en tampón NP1/300 que contenía inhibidores de proteasa, TSA 1  $\mu\text{M}$  y nicotinamida 10 mM. Se inmunoprecipitó AceCS2<sup>Flae</sup> y se preparó para espectrometría de masas.

La secuencia de ARNip bicatenario de SIRT3 fue la siguiente:

Secuencia sentido: 5'-GGAGUGGCCUGUACAGCAAUU-3' (SEC. ID N°: 17)

Secuencia antisentido: 5'-UUGCUGUACAGGCCACUCCUU-3' (SEC. ID N°: 18)

Los oligonucleótidos utilizados en experimentos de ARNip pueden estar fosforilados en sus extremos 5'.

El D-001400-01-20 bicatenario de GL3 de luciferasa se describe en Elbashir et al., "Duplexes of 21 -nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells." *Nature* 411, 494-498 (2001).

## L. Cromatografía líquida en nanoescala-Espectrometría de masas

Se separaron los inmunoprecipitados mediante SDS-PAGE y la digestión en gel se realizó esencialmente según se describe (Hojrup, 2004, *Methods Mol Biol* 251 :227-44). Se separaron los digeridos tripticos por cromatografía en fase reversa usando un sistema de nanoflujo Agilent 1100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) y electronebulizaron directamente en un espectrómetro de masas 7-tesla Finnigan LTQ-FT (Thermo Electron, Breme, Alemania) equipado con una fuente de ionización por nanoelectronebulización (Proxeon Biosystems, Odense, Denmark). Un emisor de sílice fundida de 15 cm (con un diámetro interno de 75  $\mu\text{m}$ ) empacado con resina ReproSil-Pur C 18-AQ de 3  $\mu\text{m}$  (Dr. Maisch GmbH, Ammerbuch-Entringen, Alemania) sirvió como columna de fase reversa. Los digeridos de proteína se inyectaron en la columna con un flujo de 500 nL/min y a continuación se eluyeron con un flujo de 250 nL/min con un gradiente de 5 a 40% de MeCN en ácido acético al 0.5%. Para el análisis inicial el espectrómetro de masas se abrió en un modo dependiente de los datos esencialmente según se describe (Olson y Mann, 2004, *Proc Natl Acad Sci USA* 101:13417-22). En resumen, se obtuvo una medición de espectro de masas en el rango de masas m/z 300-1600 mediante resonancia ión ciclotrón por transformada de Fourier (FTICR; resolución 50 000 a m/z 400) y los tres iones más intensos se seleccionaron para determinación precisa de masa usando un barrido de monitoreo de iones seleccionados (SIM) en el FTICR, mientras el MS/MS y MS/MS/MS se realizó usando trampa lineal de iones.

Se realizaron experimentos dirigidos de iones seleccionados usando barrido FTICR SIM en el rango m/z de interés seguido de  $\text{MS}^2$  y  $\text{MS}^3$  de los valores m/z predeterminado. Los espectros MS/MS por centroide y combinados se buscaron en la base de datos Uniprot usando una máquina de búsqueda MASCOT search engine (Matrix Science, Boston) con una tolerancia para la masa del péptido de 5 ppm y una tolerancia para el fragmento de ión de 0.6 Da. Se estableció la carbamidometilación de las cisteínas como una modificación fija mientras que la acetilación de proteínas N-terminal, la oxidación de metionina y la acetilación de lisina se permitieron como modificaciones variables. Los péptidos debían ser tripticos con a lo sumo 3 sitios de escisión faltantes. Todos los péptidos identificados se validaron manualmente usando tanto espectros  $\text{MS}^2$  como  $\text{MS}^3$ .

Ejemplo 2: Identificación de acetil-CoA sintetasa (AceCS2) como diana celular de SIRT3

Como una estrategia para identificar proteínas mitocondriales con lisina acetilada que podrían ser dianas de SIRT3, 4 o 5, se llevo a cabo una búsqueda de proteínas humanas con similitud de secuencia en la región que rodea el residuo de lisina acetilada que se encuentra en la acetil-CoA sintetasa (ACS) de *Salmonella enterica*. Se eligió la región que contiene acetil-lisina de ACS de *Salmonella enterica* porque es un sustrato conocido de la sirtuina CobB (Starai *et al.*, 2003, *Genetics* 163:545-55; Starai *et al.*, 2002, *Science* 298:2390-2). En un segundo paso, se analizaron las proteínas humanas que tienen una gran similitud en su probabilidad de localización mitocondrial usando los programas informáticos de predicción subcelular MITOPROT II Y PREDOTAR Ver. 1.03 (Small *et al.*, 2004, *Proteomics* 4:1581-90; Claros y Vincens, 1996, *Eur J Biochem* 241:779-86). La búsqueda produjo una proteína acetil-CoA sintetasa humana protein con una alta probabilidad de estar localizada en la mitocondria (MITOPROT II: 0.997; PREDOTAR: 0.94; puntaje máximo = 1), que presentó una gran similitud de secuencia con la acetil-CoA sintetasa murina, AceCS2 (Claros y Vincens, 1996, *Eur J Biochem* 241:779-86).

#### Ejemplo 3: Identificación de la localización mitocondrial de AceCS2

Para determinar si la enzima AceCS2 humana es una proteína mitocondrial, se clonó el marco de lectura abierto de AceCS2 humana y se expresó en células HeLa como una proteína etiquetada con Flag. La microscopía de barrido láser confocal mostró un patrón de tinción mitocondrial para AceCS2<sup>Flag</sup> que se superponía con el patrón de tinción observado para la proteína de matriz mitocondrial endógena manganeso superóxido dismutasa (MnSOD; Fig. 1A).

Para verificar aún más la localización mitocondrial de la AceCS2 humana, se prepararon fracciones subcelulares de células de riñón embrionarias humanas 293 (HEK293) que expresan establemente AceCS2<sup>Flag</sup>. AceCS2<sup>Flag</sup> se detectó en la fracción mitocondrial junto con SIRT3 y MnSOD como se esperaba (Fig. 1B). La inmunotransferencia de cada fracción para la proteína marcadora nuclear BRG-1 y la proteína marcadora citosólica Hsp90 confirmó la pureza de las fracciones (Fig. 1B).

Para definir aún más la localización submitocondrial de AceCS2, se prepararon mitoplastos a partir de mitocondrias que contenía AceCS2<sup>Flag</sup>. La preparación de mitoplastos rompe la membrana mitocondrial externa y torna el espacio intermembrana accesible a la proteinasa K. El tratamiento de los mitoplastos con proteinasa K condujo a la pérdida de la proteína citocromo c (Cyt. c) del espacio intermembrana, aunque esto no afectó a las proteínas de matriz mitocondrial glutamato deshidrogenasa (GDH) y SIRT3 (Fig. 1C). AceCS2<sup>Flag</sup> tampoco fue afectada por el tratamiento de los mitoplastos con proteinasa K, lo que sugiere que estaba localizada en la matriz mitocondrial, al igual que GDH y SIRT3 (Fig. 1C). Todas las proteínas fueran completamente digeridas por la proteinasa K cuando se agregó el detergente no iónico TX-100 durante la incubación de los mitoplastos con proteinasa K (Fig. 1 C; carril izquierdo).

Para determinar AceCS2 está integralmente unida al lado interno de la membrana mitocondrial interna o es soluble en la matriz mitocondrial, se extrajeron las mitocondrias con carbonato de sodio (pH 11.5). Este tratamiento libera proteínas solubles pero no proteínas integrales de membrana. AceCS2 fue completamente liberada por el tratamiento con carbonato de sodio y mostró un patrón de distribución semejante al de las proteínas de matriz solubles SIRT3 y MnSOD (Fig. 1D). En las condiciones utilizadas, la proteína integral de membrana COX-IV permaneció asociada a las membranas (Fig. 1D).

#### Ejemplo 4: Secuenciación N-Terminal de AceCS2

Las proteínas codificadas a nivel nuclear destinadas a la matriz mitocondrial a menudo acarrear una presecuencia N-terminal, que es reconocida por la translocasa mitocondrial del complejo de la membrana externa (TOM) y es escindida después de ser importada a la matriz (Rehling *et al.*, 2004, *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:519-30). Esta presecuencia N-terminal contiene a menudo una  $\alpha$ -hélice y varios residuos básicos. Esas características se encuentran en el extremo N-terminal de la AceCS2 humana, que incluye varios residuos de arginina (Fig. 2A).

La secuenciación N-terminal de AceCS2<sup>Flag</sup> inmunoprecipitada mediante la degradación de Edman reveló que faltaban los primeros 37 residuos de aminoácidos del marco de lectura abierto de la proteína, compatible con el procesamiento N-terminal de AceCS2 en la matriz mitocondrial. La identificación de alanina 38 como el aminoácido N-terminal de la AceCS2<sup>Flag</sup> inmunoprecipitada mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) confirmó los resultados de secuenciación de la proteína (no se muestran los datos). La existencia de un motivo R-2 de peptidasa de procesamiento de la matriz mitocondrial (MPP) inmediatamente corriente arriba del extremo N-terminal de la proteína AceCS2 madura sugiere que AceCS2 es procesada por MPP en la matriz mitocondrial Fig. 2B; Ito, 1999, *Biochem Biophys Res Commun* 265:611-6). Esos resultados confirman la existencia de una acetil-CoA sintetasa mitocondrial humana localizada en la matriz mitocondrial.

#### Ejemplo 5: La mutación del residuo de aminoácido Lys642 conservado suprime la actividad enzimática de AceCS2

Basándose en la conservación de la región del sitio activo de la ACS de *Salmonella enterica* con las AceCS2 humana y murina y las acetil-CoA sintetetas de otras especies (Fig. 3A), se probó si la mutación de Lys642 afectaría

la actividad de acetil-CoA sintetasa de la AceCS2 humana sobreexpresada inmunoprecipitada de células HEK293. El reemplazo de Lys642 con glutamina, que imita un residuo de lisina constitutivamente acetilado, produjo una proteína AceCS2 completamente inactiva (Fig. 3B), lo que indica que Lys642 es de fundamental importancia para la función de AceCS2. Tanto el tipo nativo AceCS2 como el mutante AceCS2-K642Q fueron expresados en niveles semejantes (Fig. 3C).

Ejemplo 6: La AceCS2 humana es acetilada *in vivo*

Para determinar si la AceCS2 es acetilada *in vivo*, se inmunoprecipitó AceCS2<sup>Flag</sup> de células después de la inactivación mediada por ARN interferente pequeño (ARNip) de SIRT3 y se preparó para espectrometría de masas. El análisis LC-MS/MS de los digeridos tripticos indicó la presencia de un residuo de lisina acetilado (ack) en la posición 642 de AceCS2 (Fig. 4).

Ejemplo 7: Hiperacetilación de AceCS2 humana expresada en *E. coli* que carece de sirtuina CobB

Al igual que la *Salmonella enterica*, *E. coli* contiene la sirtuina CobB. Dado un papel potencialmente conservado para la desacetilación mediada por sirtuina en el control de las proteínas acetil-CoA sintetasa a lo largo de la evolución, se evaluó si la expresión de la AceCS2 humana en una cepa de *E. coli* K-12 que carece de sirtuina CobB induciría la hiperacetilación de AceCS2. La AceCS2 humana purificada de una cepa CobB-inactivada reaccionó más fuerte con un anticuerpo específico contra acetil-lisina que la AceCS2 purificada de la cepa CobB tipo nativa generadora (Fig. 5A). Esta acetilación fue específica para Lys642 de AceCS2, puesto que la mutación de Lys642 a arginina, que no puede ser acetilada, suprimió la reactividad con el anticuerpo anti-acetil-lisina (Fig. 5 A; carril de la derecha). La especificidad del anticuerpo específico contra acetil-lisina se confirmó aún más mediante análisis de inmunotransferencia de péptidos sintéticos acoplados a una proteína transportadora (Fig- 5B). El anticuerpo específico contra acetil-lisina sólo reaccionó con el péptido que contenía un residuo K642 acetilado y no mostró reactividad con el péptido que contenía K642 no acetilado (Fig. 5B).

Ejemplo 8: La inhibición de la actividad de sirtuina mediante nicotinamida produce la hiperacetilación de AceCS2 humana recombinante

Se examinó el efecto de la inhibición de la actividad de sirtuina sobre el estado de acetilación de la AceCS2 humana. El tratamiento de una cepa de *E. coli* tipo nativa (DH5 $\alpha$ ; Invitrogen) con la nicotinamida inhibidora de sirtuina produjo la hiperacetilación de la AceCS2 humana recombinante (Fig. 6A). Este aumento en la acetilación fue específico para Lys642 de AceCS2, puesto que el tratamiento con nicotinamida no indujo la acetilación de una proteína AceCS2 mutante que tenía un residuo arginina en la posición 642 (Fig. 6 A; carril de la derecha). El análisis de la AceCS2 recombinante purificada de bacterias tratadas con nicotinamida mediante LC/MS-MS verificó la acetilación de una única lisina en el sitio activo de AceCS2, Lys642 (Fig. 6B).

Ejemplo 9: La reducción de los niveles de SIRT3 endógeno aumenta la acetilación de AceCS2

Para tratar aún más si SIRT3 tiene un papel en la desacetilación de AceCS2 en las células, se trataron células HEK293 que expresan AceCS2<sup>Flag</sup> con ARNip contra SIRT3 o ARNip de control y se examinó el estado de acetilación de AceCS2<sup>Flag</sup> inmunoprecipitada por inmunotransferencia con anticuerpos anti-lisina acetilada (Fig. 7). La acetilación de AceCS2<sup>Flag</sup> aumentó luego del agotamiento de SIRT3 endógeno, lo que sugiere que SIRT3 afecta la acetilación de AceCS2<sup>Flag</sup> *in vivo* (Fig. 7).

Ejemplo 10: SIRT3 desacetila a AceCS2: SIRT4 y SIRT5 no

La acetilación del sitio activo lisina en ACS de *Salmonella enterica* inactiva la enzima (Starai *et al.*, 2002, *Science* 298:2390-2). CobB de *Salmonella enterica*, que desacetila a ACS, es una sirtuina clase III que está muy estrechamente relacionada con SIRT5 humano. SIRT5 se localiza en la mitocondria y está sujeta a procesamiento N-terminal (Michishita *et al.*, 2005, *Mol Biol Cell* 16:4623-35). Para probar si SIRT5 podría desacetilar a AceCS2, se realizaron ensayos de desacetilación *in vitro*. Se prepararon sirtuinas etiquetadas con Flag inmunoprecipitadas de células HEK293 según describe en North *et al.* (North *et al.*, 2003, *Mol Cell* 11:437-44). Si bien SIRT5 etiquetada con Flag inmunoprecipitada tiene una actividad baja pero detectable sobre un péptido H4 acetilado químicamente (North *et al.*, 2003, *Mol Cell* 11:437-44), no pudo desacetilar a AceCS2 (Fig. 8A). En contraste, SIRT3 etiquetada con Flag desacetiló a AceCS2 de manera dependiente de NAD<sup>+</sup> (Fig. 8A). SIRT4 etiquetada con Flag, otra sirtuina mitocondrial de la que no se informó actividad desacetilasa (North *et al.*, 2003, *Mol Cell* 11 :437-44), no desacetiló a AceCS2 (no se muestran los datos).

Para confirmar los descubrimientos respecto a SIRT3 y SIRT5, se expresaron y purificaron sirtuinas recombinantes. Basándose en los descubrimientos de que SIRT5 está truncado N-terminalmente (Michishita *et al.*, 2005, *Mol Biol Cell* 16:4623-35) y en presencia de dos motivos putativos R-2 de MPP en el extremo N-terminal, se usaron dos proteínas SIRT5 recombinantes que carecían o bien de los primeros 1 $\Delta$ (1 -SIRT5<sup>myc-His</sup>) o 38 ( $\Delta$ 38-SIRT5<sup>myc-His</sup>)



residuos de aminoácidos, respectivamente. Nuevamente, si bien SIRT3 recombinante efectivamente desacetiló a AceCS2, ambas proteínas SIRT5 recombinantes no pudieron hacerlo (Fig. 8B). Como se esperaba, la desacetilación de AceCS2 por SIRT3 fue estrictamente dependiente de la presencia de NAD<sup>+</sup> (Fig. 8B). Asimismo, el inhibidor de la sirtuina, nicotinamida, evitó completamente la desacetilación de AceCS2 por SIRT3 y el mutante SIRT3-H248Y catalíticamente inactivo (Schwer *et al.*, 2002, *J Cell Biol* 158:647-57) no desacetiló a AceCS2, a pesar de la presencia de NAD<sup>+</sup> (Fig. 8C).

Ejemplo 11: SIRT3 inmunoprecipita conjuntamente con AceCS2 y desacetila a AceCS2 en las células

Para determinar si SIRT5 desacetila a AceCS2 en las células, AceCS2<sup>HA</sup> y SIRT3<sup>Flag</sup> o SIRT5<sup>Flag</sup> fueron coexpresados en células COS-1. AceCS2<sup>HA</sup> se inmunoprecipitó y se analizaron los complejos inmunitarios con anticuerpos contra lisina acetilada (Fig. 9A). La sobreexpresión de SIRT3 disminuyó los niveles de acetilación de AceCS2 expresada ectópicamente, mientras que SIRT5 no tuvo efecto, a pesar de los niveles de expresión mucho mayores (Fig. 9A).

Interesantemente, SIRT3 endógena inmunoprecipitó conjuntamente con AceCS2<sup>Flag</sup> de células HEK293 (Fig. 9B). Junto con los descubrimientos descritos antes, esto sugiere que SIRT3 es la auténtica desacetilasa de la AceCS2 mitocondrial.

Ejemplo 12: La acetilación de AceCS2 reduce su actividad enzimática

Basándose en el descubrimiento de que el tratamiento con nicotinamida de *E. coli* durante la expresión de AceCS2 humana aumentó significativamente sus niveles de acetilación se examinó si la acetilación de AceCS2 en Lys642 controla su actividad de acetil-CoA sintetasa (Fig. 10A). Las mediciones de la actividad específica de AceCS2 purificada de bacterias, tratadas o no con nicotinamida, indicó que la AceCS2 hiperacetilada tuvo una actividad específica significativamente menor (Fig. 10B). Estas observaciones sugieren que la acetilación de AceCS2 inhibió su actividad enzimática, compatible con lo que se mostró para ACS en bacterias (Starai *et al.*, 2002, *Science* 298:2390-2).

Para probar aún más esta hipótesis, AceCS2 hiperacetilada purificada de *E. coli* tratada con nicotinamida se incubó con SIRT3 en presencia de NAD<sup>+</sup>. Este tratamiento condujo a una desacetilación completa de AceCS2 (Fig. 10C). No se observó desacetilación de AceCS2 cuando se omitió NAD<sup>+</sup> en la reacción, o cuando se usó un mutante de SIRT3 catalíticamente inactivo (H248Y) (Fig. 10C).

Además, la medición de la actividad enzimática de AceCS2 con diferentes niveles de acetilación, según se describió antes, mostró que la desacetilación por SIRT3 se asoció con un aumento significativo en la actividad enzimática (Fig. 10D).

En otro experimento, se encontró que la incubación de AceCS2 con SIRT3 y NAD<sup>+</sup> causó una desacetilación progresiva de AceCS2 en el tiempo, que no se pudo observar con el mutante SIRT3-H248Y inactivo (Fig. 10E). Nuevamente, la desacetilación de AceCS2 se asoció a un aumento progresivo en la actividad enzimática (Fig. 10F). Basándose en los datos presentados aquí, se concluye que el estado de acetilación de Lys642 controla la actividad de la AceCS2 humana mitocondrial.

Ejemplo 13: Resumen y discusión

En *Salmonella enterica*, la acetilación de ACS por la proteína acetiltransferasa Pat inactiva la enzima, mientras que la desacetilación por la sirtuina CobB la reactiva (Starai *et al.*, 2002, *Science* 298:2390-2; Starai *et al.*, 2004, *J Mol Biol* 340:1005-12). La reacción de la acetil-CoA sintetasa, que resulta en la formación de acetil-CoA a partir de acetato, ATP y CoA se produce en dos pasos. En un primer paso, el acetato es activado a monofosfato de acetil-adenosina (acetil-AMP). En un segundo paso, acetil-AMP se convierte en acetil-CoA mediante la actividad de formación de enlace tioéster de ACS, y acetil-CoA y AMP son liberados secuencialmente (reseñado en Starai *et al.*, 2004, *Cell Mol Life Sci* 61 :2020-30). Se ha demostrado que la acetilación de lisina del sitio activo lisina (Lys609) de la ACS bacteriana inhibe específicamente la adenilación dependiente de ATP de acetato a acetil-AMP, mientras el segundo paso de la reacción de ACS permanece no afectado (Starai, *et al.*, 2002, *Science* 298:2390-2). Como se ilustra en la Fig. 3 A, Lys642 de AceCS2 corresponde al sitio activo lisina Lys609 de la ACS de *Salmonella enterica*. Dada la conservación de la región del sitio activo entre la ACS y la AceCS2 humana, se propone que la acetilación de Lys642 de AceCS2 interfiere con el primer paso de reacción que implica la activación de acetato a acetil-AMP.

AceCS2 es el primer ejemplo de una proteína mitocondrial que es controlada por la acetilación reversible de lisina y la primera proteína diana de una sirtuina desacetilasa mitocondrial. Una perspectiva general esquemática de la regulación de AceCS2 por la acetilación reversible de lisina se proporciona en la Fig. 11. Los datos presentados en este documento respaldan el modelo de que la activación de AceCS2 por SIRT3 es un mecanismo de control metabólico evolutivamente conservado. La interconversión de acetil-CoA (en el pasado conocida como "acetato

activada") y acetato, denominado "interruptor de acetato", existe en arqueobacterias, eubacterias y eucariotas y proporciona a la célula oportunidades de recuperar  $\text{NAD}^+$ , producir ATP y reponer las reservas de coenzima A (reseñado en Wolfe, 2005, *Microbiol Mol Biol Rev* 69: 12-50). El interruptor de acetato es controlado por la enzima depuradora de acetato acetil-CoA sintetasa. Las rutas metabólicas como la producción de energía en el ciclo TCA y la biosíntesis de colesterol y ácidos grasos requiere acetil-CoA como intermediario.

Las levaduras requieren críticamente acetil-CoA sintetetas para multiplicarse pero este no es el caso de las células de mamífero. La mayor parte de la acetil-CoA en células de mamíferos se produce en rutas que no son dependientes de la actividad de acetil-CoA sintetasa. Esas son la conversión de piruvato a acetil-CoA por la piruvato deshidrogenasa y la  $\beta$ -oxidación, que resulta en la formación de acetil-CoA como producto final. Sin embargo, en mamíferos, en algunas circunstancias se producen grandes cantidades de acetato que necesitan ser activadas por acetil-CoA sintetasa. Por ejemplo, en las afecciones cetogénicas como ayuno prolongado o diabetes, el hígado libera cantidades sustanciales de acetato a la circulación sanguínea (Buckley y Williamson, 1977, *Biochem J* 166:539-45; Seufert *et al.*, 1974, *Biochem Biophys Res Commun* 57:901-9; Yamashita *et al.*, 2001, *Biochim Biophys Acta* 1532:79-87). Además, la acetil-CoA hidrolasa hepática, que produce acetato, se activa en afecciones cetogénicas (Matsunaga *et al.*, 1985, *Eur J Biochem* 152, 331-6). La utilización del acetato liberado en tejidos extrahepáticos requiere la acción de acetil-CoA sintetetas. El descubrimiento de que AceCS2 es abundante en el corazón y el músculo esquelético pero que está ausente en el hígado y es inducida por afecciones cetogénicas, sugiere que AceCS2 desempeña un papel importante en la conversión de acetato para la producción de energía en afecciones cetogénicas (Fujino *et al.*, 2001, *J Biol Chem* 276, 11420-6). Basándose en el descubrimiento de que una sirtuina bacteriana controla la actividad de acetil-CoA sintetasa en *Salmonella enterica* y en la presencia de sirtuina en los tres reinos, se ha propuesto una conexión universal entre el metabolismo central y las sirtuinas (Starai *et al.*, 2003, *Genetics* 163, 545-55; Starai *et al.*, 2002, *Science* 298, 2390-2). Los descubrimientos descritos en este documento que muestran que AceCS2 puede ser inactivada mediante acetilación de su sitio activo lisina y reactivada por una sirtuina mitocondrial, respaldan las reivindicaciones y demuestran la conservación de esas rutas desde las bacterias a la mitocondria de mamífero.

Seq List EP07809490.1.txt  
LISTADO DE SECUENCIAS

<110> The J. David Gladstone Institutes  
 <120> Regulación de la actividad de la proteína  
 por acetilación reversible  
 <130> AHB/FP6597819  
 <150> 07809490.1  
 <151> 2007-06-12  
 <140> PCT/US07/013804  
 <141> 2007-06-12  
 <150> US 60/813,275  
 <151> 2006-06-12  
 <150> US 11/761,198  
 <151> 2007-06-11  
 <160> 18  
 <170> PatentIn Ver. 2.1  
 <210> 1  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia de acetil-  
 CoA sintetasa (AceCS) motivo de la secuencia común  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (3)..(4)  
 <223> Xaa = cualquier residuo de aminoácido  
 hidrófilo pequeño  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (6)  
 <223> Xaa = cualquier residuo de aminoácido  
 <400> 1  
 Ser Gly Xaa Xaa Gly Xaa Pro Lys Gly  
 1 5  
 <210> 2  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Acetil-CoA sintetasa 2  
 (AceCS) humana presecuencia N-terminal alfa-hélice anfipática  
 <400> 2  
 Ala Arg Thr Leu Gly Arg Gly Val Gly Arg Leu Leu Gly Ser Leu Arg  
 1 5 10 15  
 Gly Leu

Seq List EP07809490.1.txt

```

<210> 3
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia: Acetil-CoA sintetasa
      (AceCS) de Salmonella enterica región del sitio activo

<400> 3
Asp Ser Leu Pro Lys Thr Arg Ser Gly Lys Ile Met Arg Arg Ile Leu
 1          5          10          15

Arg Lys Ile Ala
          20

<210> 4
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia: Acetil-CoA sintetasa
      (AceCS2p) de Saccharomyces cerevisiae región del sitio activo

<400> 4
Arg Asp Leu Pro Arg Thr Arg Ser Gly Lys Ile Met Arg Arg Val Leu
 1          5          10          15

Arg Lys Val Ala
          20

<210> 5
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia: Acetil-CoA
      sintetasa (AceCS) de Caenorhabditis elegans región del sitio activo

<400> 5
Pro Gly Leu Pro Lys Thr Arg Ser Gly Lys Val Thr Arg Arg Ile Leu
 1          5          10          15

Arg Lys Ile Ala
          20

<210> 6
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia: Acetil-CoA sintetasa
      (AceCS) de Drosophila melanogaster región del sitio activo

<400> 6

```

Seq List EP07809490.1.txt

Pro Gly Leu Pro Lys Thr Arg Ser Gly Lys Ile Met Arg Arg Val Leu  
 1 5 10 15

Arg Lys Ile Ala  
 20

<210> 7  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia: Acetil-CoA sintetasa 2 (AceCS2) de Rattus norvegicus, Mus musculus y Homo sapiens región del sitio activo, fragmento del polipéptido AceCS2

<400> 7  
 Lys Arg Leu Pro Lys Thr Arg Ser Gly Lys Val Met Arg Arg Leu Leu  
 1 5 10 15

Arg Lys Ile Ile  
 20

<210> 8  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia: Acetil-CoA sintetasa 2 (AceCS2) digerido triptico preparado para espectrometría de masas

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (3)<sup>-</sup>  
 <223> lisina acetilada

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (5)<sup>-</sup>  
 <223> metionina oxidada

<400> 8  
 Ser Gly Lys Val Met Arg  
 1 5

<210> 9  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia: Acetil-CoA sintetasa 2 (AceCS2) péptido sintético acK642

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (8)<sup>-</sup>  
 <223> lisina acetilada

<220>

Seq List EP07809490.1.txt

<221> MOD\_RES  
 <222> (14)  
 <223> leucinamida

<400> 9  
 Cys Pro Lys Thr Arg Ser Gly Lys Val Met Arg Arg Leu Leu  
 1 5 10

<210> 10  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia: Acetil-CoA  
 sintetasa 2 (AceCS2) péptido sintético acK642

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (14)  
 <223> leucinamida

<400> 10  
 Cys Pro Lys Thr Arg Ser Gly Lys Val Met Arg Arg Leu Leu  
 1 5 10

<210> 11  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia: Acetil-CoA  
 sintetasa 2 (AceCS2) fragmento del polipéptido

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (8)  
 <223> lisina acetilada

<400> 11  
 Cys Pro Lys Thr Arg Ser Gly Lys Val Met Arg Arg Leu Leu  
 1 5 10

<210> 12  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia: Acetil-CoA  
 sintetasa 2 (AceCS2) fragmento del polipéptido

<400> 12  
 Cys Pro Lys Thr Arg Ser Gly Lys Val Met Arg Arg Leu Leu  
 1 5 10

<210> 13  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

Seq List EP07809490.1.txt

```

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia: epitopo etiqueta
        6XHis

<400> 13
His His His His His His
  1                               5

<210> 14
<211> 200
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia: ligador
        flexible poli Gly

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(200)
<223> Gly o ausente

<400> 14
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
  1                               5                               10           15
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
                20                               25           30
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
        35                               40           45
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
        50                               55           60
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
        65                               70           75           80
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
        85                               90           95
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
        100                              105          110
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
        115                              120          125
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
        130                              135          140
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
        145                              150          155          160
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
        165                              170          175
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
        180                              185          190
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
        195                              200

<210> 15
<211> 30

```

Página 6

Seq LIST EP0/009990.1.LAL

<212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia: Acetil-CoA sintetasa 2 (AceCS2) región codificante cebador amplificación por PCR

<400> 15  
 cggaattcca tggcggcgcg caccctgggc

<210> 16  
 <211> 34  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia: Acetil-CoA sintetasa 2 (AceCS2) región codificante cebador amplificación por PCR

<400> 16  
 cggaattcct tagcagcagc ctgcttgccc ttgc

<210> 17  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia: ARNip bicatenario del homólogo 3 (SIRT3, sirtuina 3) de la desacetilasa dependiente de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD<sup>+</sup>) regulador de información silencioso 2 (Sir 2)

<400> 17  
 ggaguggccu guacagcaau u

<210> 18  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia: ARNip bicatenario del homólogo 3 (SIRT3, sirtuina 3) de la desacetilasa dependiente de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD<sup>+</sup>) regulador de información silencioso 2 (Sir 2)

<400> 18  
 uugcuquaca ggccacuccu u

Página 6



## REIVINDICACIONES

1. Un método para identificar un agente que aumente la actividad desacetilasa de un polipéptido SIRT3, donde el método comprende los pasos de:
- 5 (a) poner en contacto en una mezcla de ensayo que contenga NAD<sup>+</sup> un polipéptido SIRT3 y un polipéptido acetil-CoA sintetasa 2 (AceCS2) con un agente con potencial terapéutico; y  
 (b) determinar el efecto, si lo hubiera del agente con potencial terapéutico sobre el nivel de AceCS2 acetilado en la mezcla de ensayo;.  
 donde una disminución en un primer nivel de AceCS2 acetilado en la mezcla de ensayo en comparación con un  
 10 segundo nivel de AceCS2 acetilado en una mezcla de ensayo, que no ha sido tratada con el agente con potencial terapéutico, es indicativa de un agente que aumenta la actividad desacetilasa del polipéptido SIRT3.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde el polipéptido AceCS2 acetilado comprende un grupo acetilo marcado con <sup>14</sup>C y el paso (b) se realiza midiendo la liberación del grupo acetilo marcado con <sup>14</sup>C.
- 15 3. Un método para identificar un agente que module el estado de acetilación o la actividad de un polipéptido acetil-CoA sintetasa 2 (AceCS2), donde el método comprende los pasos de:  
 (a) poner en contacto un polipéptido AceCS2 en una mezcla de ensayo con un agente con potencial terapéutico; y  
 20 (b) determinar el efecto, si lo hubiera, del agente con potencial terapéutico sobre el estado de acetilación o la actividad del polipéptido AceCS2 en la mezcla de ensayo;.
4. Un método para identificar un agente que aumente la actividad desacetilasa de un polipéptido SIRT3, donde el método comprende los pasos de: (a) poner en contacto una célula que expresa un polipéptido SIRT3 y un  
 25 polipéptido acetil-CoA sintetasa 2 (AceCS2) con un agente con potencial terapéutico *in vitro*; y  
 (b) determinar el efecto, si lo hubiera, del agente con potencial terapéutico sobre el nivel de AceCS2 acetilado en la célula;.  
 donde una disminución en un primer nivel de AceCS2 acetilado en la célula en comparación con un segundo nivel  
 de AceCS2 acetilado en una célula que no ha sido tratada con el agente con potencial terapéutico, es indicativa de  
 30 un agente que aumenta la actividad desacetilasa del polipéptido SIRT3.
5. El método de la reivindicación 4, donde el paso (b) comprende un ensayo inmunológico usando un anticuerpo específico para AceCS2 acetilado.
6. El método de la reivindicación 4, donde la célula es una célula de mamífero como una célula cardíaca, una célula  
 35 muscular o una célula cerebral.
7. El método de la reivindicación 6, donde la célula de mamífero es una célula humana.
8. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 4, que comprende además el paso de:  
 40 (c) identificar una estructura o secuencia del agente con potencial terapéutico.
9. Un método para identificar un agente que module el estado de acetilación o la actividad de un polipéptido acetil-CoA sintetasa 2 (AceCS2), donde el método comprende los pasos de:  
 45 (a) poner en contacto una célula que expresa un polipéptido AceCS2 con un agente con potencial terapéutico *in vitro*; y  
 (b) determinar el efecto, si lo hubiera, del agente con potencial terapéutico sobre el estado de acetilación, o la actividad del polipéptido AceCS2 en la célula;.
10. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones, 1, 2 y 4 a 8 donde  
 50 (i) el polipéptido AceCS2 comprende la secuencia establecida en SEC. ID N°: 7, 11 o 12; o  
 (ii) el polipéptido SIRT3 comprende la secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 85% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en GenBank N° de registro AAD40851; o  
 (iii) el polipéptido SIRT3 y el polipéptido AceCS2 se purifican.
- 55 11. El método de acuerdo con la reivindicación 3 o la reivindicación 9, donde:  
 (i) el polipéptido AceCS2 comprende la secuencia establecida en SEC. ID N°: 7, 11 o 12; o  
 (ii) el polipéptido AceCS2 se purifica.
- 60 12. El método de acuerdo con la reivindicación 3 o la reivindicación 9, donde el paso (b) comprende determinar el efecto, si lo hubiera, del agente con potencial terapéutico sobre el estado de acetilación del polipéptido AceCS2.
13. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 12, donde el paso (b) comprende un ensayo inmunológico usando un anticuerpo específico para AceCS2 acetilado.

14. El método de acuerdo con la reivindicación 12, donde el polipéptido AceCS2 acetilado comprende un grupo acetilo marcado con  $^{14}\text{C}$  y el paso (b) se realiza midiendo la liberación del grupo acetilo marcado con  $^{14}\text{C}$ .

5 15. El método de acuerdo con la reivindicación 3 o la reivindicación 9, donde el paso (b) comprende determinar el efecto, si lo hubiera, del agente con potencial terapéutico sobre la actividad del polipéptido AceCS2.

16. El método de la reivindicación 15, donde

(i) la actividad del polipéptido AceCS2 es la conversión enzimática de acetato, ATP y coenzima-A en acetil-CoA y AMP; o

10 (ii) la actividad del polipéptido AceCS2 es unirse a un polipéptido SIRT3.

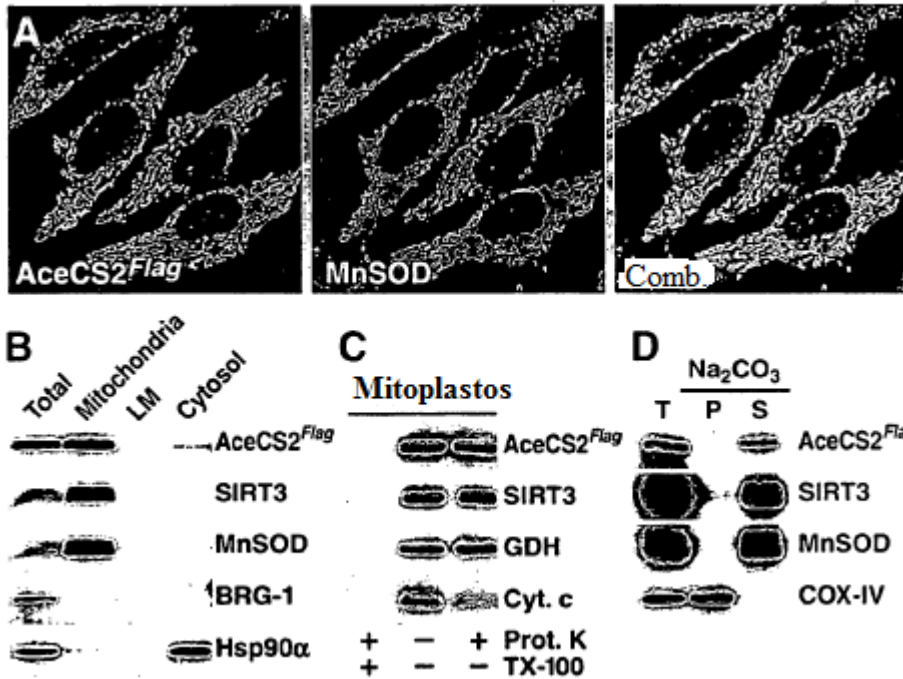


FIG. 1

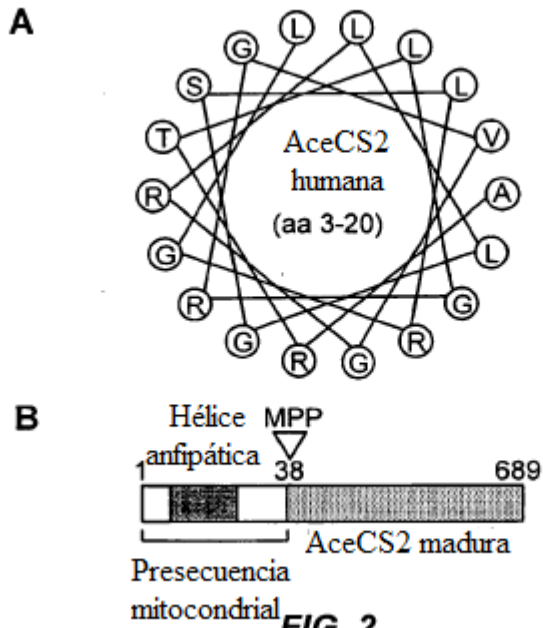
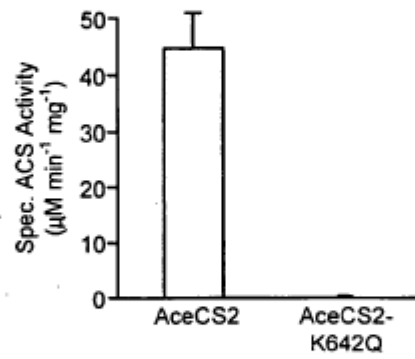


FIG. 2

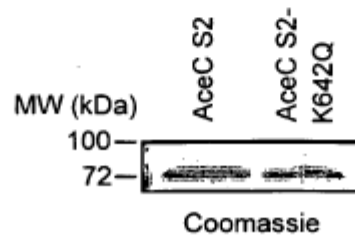
**A**

ACS <i>S. enterica</i>	D S	L P K T R S G	K	I M R R	I	L R K I A
ACS2p <i>S. cerevisiae</i>	R D	L P <b>R</b> T R S G	K	I M R R	V	L R K <b>V</b> A
ACS <i>C. elegans</i>	P G	L P K T R S G	K	<b>V T</b> R R	I	L R K I A
ACS <i>D. melanogaster</i>	P G	L P K T R S G	K	I M R R	V	L R K I A
AceCS2 <i>R. norvegicus</i>	K R	L P K T R S G	K	<b>V</b> M R R	L	L R K I I
AceCS2 <i>M. musculus</i>	K R	L P K T R S G	K	<b>V</b> M R R	L	L R K I I
AceCS2 <i>H. sapiens</i>	K R	L P K T R S G	K	<b>V</b> M R R	L	L R K I I

**B**



**C**



**FIG. 3**

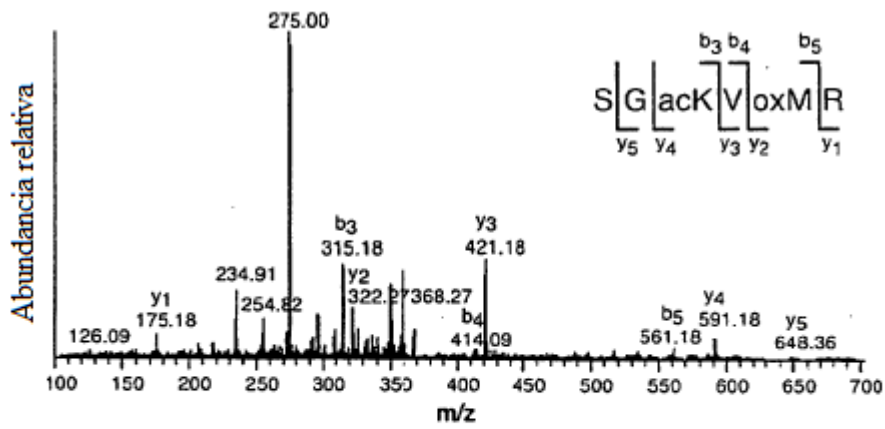


FIG. 4

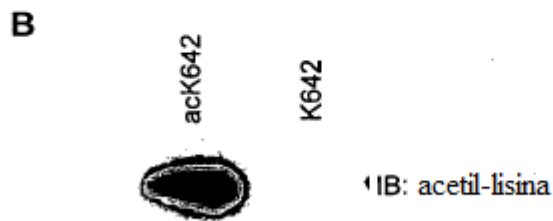
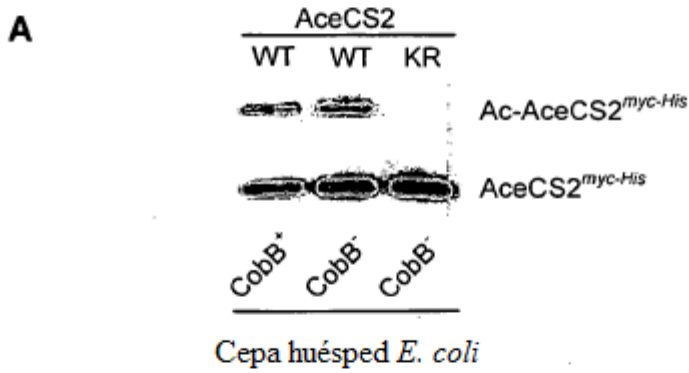
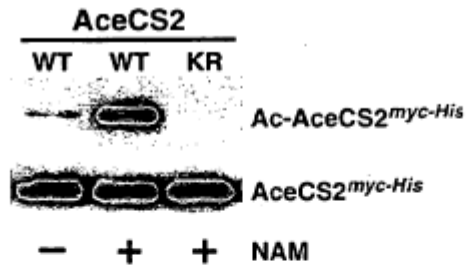
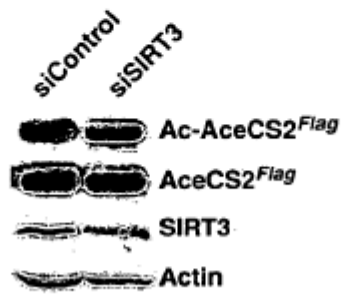
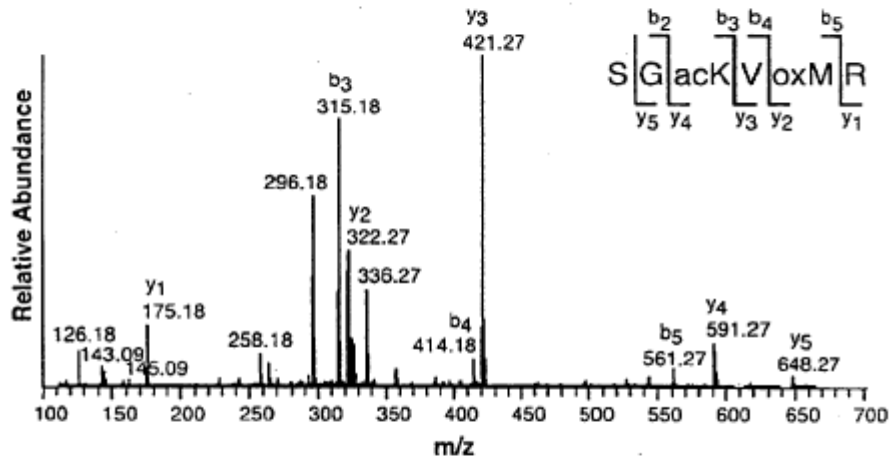


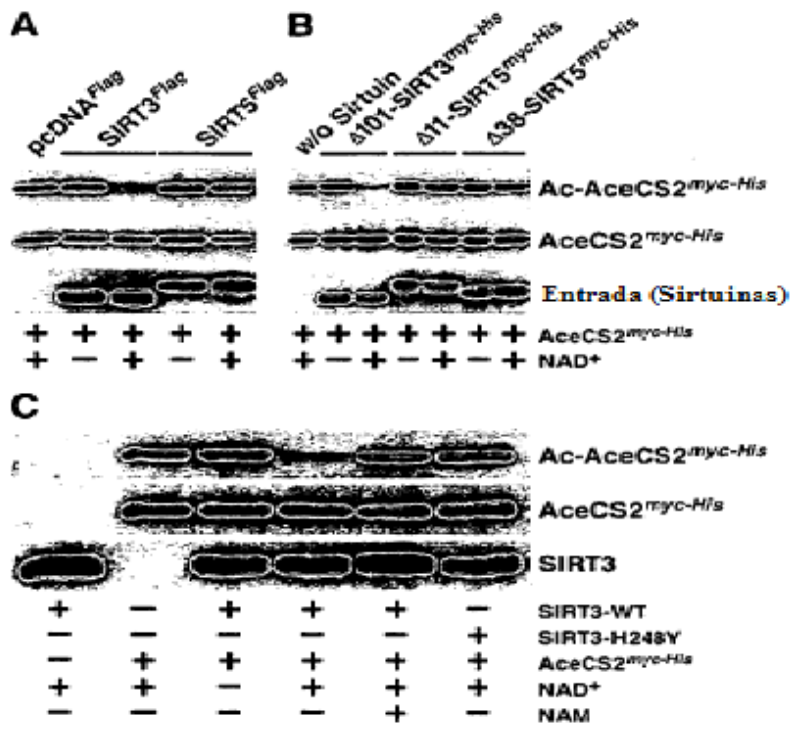
FIG. 5

**A**



**B**





**FIG. 8**



**FIG. 9**

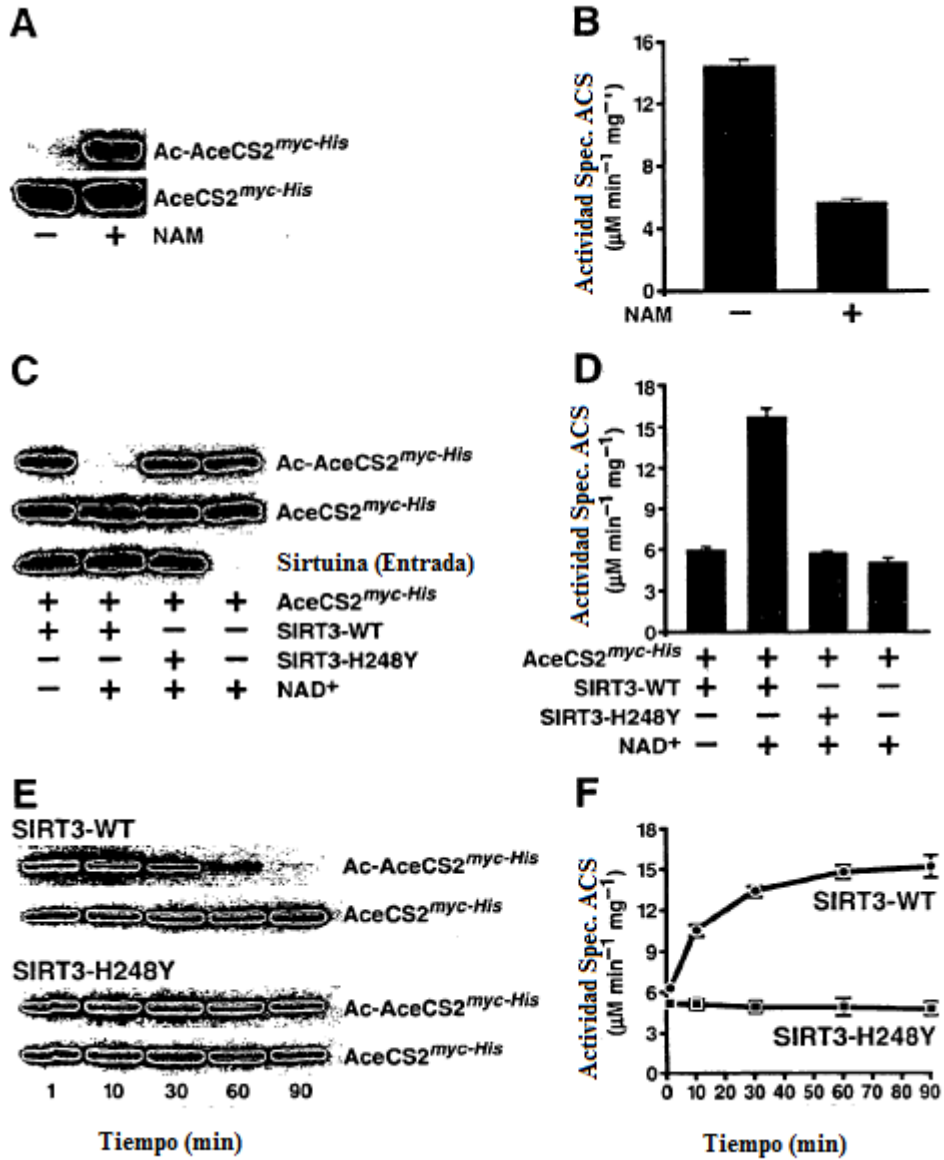
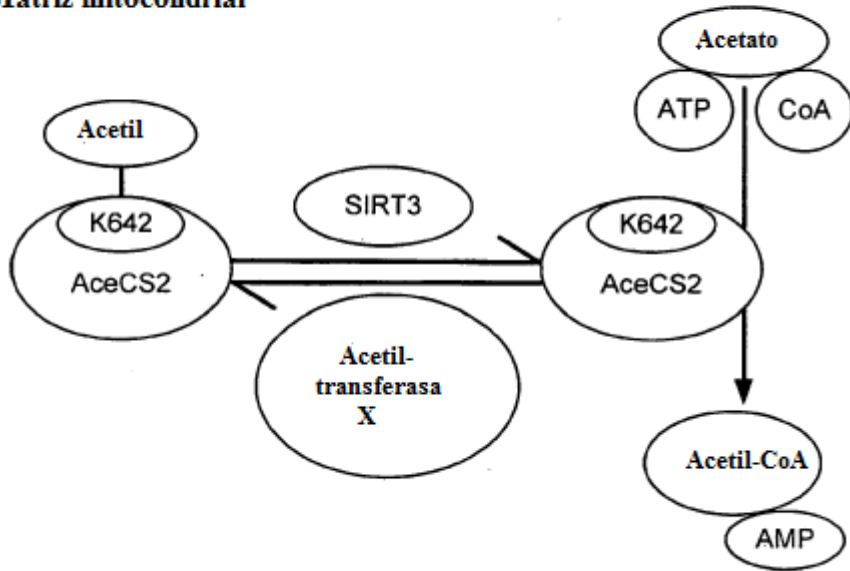


FIG. 10



**Matriz mitocondrial**



**FIG. 11**