

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 389 111**

51 Int. Cl.:  
**G01N 33/68** (2006.01)  
**C12Q 1/25** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06844714 .3**  
96 Fecha de presentación: **01.12.2006**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1955077**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **13.08.2008**

54 Título: **Ensayos de espectrometría de masas para la actividad acetiltransferasa/desacetilasa**

30 Prioridad:  
**02.12.2005 US 741783 P**  
**14.04.2006 US 792126 P**  
**15.11.2006 US 859371 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**23.10.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**23.10.2012**

73 Titular/es:  
**SIRTRIS PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)**  
**200 TECHNOLOGY SQUARE, SUITE 300**  
**CAMBRIDGE, MA 02139, US**

72 Inventor/es:  
**SMITH, JESSE;**  
**MILNE, JILL;**  
**LYNCH, AMY;**  
**CARNEY, DAVID;**  
**IFFLAND, ANDRE y**  
**BOSS, OLIVIER**

74 Agente/Representante:  
**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 389 111 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

Ensayos de espectrometría de masas para la actividad acetiltransferasa/desacetilasa

## ANTECEDENTES

5 La acetilación y la desacetilación de proteínas histónicas, factores de transcripción y proteínas relacionadas desempeñan una función importante en el control de los procesos celulares. En particular, el estado de acetilación de las histonas controla la fortaleza de la interacción entre las proteínas histónicas y el ADN y, por lo tanto, lo accesible que está el ADN a los factores de transcripción. Las enzimas que añaden grupos acetilo a las histonas o a otras proteínas se denominan histona acetiltransferasas (HAT). Las enzimas que retiran los grupos acetilo se dividen en dos familias: las histona desacetilasas (HDAC) y la familia Sir2 de desacetilasas. En la actualidad hay once miembros conocidos de la familia de las HDAC de los mamíferos (Gray y Ekstrom, *Exper. Cell Res.* 2001, 262, 75-83; Zhou, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001, 98, 10572-10577; Kao et al. *J. Biol. Chem.* 2002, 277, 187-193; Gao et al. *J. Biol. Chem.* 2002, 277, 25748-25755) y siete miembros de la familia Sir2 (Gray y Ekstrom, *Exper. Cell Res.* 2001, 262, 75-83).

15 Las histona acetiltransferasas catalizan la transferencia de un grupo acetilo desde el acetil-CoA al grupo ε-amino de un resto de lisina de la proteína diana. Se han caracterizado muchas enzimas HAT a partir de organismos eucariotas (Sterner y Berger, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2000, 64, 435-459). Las enzimas HDAC utilizan un ion de cinc en el centro activo de la proteína para catalizar la retirada del grupo acetilo de la acetil-lisina en forma de acetato. Los miembros de la familia Sir2 de enzimas utilizan NAD como cofactor para la hidrólisis de la acetil-lisina.

20 El estado de acetilación de las proteínas histónicas desempeña una función importante en la expresión génica y en el control del ciclo celular, y parece intervenir en determinadas formas de cáncer. En particular, se ha demostrado que el reclutamiento anormal de las histona desacetilasas por proteínas correpresoras promueve el desarrollo de la leucemia promielocítica. En las líneas de células tumorales, varios estudios han demostrado que el tratamiento con inhibidores de las HDAC puede conducir a la inhibición del crecimiento, la parada del crecimiento, la diferenciación terminal y/o la apoptosis. Los estudios *in vivo* han demostrado que la inhibición del crecimiento de tumores y que una reducción de las metástasis tumorales de resultados del tratamiento con inhibidores de las HDAC (Kramer et al., *Trends. Endocrinol. Metab.* 2001, 12, 294-300).

25 El estudio eficaz de la enzimología y de la modulación de las enzimas HAT, HDAC y Sir2 depende de la disponibilidad de ensayos robustos que se puedan realizar con alto rendimiento. Se han desarrollado varias metodologías de ensayo para estas enzimas, con diferentes grados de utilidad para el escrutinio de inhibidores y activadores.

30 En los ensayos de las histona acetiltransferasas se suele utilizar la radioactividad. En estos formatos, el acetil-CoA radiomarcado en el grupo acetilo se hace reaccionar con un péptido que corresponde a una secuencia de aminoácidos de histona. La transferencia del acetato radiomarcado al péptido se cuantifica mediante la unión del péptido a resina de afinidad (Ait-Si-Ali et al., *Nucleic Acids Res.* 1998, 26, 3869-3870), a papel de fosfocelulosa (Tanner et al., *J. Biol. Chem.*, 1999, 274, 18157-18160), o a microplacas de centelleo (Wynne Aheme et al., *Methods*, 2002, 26, 245-53), y la medición de la radioactividad asociada. En un formato de ensayo acoplado no radioactivo, el CoA libre que se forma en la reacción acetiltransferásica sirve de sustrato para la α-cetoglutarato deshidrogenasa o la piruvato deshidrogenasa. La formación de NADH sirve para medir la velocidad de la actividad acetiltransferasa (Kim et al., *Anal. Biochem.* 2000, 280, 308-314).

40 La metodología más habitual de ensayo de la desacetilasa implica la marcación de péptidos de histona en grupos lisina con acetato radiomarcado. La enzima desacetilasa retira el grupo acetilo como acetato, el cual se aísla posteriormente por extracción y se cuantifica basándose en su radioactividad (Inoue y Fujimoto, *Biochim. Biophys. Acta.* 1970, 220, 307-316). En una variante de este método, un ensayo de proximidad de centello, los péptidos modificados con grupos acetilo radiomarcados se unen a una perla que contiene líquido de centelleo que emite luz cuando se expone a la radiación. En este formato de ensayo, la escisión de los grupos acetilo ocasiona una disminución de la emisión de luz desde el líquido de centelleo (Nare et al., *Anal. Biochem.* 1999, 267, 390-396). Un ensayo que no emplea radioactividad utiliza péptidos que contienen un grupo acetil-lisina y una etiqueta fluorescente. La reactividad se mide mediante cromatografía líquida de alta resolución, donde las diferencias del tiempo de retención de los péptidos acetilados y sin acetilar se utiliza para aislar y cuantificar los productos de reacción (Hoffmann et al., *Nucleic Acids Res.*, 1999, 27, 2057-8; Hoffmann et al., *Bioconjug. Chem.* 2001, 12, 51-5; Hoffmann et al., *Arch Pharm (Weinheim)* 2001, 334, 248-52). Un ensayo comercial utiliza un protocolo de detección en dos etapas. En la primera etapa, un péptido que contiene una acetil-lisina se hace reaccionar con una desacetilasa durante un periodo de tiempo determinado. Después de esto, se hace detener la reacción y la lisina expuesta se hace reaccionar con un agente de revelado que produce un fluoróforo, y la cantidad de lisina desacetilada se cuantifica mediante la fluorescencia del producto (Biomol, Plymouth Meeting, Pa., EE.UU.). Más recientemente se describió un ensayo de dos etapas acoplado a proteasa, en el cual se diseñó un péptido para que contuviera un par de extintor-donante de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET, por su nombre en inglés) y una acetil-lisina. Después de dejar que tenga lugar la reacción de la desacetilasa, se detiene la reacción y se cuantifica la cantidad de péptido desacetilado mediante la reacción del péptido desacetilado con una

enzima proteásica que se escinde específicamente después de restos de lisina (Frey et al., Presentado en la 224.<sup>a</sup> Reunión nacional de la American Chemical Society, Boston, Mass., agosto de 2002; artículo MEDI-121, Marcotte et al., *Anal., Biochem.*, 332: 90 (2004)).

5 Blander et al. (*Journal of Biological Chemistry*, 18 de marzo, 2005, vol. 280, n.º 11, páginas 9780-9785) describen el uso de la espectrometría de masas en un método para analizar productos de desacetilación de SIRT1 utilizando sustratos que comprenden al menos un resto lisina acetilado (Fmoc-MASTGG-AcK-DSTEMAEEEE). El método comprende las etapas adicionales de modificar la amina de los sustratos de los péptidos y capturar los sustratos peptídicos desacetilados y biotinilados. La acción de SIRT1 da lugar a la desacetilación de los sustratos, lo que significa que cuando la enzima es activa, se vuelve visible un pico de 1895,56 en los espectros de masas [m/z] (figura 2). En otras palabras, se puede monitorizar la actividad de SIRT1. Al mismo tiempo se puede monitorizar la pérdida de un grupo acetilo por la desaparición del pico de 1959,89 (figura 2). Así pues, se puede medir una disminución de la acetilación, lo que indica que la proteína es un sustrato para SIRT1 que transmite la actividad de SIRT1.

15 Las características de los formatos de ensayo anteriores limitan su utilidad. Los ensayos en los que se emplea radioactividad tienden a ser costosos y requieren unas precauciones especiales para su manipulación. De igual forma, a menudo son difíciles de realizar en alto rendimiento. Por consiguiente, se necesitan mejores ensayos para medir la actividad de las acetiltransferasas o de las desacetilasas.

### COMPENDIO

20 Se dan a conocer en la presente memoria métodos para identificar compuestos que modulan la actividad de una desacetilasa.

Un método para identificar un compuesto que activa una sirtuina, que comprende:

25 poner en contacto un conjunto de sustratos de péptidos con una sirtuina en presencia de un compuesto problema, en el que la concentración del sustrato peptídico en el conjunto de sustratos peptídicos está por debajo de la  $K_m$  de la sirtuina por el sustrato peptídico, y en el que los miembros de dicho conjunto de sustratos peptídicos comprende al menos un resto de lisina acetilado, y

determinar el nivel de acetilación del conjunto de sustratos peptídicos mediante espectrometría de masas, en donde una disminución del nivel de acetilación del conjunto de sustratos peptídicos en presencia del compuesto problema en comparación con una reacción de control en la cual el compuesto problema no está incluido, es indicativa de un compuesto que activa una sirtuina.

30 En determinadas realizaciones, la sirtuina puede ser, por ejemplo, una proteína SIRT1. En determinadas realizaciones, la desacetilasa puede ser una proteína purificada o se proporciona como parte de una mezcla, tal como un lisado de células o de tejido.

En determinadas realizaciones, la secuencia de los sustratos peptídicos puede proceder de una histona, una proteína HMG, p53, c-Myb, GATA-1, EKLF, MyoD, E2F, dTCF o Tat de HIV, o un fragmento de las mismas.

35 En determinadas realizaciones, la espectrometría de masas puede ser espectrometría de masas de ionización por electronebulización (ESI, por su nombre en inglés) o espectrometría de masas de desorción e ionización por láser asistida por una matriz (MALDI, por su nombre en inglés).

40 En determinadas realizaciones se identifica un compuesto que incrementa la actividad de la desacetilasa. En tales realizaciones, una disminución del nivel de acetilación del conjunto de sustratos en presencia del compuesto problema en comparación con un control es indicativa de un compuesto que incrementa la actividad de la desacetilasa.

45 De acuerdo con la invención, la concentración del sustrato peptídico en el conjunto de sustratos peptídicos está por debajo de la  $K_m$  de la sirtuina para el sustrato peptídico. En determinadas realizaciones, la concentración del sustrato peptídico en el conjunto de sustratos peptídicos puede estar aproximadamente 2 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 25 veces o más por debajo de la  $K_m$  de la desacetilasa para el sustrato peptídico.

En determinadas realizaciones se puede identificar un compuesto que activa una sirtuina con más fuerza que el resveratrol. En determinadas realizaciones se puede identificar un compuesto que tiene actividad activadora de la sirtuina en al menos aproximadamente 2 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces, 100 veces o más, mayor que la actividad activadora de la sirtuina que tiene el resveratrol.

50 En determinadas realizaciones, el compuesto es una molécula pequeña.

Se describe adicionalmente un método para identificar un compuesto que activa una sirtuina que además comprende uno o más de lo siguiente: (i) preparar una cantidad del compuesto, o un análogo del mismo; (ii) llevar a cabo un perfil terapéutico del compuesto, o un análogo del mismo, para determinar la eficacia y la toxicidad en los animales; (iii) formular el compuesto, o análogo del mismo, en una formulación farmacéutica; (iv) fabricar una

preparación farmacéutica de un compuesto, o un análogo del mismo, que tiene un perfil adecuado de toxicidad animal; (v) comercializar una preparación farmacéutica de un compuesto, o de un análogo del mismo, que tiene un perfil adecuado de toxicidad animal para los proveedores de asistencia sanitaria.

5 En otro aspecto se da a conocer un método para determinar la actividad desacetilasa de una sirtuina, que comprende:

(a) poner en contacto un conjunto de sustratos peptídicos con una sirtuina, en el que la concentración del sustrato peptídico en el conjunto de sustratos peptídicos está por debajo de la  $K_m$  de la sirtuina para el sustrato peptídico, y en el que los miembros de dicho conjunto de sustratos comprenden al menos un resto de lisina acetilado; y

10 (b) determinar el nivel de acetilación del conjunto de sustratos peptídicos utilizando la espectrometría de masas, en donde una disminución del nivel de acetilación del conjunto de sustratos peptídicos es indicativa de la actividad desacetilasa de la sirtuina.

15 En determinadas realizaciones, la concentración del sustrato peptídico en el conjunto de sustratos peptídicos puede estar por debajo de la  $K_m$  de la desacetilasa para el sustrato peptídico. En determinadas realizaciones, la concentración del sustrato peptídico en el conjunto de sustratos peptídicos puede estar al menos 10 veces por debajo de la  $K_m$  de la desacetilasa para el sustrato peptídico.

En determinadas realizaciones, el conjunto de sustratos peptídicos puede comprender una sola especie de péptido. En otras realizaciones, el conjunto de sustratos peptídicos puede comprender una mezcla de dos o más péptidos.

20 En determinadas realizaciones, el método para identificar un compuesto que modula la actividad de una proteína sirtuina puede comprender además analizar si el compuesto tiene actividad moduladora de la sirtuina mediante un ensayo *in vitro*. Tales ensayos *in vitro* se pueden realizar, por ejemplo, con espectrometría de masas y/o un sustrato fluorescente para determinar la actividad de la sirtuina. En determinadas realizaciones, el ensayo *in vitro* se puede llevar a cabo antes de poner en contacto la muestra de células con el posible compuesto modulador de la sirtuina. En determinadas realizaciones, los métodos pueden además comprender comparar los resultados del ensayo *in vitro* con la concentración media de ATP por célula viable.

25 En determinadas realizaciones, la muestra de células puede comprender células NCI-H358 y/o MCF7.

En determinadas realizaciones, la concentración media de ATP por célula viable se puede determinar a unas 36-60 horas, o unas 48 horas, después de poner en contacto la muestra de células con el posible compuesto modulador de la sirtuina.

En determinadas realizaciones, la sirtuina puede ser, por ejemplo, una proteína SIRT1.

30 La puesta en práctica de los presentes métodos empleará, a menos que se indique de otra manera, técnicas convencionales de biología celular, cultivo celular, biología molecular, biología de transgénicos, microbiología, ADN recombinante e inmunología, que se encuentran dentro de los conocimientos de la técnica. Tales técnicas se explican totalmente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, *Molecular Cloning, A Laboratory manual*, 2.<sup>a</sup> ed., editado por Sambrook, Fritsch y Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989); *DNA cloning*, volúmenes I y II (D. N. Glover ed., 1985); *Oligonucleotide synthesis* (M. J. Gait ed., 1984); Mullis et al., patente de los Estados Unidos n.º 4 683 195; *Nucleic acid hybridization* (B. D. Hames y S. J. Higgins eds. 1984); *Transcription and translation* (B. D. Hames y S. J. Higgins eds. 1984); *Culture of animal cells* (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); *Immobilized cells and enzymes* (IRL Press, 1986); B. Perbal, *A practical guide to molecular cloning* (1984); *The treatise, «Methods in enzymology»* (Academic Press, Inc., N. Y.); *Gene transfer vectors for mammalian cells* (J. H. Miller y M. P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); *Methods in enzymology*, vols. 154 y 155 (Wu et al., eds.), *Immunochemical methods in cell and molecular biology* (Mayer y Walker, eds., Academic Press, Londres, 1987); *Handbook of experimental immunology*, volúmenes I-IV (D. M. Weir y C. C. Blackwell, eds. 1986); *Manipulating the mouse embryo*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1986).

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

45 La figura 1 muestra un esquema de un ensayo de espectrometría de masas para la titulación de SIRT1.

La figura 2 muestra un gráfico de barras del ensayo de espectrometría de masas MS de la cinética temporal de la titulación de la enzima SIRT1 (panel superior) y un gráfico de la velocidad inicial frente a la concentración de la enzima (panel inferior).

La figura 3 muestra un esquema de una  $K_m$  de SIRT1 para el ensayo del sustrato peptídico acetilado.

50 La figura 4 muestra un gráfico representativo de una  $K_m$  de SIRT1 para un sustrato peptídico acetilado.

La figura 5 muestra un esquema de una  $K_m$  de SIRT1 para el ensayo de  $NAD^+$ .

La figura 6 muestra un gráfico de la  $K_m$  de SIRT1 para el  $NAD^+$ .

La figura 7 muestra un esquema de un ensayo de espectrometría de masas de la tolerancia de SIRT1 al DMSO.

La figura 8 muestra un gráfico de barras de la velocidad inicial por espectrometría de masas de SIRT1 frente a la concentración de DMSO.

La figura 9 muestra un esquema de un ensayo de espectrometría de masas de  $K_m$ .

- 5 La figura 10 muestra el efecto del resveratrol sobre la  $K_m$  de SIRT1 para el sustrato peptídico acetilado. El panel superior muestra un gráfico de la concentración del resveratrol ( $\mu\text{M}$ ) frente a la  $K_m$  para el % del DMSO y el panel inferior muestra un gráfico de barras de la concentración de resveratrol ( $\mu\text{M}$ ) frente a la  $K_m$  para el péptido ( $\mu\text{M}$ ).

La figura 11 muestra un esquema de un ensayo del ATP celular.

La figura 12 muestra una curva de respuesta a la dosis para el tratamiento del resveratrol.

- 10 La figura 13 muestra un análisis de inmunotransferencia para identificar líneas celulares que tienen un nivel endógeno relativamente bajo de expresión de SIRT1.

La figura 14 muestra un análisis de inmunotransferencia de la concentración de SIRT1 frente a la concentración de tubulina en una serie de tipos celulares y un correspondiente gráfico de barras que muestra la expresión normalizada de SIRT1 para una serie de tipos de células.

- 15 La figura 15 muestra un gráfico de barras de la señal normalizada de la proteína para tres marcadores mitocondriales después de una exposición de 48 horas de las células NCI-H358 a varias concentraciones de resveratrol. Succ-Ubi-Ox es succinato-ubiquinol oxidorreductasa; F1F0 ATP Syn. es ATP sintasa F1F0 ; y NADH-UBI es NADH-ubiquinol oxidorreductasa.

- 20 Las figuras 16A y 16B muestran el efecto del pretratamiento de los lisados preparados de las células CDC12 (figura 16A) o de leucocitos periféricos humanos (figura 16B) con 6-cloro-2,3,4,9-tetrahidro-1-H-carbazol-1-carboxamida (Sirt Inh, 5  $\mu\text{M}$ ), TSA (1  $\mu\text{M}$ ) y nicotinamida (NAM, 5 mM) sobre la actividad desacetilasa como se describe en el ejemplo 12.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA

### 1. Definiciones

- 25 Tal y como se utiliza en la presente memoria, las terminologías y frases siguientes tendrán los significados establecidos a continuación. A menos que se defina de otra manera, toda la terminología científica y técnica utilizada en la presente memoria tiene el mismo significado que suele darle el experto en la técnica.

Las formas singulares «un», «una» y «el» incluyen referencias plurales a menos que el contexto lo dictamine claramente de otra manera.

- 30 La terminología «comprende» y «que comprende» se utilizan en sentido amplio, inclusivo, lo que significa que se podrían incluir elementos adicionales.

- La terminología «resto conservado» se refiere a un aminoácido que es un miembro de un grupo de aminoácidos que tienen determinadas propiedades comunes. La terminología «sustitución conservativa de aminoácido» se refiere a la sustitución (conceptualmente o de otra manera) de un aminoácido de un grupo por un aminoácido diferente del mismo grupo. Un modo funcional de definir las propiedades comunes entre cada uno de los aminoácidos es analizar las frecuencias normalizadas de los cambios de aminoácido entre las correspondientes proteínas de organismos homólogos (Schulz, G. E. y R. H. Schirmer., *Principles of protein structure*, Springer-Verlag). De acuerdo con tales análisis, se pueden definir grupos de aminoácidos en los que los aminoácidos dentro de un grupo se intercambian preferentemente con otro y, por lo tanto, se parecen unos a los otros principalmente en su impacto sobre la estructura global de la proteína (Schultz, G. E y R. H. Schirmer, *Principles of protein structure*, Springer-Verlag). Un ejemplo de un conjunto de grupos de aminoácidos definidos de este modo incluyen: (i) un grupo cargado, que consiste en Glu y Asp, Lys, Arg y His, (ii) un grupo cargado positivamente, que consiste en Lys, Arg e His, (iii) un grupo cargado negativamente, que consiste en Glu y Asp, (iv) un grupo aromático, que consiste en Phe, Tyr y Trp, (v) un grupo con anillo con nitrógeno, que consiste en His y Trp, (vi) un grupo no polar con cadenas alifáticas grandes, que consiste en Val, Leu e Ile, (vii) un grupo ligeramente polar, que consiste en Met y Cys, (viii) un grupo de restos pequeños, que consiste en Ser, Thr, Asp, Asn, Gly, Ala, Glu, Gln y Pro, (ix) un grupo alifático que consiste en Val, Leu, Ile, Met y Cys, y (x) un grupo hidroxilo pequeño que consiste en Ser y Thr.

La terminología «que incluye» se utiliza para significar «que incluye pero sin limitarse a». «Que incluye» y «que incluye pero sin limitarse a» se utilizan indistintamente.

- 50 La terminología «mamífero» se conoce en la técnica, y los mamíferos de ejemplo incluyen humanos, primates, ganado (como bovino, porcino, etc.), animales de compañía (p. ej., perros, gatos, etc.) y roedores (p. ej., ratones y ratas).

La terminología «modula», cuando se utiliza en referencia a la actividad de una desacetilasa, se refiere a la inducción (p. ej., activación o estimulación), descenso (p. ej., inhibición o supresión) u otro cambio en una característica de tal actividad acetiltransferasa o desacetilasa.

5 La terminología «porcentaje idéntico» se refiere a la identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de nucleótidos. Cada identidad se puede determinar al comparar una posición de cada secuencia que se puede alinear para propósitos de comparación. Cuando una posición equivalente en las secuencias comparadas está ocupada por la misma base o aminoácido, entonces las moléculas son idénticas en esta posición; cuando el sitio equivalente está ocupado por el mismo resto de aminoácido o uno similar (p. ej., de naturaleza estérica y/o electrónica similares), entonces se puede decir que las moléculas son homólogas (similares) en esa posición. La expresión como un porcentaje de homología, similitud o identidad estará en función del número de aminoácidos idénticos o similares en las posiciones compartidas por las secuencias comparadas. La expresión como un porcentaje de homología, similitud o identidad estará en función del número de aminoácidos idénticos o similares en las posiciones compartidas por las secuencias comparadas. Se pueden utilizar diferentes algoritmos y/o programas de alineamiento, entre ellos, FASTA, BLAST o ENTREZ. FASTA y BLAST están disponibles como una parte del paquete de análisis de secuencias GCG (Universidad de Wisconsin, Madison, Wis.) y se puede utilizar con, p. ej., con los ajustes por defecto. ENTREZ está disponible a través del NCBI (Centro Estadounidense para la Información Biotecnológica) de la NLM (Biblioteca Estadounidense de Medicina) de NIH (Institutos Estadounidenses de Salud), en Bethesda, MD. En una realización, el porcentaje de identidad de dos secuencias se puede determinar mediante el programa GCG con una ponderación del hueco de 1, p. ej., cada hueco de aminoácido se pondera como si hubiera una discordancia de un único aminoácido o nucleótido entre las dos secuencias.

Otras técnicas de alineamiento se describen en *Methods in Enzymology*, vol. 266: «Computer methods for macromolecular sequence analysis» (1996), ed. Doolittle, Academic Press, Inc., una división de Harcourt Brace & Co., San Diego, California, EE.UU. Preferentemente, para alinear las secuencias se utiliza un programa de alineamiento que permite huecos en la secuencia. El algoritmo de Smith-Waterman es uno que permite huecos en los alineamientos de secuencia. Véase *Meth. Mol. Biol.* 70: 173-187 (1997). De igual forma se puede utilizar el programa GAP que utiliza el método de alineamiento de Needleman y Wunsch para alinear las secuencias. Una estrategia de búsqueda alternativa utiliza el programa informático MPSRCH, que se ejecuta en un ordenador MASPAR. MPSRCH utiliza un algoritmo de Smith-Waterman para puntuar las secuencias en un ordenador de arquitectura paralela. Este método mejora la capacidad para extraer concordancias muy distantes y es especialmente tolerante a los huecos pequeños y a los errores de secuencia nucleotídica. Las secuencias de aminoácidos codificadas por ácidos nucleicos se pueden utilizar para buscar en bases de datos de ADN y de proteínas.

La terminología «vehículo farmacéuticamente aceptable» está reconocida en la técnica y se refiere a un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como una sustancia de relleno, diluyente, excipiente, solvente o material encapsulador líquidos o sólidos, implicados en el acarreamiento o transporte de cualquier composición objeto o componente de la misma. Cada vehículo debe ser «aceptable» en el sentido de que es compatible con la composición objeto y sus componentes y no son perjudiciales para el paciente. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) azúcares, tal como lactosa, glucosa y sacarosa; (2) almidones, tal como almidón de maíz y almidón de patata; (3) celulosa, y sus derivados, tal como carboximetilcelulosa de sodio, etilcelulosa y acetato de celulosa; (4) goma tragacanto en polvo; (5) malta; (6) gelatina; (7) talco; (8) excipientes, tales como manteca de cacao y ceras para supositorios; (9) aceites, tales como aceite de cacahuete, aceite de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; (10) glicoles, tales como propilenglicol; (11) polioles, tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; (12) ésteres, tales como oleato de etilo y laurato de etilo; (13) agar; (14) tamponantes, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; (15) ácido algínico; (16) agua sin pirógenos; (17) solución salina isotónica; (18) solución de Ringer; (19) alcohol etílico; (20) soluciones tamponantes de fosfato; y (21) otras sustancias compatibles no tóxicas que se emplean en las formulaciones farmacéuticas.

La terminología «sustancialmente homóloga», cuando se utiliza con relación a secuencias de aminoácidos, se refiere a secuencias que tienen secuencias sustancialmente idénticas o similares entre sí, lo que da lugar a una homología de conformación y, por consiguiente, a retención, a un grado útil, de una o más actividades biológicas (incluidas las inmunitarias). La terminología no pretende implicar una evolución común de las secuencias.

La terminología «sintético» está reconocida en la técnica y se refiere a la producción mediante la síntesis enzimática o química *in vitro*.

La terminología «agente terapéutico» está reconocida en la técnica y se refiere a cualquier grupo químico que es una sustancia biológica, física o farmacológicamente activa que actúa local o sistémicamente en un sujeto. La terminología también significa cualquier sustancia diseñada para uso en el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento o prevención de una enfermedad o en la mejora deseable del desarrollo mental o físico y/o enfermedades en un animal o en un humano.

La terminología «efecto terapéutico» está reconocida por la técnica y se refiere a un efecto local o sistémico en los animales, en particular los mamíferos, y más en particular los humanos, ocasionada por una sustancia

farmacológicamente activa. La frase «cantidad terapéuticamente eficaz» hace referencia a la cantidad de tal sustancia que produce algún efecto deseado sistémico o local a una proporción riesgo/beneficio razonable aplicable a cualquier tratamiento. La cantidad terapéuticamente eficaz de tal sustancia variará según el individuo y estado de la enfermedad a tratar, la masa y la edad del individuo, la gravedad del estado de la enfermedad, la manera de administrarla y similares, que el experto en la técnica puede determinar con facilidad.

## 2. Ensayos de la actividad desacetilasa por espectrometría de masas

Se dan a conocer en la presente memoria métodos para determinar la actividad de desacetilación de una sirtuina. Los métodos pueden implicar, por ejemplo, poner en contacto un conjunto de sustratos peptídicos con una sirtuina y determinar el nivel de acetilación del conjunto de sustratos mediante la espectrometría de masas.

De acuerdo con la invención, la desacetilasa que se utiliza de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria es una proteína sirtuina. Una proteína sirtuina se refiere a un miembro de la familia sirtuina de proteínas desacetilasas o, preferentemente, a la familia sir2, que incluye las proteínas Sir2 de levadura (n.º de acceso de GenBank P53685), Sir-2.1 de *C. elegans* (n.º de acceso de GenBank NP\_501912) y SIRT1 de humanos (n.º de acceso de GenBank NM-012238 y NP\_036370 (o AF083106)) y SIRT2 (n.º de acceso de GenBank NM\_012237, NM\_030593, NP\_036369, NP\_085096 y AF083107). Otros miembros de la familia incluyen los cuatro genes adicionales de tipo Sir2 de la levadura denominados «genes *HST*» (homólogos de *Sir2*) HST1, HST2, HST3 y HST4, y los otros cinco homólogos humanos hSIRT3, hSIRT4, hSIRT5, hSIRT6 y hSIRT7 (Brachmann et al., (1995) *Genes Dev.* 9: 2888 y Frye et al., (1999) *BBRC* 260: 273). También se pueden utilizar homólogos, p. ej., ortólogos y parálogos, dominios, fragmentos, variantes y derivados de los anteriores de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria. Las HDAC de clase III forman una clase estructuralmente diferente de enzimas dependientes de NAD que están relacionadas con las proteínas SIR2 de la levadura y que no están inhibidas por los inhibidores de HDAC basados en el ácido hidroxámico.

De acuerdo con la invención, los métodos descritos en la presente memoria se pueden utilizar para determinar la actividad de una proteína SIRT1. Una proteína SIRT1 se refiere a un miembro de la familia sir2 de las desacetilasas sirtuina. En una realización, una proteína SIRT1 incluye las proteínas Sir2 de la levadura (n.º de acceso de GenBank P53685), Sir-2.1 de *C. elegans* (n.º de acceso de GenBank NP\_501912), SIRT1 de humanos (n.º de acceso de GenBank NM\_012238 o NP\_036370 (o AF083106)), y SIRT2 de humanos (n.º de acceso de GenBank NM\_012237, NM\_030593, NP\_036369, NP\_085096 o AF083107), y equivalentes y fragmentos de las mismas. En otra realización, una proteína SIRT1 incluye un polipéptido que comprende una secuencia que consiste en, o que consiste esencialmente en, la secuencia de aminoácidos establecida en los n.º de acceso de GenBank NP\_036370, NP\_501912, NP\_085096, NP\_036369 o P53685. Las proteínas SIRT1 incluyen polipéptidos que comprenden toda o parte de la secuencia de aminoácidos establecida en los n.º de acceso de GenBank NP\_036370, NP\_501912, NP\_085096, NP\_036369 o P53685; la secuencia de aminoácidos establecida en los n.º de acceso de GenBank NP\_036370, NP\_501912, NP\_085096, NP\_036369 o P53685 con 1 a aproximadamente 2, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 30, 50, 75 o más sustituciones conservativas de aminoácidos; una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos al 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% a los n.º de acceso de GenBank NP\_036370, NP\_501912, NP\_085096, NP\_036369 o P53685, y fragmentos funcionales de las mismas. Las proteínas SIRT1 también incluyen homólogos (p. ej., ortólogos y parálogos), variantes o fragmentos, de los n.º de acceso de GenBank NP\_036370, NP\_501912, NP\_085096, NP\_036369 o P53685.

En una realización, los métodos descritos en la presente memoria se pueden utilizar para determinar la actividad de una proteína SIRT3. Una proteína SIRT3 se refiere a un miembro de la familia sirtuina de proteínas desacetilasas y/o a un homólogo de una proteína SIRT1. En una realización, una proteína SIRT3 incluye las proteínas SIRT3 de humanos (n.º de acceso de GenBank AAH01042, NP\_036371 o NP\_001017524) y SIRT3 de ratón (n.º de acceso de GenBank NP\_071878), y equivalentes y fragmentos de las mismas. En otra realización, una proteína SIRT3 incluye un polipéptido que comprende una secuencia que consiste en, o que consiste esencialmente en, la secuencia de aminoácidos establecida en los n.º de acceso de GenBank AAH01042, NP\_036371, NP\_001017524 o NP\_071878. Las proteínas SIRT3 incluyen polipéptidos que comprenden todo o una parte de la secuencia de aminoácidos establecida en los n.º de acceso de GenBank AAH01042, NP\_036371, NP\_001017524 o NP\_071878; la secuencia de aminoácidos establecida en los n.º de acceso de GenBank n.º AAH01042, NP\_036371, NP\_001017524 o NP\_071878 con 1 a aproximadamente 2, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 30, 50, 75 o más sustituciones conservativas de aminoácido; una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos al 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% a los n.º de acceso de GenBank AAH01042, NP\_036371, NP\_001017524 o NP\_071878, y fragmentos funcionales de los mismos. Las proteínas SIRT3 también incluyen homólogos (p. ej., ortólogos y parálogos), variantes o fragmentos de los n.º de acceso de GenBank AAH01042, NP\_036371, NP\_001017524 o NP\_071878.

En otra realización se puede utilizar una porción biológicamente activa de una sirtuina de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria. Una porción biológicamente activa de una sirtuina se refiere a una porción de una proteína sirtuina que tiene una actividad biológica, tal como la capacidad de desacetilar. Las porciones biológicamente activas de las sirtuinas pueden comprender el dominio central de una sirtuina. Las porciones biológicamente activas de SIRT1 que tiene el n.º de acceso de GenBank NP\_036370 que abarca el dominio de unión del NAD<sup>+</sup> y el dominio de unión del sustrato, por ejemplo, pueden incluir sin limitación los aminoácidos 62-293 del n.º de acceso de GenBank NP\_036370, que están codificados por los nucleótidos 237 a 932 del n.º de acceso de

GenBank NM\_012238. Por lo tanto, esta región a veces se denomina el dominio central. Otras porciones biológicamente activas de SIRT1, también denominadas a veces dominios centrales, incluyen aproximadamente los aminoácidos 261 a 447 del n.º de acceso de GenBank NP\_036370, que están codificados por los nucleótidos 834 a 1394 del n.º de acceso de GenBank NM\_012238; aproximadamente los aminoácidos 242 a 493 del n.º de acceso de GenBank NP\_036370, que están codificados por los nucleótidos 777 a 1532 del n.º de acceso de GenBank NM\_012238; o aproximadamente los aminoácidos 254 a 495 del n.º de acceso de GenBank NP\_036370, que están codificados por los nucleótidos 813 a 1538 del n.º de acceso de GenBank NM\_012238. En otra realización, una porción biológicamente activa de una sirtuina puede ser un fragmento de una proteína SIRT3 que se produce mediante la escisión con una peptidasa de procesamiento de la matriz mitocondrial (MPP) y/o una peptidasa intermediaria mitocondrial (MIP).

Las enzimas desacetilasa que se pueden utilizar de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria pueden ser proteínas endógenas, proteínas recombinantes, proteínas purificadas o proteínas presentes en una mezcla, tal como un lisado de tejido o de células. En determinadas realizaciones, las enzimas adecuadas para uso de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria se pueden comprar en el mercado o se pueden purificar mediante los procedimientos estándares. Por ejemplo, la SIRT1 humana (n.º de catálogo SE-239), la SIRT2 humana (n.º de catálogo SE-251) y la SIRT3 humana (n.º de catálogo SE-270) se pueden comprar a Biomol International (Plymouth Meeting, PA). Los métodos para la expresión y purificación de SIRT1 humana y de SIRT3 humana se describen, por ejemplo, en la publicación PCT de patente internacional n.º WO2006/094239. En otras realizaciones, las enzimas adecuadas para uso de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria se pueden dar a conocer como parte de una mezcla, tal como, por ejemplo, un lisado de tejido o de células o un lisado fraccionado. Los lisados adecuados incluyen lisados brutos que incluyen todos los componentes de la célula o del tejido, o lisados de los cuales se han retirado uno o más componentes tales como, por ejemplo, ácidos nucleicos, materiales insolubles, materiales membranarios, etc. El lisado se puede obtener de muy diferentes fuentes tal como una muestra de células sanguíneas, una muestra de tejido, un cultivo celular, etc.

Se puede utilizar un amplio abanico de sustratos peptídicos de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria. Al determinar la actividad de una desacetilasa, el sustrato peptídico utilizado en la reacción comprende al menos un resto de lisina acetilado.

En determinadas realizaciones, la secuencia del sustrato peptídico se puede obtener, o derivar, de una proteína que se puede desacetilar mediante una desacetilasa. Los sustratos de ejemplo para las acetiltransferasas y las desacetilasas incluyen, por ejemplo, histonas (p. ej., H1, H2, H2A, H2B, H3 y H4), proteínas no histónicas de la cromatina (p. ej., HMG1, HMG2, Sin1 de levadura, HMG14, HMG17 y HMG I(Y)), activadores transcripcionales (p. ej., p53, c-Myb, GATA-1, EKLF, MyoD, E2F, dTCF y Tat del HIV), coactivadores del receptor nuclear (p. ej., ACTR, SRC-1, TIF2), factores de transcripción generales (p. ej., TFIIIE y TFIIIF), importina- $\alpha$ 7, Rch1 y  $\alpha$ -tubulina. Los sustratos peptídicos utilizados de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria pueden comprender una proteína completa de sustrato o una porción de la misma que contiene al menos un resto de lisina. En determinadas realizaciones puede ser deseable modificar la secuencia de una proteína de sustrato, o de un fragmento de la misma, para añadir, retirar y/o cambiar la localización de uno o más restos de lisina. Por ejemplo, puede ser deseable tener un sustrato peptídico que contiene uno o más restos de lisina localizados sólo en las posiciones deseadas dentro del sustrato peptídico, p. ej., hacia el centro del sustrato, hacia un extremo del sustrato (p. ej., extremo amino o extremo carboxilo), que tiene varios restos de lisina juntos, que tiene restos de lisina repartidos por todo el péptido, etc. En determinadas realizaciones, puede ser deseable tener un sustrato peptídico que contiene sólo un único resto de lisina. Se pueden retirar uno o más restos de lisina de una secuencia de sustratos peptídicos al reemplazar el resto aminoácido con un resto de aminoácido diferente o al eliminar el resto aminoácido de la secuencia sin sustituirlo por un aminoácido diferente. En determinadas realizaciones se puede reemplazar uno o más restos de lisina mediante una sustitución de aminoácidos conservativa.

En las realizaciones de ejemplo, la invención da a conocer un método para identificar compuestos que activan una proteína sirtuina, tal como, por ejemplo, una proteína SIRT1. En tales realizaciones, los métodos utilizan un sustrato peptídico que es un sustrato peptídico capaz de activar la sirtuina. Un sustrato peptídico capaz de activar la sirtuina es un sustrato peptídico que es adecuado para uso en un ensayo basado en la espectrometría de masas para identificar activadores de la actividad de las sirtuinas. Se puede identificar un péptido de sustrato capaz de activar sirtuina mediante una serie de ensayos de sirtuina que incluyen, por ejemplo, el ensayo de espectrometría de masas descrito en la presente memoria y los otros ensayos de actividad de la sirtuina descritos en la presente memoria más adelante. Los sustratos peptídicos capaces de activar la sirtuina de ejemplo se dan a conocer en la presente memoria en las tablas 1 y 2 que vienen a continuación. En algunas realizaciones, la secuencia de un sustrato peptídico capaz de activar la sirtuina procede de un sustrato de sirtuina conocido tal como, por ejemplo, una proteína HMG, p53, c-Myb, GATA-1, EKLF, MyoD, E2F, dTCF o Tat del HIV, o un fragmento de las mismas. En algunas realizaciones, un sustrato peptídico capaz de activar la sirtuina puede tener una longitud de unos 5-100, unos 10-100, unos 10-75, unos 10-50, unos 20-100, unos 20-75, unos 20-50, unos 20-30 o unos 20-25 aminoácidos. En determinadas realizaciones, un sustrato peptídico capaz de activar la sirtuina comprende al menos una región hidrófoba. En determinadas realizaciones, una región hidrófoba puede estar localizada en o cerca de uno o ambos extremos del sustrato peptídico capaz de activar la sirtuina, p. ej. los extremos amino y/o carboxilo. Una región hidrófoba puede ser de las que se producen de forma natural en la secuencia del sustrato peptídico capaz de activar la sirtuina, p. ej., se puede utilizar como el sustrato peptídico al menos una porción de un sustrato proteico de

5 sirtuina que comprende una región hidrófoba. Alternativamente o además, a un sustrato peptídico de sirtuina se le puede añadir una región hidrófoba. Por ejemplo, se puede añadir una región hidrófoba a un sustrato peptídico al modificar la secuencia del péptido para incrementar el número de restos de aminoácidos hidrófobos en una región deseada, p. ej., al añadir 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más restos de aminoácidos hidrófobos a un péptido bien añadiendo nuevos restos de aminoácidos o bien mediante el reemplazo de los restos de aminoácidos no hidrófobos (o menos hidrófobos) existentes con restos de aminoácidos hidrófobos (o más hidrófobos). En algunas realizaciones, una región hidrófoba puede ser una región de unos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más restos de aminoácidos hidrófobos en un tramo contiguo o sustancialmente contiguo dentro del péptido. Los restos de aminoácidos hidrófobos incluyen alanina, fenilalanina, glicina, isoleucina, leucina, metionina, prolina, valina y triptófano. En las realizaciones de ejemplo, las regiones hidrófobas comprenden uno o más restos de aminoácidos de triptófano, alanina y/o fenilalanina. Alternativamente se puede añadir una región hidrófoba a un sustrato peptídico al modificar químicamente el péptido para incrementar su hidrofobia. Por ejemplo, se puede introducir una región hidrófoba en un péptido uniendo covalentemente un resto químico hidrófobo al péptido. Ejemplos de restos químicos incluyen, por ejemplo, fluoróforos, tal como AF 350, AF 430, AF 488, AF 532, AF 546, AF 568, AF 594, AF 633, AF 647, AF 660, AF 680, dintrofenilo, AMCA, Cascade Blue®, Marina Blue®, fluoresceína/FITC, Oregon Green® 488, Rhodamine Green™, BODIPY FL, BODIPY TMR, BODIPY TR, Oregon Green® 514, Rhodamine Red™, tetrametilrodamina, rojo Texas, BODIPY 630/650, BODIPY 650/665, QSY 7, FluorX, Cy2 bis, Cys mono, Cy3.5 mono, Cy5 mono, Cy5.5 mono, Cy7 mono, DEAC, R6G, TAMRA y MR 121. Se conocen en la técnica los métodos para modificar covalentemente un péptido con un resto químico tal como un fluoróforo y, por lo tanto, se pueden realizar de acuerdo con los métodos convencionales. En las realizaciones de ejemplo, el resto químico hidrófobo se puede unir covalentemente o conjugar al péptido para que no interfiera con la acetilación ni la desacetilación del resto o restos de lisina.

Los sustratos peptídicos que se pueden utilizar de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria se pueden sintetizar de acuerdo con los métodos convencionales. Los sustratos peptídicos pueden incluir péptidos que se producen de forma natural, péptidos preparados mediante técnicas de recombinación genética y péptidos sintéticos. Los péptidos se pueden fusionar con otros péptidos (por ejemplo, glutatión-S-transferasa, etiqueta HA, etiqueta FLAG, etc.) para hacer más cómoda la purificación, etc. Además, el péptido puede comprender unidades estructurales diferentes a los aminoácidos mientras que sirva de sustrato para una desacetilasa o acetiltransferasa. Típicamente, la síntesis de un péptido se consigue al añadir aminoácidos, resto a resto, desde el extremo carboxilo de la secuencia de aminoácidos de interés. Además, algunos de los fragmentos peptídicos sintetizados de ese modo se pueden unir para formar una molécula peptídica más larga. Para medir la actividad desacetilasa, el sustrato peptídico necesita acetilarse antes de realizar la reacción. Un método de ejemplo de acetilación de aminoácidos incluye la acetilación de los aminoácidos cuyos grupos α-amino y cuyos grupos amino de las cadenas laterales se bloquean con grupos protectores, con anhídrido acético, acetato de N-hidroxisuccinimida o reactivos similares. Estos aminoácidos acetilados luego se utilizan para sintetizar los péptidos que comprenden restos de lisina acetilados, por ejemplo, utilizando el método de fase sólida. Por lo general, los péptidos acetilados se pueden sintetizar con un sintetizador peptídico de acuerdo con el método del Fmoc. Por ejemplo, los proveedores comerciales, que proporcionan servicios de síntesis de péptidos personalizados pueden sintetizar péptidos que tienen las secuencias de aminoácidos especificadas que comprenden restos acetilados en posiciones predeterminadas.

40 Los sustratos peptídicos de ejemplo para las desacetilasas Sirt1, Sirt2 y Sirt3 que se pueden utilizar de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria se muestran a continuación en las tablas 1 y 2.

Tabla 1. Sustratos peptídicos de Sirt1, Sirt2 y Sirt3 que tienen restos químicos unidos covalentemente.

Enzima/base para la secuencia de los péptidos	Secuencia	SEQ ID n.º
Sirt1/p53	Ac-EEKGQSTSSHS-K(Ac)-Nle-STEK-K (MR121)-EE-NH <sub>2</sub>	SEQ ID n.º 1
Sirt1/p53	Ac-EEKGQSTSSHS-K(Ac)-Nle-STEK-K(5-TMR)-EE-NH <sub>2</sub>	SEQ ID n.º 2
Sirt1/PGC 1α	TNPAIV-K(Ac)-TENS-K(MR121)-NH <sub>2</sub>	SEQ ID n.º 3
Sirt1/PGC 1α	TNPAIV-K(Ac)-TENS-K(5-TMR)-NH <sub>2</sub>	SEQ ID n.º 4
Sirt1/PGC 1α	QHLQA-K(Ac)-PTTLS-K(MR121)-NH <sub>2</sub>	SEQ ID n.º 5
Sirt1/PGC 1α	QHLQA-K(Ac)-PTTLS-K(5-TMR)-NH <sub>2</sub>	SEQ ID n.º 6
Sirt2/α-tubulina	MPSD-K(Ac)-TIGG-K(MR121)-NH <sub>2</sub>	SEQ ID n.º 7

Enzima/base para la secuencia de los péptidos	Secuencia	SEQ ID n.º
Sirt2/α-tubulina	MPSD-K(Ac)-TIGG-K(5-TMR)-NH <sub>2</sub>	SEQ ID n.º 8
Sirt2/α-tubulina	Nle-PSD-K(Ac)-TIGG-K(MR121)-NH <sub>2</sub>	SEQ ID n.º 9
Sirt2/α-tubulina	Nle-PSD-K(Ac)-TIGG-K(5-TMR)-NH <sub>2</sub>	SEQ ID n.º 10
Sirt2/α-tubulina	GQ-Nle-PSD-K(Ac)-TIGG-K(MR121)-NH <sub>2</sub>	SEQ ID n.º 11
Sirt2/α-tubulina	GQ-Nle-PSD-K(Ac)-TIGG-K(5-TMR)-NH <sub>2</sub>	SEQ ID n.º 12
Sirt3/acetil-CoA sintasa 2	SG-K(Ac)-1M-K(MR121)-NH <sub>2</sub>	SEQ ID n.º 13
Sirt3/acetil-CoA sintasa 2	SG-K(Ac)-IM-K(5-TMR)-NH <sub>2</sub>	SEQ ID n.º 14
Sirt3/acetil-CoA sintasa 2	TSSG-K(Ac)-I-Nle-S-K(MR121)-NH <sub>2</sub>	SEQ ID n.º 15
Sirt3/acetil-CoA sintasa 2	TSSG-K(Ac)-1-Nle-S-K(5-TMR)-NH <sub>2</sub>	SEQ ID n.º 16
Sirt3/acetil-CoA sintasa 2	PSTSSG-K(Ac)-I-Nle-SS-K(MR121)-NH <sub>2</sub>	SEQ ID n.º 17
Sirt3/acetil-CoA sintasa 2	PSTSSG-K(Ac)-I-Nle-SS-K(5-TMR)-NH <sub>2</sub>	SEQ ID n.º 18
Sirt3/histona H4	SGSG-K(Ac)-GGG-K(MR121)-NH <sub>2</sub>	SEQ ID n.º 19
Sirt3/histona H4	SGSG-K(Ac)-GGG-K(5-TMR)-NH <sub>2</sub>	SEQ ID n.º 20
Sirt3/histona H4	GSGGA-K(Ac)-SHS-K(MR121)-NH <sub>2</sub>	SEQ ID n.º 21
Sirt3/histona H4	GSGGA-K(Ac)-SHS-K(5-TMR)-NH <sub>2</sub>	SEQ ID n.º 22
Sirt3/histona H4	GASSHS-K(Ac)-VL-K(MR121)-NH <sub>2</sub>	SEQ ID n.º 23
Sirt3/histona H4	GASSHS-K(Ac)-V L-K(5-TMR)-NH <sub>2</sub>	SEQ ID n.º 24

Tabla 2. Sustratos peptídicos de sirtuina que tienen regiones de aminoácidos hidrófobos.

Enzima/base para la secuencia de los péptidos	Secuencia	SEQ ID n.º
p53	Ac-EEKGQSTSSHS-K(Ac)-Nle-STEGKWEE-NH <sub>2</sub>	SEQ ID n.º 25
p53	Ac-EEKGQSTSSHS-K(Ac)-Nle-STEGKWAWEE-NH <sub>2</sub>	SEQ ID n.º 26
p53	Ac-EEKGQSTSSHS-K(Ac)-Nle-STEGKWWFEE-NH <sub>2</sub>	SEQ ID n.º 27
p53	Ac-EEKGQSTSSHS-K(Ac)-Nle-STEGKWWWEE-NH <sub>2</sub>	SEQ ID n.º 28
p53	Ac-EEKGQSTSSHS-K(Ac)-Nle-STEGWEE-NH <sub>2</sub>	SEQ ID n.º 29
p53	Ac-EEKGQSTSSHS-K(Ac)-Nle-STEGWAWEE-NH <sub>2</sub>	SEQ ID n.º 30

Enzima/base para la secuencia de los péptidos	Secuencia	SEQ ID n.º
p53	Ac-EEKGQSTSSHS-K(Ac)-Nle-STEGWWFEE-NH <sub>2</sub>	SEQ ID n.º 31
p53	Ac-EEKGQSTSSHS-K(Ac)-Nle-STEGWWWEE-NH <sub>2</sub>	SEQ ID n.º 32
p53	Ac-EEKGQSTSSHS-K(Ac)-Nle-STEGKWWWWWEE-NH <sub>2</sub>	SEQ ID n.º 33

De acuerdo con la invención, la invención da a conocer un sustrato peptídico para uso en la determinación de la actividad de una sirtuina con el uso de la espectrometría de masas, en la que el sustrato comprende una o más de las SEQ ID n.º 1-35.

5 En determinadas realizaciones, los métodos descritos en la presente memoria se llevan a cabo en condiciones que permiten la desacetilación del sustrato peptídico mediante una desacetilasa.

10 En determinadas realizaciones, el conjunto de sustratos peptídicos comprende numerosas copias de uno o más sustratos peptídicos. En una realización de ejemplo, un conjunto de sustratos peptídicos comprende numerosas copias del mismo sustrato peptídico. Tales conjuntos de sustratos peptídicos pueden comprender el sustrato peptídico que flota libre en la solución o que está unido a una superficie sólida, tal como una placa, perla, filtro, etc. También se pueden utilizar combinaciones de moléculas de sustratos peptídicos ancladas y que flotan libremente de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria.

15 En determinadas realizaciones, los métodos descritos en la presente memoria se pueden llevar a cabo en un único recipiente de reacción sin que haga falta retirar reactivos de la mezcla de reacción (p. ej., un ensayo homogéneo). En varias realizaciones, los componentes de las reacciones descritas en la presente memoria se pueden añadir secuencial o simultáneamente.

20 De acuerdo con la invención, la invención da a conocer un método para identificar un compuesto que activa una sirtuina. Los métodos pueden implicar la comparación de la actividad de una sirtuina en presencia de un compuesto problema con la actividad de la sirtuina en una reacción de control. La reacción de control puede ser simplemente una reacción por duplicado en la que no está incluido el compuesto problema. Alternativamente, la reacción de control puede ser una reacción por duplicado en presencia de un compuesto que tiene un efecto conocido sobre la actividad desacetilasa de la sirtuina (p. ej., un activador, un inhibidor o un compuesto que no tiene ningún efecto sobre la actividad enzimática).

25 Debido a la flexibilidad disponible al diseñar los sustratos peptídicos para los métodos basados en la espectrometría de masas descritos en la presente memoria, es posible optimizar los sustratos peptídicos para proporcionar una K<sub>m</sub> aparente baja, lo que, por lo tanto, permite utilizar una concentración más baja de sustrato cuando se emplean los métodos. La tabla 3 que se muestra a continuación da a conocer los valores de K<sub>m</sub> para un sustrato peptídico de sirtuina suministrado de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria en comparación con los valores de K<sub>m</sub> de varios ensayos de sirtuina publicados o disponibles en el mercado. Por consiguiente, en algunas realizaciones, los sustratos peptídicos para uso de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria se pueden optimizar para proporcionar una K<sub>m</sub> aparente baja.

Tabla 3. Comparaciones de las K<sub>m</sub> para diferentes ensayos de sirtuina.

Referencia	Ensayo	Enzima	Sustrato peptídico (*FL con la marcación fluorescente)	K <sub>m</sub> del péptido (µM)	K <sub>m</sub> del NAD (µM)
Biomol (Fluor de Lys) <sup>1</sup>	Fluorescente	Sirt1	p53 (aa 379-382) *FL	64	558
	Fluorescente	Sirt2	p53 (aa 317-320) *FL	186	547
	Fluorescente	Sirt3	p53 (aa 317-320) *FL	32	2034
<sup>2</sup> Kaeberlein et al.	Liberación de nicotinamida	Sirt1	p53 (aa 368-386) sin FL	10,3	132,5
	Liberación de nicotinamida	Sirt1	p53 (aa 368-386) *FL	87,6	192

Referencia	Ensayo	Enzima	Sustrato peptídico (*FL con la marcación fluorescente)	K <sub>m</sub> del péptido (μM)	K <sub>m</sub> del NAD (μM)
<sup>3</sup> Marcotte et al.	FRET	Sirt1	p53 20-mero (aa 372-387) *FL	ND	90
	FRET	Sirt2	p53 20-mero (aa 372-387) *FL	ND	42
<sup>4</sup> McDonagh et al	Liberación de nicotinamida	Sirt1	p53 19-mero (aa 368-386) sin FL	10,3	133
Presente invención	Espectrometría de masas	Sirt1	SEQ ID n.º 34	11,6	464

<sup>1</sup>Biomol (Fluor de Lys) como se describió en la bibliografía del producto para el kit fluorimétrico de descubrimiento de fármacos de SIRT1 (AK-555), kit fluorimétrico de descubrimiento de fármacos de SIRT2 (AK-556), kit fluorimétrico de descubrimiento de fármacos de SIRT3 (AK-557) (Biomol International, Plymouth Meeting, PA); <sup>2</sup>Kaerberlein et al., *JBC*, 280 (17), 17038, 2005; <sup>3</sup>Marcotte et al., *Anal. Biochem.*, 332, 90, 2004; <sup>4</sup>McDonagh et al., *Methods*, 36, 346, 2005.

Los métodos descritos en la presente memoria utilizan espectrometría de masas para determinar la cantidad de sustrato acetilado y/o desacetilado en una reacción. La espectrometría de masas (o simplemente MS) abarca cualquier técnica o proceso espectrométricos en el cual las moléculas se ionizan y se separan y/o se analizan basándose en sus respectivas masas moleculares. Así pues, la espectrometría de masas y la MS abarcan cualquier tipo de método de ionización, que incluyen, sin limitación, la ionización por electronebulización (ESI), ionización química a presión atmosférica (APCI por su nombre en inglés) y otras formas de ionización a presión atmosférica (API, por su nombre en inglés), e irradiación láser. Los espectrómetros de masas se pueden combinar con métodos de separación tales como la cromatografía de gases (GC, por su nombre en inglés) y la cromatografía líquida (LC, por su nombre en inglés). La GC o la LC separan los componentes en una mezcla y a continuación los componentes se introducen por separado en el espectrómetro de masas; tales técnicas se denominan por lo general GC/MS y LC/MS, respectivamente. La MS/MS es una técnica análoga en la que el dispositivo de separación de la primera etapa es otro espectrómetro de masas. En la LC/MS/MS, los métodos de separación comprenden cromatografía líquida y MS. Para poner en práctica los métodos descritos en la presente memoria se puede utilizar cualquier combinación (p. ej., GC/MS/MS, GC/LC/MS, GC/LC/MS/MS, etc) de métodos. En tales combinaciones, la MS se puede referir a cualquier forma de espectrometría de masas; a modo de ejemplo no limitante, la LC/MS abarca la LC/MS ESI y la LC/MS MALDI-TOF. Por consiguiente, la espectrometría de masas y la MS incluyen sin limitación la MS APCI; MS ESI; MS GC; MS MALDI-TOF; combinaciones de LC/MS; combinaciones de LC/MS/MS; combinaciones de MS/MS; etc. Otros ejemplos de MS incluyen, por ejemplo, MS MALDI-TOF-TOF, MS MALDI tiempo de vuelo cuadrupolo (Q-TOF, por su nombre en inglés), ionización por electronebulización (ESI)-MS TOF, ESI-Q-TOF, ESI-TOF-TOF, ESI-MS de trampa de iones, MS de triple cuadrupolo ESI, MS con transformada de Fourier (FTMS, por su nombre en inglés) ESI, MALDI-FTMS, MALDI-trampa de iones-TOF, ESI-trampa de iones-TOF, desorción e ionización por láser de superficie mejorado (SELDI), MS/MS/MS, ESI-MS/MS, espectrómetro de masas de tiempo de vuelo cuadrupolo MS QqTOF, MALDI-MS QqTOF, ESI-MS QqTOF y electroforesis capilar de chip (chip-CE)-MS QqTOF, etc.

A menudo, es necesario preparar muestras que comprenden un analito de interés para la MS. Tales preparaciones incluyen, sin limitación, la purificación y/o el intercambio de tampones. Se puede utilizar cualquier método adecuado, o combinación de métodos, para preparar la muestras para la MS. Un tipo de método de MS preparativa es la cromatografía líquida (LC) que incluye, sin limitación, la HPLC y la RP-HPLC.

La cromatografía líquida de alta presión (HPLC, por su nombre en inglés) es una herramienta analítica separativa y cuantitativa que suele ser robusta, fiable y flexible. La fase inversa (RP, por su nombre en inglés) es una fase estacionaria utilizada con frecuencia que se caracteriza por tener cadenas alquílicas de longitud específica inmovilizadas en un soporte de perlas de sílice. La RP-HPLC es adecuada para separar y analizar distintos tipos de compuestos que incluyen, sin limitación, biomoléculas (p. ej., glucoconjugados, proteínas, péptidos y ácidos nucleicos y, con suplementos de fase móvil, oligonucleótidos). Una de las razones más importantes por la que la RP-HPLC ha sido la técnica de elección entre todas las técnicas de HPLC es su compatibilidad con la ionización por electronebulización (ESI). Durante la ESI se pueden introducir muestras líquidas en un espectrómetro de masas mediante un proceso que crea varios iones cargados (Wilm et al., *Anal. Chem.* 68:1, 1996). Sin embargo, muchos iones pueden dar lugar a espectros complejos y a una reducción de la sensibilidad.

En la HPLC, los péptidos y las proteínas se inyectan en una columna, típicamente C18 a base de sílice. Se utiliza un tampón acuoso para eluir las sales, mientras que los péptidos y las proteínas se eluyen con una mezcla de solvente acuoso (agua) y solvente orgánico (acetonitrilo, metanol, propanol). La fase acuosa es generalmente agua de calidad para HPLC con ácido al 0,1% y la fase de solvente orgánico es generalmente un acetonitrilo o metanol de calidad para HPLC con ácido al 0,1%. El ácido se utiliza para mejorar la forma del pico cromatográfico y para proporcionar una fuente de protones en la LC/MS de fase inversa. Los ácidos que se utilizan con más frecuencia son ácido fórmico, ácido trifluoroacético y ácido acético. En la RP-HPLC, los compuestos se separan basándose en su carácter hidrófobo. Con un sistema de LC unido al espectrómetro de masas a través de una fuente de ESI y la capacidad para realizar una exploración dependiente de los datos, en la actualidad es posible, al menos en algunos casos, distinguir las proteínas en mezclas complejas que contienen más de 50 componentes sin purificar primero cada proteína hasta la homogeneidad. Cuando la complejidad de la mezcla es extrema, se pueden acoplar en tándem la cromatografía de intercambio iónico y la RP-HPLC para identificar proteínas en las mezclas que contienen más de 1000 proteínas.

Un tipo particular de técnica de MS, la espectrometría de masas por desorción con láser asistida por matriz y tiempo de vuelo (MS MALDI-TOF) (Karas et al., *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* 78: 53, 1987), ha sido la técnica más usada para el análisis de los polímeros biológicos por sus características deseables, tales como la relativa facilidad de preparación de las muestras, la predominancia de iones con una única carga en los espectros de masas, la sensibilidad y la rapidez. La MS MALDI-TOF es una técnica en la cual una matriz que absorbe luz UV y una molécula de interés (analito) se mezclan y coprecipitan para formar cristales de analito:matriz. Los cristales se irradian con un pulso de láser de nanosegundos. La mayor parte de la energía del láser es absorbida por la matriz, lo que impide la fragmentación indeseada de la biomolécula. Sin embargo, las moléculas de la matriz transfieren su energía a las moléculas de analito, lo que les provoca que se evaporen y que se ionicen. Las moléculas ionizadas se aceleran en un campo eléctrico y entran en el tubo de vuelo. Durante su vuelo en este tubo se separan las diferentes moléculas según su relación entre masa y carga ( $m/z$ ) y alcanzan el detector en diferentes momentos. Cada molécula produce una señal distintiva. El método se puede utilizar para detectar y caracterizar biomoléculas, tales como proteínas, péptidos, oligosacáridos y oligonucleótidos, con masas moleculares entre unos 400 y unos 500 000 Da, o más. La MALDI-MS es una técnica sensible que permite la detección de cantidades pequeñas ( $10^{-15}$  a  $10^{-18}$  moles) de analito en una muestra.

La ionización por electronebulización se puede utilizar tanto para moléculas pequeñas como las muy grandes. El proceso de electronebulización produce muchos analitos cargados, lo que hace que sea en cierto modo más fácil detectar analitos más grandes tales como las proteínas. De igual forma se pueden medir fácilmente moléculas pequeñas en ausencia de la matriz. El proceso de MALDI requiere una matriz, lo que puede dificultar el análisis de las moléculas pequeñas, por ejemplo, con masas moleculares de menos de unos 700 Da.

Con algunos espectrómetros de masas, por ejemplo, MALDI-TOF, la sensibilidad disminuye a medida que se incrementa la masa molecular de una molécula. Por ejemplo, la sensibilidad de la detección de moléculas con masas moleculares en el margen de unos 10 000 Da puede estar un orden de magnitud o más por debajo de la sensibilidad de detección de moléculas con masas moleculares en el margen de unos 1000 Da. El uso y la detección de un resto codificante y/o marcaciones con una masa molecular diferente, por ejemplo menor, que la del analito puede por lo tanto mejorar la sensibilidad del ensayo. La sensibilidad también se puede incrementar utilizando un resto codificante y/o que se presta fácilmente a la ionización.

En la espectrometría de masas con electronebulización, la introducción de muestras en un espectrómetro de masas tal como un cuadrupolo, una trampa de iones, un TOF, una FTICR o un espectrómetro de masas en tándem, los compuestos con una masa molecular más elevada, por ejemplo, proteínas, se observan como iones que tienen un número variable de estados de carga. Mientras que el fenómeno de numerosas cargas incrementa la sensibilidad, los espectros son más complejos y difíciles de interpretar. El uso y la detección de un resto codificante con un espectro de masas menos complejo que el analito puede, por lo tanto, mejorar la resolución del ensayo.

Se pueden utilizar varios espectrómetros de masas de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria. Los ejemplos representativos incluyen: espectrómetros de masa de cuadrupolo triple, instrumentos del sector magnético (espectrómetro de masas en tándem magnético, JEOL, Peabody, Mass.), espectrómetros de masas con electropulverización (Bruins et al., *Anal. Chem.* 59: 2642-2647, 1987), espectrómetros de masas con electronebulización (entre ellos, en tándem, en nano-tándem y en nano-electronebulización-tándem) (Fenn et al., *Science*, 246: 64-71, 1989), espectrómetros de masas de tiempo de vuelo y desorción por láser (Karas y Hillenkamp, *Anal. Chem.* 60: 2299-2301, 1988) y un espectrómetro de masas de resonancia de iones ciclotónicos por transformada de Fourier (Extrel Corp., Pittsburgh, Mass.).

Para más información con respecto a los espectrómetros de masas, véase, p. ej., *Principles of instrumental analysis*, 3.<sup>a</sup> ed., Skoog, Saunders College Publishing, Filadelfia, 1985; *Kirk-Othmer encyclopedia of chemical technology*, 4.<sup>a</sup> ed., vol. 15 (John Wiley & Sons, Nueva York, 1995), pág. 1071-1094; Chemushevich y Thomson (patente europea EP 1006559); Verentchikov et al., (patente internacional WO/0077823); Clemmer y Reilly (patente internacional WO/0070335); Hager (patente internacional WO/0073750); patente internacional WO 99/01889; G. Siuzdak, *Mass spectrometry for biotechnology*, Academic Press, N.Y., (1996); Krutchinsky et al., patente internacional WO 99/38185; Shevchenko et al., (2000) *Anal. Chem.* 72: 2132-2141; Figeys et al., (1998) *Rapid Comm'ns. Mass Spec.*

12-1435-144; Li et al., (2000) *Anal. Chem.* 72: 599-609; Li et al., (2000) *Tibtech* 18: 151-160; Rowley et al. (2000) *Methods.* 20: 383-397; Kuster y Mann (1998) *Curr. Opin. Structural Biol.* 8: 393-400; Chait et al. (1993) *Science*, 262: 89-92; Keough et al. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 7131-6; y Bergman (2000) *EXS* 88: 133-44.

5 En una realización ejemplar, los métodos de ensayo basados en la espectrometría de masa descritos en la presente memoria se llevan a cabo como técnica de alto rendimiento, tal y como se describió en C.C. Ozbal et al., *Assay and drug development technologies*, 2: 373-381 (2004). En determinadas realizaciones, los métodos de ensayo basados en espectrometría de masas de alto rendimiento descritos en la presente memoria utilizan un sistema microfluidico integrado que utiliza un espectrómetro de masas cuadrupolo triple de ionización a presión atmosférica como el sistema de detección con ionización por electronebulización (ESI) o ionización química a presión atmosférica (APCI).

10 En determinadas realizaciones, la invención da a conocer métodos para escrutar los compuestos que activan una desacetilasa. En determinadas realizaciones, los métodos descritos en la presente memoria se pueden utilizar para identificar un compuesto problema que incrementa la actividad desacetilasa en al menos aproximadamente el 10%, 25%, 50%, 75%, 80%, 90% o 100%, o más, respecto a la ausencia del compuesto problema. En una realización de ejemplo, los métodos descritos en la presente memoria se pueden utilizar para identificar un compuesto activador de sirtuina que incrementa la actividad desacetilasa en al menos aproximadamente el 10%, 25%, 50%, 75%, 80%, 90% o 100%, o más, respecto a la actividad activadora de la sirtuina del resveratrol.

20 De acuerdo con la invención, la concentración del sustrato peptídico en la reacción está por debajo de la  $K_m$  de la enzima para el sustrato peptídico. En determinadas realizaciones, la concentración del sustrato peptídico en la reacción puede estar al menos 2 veces, 5 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 25 veces, 30 veces o más por debajo de la  $K_m$  de la enzima para el sustrato peptídico.

25 Los compuestos problema pueden ser agentes farmacológicos ya conocidos en la técnica o pueden ser compuestos desconocidos hasta ahora que tienen alguna actividad farmacológica. Los compuestos pueden ser naturales o diseñados en el laboratorio. Se pueden aislar de microorganismos, de animales o de plantas, y se pueden producir por técnicas recombinantes, o sintetizar mediante los métodos químicos conocidos en la técnica. Si se desea, los compuestos problema se pueden obtener mediante alguno de los numerosos métodos de las colecciones combinatorias conocidas en la técnica, entre ellas, pero sin limitarse a ellas, colecciones biológicas, colecciones en fase de solución o en fase sólida paralelas dirigibles espacialmente, métodos de colecciones sintéticas que requieren la desconvolución, el método de colección «una perla-un compuesto» y los métodos de colecciones sintéticas que seleccionan por cromatografía de afinidad. El método de la colección biológica se limita a las genotecas polipeptídicas, mientras que los otros cuatro métodos se aplican a colecciones de compuestos polipeptídicos, oligoméricos no peptídicos o de moléculas pequeñas. Véase, Lam, *Anticancer Drug Des.* 12, 145, 1997.

35 Los métodos para la síntesis de colecciones moleculares se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, DeWitt et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 6909, 1993; Erb et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 11422, 1994; Zuckermann et al., *J. Med. Chem.* 37, 2678, 1994; Cho et al., *Science*, 261, 1303, 1993; Carell et al., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33, 2059, 1994; Carell et al., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33, 2061; Gallop et al., *J. Med. Chem.* 37, 1233, 1994). Las colecciones de compuestos se pueden presentar en solución (véase, p. ej., Houghten, *BioTechniques*, 13, 412-421, 1992), o en perlas (Lam, *Nature* 354, 82-84, 1991), chips (Fodor, *Nature*, 364, 555-556, 1993), bacterias o esporas (Ladner, patente de los EE.UU. n.º 5 223 409), plásmidos (Cull et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 1865-1869, 1992) o fagos (Scott y Smith, *Science* 249, 386-390, 1990; Devlin, *Science*, 249, 404-406, 1990); Cwirla et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 6378-6382, 1990; Felici, *J. Mol. Biol.* 222, 301-310, 1991; y Ladner, patente de los EE.UU. n.º 5 223 409).

45 Los compuestos problema se pueden escrutar por su capacidad para modular la actividad acetiltransferasa o desacetilasa mediante el escrutinio de alto rendimiento. Mediante el escrutinio de alto rendimiento se pueden ensayar muchos compuestos distintos en paralelo por lo que se pueden escrutar rápidamente una gran cantidad de compuestos problema. Las técnicas establecidas más ampliamente utilizan placas de microtitulación de 96 pocillos. Además de las placas, muchos instrumentos, materiales, pipeteadores, robótica, lavadores de placas y lectores de placas que están disponibles en el mercado se ajustan al formato de 96 pocillos.

50 Alternativamente se pueden utilizar ensayos de formato libre, o ensayos que no tienen ninguna barrera física entre las muestras. Los ensayos con formatos libres se describen, por ejemplo, en Jayawickreme et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 19, 1614-18 (1994); Chelsky, «Strategies for screening combinatorial libraries: novel and traditional approaches», publicado en la primera conferencia anual de la Sociedad para el Escrutinio Biomolecular en Filadelfia, Pa., (7-10 de noviembre de 1995); y Salmon et al., *Molecular Diversity* 2, 57-63 (1996). Otro método de escrutinio de alto rendimiento se describe en Beutel et al, patente de los EE.UU. n.º 5 976 813.

55 La invención además describe kits para medir la actividad de una acetiltransferasa o de una desacetilasa y el escrutinio de compuestos que inhiben o mejoran la actividad acetiltransferasa o desacetilasa como se describe más arriba. Tales kits pueden ser útiles para propósitos de investigación, descubrimiento de fármacos, propósitos diagnósticos, etc.

Un kit puede comprender un sustrato peptídico (como se describe más arriba) y uno o más de lo siguientes: una sirtuina, uno o más compuestos problema, un control positivo, un control negativo, instrucciones para uso, un recipiente de reacción, tampones, una matriz de MALDI, etc. Los kits para la determinación de la actividad desacetilasa pueden comprender un sustrato peptídico previamente acetilado. El sustrato peptídico también puede comprender una región hidrófoba. En determinadas realizaciones, cada componente, p. ej., el sustrato peptídico, la desacetilasa y/o el compuesto problema, se pueden empaquetar por separado.

Se pueden combinar los componentes respectivos del kit para alcanzar una concentración final que es adecuada para la reacción. Adicionalmente, además de estos componentes, el kit puede comprender un tampón que da una condición adecuada para la reacción. La preparación enzimática y el sustrato peptídico se pueden combinar con otros componentes que estabilizan proteínas. Por ejemplo, los componentes del kit se pueden almacenar y/o transportar en presencia de SAB a aproximadamente el 1% y polioles (p. ej., sacarosa o fructosa) a aproximadamente el 1% para prevenir la desnaturalización de las proteínas después de la liofilización.

Cada componente del kit se puede dar a conocer en forma líquida o forma seca. A los componentes se les pueden añadir los detergentes, conservantes, tampones, etc, utilizados habitualmente en la técnica siempre que no inhiban la medición de la actividad desacetilasa.

Los compuestos que activan la actividad desacetilasa, que se pueden seleccionar según el método de escrutinio de la presente invención, son útiles como compuestos candidatos para sustancias antimicrobianas, fármacos contra el cáncer y una amplia gama de usos. Por ejemplo, los compuestos que activan una proteína desacetilasa de la sirtuina pueden ser útiles para incrementar la longevidad de una célula y tratar y/o prevenir una amplia gama de enfermedades y trastornos, entre ellos, por ejemplo, enfermedades o trastornos relacionados con el envejecimiento o el estrés, diabetes, obesidad, enfermedades neurodegenerativas, neuropatía inducida por quimioterápicos, neuropatía asociada con una isquemia, enfermedades y/o trastornos oculares, cardiovasculopatías, coagulopatías de la sangre, inflamación y/o irritación cutánea. Los inhibidores de la desacetilasa de la sirtuina pueden ser útiles para una serie de aplicaciones terapéuticas que incluyen, por ejemplo, incremento de la sensibilidad celular al estrés, incremento de la apoptosis, tratamiento del cáncer, estimulación del apetito y/o estimulación del aumento de peso, etc.

En determinadas realizaciones, los ensayos de espectrometría de masas descritos en la presente memoria no utilizan un sustrato peptídico que se obtiene o procede de una proteína Tat del HIV.

En determinadas realizaciones, la invención da a conocer un método para identificar un compuesto que activa una proteína sirtuina que comprende (a) poner en contacto un conjunto de sustratos peptídicos con una sirtuina en presencia de un compuesto problema, en el que los miembros de dicho conjunto de sustratos peptídicos tienen la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID n.º 34; y (b) determinar el nivel de acetilación del conjunto de sustratos peptídicos mediante espectrometría de masas, en el que una disminución del nivel de acetilación del conjunto de sustratos peptídicos en presencia del compuesto problema en comparación con un control es indicativa de un compuesto que activa una sirtuina.

En otra realización, la invención da a conocer un método para identificar un compuesto que activa una desacetilasa, que comprende (a) poner en contacto un conjunto de sustratos peptídicos con una desacetilasa en presencia de un compuesto problema, en el que los miembros de dicho conjunto de sustratos peptídicos comprenden al menos un resto de lisina acetilada, y (b) determinar el nivel de acetilación del conjunto de sustratos peptídicos mediante espectrometría de masas, en el que una disminución del nivel de acetilación del conjunto de sustratos peptídicos en presencia del compuesto problema en comparación con un control es indicativa de un compuesto que activa una desacetilasa, siempre y cuando el método no comprenda poner en contacto un conjunto de sustratos peptídicos con una sirtuina en presencia de un compuesto problema, en donde los miembros de dicho conjunto de sustratos peptídicos tienen la secuencia de aminoácidos presentada en la SEQ ID n.º 34.

### 3. Ensayos de ATP para la actividad de la sirtuina

Además, la solicitud describe métodos con células para determinar la actividad de la sirtuina. Los ensayos comprenden poner en contacto una célula con un posible compuesto modulador de la sirtuina y entonces determinar la viabilidad celular y la concentración de ATP en la célula. Un incremento de la concentración media de ATP por célula viable es indicativa de un incremento de la actividad de la sirtuina (p. ej., un compuesto activador de la sirtuina), mientras que una disminución de la concentración media de ATP por célula viable es indicativa de una disminución de la actividad de la sirtuina (p. ej., un compuesto inhibidor de la sirtuina). En algunas realizaciones, los ensayos pueden comprender además llevar a cabo un ensayo *in vitro* para determinar si el compuesto tiene actividad moduladora de la sirtuina. Tales ensayos *in vitro* se pueden llevar a cabo antes, después o a la vez que los ensayos con células. Los ensayos con células descritos en la presente memoria se pueden utilizar como un escrutinio secundario para caracterizar adicionalmente un posible compuesto modulador de sirtuina. Por ejemplo, los ensayos con células se pueden utilizar para confirmar que el compuesto modulador de sirtuina identificado *in vitro* tiene actividad moduladora de sirtuina en un medio celular, y proporcionan información sobre la permeabilidad de la membrana celular y/o la toxicidad celular. Los compuestos que muestran un nivel más bajo de actividad moduladora de la sirtuina en un ensayo con células que en un ensayo *in vitro* podrían ser compuestos que tienen una baja

permeabilidad de la membrana celular o compuestos que son impermeables para la membrana celular. Adicionalmente, los compuestos que muestran actividad activadora de la sirtuina en un ensayo *in vitro* pero que muestran actividad inhibitoria de la sirtuina en un ensayo con células podrían ser compuestos que son citotóxicos. En consecuencia, tales ensayos con células proporcionan información útil para desarrollar agentes terapéuticos. En determinadas realizaciones, los métodos con células descritos en la presente memoria se pueden utilizar para determinar el efecto de un posible compuesto modulador de la sirtuina en la biogénesis mitocondrial.

Los métodos con células para determinar la actividad de la sirtuina descritos en la presente memoria pueden utilizar una línea celular capaz de activar la sirtuina. Una línea celular capaz de activar la sirtuina es una línea celular que es adecuada para uso en los ensayos de activación de la sirtuina con células descritos en la presente memoria. Una línea celular capaz de activar la sirtuina comprende una cantidad endógena relativamente baja de una o más proteínas sirtuina (p. ej., la cantidad de la actividad de la sirtuina en la célula no es saturante y se consigue observar cualquier incremento de la actividad) y una cantidad relativamente baja de mitocondrias y/o de la capacidad de fosforilación oxidativa (p. ej., la cantidad de mitocondrias y/o de fosforilación oxidativa en la célula no es saturante y se consigue observar cualquier incremento de la concentración de ATP). Se puede identificar una línea celular capaz de activar la sirtuina mediante los métodos descritos en el apartado de ejemplos que viene a continuación. Líneas celulares capaces de activar la sirtuina de ejemplo incluyen, por ejemplo, NCI-H358 y MCS7.

Los métodos con células para determinar la actividad de la sirtuina descritos en la presente memoria implican la determinación de la concentración de ATP en una célula o en una muestra de células. La concentración de ATP se puede determinar mediante cualquier método conocido en la técnica o cualquier método aún por descubrir. Las formulaciones de reactivos que contienen luciferasa y luciferina para ensayar el ATP en una muestra ya se conocen en la técnica. Por ejemplo, la patente de los EE.UU. n.º 6 004 767 de Crouch et al describe un reactivo bioluminiscente en forma de polvo liofilizado, a reconstituir antes de su uso. La patente de los EE.UU. n.º 5 558 986 de Lundin describe tal formulación de reactivos para uso en combinación con una ciclodextrina. La solicitud de patente de los EE.UU. n.º 2001/0046687 de DiCesare también describe el uso de tal formulación, en donde se utiliza trehalosa para potenciar la emisión de la intensidad de la luz. La solicitud de patente internacional publicada WO 94/11528 de Foote y Grant describe una composición acuosa que incluye polioles para uso en un ensayo bioluminiscente al añadir un tampón fuerte para dar un pH que está cercano al pH óptimo de la reacción de la luciferasa. Otros ensayos para determinar la concentración de ATP se describen en las patentes de los EE.UU. n.º 5 618 682; 3 933 592; 4 303 752; en las publicaciones de patente de los EE.UU. n.º 2006/0073537; 200/50124018; 2003/0104507; 2006/0008860; y la publicación PCT de patente internacional WO 00/18953. Adicionalmente, en el mercado se encuentran disponibles multitud de kits para determinar la concentración de ATP adquiribles a una amplia gama de empresas, entre ellos, por ejemplo, el kit de ensayo de ATP (Calbiochem, San Diego, CA), kit de determinación de ATP (Molecular Probes [Invitrogen], Eugene, OR), sistema de ensayo de la ATP ENLITEN (Promega, Madison, WI), kit de ensayo de bioluminiscencia de ATP (Roche Applied Science, Indianapolis, IN), kit de ensayo bioluminiscente del 5'-trifosfato de adenosina (ATP) (Sigma-Aldrich, San Louis, MO), kit de ensayo de ATP (Thermo Electro Corporation, Milford, MA).

Los métodos con células para determinar la actividad de la sirtuina descritos en la presente memoria implican la determinación de la viabilidad celular en muestras de células. La viabilidad celular se puede determinar mediante cualquier método conocido en la técnica o cualquier método aún por descubrir. Los métodos de ejemplo para determinar la viabilidad celular incluyen, por ejemplo, Alamar Blue, Brd U, MTT, exclusión con Trypan Blue, incorporación de <sup>3</sup>H-timidina y ensayos de XTT. Los kits para determinar la viabilidad celular que están disponibles los comercializan numerosas empresas.

En determinadas realizaciones, los métodos con células para determinar la actividad de la sirtuina descritos en la presente memoria pueden comprender adicionalmente la determinación de la actividad de la sirtuina en un ensayo *in vitro*. La actividad de la sirtuina se puede determinar mediante cualquier método conocido en la técnica o cualquier método aún por descubrir. Los ensayos para determinar la actividad de la sirtuina se pueden llevar a cabo con un formato con células o con un formato sin células. Por ejemplo, un ensayo puede comprender la incubación (o poner en contacto) de una sirtuina con un agente problema en condiciones en las cuales se puede activar una sirtuina mediante un agente que se sabe que activa la sirtuina, y monitorizar o determinar el nivel de activación de la sirtuina en presencia del agente problema respecto a la ausencia del agente problema. El nivel de activación de una sirtuina se puede determinar mediante la determinación de su capacidad para desacetilar un sustrato. Los sustratos de ejemplo son péptidos acetilados, por ejemplo, péptidos de BIOMOL (Plymouth Meeting, PA), péptidos de p53 (tal como los que comprenden una K382 acetilada), el péptido acetilado Fluor de Lys-SIRT1 (BIOMOL) (Arg-His-Lys-Lys), péptidos de las histonas humanas H3 y H4, un aminoácido acetilado y los otros sustratos peptídicos descritos en la presente memoria. El kit de descubrimiento de fármacos/ensayo de actividad fluorescente de HDAC (AK-500, BIOMOL Research Laboratories) se puede utilizar para determinar el nivel de acetilación. Se han descrito métodos para determinar la actividad de la sirtuina. Por ejemplo, Bitterman et al. (2002) *J. Biol. Chem.* 277: 45099 describe un ensayo basado en la fluorescencia para determinar la actividad de la sirtuina. Adicionalmente, los kits de ensayos enzimáticos fluorescentes para determinar la actividad de la sirtuina se encuentran disponibles en el mercado (Biomol International L.P., Plymouth Meeting, PA). Otros ensayos adecuados para identificar los activadores de la sirtuina incluyen un ensayo basado en la polarización de la fluorescencia descrito en la patente internacional PCT/US06/07748 o los ensayos de espectrometría de masas descritos en la presente memoria.

Los ensayos con células descritos en la presente memoria comprenden la determinación de la concentración de ATP y de la viabilidad celular en uno o más momentos fijos después de poner en contacto las células con un posible compuesto modulador de sirtuina. En las realizaciones de ejemplo, la concentración de ATP y la viabilidad celular se determinan a unas 12-84 horas, a unas 24-72 horas, a unas 36-60 horas, o a unas 48 horas, después de la exposición de las células a un posible compuesto modulador de la sirtuina.

Los ensayos con células descritos en la presente memoria pueden comprender la determinación de la concentración de ATP y de la viabilidad celular en una muestra de células que crecen de forma logarítmica (p. ej., en la fase logarítmica del crecimiento).

Los ensayos con células descritos en la presente memoria pueden utilizar controles. Por ejemplo, los controles incluyen ensayos por duplicado en los cuales las muestras de células se ponen en contacto con un único vehículo o con un compuesto modulador de la sirtuina que tiene actividad conocida (p. ej., un compuesto activador de la sirtuina, un compuesto inhibidor de la sirtuina y/o un compuesto que no tiene ninguna actividad moduladora de la sirtuina).

### Ejemplos

La invención que se describe a continuación de forma general se comprenderá con más facilidad al hacer referencia a los ejemplos siguientes que se incluyen simplemente con el propósito de ilustrar determinados aspectos y realizaciones de la presente invención.

#### **Ejemplo1: titulación enzimática de SIRT1 y cinética temporal**

Este ejemplo describe el desarrollo del ensayo enzimático con espectrometría de masas *in vitro* de SIRT1 para la actividad desacetilasa dependiente de NAD<sup>+</sup> de SIRT1. El ensayo mediante la espectrometría de masas utiliza un péptido que tiene 20 restos de aminoácidos que viene a continuación: **Ac-EE-K(biotin)-GQSTSSHHSK(Ac)NleSTEG-K(5TMR)-EE-NH<sub>2</sub>**<sup>1</sup> (SEQ ID n.º 34) en la que K(Ac) es un resto lisina acetilado y Nle es una norleucina. El péptido está marcado con el fluoróforo 5TMR (excitación a 540 nm/emisión a 580 nm) en el extremo carboxilo. La secuencia del sustrato peptídico se basa en la de p53 con varias modificaciones. Además, el resto de metionina presente de forma natural en la secuencia se reemplazó por la norleucina porque la metionina se puede oxidar durante la síntesis y la purificación. Un péptido idéntico que carece del grupo acetilo de la lisina también se sintetizó como referencia para el producto esperado en el ensayo de espectrometría de masas. Este segundo péptido, que tiene 20 restos de aminoácidos, es el siguiente: **Ac-EE-K(biotin)-GQSTSSHHSKNleSTEG-K(5TMR)-EE-NH<sub>2</sub>** (SEQ ID n.º 35), en el que Nle es una norleucina. El péptido está también marcado con el fluoróforo 5TMR (excitación a 540 nm/emisión a 580 nm) en el extremo carboxilo. Además, el resto de metionina presente de forma natural en la secuencia se reemplazó por la norleucina porque la metionina se puede oxidar durante la síntesis y purificación. Los sustratos peptídicos de SIRT1 acetilados y desacetilados se obtuvieron de Biopeptide, Inc. (San Diego, CA).

Se puede utilizar la espectrometría de masas para detectar el cambio de masa observado en un sustrato peptídico después de la desacetilación cuando la desacetilación da lugar a un cambio de masa de 44 unidades de masas atómicas (UMA) en el sustrato peptídico (a saber, la diferencia esperada en las unidades de masa entre el péptido que corresponde a las SEQ ID n.º 34 y SEQ ID n.º 35). Se desarrolló un método analítico de espectrometría de masas para detectar el sustrato peptídico acetilado de SIRT1 y el sustrato peptídico desacetilado de SIRT1 utilizando las referencias de los péptidos de producto y de sustrato. La espectrometría de masas se realizó en formato de alto rendimiento como se describe en Ozbal et al. (*Assay and drug development technologies*, 2 (4), 2004). Para revelar el ensayo enzimático de SIRT1, se estableció la dependencia de la formación del producto sobre la concentración de la enzima SIRT1 y el tiempo de incubación. Por consiguiente, se puede utilizar este método para detectar NCE, con un modo de detección de alto rendimiento (HTS, por su nombre en inglés), frente a SIRT1 para identificar los inhibidores y/o los activadores.

La proteína SIRT1 se expresó y purificó como sigue. Se clonó el gen *Sirt1* en un vector que contiene el promotor de T7 y se transformó en BL21 (DE3). La proteína se expresó por inducción con IPTG a 1 mM como una proteína de fusión con etiqueta de His en el extremo amino a 18 °C durante una noche y se recogió a 30 000 x g. Se lisaron las células con lisozima en tampón de lisis (Tris-HCl a 50 mM, Tris[2-carboxietil]fosfina (TCEP) a 2 mM, ZnCl<sub>2</sub> a 10 µM, NaCl a 200 mM) y además se trató con ultrasonidos durante 10 minutos para completar la lisis. Se purificó la proteína en una columna Ni-NTA (Amersham) y las fracciones que contenían la proteína pura se reunieron, se concentraron y se cargaron en una columna de exclusión por tamaños (Sephadex S200 26/60 global). Se recogió el pico que contenía la proteína soluble y se cargó en una columna de intercambio iónico (MonoQ). La elución en gradiente (NaCl de 200 mM a 500 mM) produjo la proteína pura. Esta proteína se concentró y se dializó contra el tampón de diálisis (Tris-HCl a 20 mM, TCEP a 2 mM) durante una noche. La proteína se distribuyó en alícuotas y se congelaron a -80°C hasta su uso posterior.

Para establecer la dependencia del ensayo enzimático sobre la concentración de la enzima SIRT1 y el tiempo de incubación, se realizó un experimento basado en la velocidad con numerosas concentraciones de la enzima SIRT1. El ensayo emplea la espectrometría de masas para monitorizar la conversión del sustrato peptídico acetilado en

producto peptídico desacetilado por SIRT1. En la figura 1 se muestra un esquema del ensayo.

5 Brevemente, se añadió 1 µl de vehículo (DMSO) a cada pocillo de una placa de ensayo con fondo redondo y transparente de 96 pocillos Costar. Se añadió ácido fórmico (10 µl al 10%) a todos los pocillos en la columna 1 de la placa de ensayo de 96 pocillos. Se prepararon ocho concentraciones madre de SIRT1 (80, 40, 20, 10, 5, 2,5, 1,25 y 0,63 nM) en una solución de trabajo para la enzima (Tris HCl a 50 mM, pH 8,0, NaCl a 137 mM, KCl a 2,7 mM, MgCl<sub>2</sub> a 1 mM, DTT a 5 mM y SAB al 0,05%). Se añadieron 50 µl de la solución madre de SIRT1 a una fila de la placa de ensayo de 96 pocillos (p. ej., la dosis a 80 nM se añadió a los pocillos de la fila A, la dosis a 40 nM se añadió a todos los pocillos de la fila B, etc.).

10 Para iniciar la reacción, 50 µl de la solución de trabajo para el sustrato (sustrato peptídico acetilado de SIRT1 a 1 µM, NAD<sup>+</sup> a 240 µM, Tris HCl a 50 mM, pH 8,0, NaCl a 137 mM, KCl a 2,7 mM, MgCl<sub>2</sub> a 1 mM, DTT a 5 mM y SAB al 0,05%) se añadió a todos los pocillos de la placa de ensayo de 96 pocillos.

15 A los 0, 5, 10, 15, 25, 35, 45, 60, 75, 90, 105 y 120 minutos se detuvo la reacción mediante la adición de ácido fórmico al 10% y la conversión del sustrato en el producto se determinó mediante espectrometría de masas. La retirada de un grupo acetilo da lugar a la pérdida de 44 UMA del sustrato peptídico original. La actividad de cada concentración de SIRT1 se monitorizó al comparar el porcentaje de conversión del sustrato peptídico acetilado en el producto peptídico desacetilado con el tiempo.

Las condiciones finales del ensayo fueron SIRT1 (40, 20, 10, 5, 2,5, 1,25, 0,63 o 0,031 nM), sustrato peptídico acetilado de SIRT1 a 0,5 µM, NAD<sup>+</sup> a 120 µM, Tris HCl a 50 mM, pH 8,0, NaCl a 137 mM, KCl a 2,7 mM, MgCl<sub>2</sub> a 1 mM, DTT a 5 mM, SAB al 0,05% y 25 °C.

20 La capacidad de SIRT1 para convertir el sustrato peptídico acetilado en el producto peptídico desacetilado se evaluó a 8 concentraciones diferentes de SIRT1, en presencia de vehículo (DMSO), en muchos puntos temporales. Se representó en un gráfico la velocidad de la formación del producto frente al tiempo para cada concentración de la enzima SIRT1 ensayada. Se determinó la velocidad en la parte lineal de la curva.

### Resultados

25 La figura 2 muestra la velocidad inicial determinada para cada concentración de SIRT1 ensayada. La actividad de desacetilación de SIRT1 es dependiente de la concentración de la enzima y del tiempo de incubación. Las concentraciones de la enzima entre 5 y 20 nM dan lugar a la formación del producto claramente por encima del ruido de fondo. Basándose en estos resultados, se seleccionó la SIRT1 a 10 nM como la condición estándar para el ensayo.

### 30 **Ejemplo 2: Determinación de la $K_m$ de SIRT1 para el sustrato peptídico acetilado**

Para determinar la  $K_m$  de SIRT1 para el sustrato peptídico acetilado, se determinó la velocidad lineal a 12 concentraciones del sustrato peptídico acetilado (50, 25, 12,5, 6,25, 3,12, 1,56, 0,78, 0,39, 0,19, 0,098, 0,049 y 0,024 µM) en presencia del vehículo (DMSO al 1%). En la figura 3 se muestra un esquema del ensayo.

35 Brevemente, se añadió 1 µl del vehículo (DMSO) a cada pocillo de una placa de ensayo con fondo redondo y transparente de 96 pocillos Costar, y se añadieron 10 µl de ácido fórmico al 10% a todos los pocillos de la columna A. El sustrato peptídico acetilado se diluyó en serie. Los pocillos A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8, A9, A10, A11 y A12 de un bloque de ensayo de 96 pocillos de 2 ml de Costar se llenaron con 600 µl de la solución de trabajo para dilución del sustrato (SDWS, por su nombre en inglés; NAD<sup>+</sup> a 4 mM, Tris HCl a 50 mM, pH 8,0, NaCl a 137 mM, KCl a 2,7 mM, MgCl<sub>2</sub> a 1 mM, DTT a 5 mM y SAB al 0,05%). Se añadieron 1200 µl de la solución de trabajo para la dosis máxima del sustrato peptídico acetilado (APSTD-WS, por su nombre en inglés; sustrato peptídico acetilado de SIRT1 a 100 µM, NAD<sup>+</sup> a 4 mM, Tris HCl a 50 mM, pH 8,0, NaCl a 137 mM, KCl a 2,7 mM, MgCl<sub>2</sub> a 1 mM, DTT a 5 mM y SAB al 0,05%) al pocillo A1 del bloque de ensayo de 96 pocillos de 2 ml de Costar. La APSTD-WS se diluyó en serie en SDWS mediante la transferencia de 600 µl de APSTD-WS desde el pocillo A1 al pocillo B1 del bloque de ensayo de 96 pocillos de 2 ml de Costar. Se mezcló la solución 5 veces y el proceso continuó moviéndose por la fila A, hasta que se alcanzó el pocillo A12.

45 Se preparó la solución de trabajo para la enzima (SIRT1 a 20 nM, Tris HCl a 50 mM, pH 8,0, NaCl a 137 mM, KCl a 2,7 mM, MgCl<sub>2</sub> a 1 mM, DTT a 5 mM, SAB al 0,05%). Se transfirieron 50 µl de la APSTD-WS diluida en serie desde la fila A completa del bloque de ensayo de 96 pocillos de 2 ml de Costar a cada fila de la placa de ensayo de 96 pocillos mediante una pipeta de 12 canales (p. ej., de la fila A del bloque de ensayo de 2 ml a las filas A, B, C, D, E, F, G, H de la placa de ensayo de 96 pocillos). Para iniciar la reacción se añadieron 50 µl de la solución de trabajo para la enzima a cada pocillo de la placa de ensayo de 96 pocillos utilizando el Multidrop.

La reacción se detuvo con ácido fórmico al 10% a los 0, 3, 6, 9, 12, 15, 20, y 25 minutos, y se determinó la conversión del sustrato en producto mediante espectrometría de masas.

55 Las condiciones finales del ensayo fueron SIRT1 a 10 nM, sustrato peptídico acetilado de SIRT1 a 50, 25, 12,5, 6,25, 3,12, 1,56, 0,78, 0,39, 0,19, 0,098, 0,049 o 0,024 µM, NAD<sup>+</sup> a 2 mM, Tris HCl a 50 mM, pH 8,0, NaCl a 137

mM, KCl a 2,7 mM, MgCl<sub>2</sub> a 1 mM, DTT a 5 mM, SAB al 0,05% y 25 °C.

Se determinó la  $K_m$  de SIRT1 para el sustrato peptídico acetilado en presencia de vehículo (DMSO al 1%). La actividad enzimática de SIRT1 a 12 concentraciones del sustrato peptídico acetilado de SIRT1 se monitorizó mediante la comparación del porcentaje de conversión del sustrato peptídico acetilado en el producto peptídico desacetilado con el tiempo. La velocidad de reacción a cada concentración de sustrato se determinó gráficamente como la pendiente de la formación del producto frente al tiempo en el intervalo lineal. Las velocidades obtenidas se representaron entonces gráficamente frente a la concentración del sustrato para generar un gráfico para la determinación de la  $K_m$ .

### Resultados

Tal y como se representa en la figura 4, la  $K_m$  de SIRT1 para el sustrato peptídico acetilado se determinó en 2 placas duplicadas que eran de 11,2  $\mu\text{M}$  y de 11,9  $\mu\text{M}$ , lo que da lugar a una  $K_m$  media de 11,6  $\mu\text{M}$ . Se establecieron las condiciones de ensayo estándares a concentraciones por debajo de la  $K_m$  (sustrato peptídico acetilado a 0,5  $\mu\text{M}$ ) del sustrato peptídico para llevar al máximo el efecto de los activadores de tipo  $K_m$ .

#### **Ejemplo 3: Determinación de la $K_m$ de SIRT1 para el NAD<sup>+</sup>**

Para determinar la  $K_m$  para el NAD<sup>+</sup>, se determinó la velocidad lineal a 8 concentraciones de NAD<sup>+</sup> (2000, 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25 y 15,6  $\mu\text{M}$ ) en vehículo (DMSO al 1%). En la figura 5 se muestra un esquema del diseño del ensayo.

Se añadió el vehículo (1  $\mu\text{l}$  de DMSO) a cada pocillo de una placa de ensayo con fondo redondo transparente de 96 pocillos de Costar, y se añadieron 10  $\mu\text{l}$  de ácido fórmico al 10% a todos los pocillos de la fila A de la placa de ensayo de 96 pocillos.

Se diluyó en serie el NAD<sup>+</sup> en un bloque de ensayo de 96 pocillos de 2 ml de Costar llenando primero los pocillos B1, C1, D1, E1, F1, G1 y H1 con 600  $\mu\text{l}$  de la solución de trabajo para la dilución del sustrato (SDWS, por su nombre en inglés; sustrato peptídico acetilado a 100  $\mu\text{M}$ , Tris HCl a 50 mM, pH 8,0, NaCl a 137 mM, KCl a 2,7 mM, MgCl<sub>2</sub> a 1 mM, DTT a 5 mM y SAB al 0,05%). Se añadieron 1200  $\mu\text{l}$  de la solución de trabajo para la dosis máxima de NAD<sup>+</sup> (NADTD-WS, por su nombre en inglés; sustrato peptídico acetilado de SIRT1 a 100  $\mu\text{M}$ , NAD<sup>+</sup> a 4 mM, Tris HCl a 50 mM, pH 8,0, NaCl a 137 mM, KCl a 2,7 mM, MgCl<sub>2</sub> a 1 mM, DTT a 5 mM y SAB al 0,05%) al pocillo A1 del bloque de ensayo de 96 pocillos de 2 ml de Costar. La NADTD-WS se diluyó en serie en SDWS mediante la transferencia de 600  $\mu\text{l}$  de NADTD-WS desde el pocillo A1 al pocillo B1 del bloque de ensayo de 96 pocillos de 2 ml de Costar. Se mezclaron las soluciones 5 veces y se repitió el proceso hasta que se alcanzó el pocillo H1.

Se preparó la solución de trabajo para la enzima (SIRT1 a 20 nM, Tris HCl a 50 mM, pH 8,0, NaCl a 137 mM, KCl a 2,7 mM, MgCl<sub>2</sub> a 1 mM, DTT a 5 mM y SAB al 0,05%).

La NADTD-WS diluida en serie (50  $\mu\text{l}$ ) se transfirió a cada columna de la placa de ensayo de 96 pocillos desde toda la columna 1 del bloque de ensayo de 96 pocillos de 2 ml de Costar mediante una pipeta de 8 canales (p. ej., de la columna 1 del bloque de ensayo de 2 ml a las columnas 1-12 de la placa de ensayo de 96 pocillos). Para iniciar la reacción se añadieron 50  $\mu\text{l}$  de la solución de trabajo para la enzima a cada pocillo de la placa de ensayo de 96 pocillos con el Multidrop.

La reacción se detuvo con ácido fórmico al 10% a los 0, 10, 15, 20 y 30 minutos, y se determinó la conversión del sustrato en el producto mediante espectrometría de masas. La actividad a cada concentración de NAD<sup>+</sup> se monitorizó por comparación con el porcentaje de conversión del sustrato peptídico acetilado en el producto peptídico desacetilado con el tiempo.

Las condiciones finales del ensayo fueron SIRT1 a 10 nM, NAD<sup>+</sup> a 2000, 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25 o 15,6  $\mu\text{M}$ , sustrato peptídico acetilado de SIRT1 a 50  $\mu\text{M}$ , Tris HCl a 50 mM, pH 8,0, NaCl a 137 mM, KCl a 2,7 mM, MgCl<sub>2</sub> a 1 mM, DTT a 5 mM, SAB al 0,05% y 25 °C.

Se determinó la  $K_m$  de SIRT1 para el NAD<sup>+</sup> en presencia del vehículo (DMSO al 1%). La actividad de la enzima SIRT1 a 8 concentraciones de NAD<sup>+</sup> se monitorizó por comparación con el porcentaje de conversión del sustrato peptídico acetilado en el producto peptídico desacetilado con el tiempo. La velocidad de reacción de cada concentración de NAD<sup>+</sup> se determinó gráficamente como la pendiente de la formación del producto frente al tiempo en el intervalo lineal. A continuación se representaron gráficamente las velocidades obtenidas frente a la concentración de NAD<sup>+</sup> para generar un gráfico para la determinación de la  $K_m$ .

### Resultados

Se determinó que la  $K_m$  de SIRT1 para NAD<sup>+</sup> era de 220  $\mu\text{M}$  (figura 6). Se establecieron las condiciones del ensayo estándares a concentraciones por debajo de la  $K_m$  (NAD<sup>+</sup> a 120  $\mu\text{M}$ ) del sustrato peptídico para elevar al máximo el efecto de los activadores de tipo  $K_m$ .

#### **Ejemplo 4: Determinación de la tolerancia al DMSO que presenta el ensayo de espectrometría de masas de**

**SIRT1**

Para determinar la tolerancia al DMSO que presenta el ensayo de espectrometría de masas de SIRT1 se llevó a cabo un experimento basado en la velocidad a varias concentraciones de DMSO. En la figura 7 se muestra un esquema del diseño del ensayo.

5 Se añadió ácido fórmico (10 µl del 10%) a todos los pocillos de la columna 1 de la placa de ensayo de 96 pocillos. Se prepararon ocho concentraciones de DMSO (40%, 20%, 10%, 5,0%, 2,5%, 1,25%, 0,625% y 0,313%) en tampón con Tris HCl a 50 mM, pH 8,0, NaCl a 137 mM, KCl a 2,7 mM, MgCl<sub>2</sub> a 1 mM, DTT a 5 mM y SAB al 0,05%.

10 Se preparó esta titulación de DMSO fabricando una solución de 2000 µl de DMSO al 40% en Tris HCl a 50 mM, pH 8,0, NaCl a 137 mM, KCl a 2,7 mM, MgCl<sub>2</sub> a 1 mM, DTT a 5 mM y SAB al 0,05% en el pocillo A1 de un bloque de ensayo de 96 pocillos de 2 ml de Costar. Se añadió la solución de trabajo para diluciones (1000 µl; Tris HCl a 50 mM, pH 8,0, NaCl a 137 mM, KCl a 2,7 mM, MgCl<sub>2</sub> a 1 mM, DTT a 5 mM y SAB al 0,05%) a los pocillos B1, C1, D1, E1, F1, G1 y H1. Se transfirieron 1000 µl del DMSO al 40% en solución tamponante desde A1 a A2, y se mezcló la solución 5 veces. Se repitió este proceso con los pocillos de la columna 1 hasta que se alcanzó el pocillo H1.

15 Con una multipipeta de 8 canales se transfirieron 50 µl de la columna 1 del bloque de ensayo de 96 pocillos de 2 ml a todas las columnas de una placa de ensayo de 96 pocillos.

Se prepararon 25 µl de la solución de trabajo para la enzima (SIRT1 a 40 nM, Tris HCl a 50 mM, pH 8,0, NaCl a 137 mM, KCl a 2,7 mM, MgCl<sub>2</sub> a 1 mM, DTT a 5 mM y SAB al 0,05%) y se añadieron a cada pocillo de la placa de ensayo de 96 pocillos con fondo redondo.

20 Para iniciar la reacción, se añadieron 25 µl de la solución de trabajo para el sustrato (sustrato peptídico acetilado de SIRT1 a 2 µM, NAD a 480 µM, Tris HCl a 50 mM, pH 8,0, NaCl a 137 mM, KCl a 2,7 mM, MgCl<sub>2</sub> a 1 mM, DTT a 5 mM y SAB al 0,05%) a todos los pocillos de la placa de ensayo de 96 pocillos.

25 A los 0, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 y 60 minutos, se detuvo la reacción con ácido fórmico al 10% y se determinó la conversión del sustrato en el producto mediante espectrometría de masas. Se monitorizó la actividad de SIRT1 a cada concentración de DMSO mediante la comparación del porcentaje de conversión del sustrato peptídico acetilado en el producto peptídico desacetilado con el tiempo.

Las condiciones finales del ensayo fueron SIRT1 a 10 nM, sustrato peptídico acetilado de SIRT1 a 0,5 µM, NAD a 120 µM, Tris HCl a 50 mM, pH 8,0, NaCl a 137 mM, KCl a 2,7 mM, MgCl<sub>2</sub> a 1 mM, DTT a 5 mM, SAB al 0,05% y DMSO (20%, 10%, 5%, 2,5%, 1,25%, 0,63% o 0,031%, 0,156%).

30 Se representó gráficamente la formación del producto frente al tiempo para cada concentración de DMSO ensayada. Se determinó la velocidad tomando la pendiente de la parte lineal de la cinética temporal. Se representó gráficamente la velocidad frente a la concentración de DMSO en un gráfico de barras para comparar los diferentes tratamientos.

**Resultados**

35 Se presentaron los datos como la velocidad inicial obtenida a cada concentración de DMSO. Los resultados demuestran que la actividad enzimática de SIRT1 es sensible al DMSO a concentraciones por encima de 0,625% (figura 8). La actividad enzimática disminuyó un 36% con DMSO al 2,5%, un 21% con DMSO al 1,25% y un 9,1% con DMSO al 0,625%. Según estos resultados, la concentración de DMSO en la reacción en las condiciones estándares de ensayo no debe exceder el 1% final.

**Ejemplo 5: Determinación del mecanismo de activación de SIRT1 por el resveratrol**

40 El propósito de este ejemplo era abordar el mecanismo mediante el cual la molécula pequeña, el resveratrol, activa la actividad enzimática de SIRT1. Se examinó el efecto del resveratrol sobre la K<sub>m</sub> de la enzima SIRT1 humana para el sustrato peptídico acetilado mediante el ensayo de espectrometría de masas de SIRT1 descrito en los ejemplos anteriores. El diagrama del diseño experimental está en la figura 9. Utilizando el ensayo de MS sin células, se determinó la K<sub>m</sub> de la enzima SIRT1 para el sustrato peptídico a cinco concentraciones de resveratrol (100, 33, 11, 45 3,7, 1,2 µM) y también en presencia del vehículo DMSO solo. Para determinar la K<sub>m</sub>, se determinó la velocidad lineal a 12 concentraciones de sustrato peptídico acetilado (50, 25, 12,5, 6,25, 3,12, 1,56, 0,78, 0,39, 0,19, 0,098, 0,049 y 0,024 µM) para cada una de las concentraciones de resveratrol y para el control de vehículo. La enzima SIRT1, el NAD<sup>+</sup> y el sustrato peptídico acetilado a 0-50 µM se incuban con resveratrol a 0-100 µM a 25 °C. A los 0, 3, 6, 9, 12, 15, 20 y 25 minutos se detuvo la reacción con ácido fórmico al 10% y se determinó la conversión de los sustratos en 50 los productos mediante espectrometría de masas.

Se pesó el resveratrol y se colocó en un vial marrón. Se disolvió el material en el vehículo al 100% (DMSO) para producir una concentración final de 10 mM (solución madre). La solución madre se diluyó en serie con DMSO al 100% en una placa de 96 pocillos profundos.

Brevemente, se pipetearon 337,5 µl de resveratrol a 10 mM en el pocillo A1 y se diluyeron en serie a la tercera parte

cuatro veces, de tal modo que se añadieron 112,5  $\mu\text{l}$  de la solución madre a 10 mM a 225  $\mu\text{l}$  de DMSO al 100% y se mezclaron 10 veces con una pipeta. Este procedimiento dio lugar a una solución madre de resveratrol a 3,3 mM en el pocillo A2, de resveratrol a 1,1 mM en el pocillo A3, de resveratrol a 0,37 mM en el pocillo A4, y de resveratrol a 0,12 mM en el pocillo A5. Se transfirieron 25  $\mu\text{l}$  de A1-A5 de la placa de 96 pocillos a las filas B-H. A continuación, con un pipeteador de 8 canales, se retiraron 14  $\mu\text{l}$  de la columna 1 (resveratrol a 10 mM) de la placa de soluciones madre y se dispensó 1  $\mu\text{l}$  en el desecho y luego se distribuyó 1  $\mu\text{l}$  a través de una placa hija en las columnas 1 a 12. Este procedimiento produjo una placa de 96 pocillos completa que contenía 1  $\mu\text{l}$ /pocillo de resveratrol a 10 mM. Este procedimiento se repitió para crear placas que contenían 1  $\mu\text{l}$ /pocillo de resveratrol a 3,3, 1,1, 0,37 y 0,12 mM. También se generaron dos placas que contenían 1  $\mu\text{l}$ /pocillo de DMSO al 100% para determinar la  $K_m$  en presencia únicamente de vehículo.

Se determinó la  $K_m$  de SIRT1 para el sustrato peptídico acetilado a 5 concentraciones diferentes de resveratrol y en presencia únicamente del vehículo. Para determinar la  $K_m$ , se determinó la velocidad de conversión del sustrato en producto en varios puntos temporales del intervalo lineal del ensayo.

### Resultados

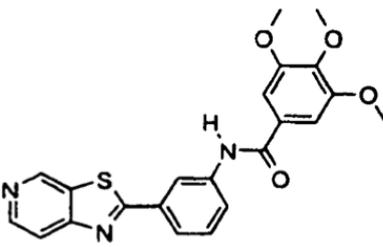
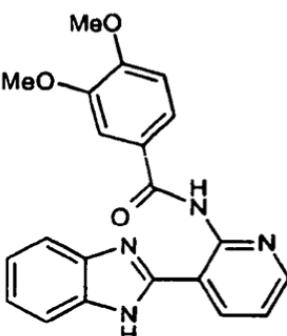
Los datos se presentan como el % de la  $K_m$  en presencia de vehículo ( $K_m$  del % de DMSO) frente a la concentración del resveratrol (figura 10). El resveratrol disminuyó la  $K_m$  de SIRT1 para el sustrato peptídico de una manera dependiente de la dosis. La  $K_m$  para el sustrato peptídico disminuyó un 2%, 14%, 14%, 32% y 46% con resveratrol a 1,2, 3,7, 11, 33 y 100  $\mu\text{M}$ , respectivamente.

### Ejemplo 6: Determinación del mecanismo de activación de SIRT1 por los compuestos problema

El propósito de este ejemplo es describir el efecto de las moléculas pequeñas activadoras de SIRT1 sobre la  $K_m$  de SIRT1 para el sustrato peptídico acetilado mediante espectrometría de masas. El mecanismo de activación se debe al menos en parte a una disminución de la  $K_m$  para el sustrato peptídico. La evaluación de la magnitud del efecto de la  $K_m$  proporciona una manera de rastrear la potencia de los compuestos con un solo valor en vez de utilizar los valores de  $CE_{50}$  y de veces de activación. La  $K_{m50}$  que se determinó como se describe en este ejemplo se define como la concentración del compuesto que se necesita para disminuir un 50% la  $K_m$  para el sustrato peptídico acetilado. Basándose en el ejemplo anterior, la  $K_{m50}$  para el resveratrol es  $> 100 \mu\text{M}$ .

Se ensayó el efecto de tres compuestos problema sobre la  $K_m$  de SIRT1 para el sustrato peptídico acetilado y se determinó una  $K_{m50}$ . Estos tres compuestos y los resultados se muestran en la tabla 4.

Tabla 4.  $K_{m50}$  para los compuestos indicados.

COMPUESTO N.º	ESTRUCTURA	$K_{m50}$ ( $\mu\text{M}$ )
115		2,66
276		0,327

COMPUESTO N.º	ESTRUCTURA	Km <sub>50</sub> (µM)
142		0,182

**Ejemplo 7: Escrutinio de los compuestos problema mediante el ensayo de espectrometría de masas de SIRT1**

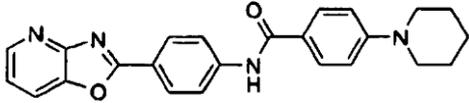
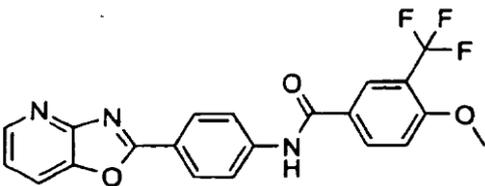
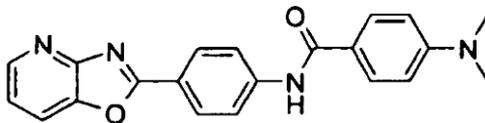
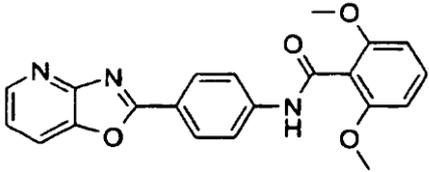
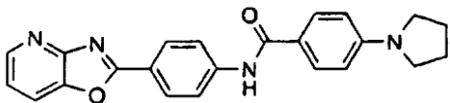
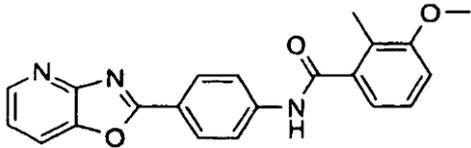
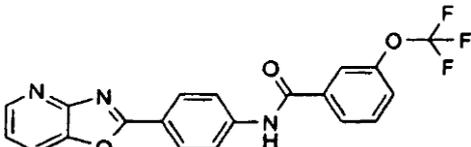
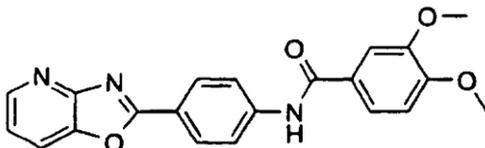
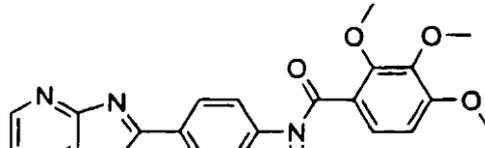
El ensayo de espectrometría de masas se lleva a cabo del siguiente modo: el sustrato peptídico a 0,5 µM (SEQ ID n.º 34) y el NAD<sup>+</sup> a 120 µM se incuban con SIRT1 a 10 nM durante 25 minutos a 37°C en tampón de reacción (Tris-acetato a 50 mM, pH 8, NaCl a 137 mM, KCl a 2,7 mM, MgCl<sub>2</sub> a 1 mM, DTT a 5 mM, SAB al 0,05%). Se añadieron los compuestos problema a la reacción como se describe más arriba. El gen Sirt1 se clona en un vector que contiene el promotor de T7 y se transforma en BL21(DE3). Después de una incubación de 25 minutos con SIRT1, se añaden 10 µl de ácido fórmico al 10% para detener la reacción. Se sellan las reacciones y se congelan para el análisis posterior de espectrometría de masas. La determinación de la masa del sustrato peptídico permite determinar de modo preciso el grado de acetilación (a saber, el material de partida) al compararlo con el péptido desacetilado (producto).

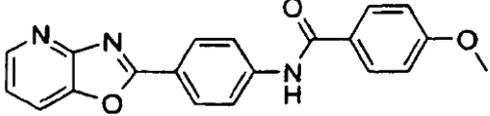
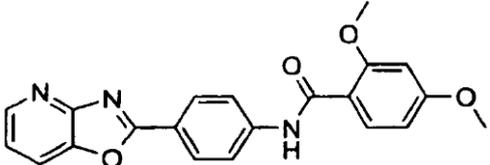
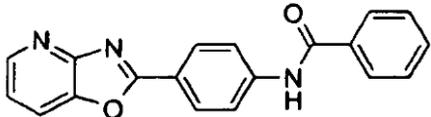
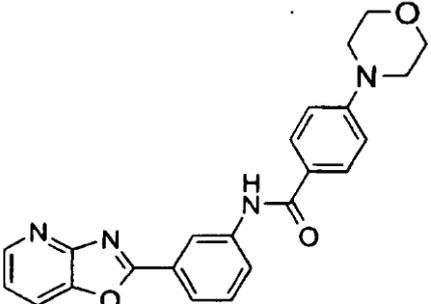
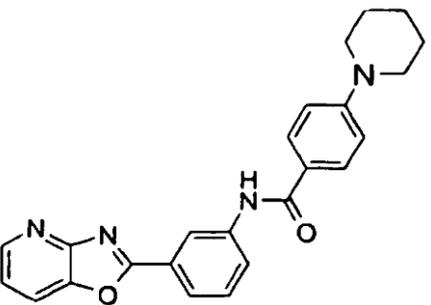
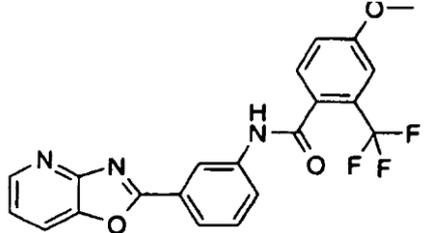
Para el ensayo basado en la espectrometría de masas, se lleva a cabo un control para la inhibición de la actividad de la sirtuina añadiendo 1 µl de nicotinamida a 500 mM como control negativo al comienzo de la reacción (p. ej., permite determinar la inhibición máxima de la sirtuina). Se realiza un control de la activación de la actividad de la sirtuina utilizando 10 nM de la proteína sirtuina, con 1 µl de DMSO en lugar del compuesto, para determinar la cantidad de desacetilación del sustrato en un momento temporal determinado dentro del margen lineal del ensayo. Este punto de tiempo es el mismo que el utilizado para los compuestos problema y, dentro del margen lineal, el criterio de valoración representa un cambio de la velocidad.

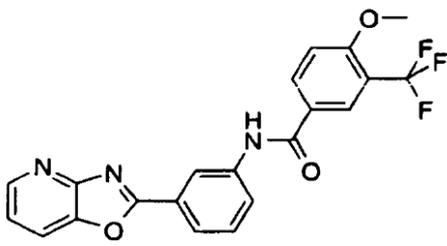
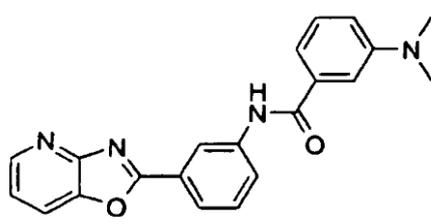
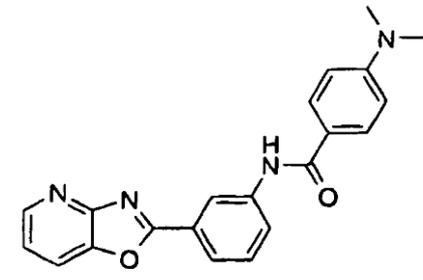
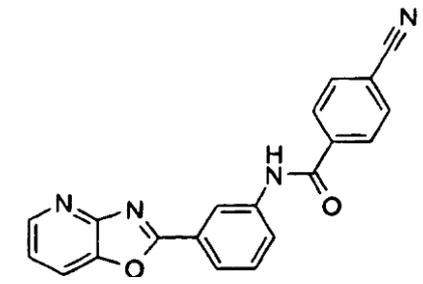
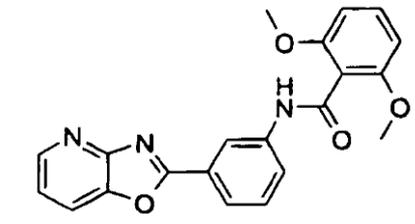
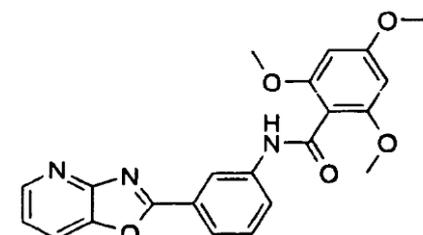
Los compuestos moduladores de la sirtuina que activaron SIRT1 se identificaron con el ensayo descrito más arriba y se muestran más abajo en la tabla 5. Los valores de DE<sub>50</sub> para los compuestos activadores en el ensayo de espectrometría de masas (MS) se representan mediante A (DE<sub>50</sub> ≤ 50 µM), B (DE<sub>50</sub> = 51-100 µM), C (DE<sub>50</sub> = 101-150 µM) y D (DE<sub>50</sub> ≥ 150 µM). NA significa que el compuesto no era activo y NE significa que el compuesto no se ensayó con la prueba indicada. Las veces de activación, determinadas según la espectrometría de masas (MS), se representa mediante A (veces de activación > 250%), B (veces de activación < 250%) o C (no se activa). La DE<sub>50</sub> del resveratrol para la activación de SIRT1 es de 16 µM y las veces de activación del resveratrol para SIRT1 en el ensayo de MS es aproximadamente del 200%.

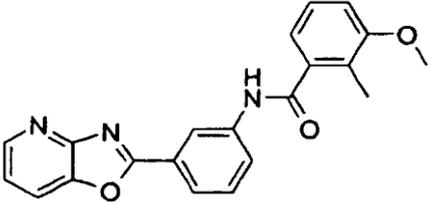
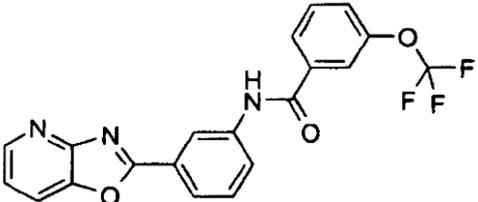
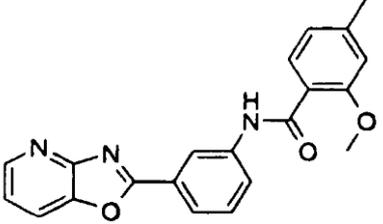
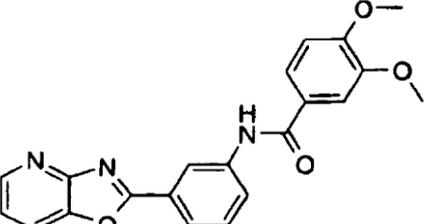
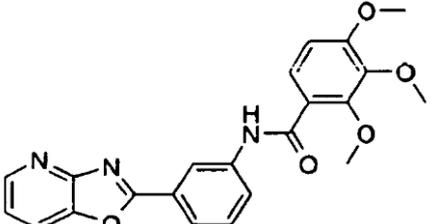
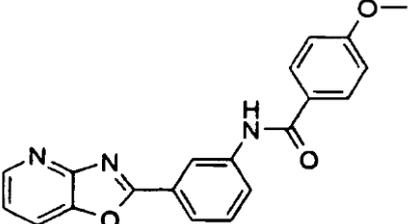
Tabla 5. Valores de DE<sub>50</sub> y de veces de activación para los compuestos indicados.

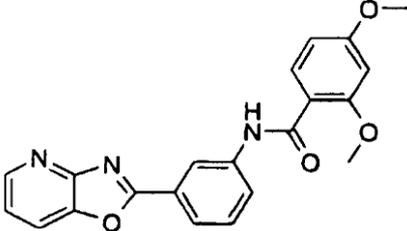
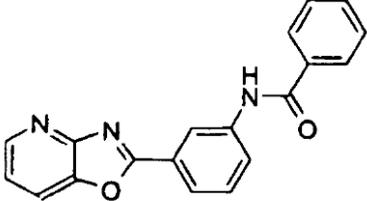
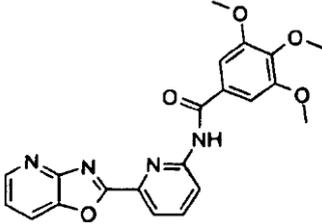
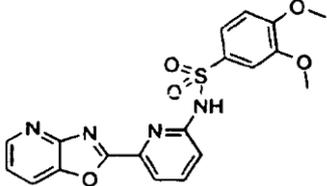
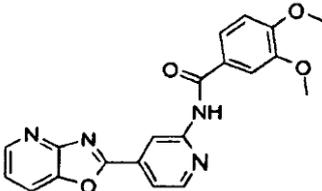
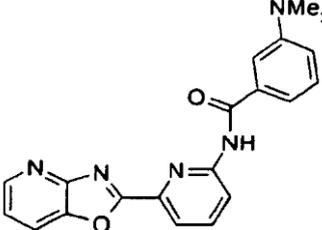
COMPUESTO N.º	ESTRUCTURA	DE <sub>50</sub> EN EL ENSAYO DE MS	VECES DE ACTIVACIÓN POR MS
19		D	C
20		D	C

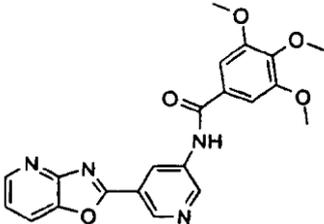
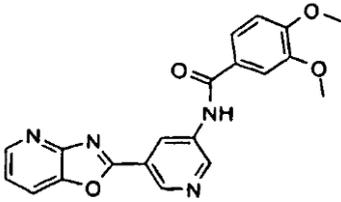
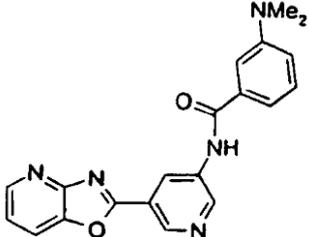
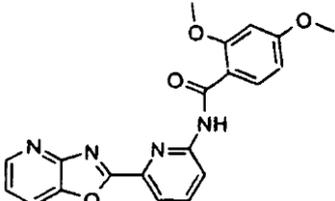
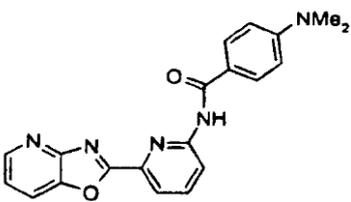
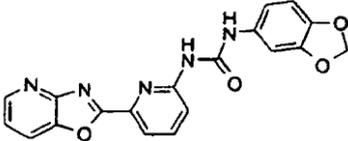
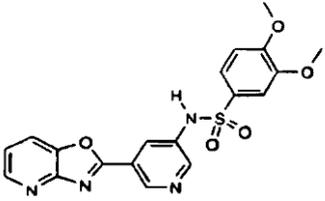
COMPUESTO N.º	ESTRUCTURA	DE <sub>50</sub> EN EL ENSAYO DE MS	VECES DE ACTIVACIÓN POR MS
21		D	C
22		D	C
24		D	C
27		D	C
29		D	C
31		D	C
32		D	C
33		D	C
34		D	C

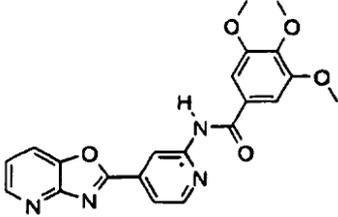
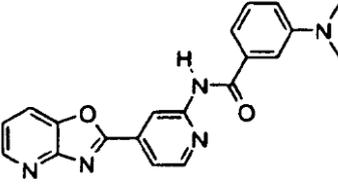
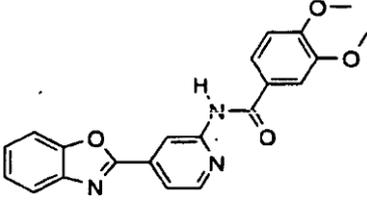
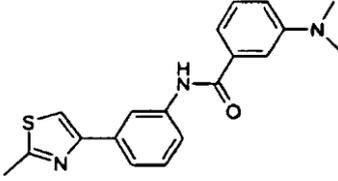
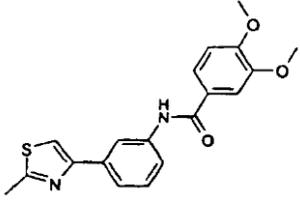
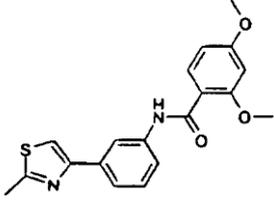
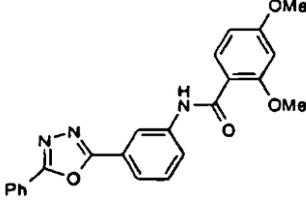
COMPUESTO N.º	ESTRUCTURA	DE <sub>50</sub> EN EL ENSAYO DE MS	VECES DE ACTIVACIÓN POR MS
35		D	C
36		D	C
37		D	C
38		D	C
39		D	C
40		D	C

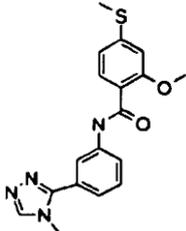
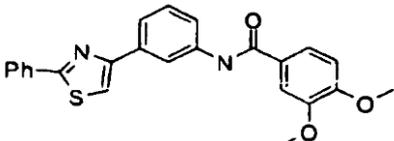
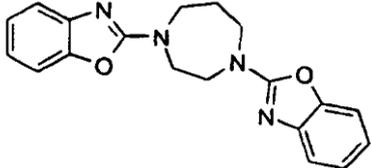
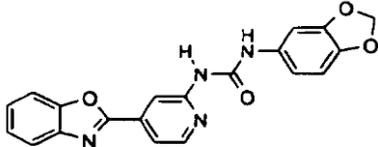
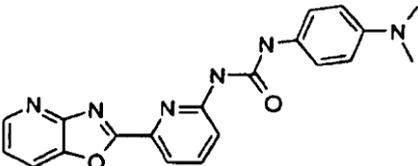
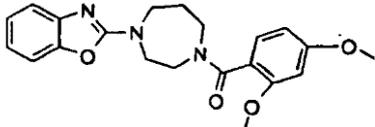
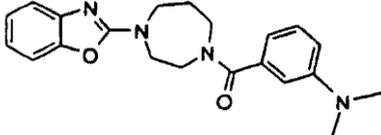
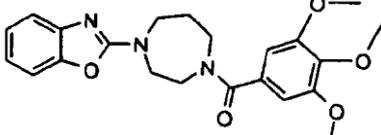
COMPUESTO N.º	ESTRUCTURA	DE <sub>50</sub> EN EL ENSAYO DE MS	VECES DE ACTIVACIÓN POR MS
41		D	C
42		A	B
43		A	B
45		D	C
46		D	C
48		D	C

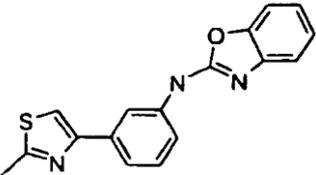
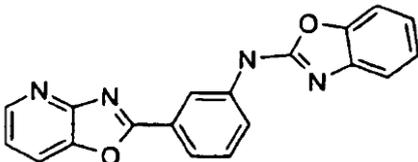
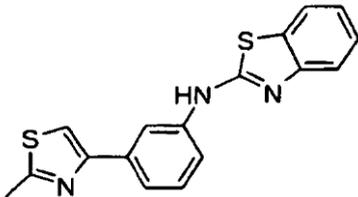
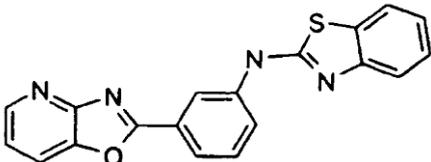
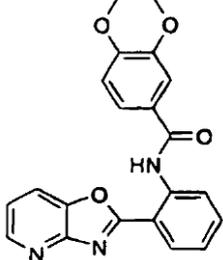
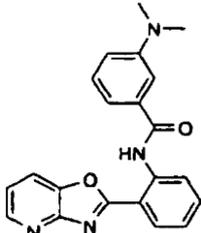
COMPUESTO N.º	ESTRUCTURA	DE <sub>50</sub> EN EL ENSAYO DE MS	VECES DE ACTIVACIÓN POR MS
49		A	B
50		D	
51		A	B
52		A	B
53		D	C
54		D	NE

COMPUESTO N.º	ESTRUCTURA	DE <sub>50</sub> EN EL ENSAYO DE MS	VECES DE ACTIVACIÓN POR MS
55		A	B
56		A	B
57		A	NE
60		A	NE
63		A	NE
64		A	NE

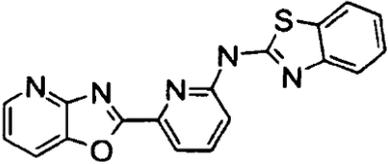
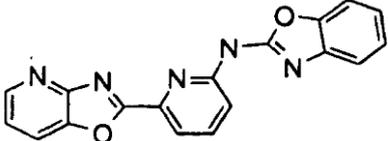
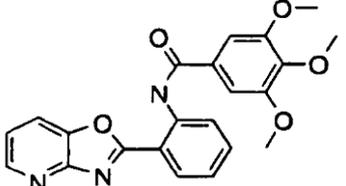
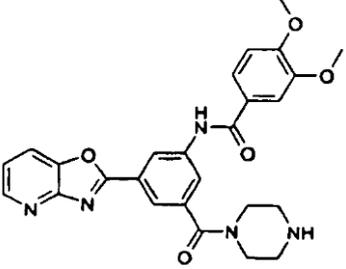
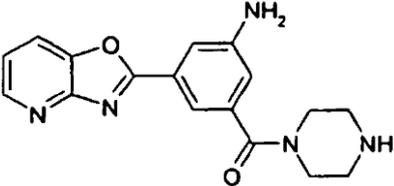
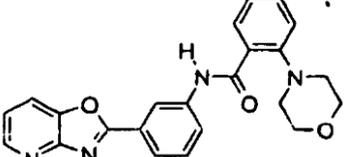
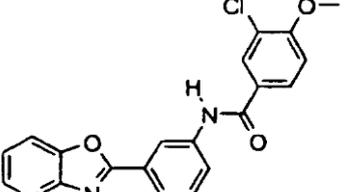
COMPUESTO N.º	ESTRUCTURA	DE <sub>50</sub> EN EL ENSAYO DE MS	VECES DE ACTIVACIÓN POR MS
66		A	NE
67		A	NE
68		A	NE
69		A	B
70		A	B
71		A	B
74		D	C

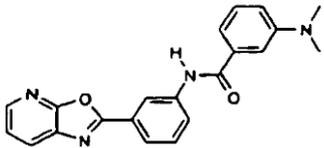
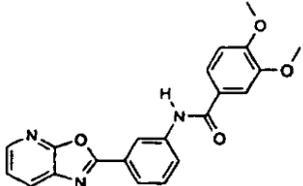
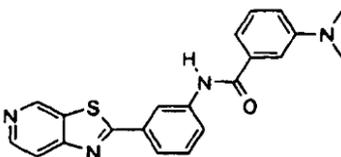
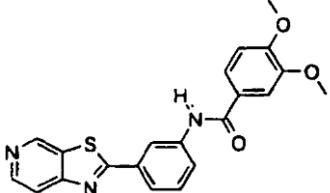
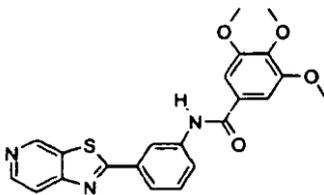
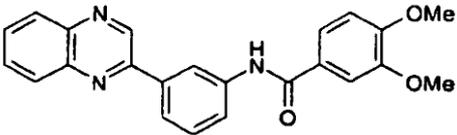
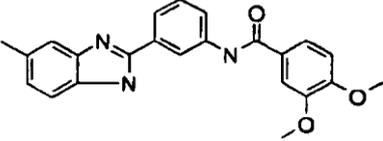
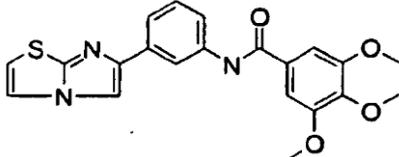
COMPUESTO N.º	ESTRUCTURA	DE <sub>50</sub> EN EL ENSAYO DE MS	VECES DE ACTIVACIÓN POR MS
75		A	B
76		A	B
77		A	B
79		D	C
80		A	B
81		A	B
82		C	NE

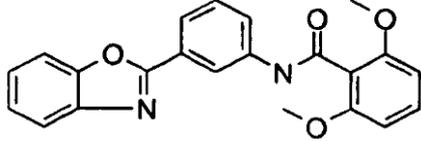
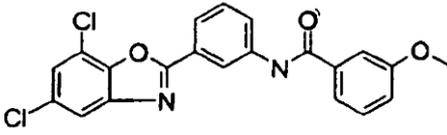
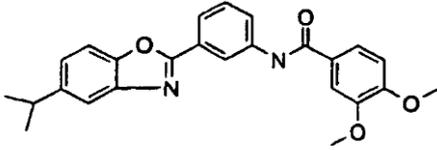
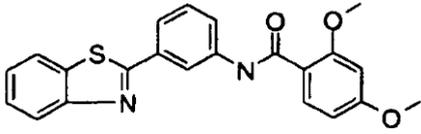
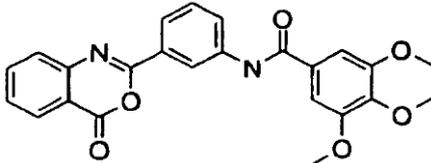
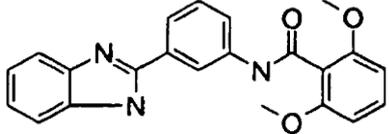
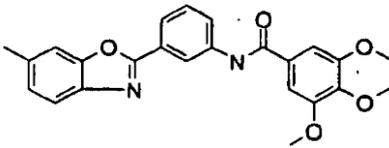
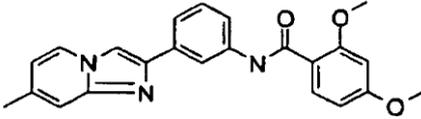
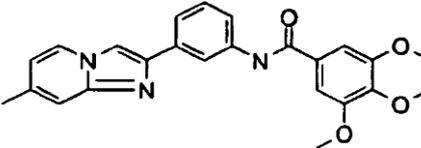
COMPUESTO N.º	ESTRUCTURA	DE <sub>50</sub> EN EL ENSAYO DE MS	VECES DE ACTIVACIÓN POR MS
83		A	B
84		A	B
85		D	C
86		D	C
87		D	C
88		D	C
89		D	C
91		D	C

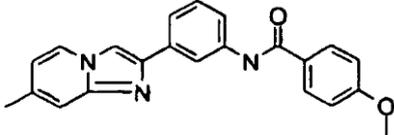
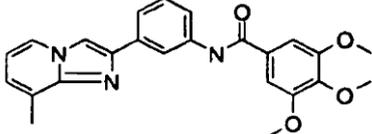
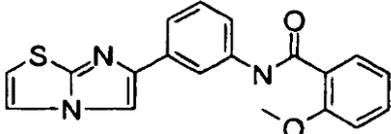
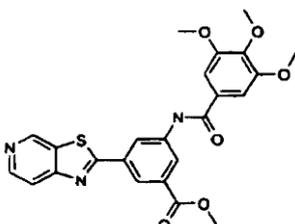
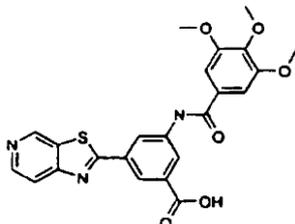
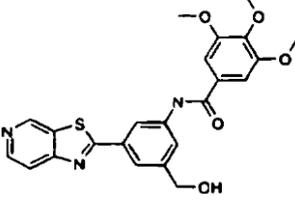
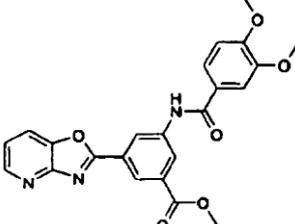
COMPUESTO N.º	ESTRUCTURA	DE <sub>50</sub> EN EL ENSAYO DE MS	VECES DE ACTIVACIÓN POR MS
92		A	B
93		A	B
94		A	B
95		A	B
96		A	B
97		A	B

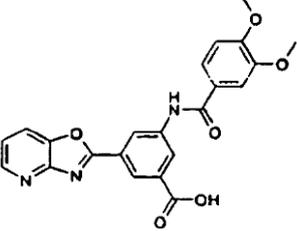
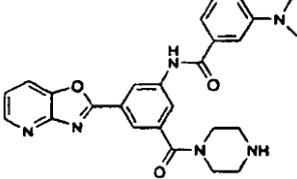
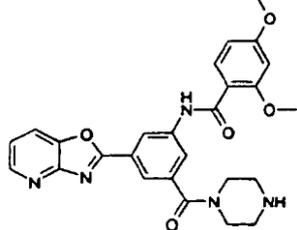
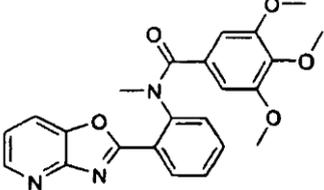
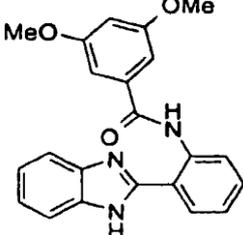
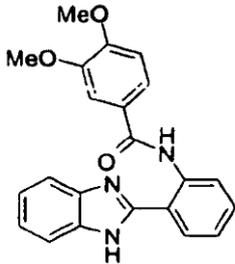
COMPUESTO N.º	ESTRUCTURA	DE <sub>50</sub> EN EL ENSAYO DE MS	VECES DE ACTIVACIÓN POR MS
98		D	C
99		A	A
100		A	B
101		A	A
102		A	A
103		D	C

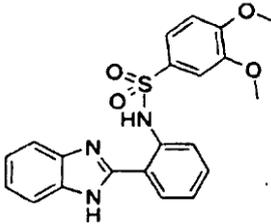
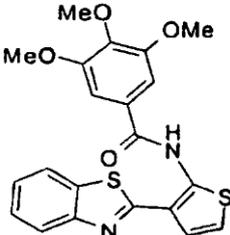
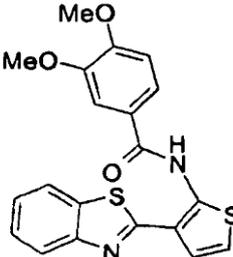
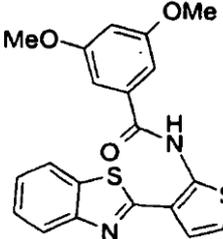
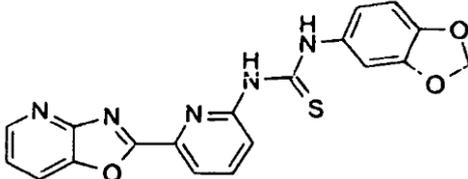
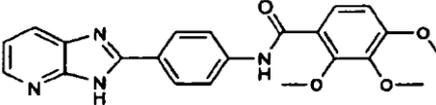
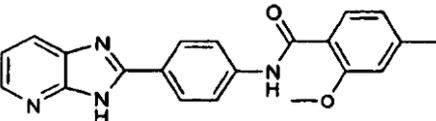
COMPUESTO N.º	ESTRUCTURA	DE <sub>50</sub> EN EL ENSAYO DE MS	VECES DE ACTIVACIÓN POR MS
104		A	B
105		A	B
106		A	B
107		A	B
108		NA	NE
109		A	B
110		C	NE

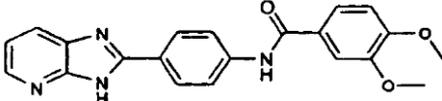
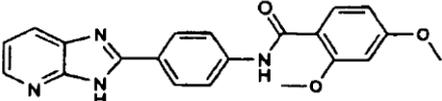
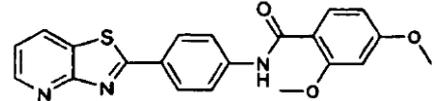
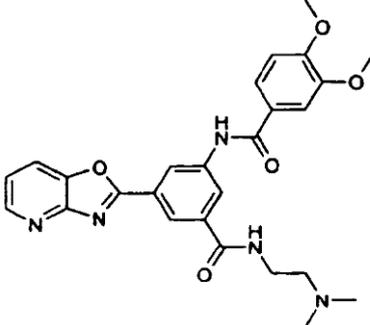
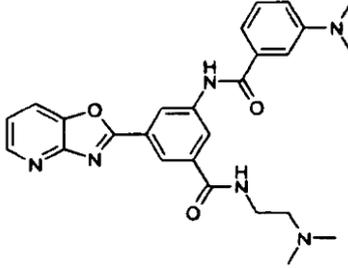
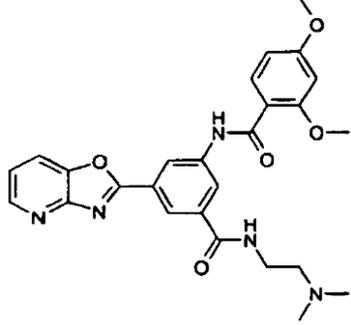
COMPUESTO N.º	ESTRUCTURA	DE <sub>50</sub> EN EL ENSAYO DE MS	VECES DE ACTIVACIÓN POR MS
111		A	B
112		A	B
113		A	B
114		A	A
115		A	A
116		C	NE
117		A	A
118		A	A

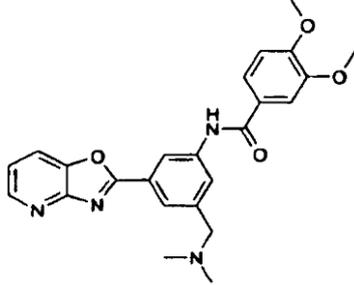
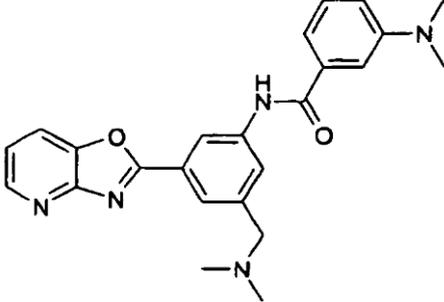
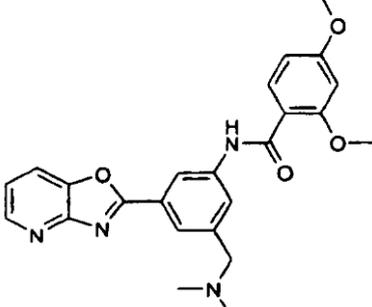
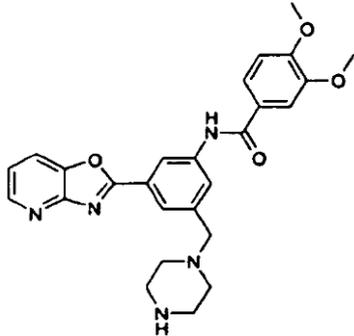
COMPUESTO N.º	ESTRUCTURA	DE <sub>50</sub> EN EL ENSAYO DE MS	VECES DE ACTIVACIÓN POR MS
119		A	B
121		D	C
122		C	NE
124		A	B
125		B	B
126		A	B
127		A	A
128		A	B
129		A	A

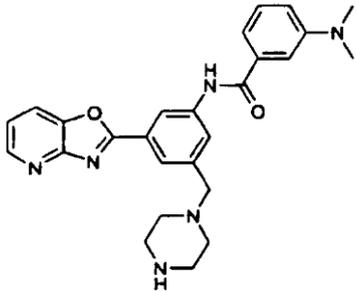
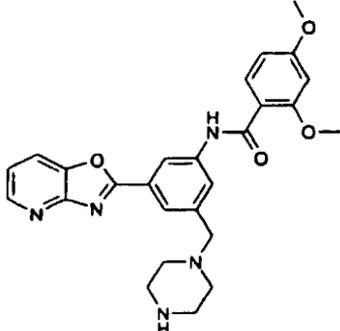
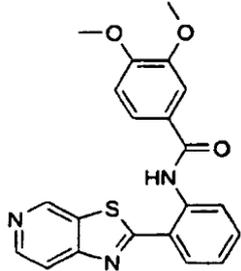
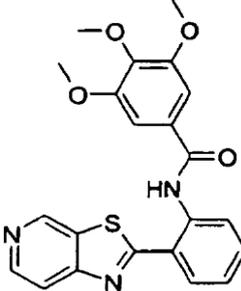
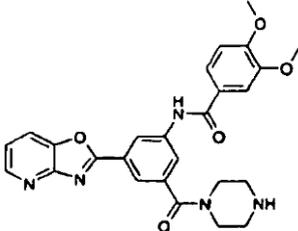
COMPUESTO N.º	ESTRUCTURA	DE <sub>50</sub> EN EL ENSAYO DE MS	VECES DE ACTIVACIÓN POR MS
130		A	B
131		A	A
132		A	A
133		A	B
134		A	B
135		A	B
136		D	C

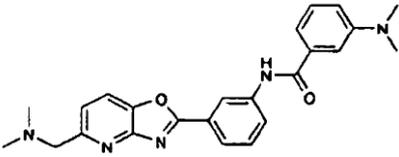
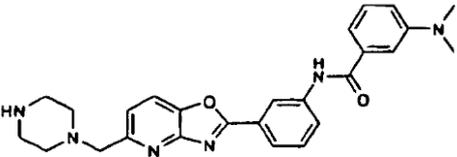
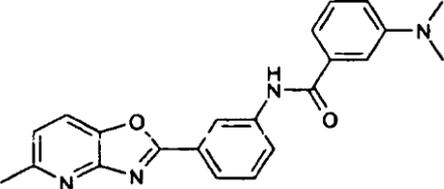
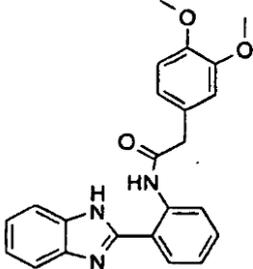
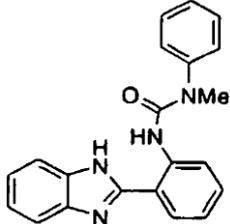
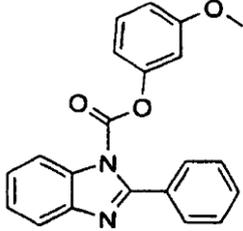
COMPUESTO N.º	ESTRUCTURA	DE <sub>50</sub> EN EL ENSAYO DE MS	VECES DE ACTIVACIÓN POR MS
137		D	NE
138		A	B
139		A	B
140		D	NE
141		A	B
142		A	A

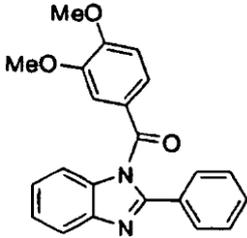
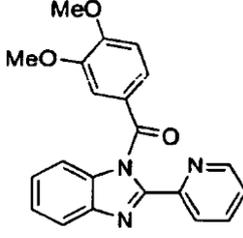
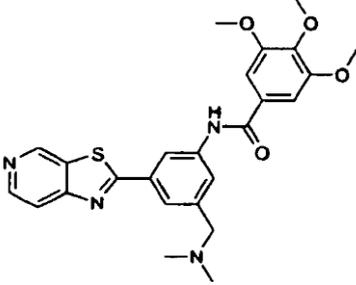
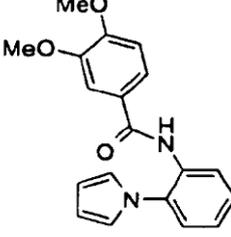
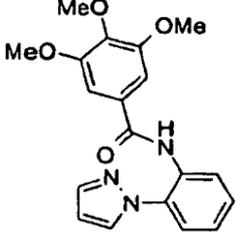
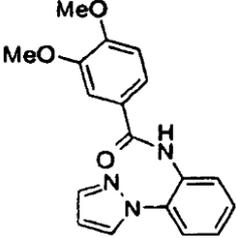
COMPUESTO N.º	ESTRUCTURA	DE <sub>50</sub> EN EL ENSAYO DE MS	VECES DE ACTIVACIÓN POR MS
143		D	NE
144		D	C
145		A	B
146		A	B
147		D	NE
148		D	NE
149		A	B

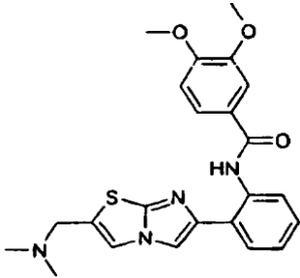
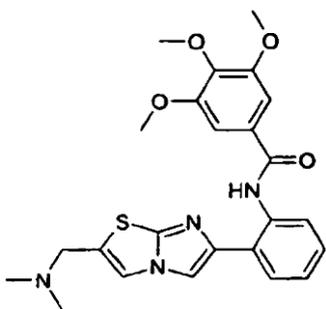
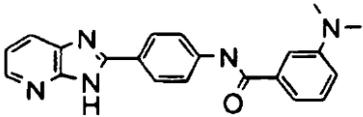
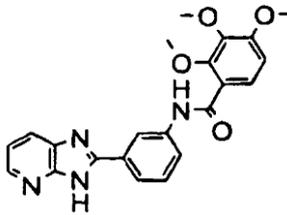
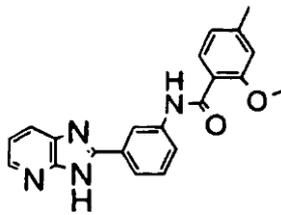
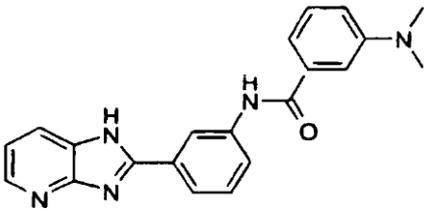
COMPUESTO N.º	ESTRUCTURA	DE <sub>50</sub> EN EL ENSAYO DE MS	VECES DE ACTIVACIÓN POR MS
150		A	B
151		D	C
152		D	C
153		A	B
154		C	A
155		A	B

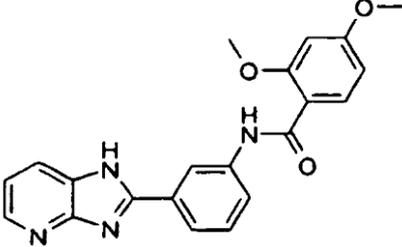
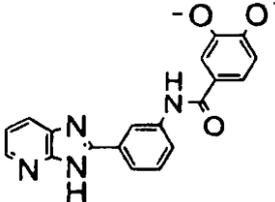
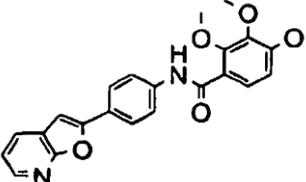
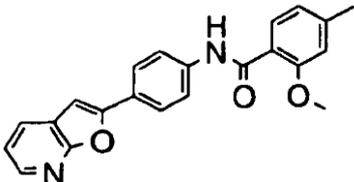
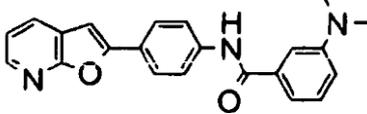
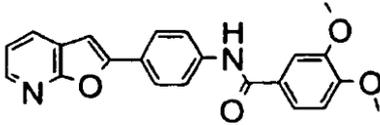
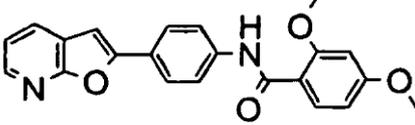
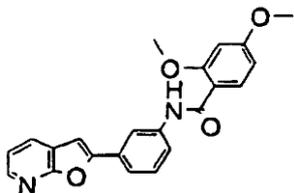
COMPUESTO N.º	ESTRUCTURA	DE <sub>50</sub> EN EL ENSAYO DE MS	VECES DE ACTIVACIÓN POR MS
156		A	B
157		D	B
158		A	B
159		A	B

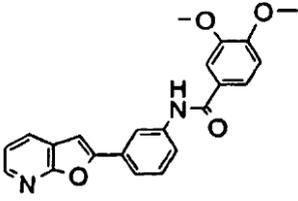
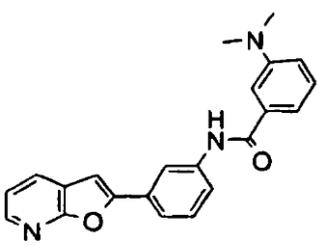
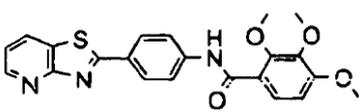
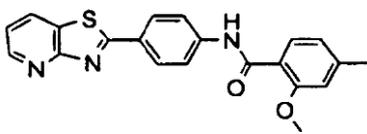
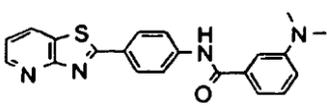
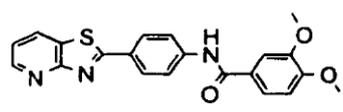
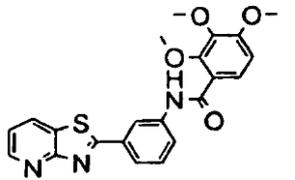
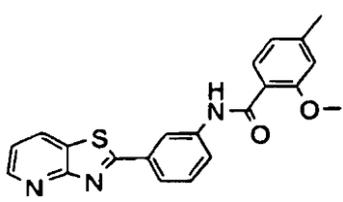
COMPUESTO N.º	ESTRUCTURA	DE <sub>50</sub> EN EL ENSAYO DE MS	VECES DE ACTIVACIÓN POR MS
160		B	A
161		A	A
162		A	B
163		A	B
164		A	B

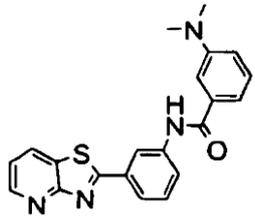
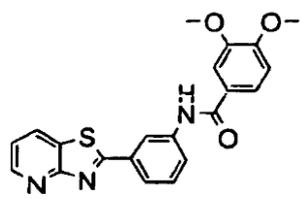
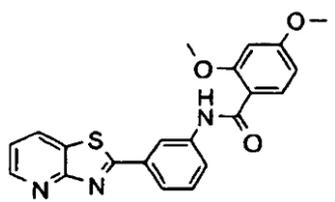
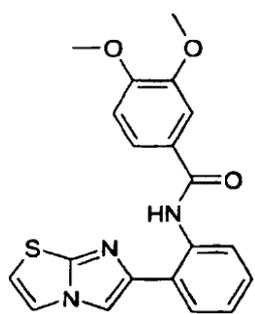
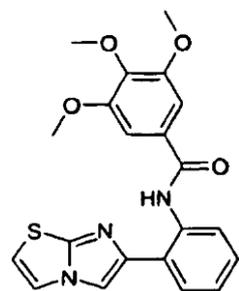
COMPUESTO N.º	ESTRUCTURA	DE <sub>50</sub> EN EL ENSAYO DE MS	VECES DE ACTIVACIÓN POR MS
165		D	A
166		A	B
167		A	B
168		NA	C
169		A	B
171		NA	C

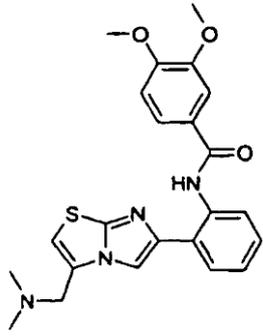
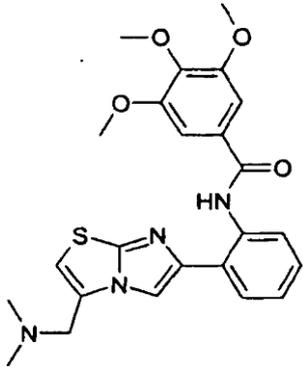
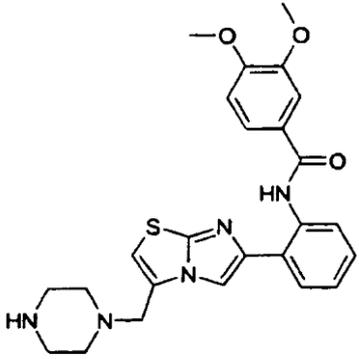
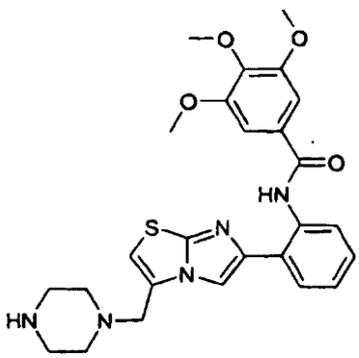
COMPUESTO N.º	ESTRUCTURA	DE <sub>50</sub> EN EL ENSAYO DE MS	VECES DE ACTIVACIÓN POR MS
172		NA	C
173		NA	C
174		B	A
175		B	B
176		B	B
177		D	B

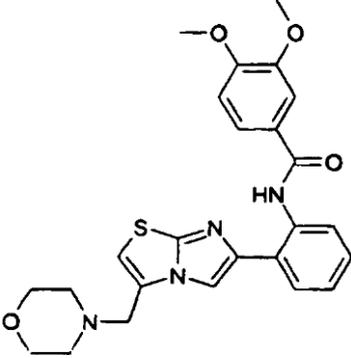
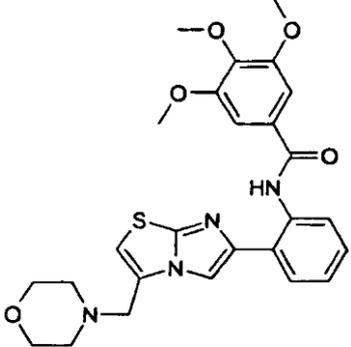
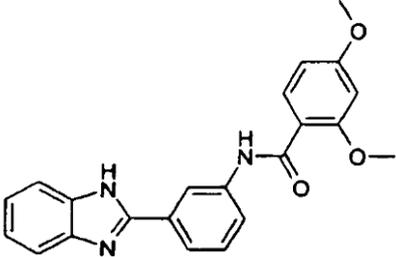
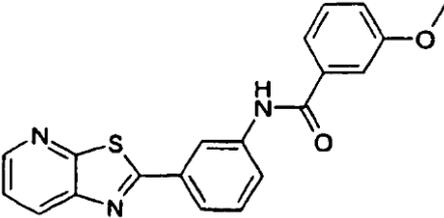
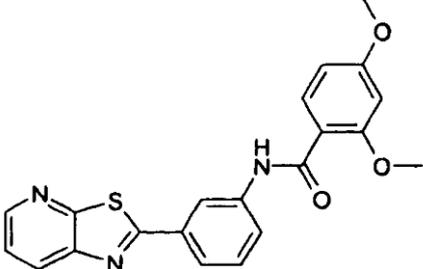
COMPUESTO N.º	ESTRUCTURA	DE <sub>50</sub> EN EL ENSAYO DE MS	VECES DE ACTIVACIÓN POR MS
178		A	A
179		A	A
180		A	B
181		A	A
182		A	A
183		A	A

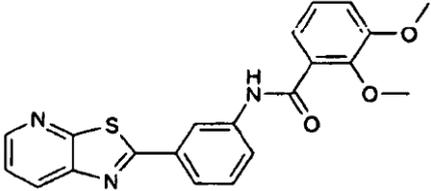
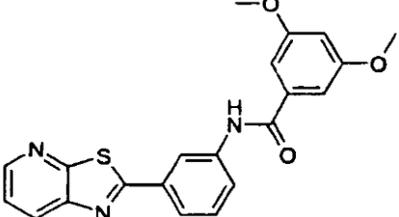
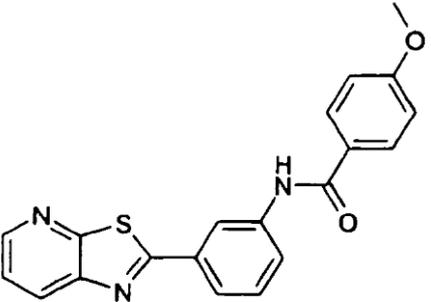
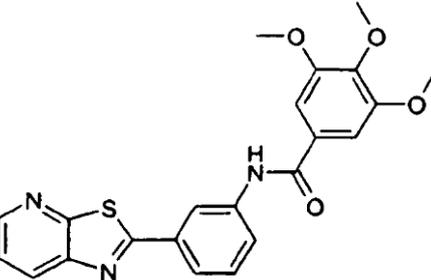
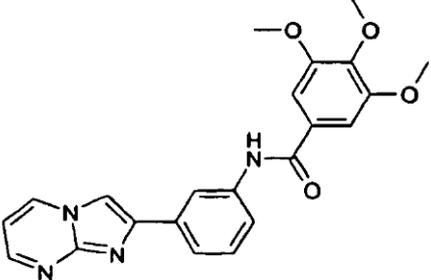
COMPUESTO N.º	ESTRUCTURA	DE <sub>50</sub> EN EL ENSAYO DE MS	VECES DE ACTIVACIÓN POR MS
184		A	B
185		A	A
186		NA	C
187		A	B
188		NA	C
189		NA	C
190		A	B
191		A	B

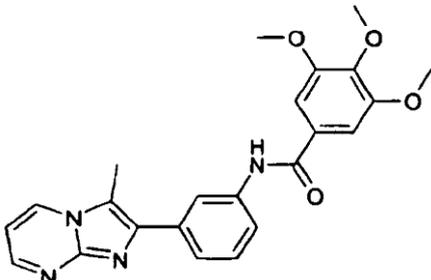
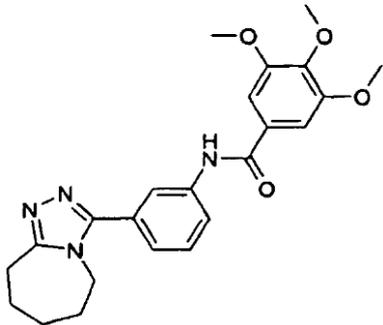
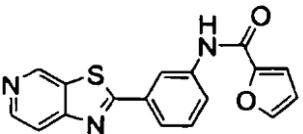
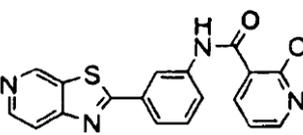
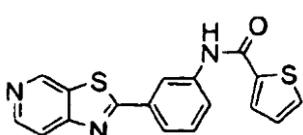
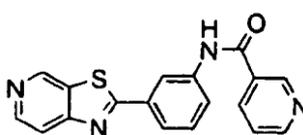
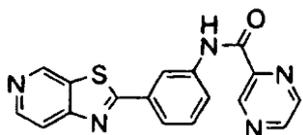
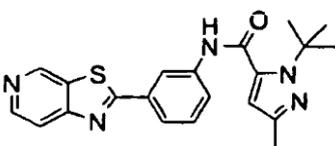
COMPUESTO N.º	ESTRUCTURA	DE <sub>50</sub> EN EL ENSAYO DE MS	VECES DE ACTIVACIÓN POR MS
192		A	B
193		NA	C
194		NA	C
195		NA	C
196		A	B
197		A	B
198		A	B
199		A	B

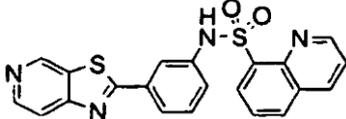
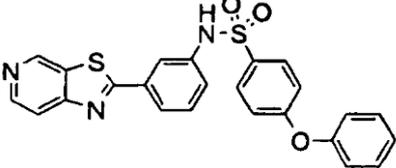
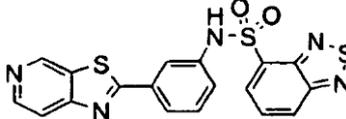
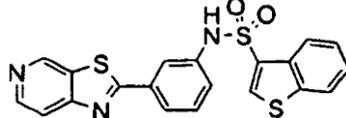
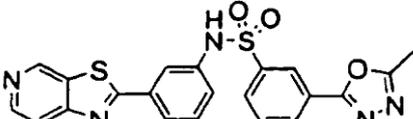
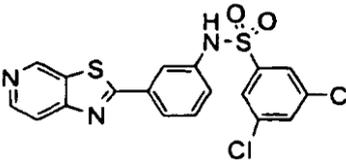
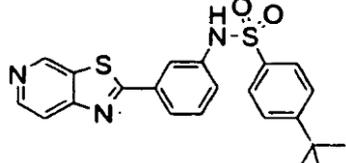
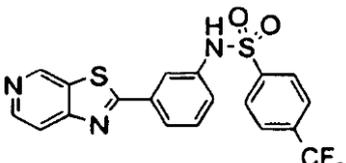
COMPUESTO N.º	ESTRUCTURA	DE <sub>50</sub> EN EL ENSAYO DE MS	VECES DE ACTIVACIÓN POR MS
200		A	B
201		A	B
202		A	B
203		A	B
204		A	A

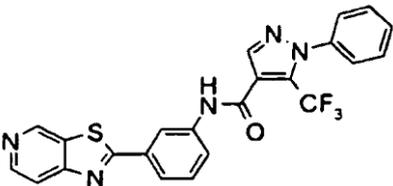
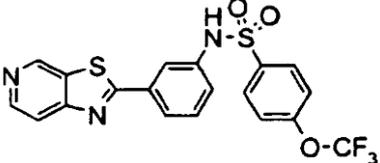
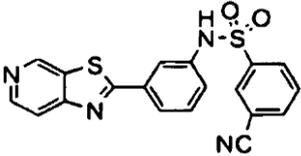
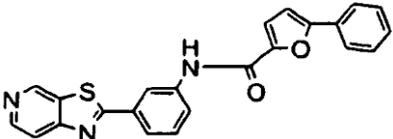
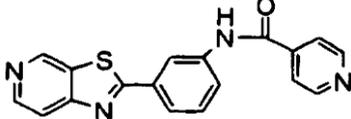
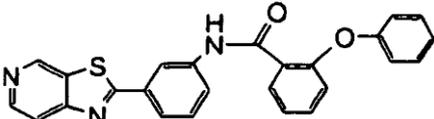
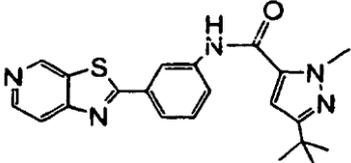
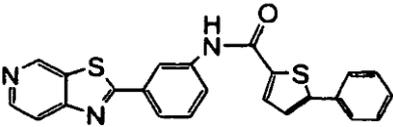
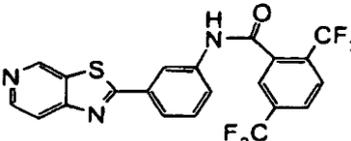
COMPUESTO N.º	ESTRUCTURA	DE <sub>50</sub> EN EL ENSAYO DE MS	VECES DE ACTIVACIÓN POR MS
205		A	A
206		A	A
207		A	A
208		A	A

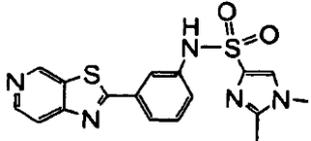
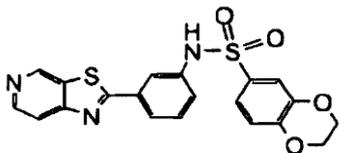
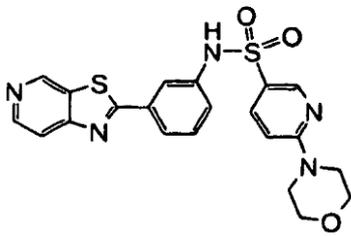
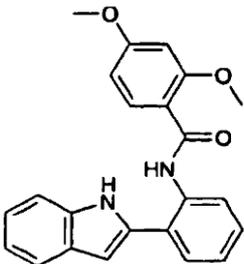
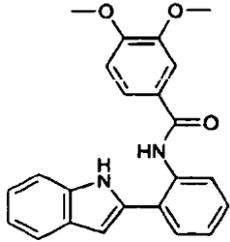
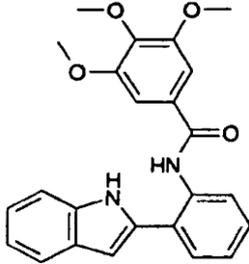
COMPUESTO N.º	ESTRUCTURA	DE <sub>50</sub> EN EL ENSAYO DE MS	VECES DE ACTIVACIÓN POR MS
209		A	A
210		A	B
211		A	B
212		A	B
213		A	B

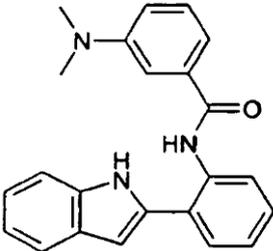
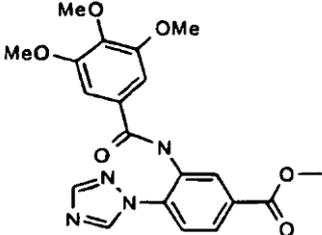
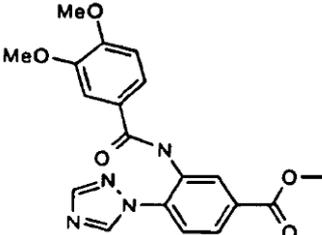
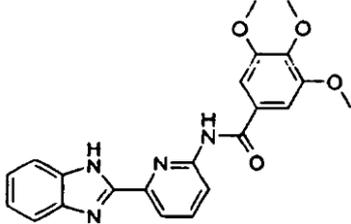
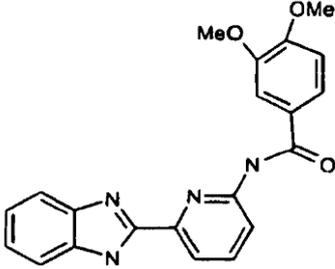
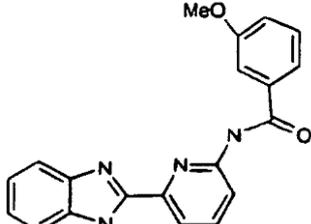
COMPUESTO N.º	ESTRUCTURA	DE <sub>50</sub> EN EL ENSAYO DE MS	VECES DE ACTIVACIÓN POR MS
214		A	B
215		A	B
216		A	B
217		A	A
218		A	A

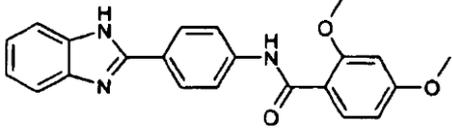
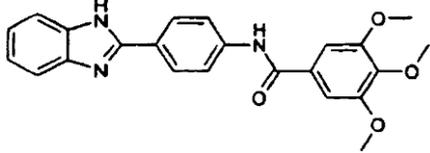
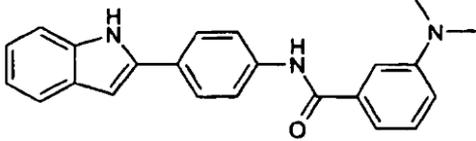
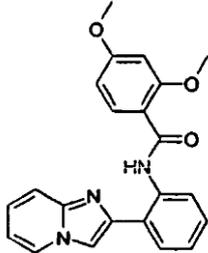
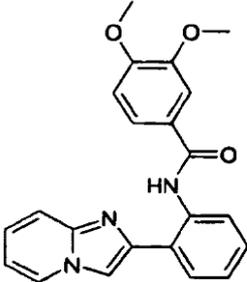
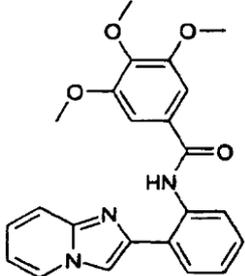
COMPUESTO N.º	ESTRUCTURA	DE <sub>50</sub> EN EL ENSAYO DE MS	VECES DE ACTIVACIÓN POR MS
219		A	A
220		NA	C
221		A	B
222		A	B
223		A	B
225		NA	C
227		NA	C
228		A	A

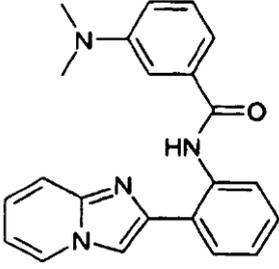
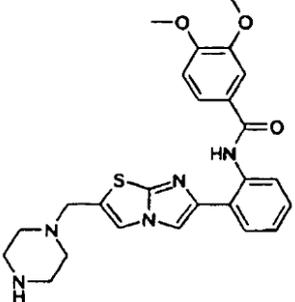
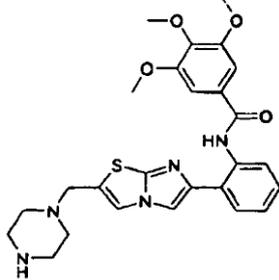
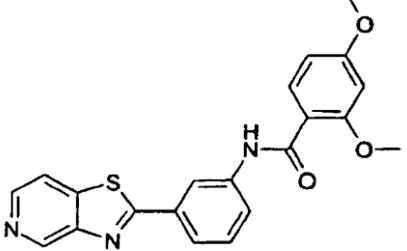
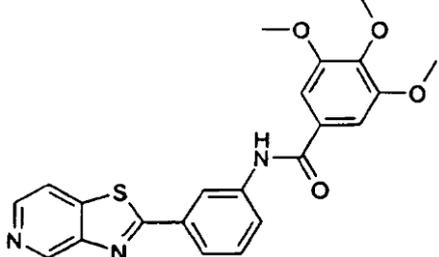
COMPUESTO N.º	ESTRUCTURA	DE <sub>50</sub> EN EL ENSAYO DE MS	VECES DE ACTIVACIÓN POR MS
229		NA	C
230		NA	C
231		NA	C
232		NA	C
234		NA	C
235		NA	C
236		NA	C
237		NA	C

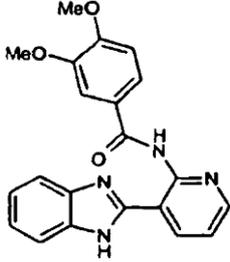
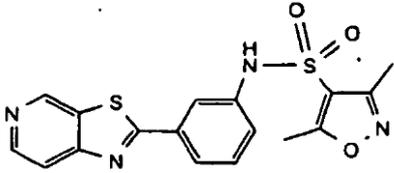
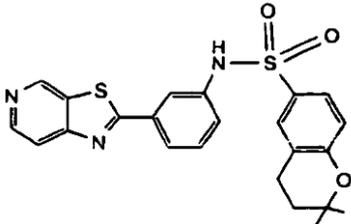
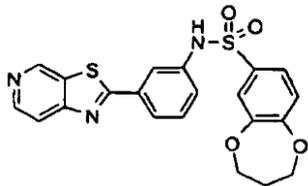
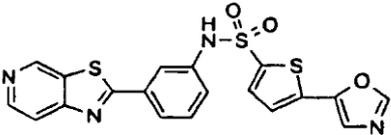
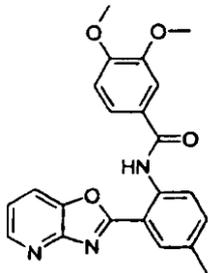
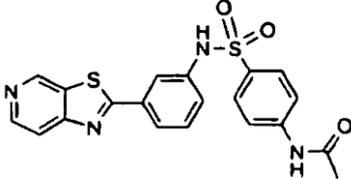
COMPUESTO N.º	ESTRUCTURA	DE <sub>50</sub> EN EL ENSAYO DE MS	VECES DE ACTIVACIÓN POR MS
238		A	B
239		A	B
240		NA	C
241		A	B
244		NA	C
245		A	B
246		A	B
247		NA	C
248		A	B

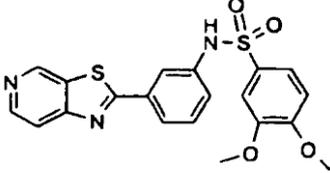
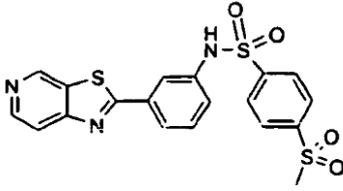
COMPUESTO N.º	ESTRUCTURA	DE <sub>50</sub> EN EL ENSAYO DE MS	VECES DE ACTIVACIÓN POR MS
250		NA	C
251		NA	C
252		NA	C
253		NA	C
254		A	B
255		A	B

COMPUESTO N.º	ESTRUCTURA	DE <sub>50</sub> EN EL ENSAYO DE MS	VECES DE ACTIVACIÓN POR MS
256		NA	C
257		NA	C
258		A	B
259		A	A
260		A	A
261		A	A

COMPUESTO N.º	ESTRUCTURA	DE <sub>50</sub> EN EL ENSAYO DE MS	VECES DE ACTIVACIÓN POR MS
262		A	B
263		A	B
264		A	B
265		A	B
266		A	A
267		A	B

COMPUESTO N.º	ESTRUCTURA	DE <sub>50</sub> EN EL ENSAYO DE MS	VECES DE ACTIVACIÓN POR MS
268		A	B
270		A	A
271		A	A
272		A	B
273		A	A

COMPUESTO N.º	ESTRUCTURA	DE <sub>50</sub> EN EL ENSAYO DE MS	VECES DE ACTIVACIÓN POR MS
276		A	B
282		NA	C
283		NA	C
284		NA	C
285		NA	C
286		NA	C
288		A	B

COMPUESTO N.º	ESTRUCTURA	DE <sub>50</sub> EN EL ENSAYO DE MS	VECES DE ACTIVACIÓN POR MS
289		A	B
290		NA	C

**Ejemplo 8: Ensayo de ATP con células**

Este ejemplo describe el efecto del activador de SIRT1, el resveratrol, sobre la concentración del ATP celular en las células NCI-H358. La concentración del ATP celular es una medición indirecta del índice metabólico celular y, por extensión, del funcionamiento mitocondrial. Como la activación de SIRT1 se ha relacionado con un incremento de la biogénesis mitocondrial *in vivo*, este estudio está diseñado para determinar si el resveratrol incrementa el funcionamiento mitocondrial a partir de las lecturas de la concentración del ATP celular. El ensayo de ATP se combina con un ensayo de la viabilidad celular para normalizar la concentración del ATP celular por las células viables. La concentración de ATP celular se midió con el kit ATPLite 1 Step (Perkin-Elmer) y se midió la viabilidad celular con el colorante permeable celular AlamarBlue™.

- 5 El ensayo de ATP se combina con un ensayo de la viabilidad celular para normalizar la concentración del ATP celular por las células viables. La concentración de ATP celular se midió con el kit ATPLite 1 Step (Perkin-Elmer) y se midió la viabilidad celular con el colorante permeable celular AlamarBlue™.
- 10 El ensayo del ATP celular es un ensayo multiplexado que mide tanto la concentración de ATP como la viabilidad de una muestra celular determinada. Este ensayo se realiza en una placa de ensayo de 96 pocillos y los datos se describen como la [ATP]/viabilidad para cada pocillo de la placa de ensayo.

El kit ATPLite 1 Step™ es un ensayo luminiscente con células en una única etapa para la detección de ATP. El kit contiene una mezcla liofilizada de sustratos, que comprende la D-luciferina y la enzima luciferasa de luciérnaga (*Photinus pyralis*). Adicionalmente, el kit contiene un tampón de reconstitución con detergentes que induce la lisis de las membranas celulares. La luciferasa en la mezcla del ensayo cataliza una reacción entre el ATP celular libre y la D-luciferina para producir bioluminiscencia de acuerdo con la reacción esquemática resumida más abajo. La cantidad de luz es proporcional a la concentración de ATP celular.

El ensayo con AlamarBlue™ es un ensayo en una única etapa que utiliza un colorante permeable para las células que no es tóxico pero sí soluble, y que se añade al medio de crecimiento celular. Este colorante se somete a la reducción electrónica en las células viables pero no en las células muertas. El producto del colorante reducido da una señal fluorescente que se puede monitorizar con un lector de fluorescencia en placas (excitación a 545 nm y emisión a 575 nm). La cantidad de fluorescencia generada en un determinado pocillo es proporcional al número de células viables. La señal de la viabilidad generada en este ensayo se utiliza para normalizar la señal de ATP de los resultados del ensayo con ATPLite 1 Step™.

Preparación de la sustancia problema para el ensayo del ATP celular: se pesó el resveratrol y se colocó en un vial marrón. Se disolvió el material en el vehículo al 100% (DMSO) para producir una concentración final de 10 mM (solución madre). La solución madre se diluyó en serie con DMSO al 100% como se describió en SOP 7.10. Las concentraciones finales del resveratrol en la placa del compuesto fueron 0,008, 0,023, 0,069, 0,206, 0,617, 1,852, 5,556, 16,667, 50 y 150 µM.

Se examinó el efecto del resveratrol sobre la concentración del ATP celular en las células NCI-H358 (100 µl) mediante el ensayo del ATP celular tal y como se ha descrito. El diseño experimental se resume en la figura 11. En este ensayo, se inocularon las células NCI-H358 (obtenidas de la American Tissue Culture Collection, ATCC) en microplacas de 96 pocillos (10<sup>4</sup> células/pocillo). El medio de cultivo para crecimiento de las NCI-H358 consiste en el medio RPMI 1640 complementado con SBF al 10%, estreptomomicina a 100 mg/ml y penicilina a 100 unidades/ml. Se trataron tres réplicas de microplacas de células con 15 µl de 10 concentraciones de resveratrol (0,008, 0,023, 0,069, 0,206, 0,617, 1,852, 5,556, 16,667, 50 y 150 µM) o de 15 µl de vehículo (DMSO; concentración final del 0,5%; 12 replicas por placa). Después de 48 horas de tratamiento con el compuesto en las condiciones de crecimiento celular, se retiraron las placas del incubador y a cada pocillo se le añadieron 15 µl del colorante AlamarBlue™. Se incubaron las microplacas de células con el colorante durante 2 horas en las condiciones de crecimiento, y posteriormente se

5 midió la fluorescencia con un lector de placas. Se retiró el medio que contenía el AlamarBlue™ y se lavaron las placas en 100 µl de PBS por pocillo. Se retiró este lavado y se añadieron 200 µl del reactivo 1 x ATPLite 1 Step a cada pocillo. Luego se midió la luminiscencia con un lector de placas. La señal del ATP para cada pocillo, medida según la detección de la luminiscencia, se normalizó a su correspondiente valor de viabilidad celular, medido por la detección de la fluorescencia, para generar la concentración media de ATP por unidad de células viables (ATP/CélulaV). Luego, la ATP/CélulaV para cada tratamiento se normalizó a la ATP/CélulaV media del vehículo para su microplaca de células correspondiente, lo que produjo la ATP/CélulaV normalizada (ATP/CélulaV norm.). Finalmente, la ATP/CélulaV norm. para cada tratamiento único se promedió por los replicados de las placas, lo que generó la ATP/CélulaV norm. media. Las dosis de resveratrol que incrementan la concentración del ATP celular tiene un valor de ATP/CélulaV normalizados mayor de 1,0. La concentración de resveratrol que da el 50% del incremento máximo en la ATP/CélulaV normalizada (CE<sub>50</sub> del ATP) se determinó mediante el análisis de la curva que mejor se ajusta mediante un modelo de curva sigmoidea de respuesta a la dosis.

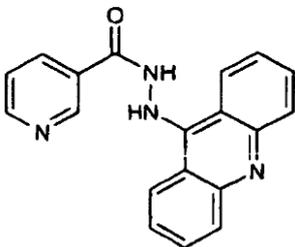
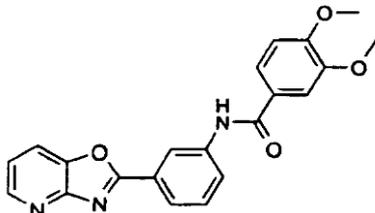
15 Se midió la concentración de ATP de las células tratadas con 10 concentraciones de resveratrol o únicamente vehículo. Cada una de estas concentraciones de ATP estaba normalizada por la viabilidad celular en el correspondiente pocillo de tratamiento, lo que generó el valor de ATP/CélulaV. Posteriormente, cada valor de ATP/CélulaV se normalizó a su valor de ATP/CélulaV media del vehículo para su microplaca de células correspondiente.

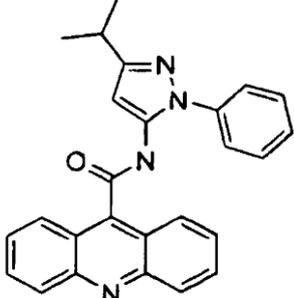
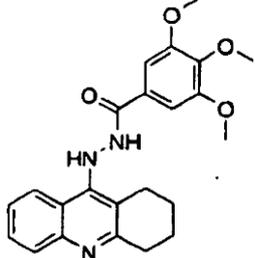
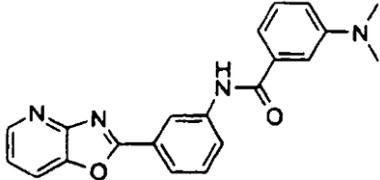
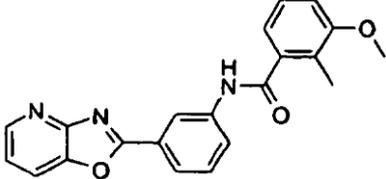
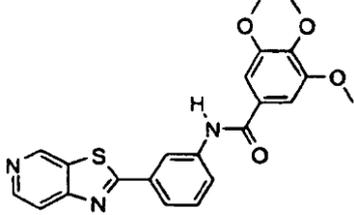
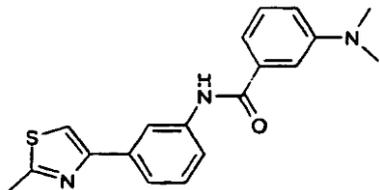
20 Los datos se representan como la ATP/CélulaV normalizada (unidades arbitrarias). La figura 12 muestra la curva sigmoidea de respuesta a la dosis que mejor se ajusta para las 10 concentraciones de resveratrol representadas gráficamente frente a sus correspondientes valores de ATP/CélulaV normalizados. Estos valores representan una media de tres replicas de placas, el resveratrol incrementa la concentración del ATP celular en las células NCI-H358 de una manera dependiente de la dosis. El incremento máximo de la concentración del ATP celular fue de 3,0 veces y se produjo con el tratamiento de resveratrol a 50 µM. Se determinó que la CE<sub>50</sub> del ATP para el resveratrol era de 29 µM.

25 **Ejemplo 9: Escrutinio de compuestos problema en un ensayo de ATP con células**

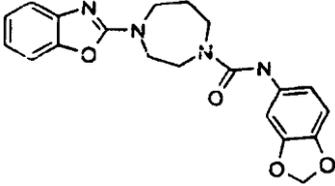
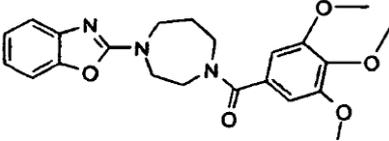
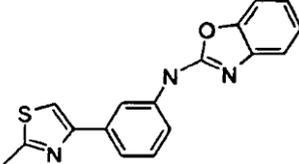
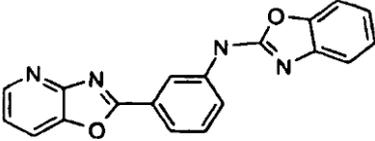
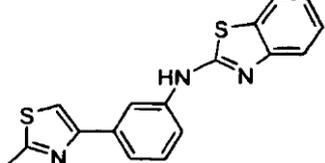
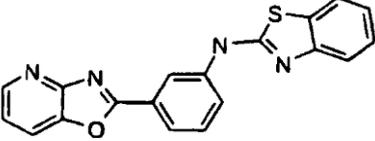
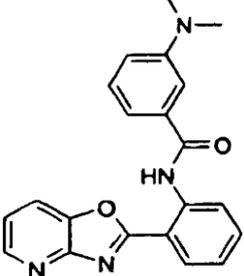
Se escrutaron una serie de compuestos por su efecto sobre la concentración de ATP en el ensayo tal y como se describe en el ejemplo 8. Los resultados se muestran en la tabla 6. Los valores de la DE<sub>50</sub> para los compuestos que subieron la concentración del ATP intracelular se representan mediante A (DE<sub>50</sub> ≤ 50 µM), B (DE<sub>50</sub> = 51-100 µM), C (DE<sub>50</sub> = 101-150 µM) y D (DE<sub>50</sub> ≥ 150 µM). NA significa que el compuesto no se ensayó con la prueba indicada. De igual forma, los valores de la CI<sub>50</sub> para los compuestos que disminuyeron la concentración del ATP intracelular se representan mediante A (CI<sub>50</sub> ≤ 50 µM), B (CI<sub>50</sub> = 51-100 µM), C (CI<sub>50</sub> = 101-150 µM) y D (CI<sub>50</sub> ≥ 150 µM).

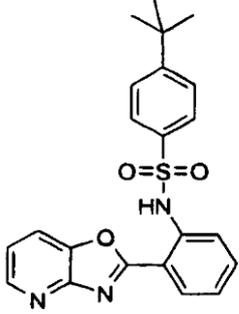
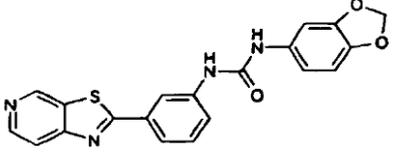
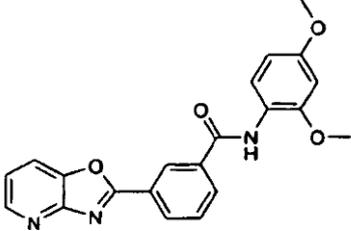
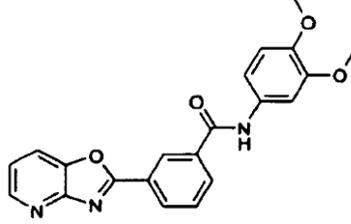
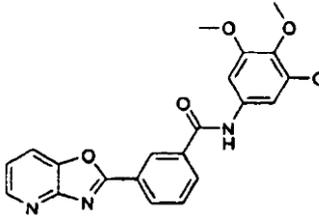
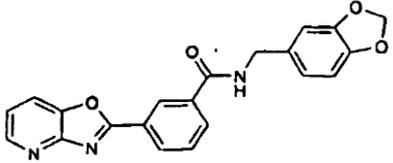
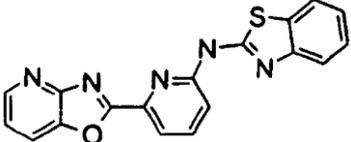
Tabla 6. Valores de DE<sub>50</sub> para los valores de CI<sub>50</sub> para los compuestos que inhiben y activan la sirtuina, respectivamente.

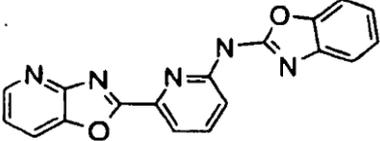
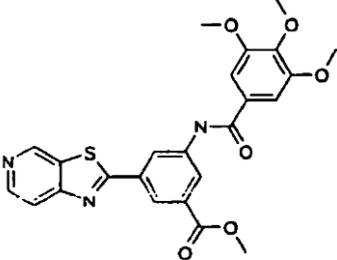
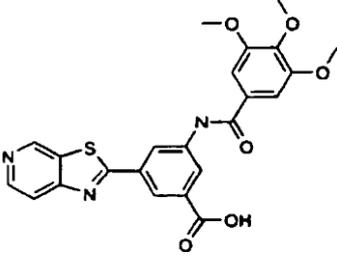
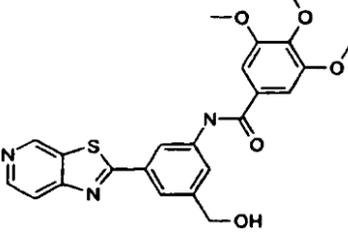
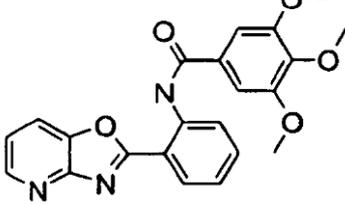
COMPUESTO N.º	ESTRUCTURA	DE <sub>50</sub> DEL ENSAYO DE ATP	CI <sub>50</sub> DEL ENSAYO DE ATP
11		A	
52		A	

COMPUESTO N.º	ESTRUCTURA	DE <sub>50</sub> DEL ENSAYO DE ATP	CI <sub>50</sub> DEL ENSAYO DE ATP
118		D	
120		A	
42		A	
49		A	
115		D	
79		A	

COMPUESTO N.º	ESTRUCTURA	DE <sub>50</sub> DEL ENSAYO DE ATP	CI <sub>50</sub> DEL ENSAYO DE ATP
117			B
120		A	
121		NA	
123		D	
85		NA	
86		A	
87		NA	
88		NA	
89			A

COMPUESTO N.º	ESTRUCTURA	DE <sub>50</sub> DEL ENSAYO DE ATP	CI <sub>50</sub> DEL ENSAYO DE ATP
90		D	
91			A
92			B
93		D	
94		D	
95		NA	
97		A	

COMPUESTO N.º	ESTRUCTURA	DE <sub>50</sub> DEL ENSAYO DE ATP	CI <sub>50</sub> DEL ENSAYO DE ATP
98		NA	
99		A	
100		A	
101		C	
102		A	
103		NA	
104		A	

COMPUESTO N.º	ESTRUCTURA	DE <sub>50</sub> DEL ENSAYO DE ATP	CI <sub>50</sub> DEL ENSAYO DE ATP
105		A	
133		NA	
134		NA	
135		A	
106		A	

**Ejemplo 10: Identificación de líneas celulares capaces de activar la sirtuina**

Se llevaron a cabo experimentos de análisis de inmunotransferencia para identificar las líneas celulares que tenían un nivel de expresión de la SIRT1 endógena relativamente bajo. El objetivo era identificar las líneas celulares en las que la actividad de la SIRT1 no era saturante para que en el ensayo del ATP celular descrito más arriba se pudiera observar un incremento de la actividad de la SIRT1 al exponer las células a un compuesto activador de la sirtuina. El planteamiento opuesto se realizaría para identificar compuestos que inhiben la sirtuina, a saber, se preferirían las células con un alto nivel de expresión de la SIRT1 endógena.

La figura 13 muestra los resultados de un experimento de análisis de inmunotransferencia para determinar el nivel de expresión de SIRT1 en una serie de líneas de células. Se analizaron cantidades iguales de lisados celulares mediante análisis de inmunotransferencia para la expresión de la SIRT1 endógena. En las transferencias se utilizó como sonda un anticuerpo primario policlonal de conejo contra SIRT1 (Abcam, n.º de cat. AB 13749) y uno secundario de cabra anti-IgG de conejo conjugado a HRP (Santa Cruz, n.º de cat. SC-2054). Tal y como se puede

observar, la expresión de SIRT1 varía ampliamente entre las distintas líneas celulares, observándose una expresión máxima en HEK293 y una expresión mínima en las células IMR90 y H358.

La figura 14 muestra los resultados de un experimento de inmunotransferencia para determinar el nivel de expresión de la proteína SIRT1 normalizada por el nivel de expresión de la tubulina en varias líneas celulares. Análisis de inmunotransferencia de un grupo de líneas celulares humanas para estudiar el nivel de expresión de la proteína SIRT1. La expresión de SIRT1 se normalizó por la expresión de la tubulina. Todas las muestras se ensayaron por duplicado. La proteína se cuantificó con anticuerpos secundarios marcados con colorante infrarrojo seguido por la detección de la transferencia con el escáner Licor® Odyssey®. Los anticuerpos primarios utilizados son monoclonales de ratón contra la tubulina  $\alpha$ , (Santa Cruz Biotech, cat. n.º SC -8035) y policlonales de conejo contra SIRT1 (Abcam, cat. n.º AB 13749). El anticuerpo secundario (de cabra) utilizado para la detección de SIRT1 era anti-IgG de conejo conjugado a IRDye 800 (Rockland Immunochemicals, cat. n.º 611-132-122) y para la expresión de la tubulina fue de cabra anti-IgG de ratón con AlexaFluor 680 (Invitrogen cat. n.º A21057).

Las líneas celulares también se analizaron en los ensayos del ATP celular descritos más arriba para identificar las líneas celulares que tenían una cantidad relativamente más baja de mitocondrias y/o de fosforilación oxidativa, de tal modo que sería observable un incremento de la concentración de ATP al exponerlas a un compuesto activador de la sirtuina. Se identificaron las líneas celulares NCI-H358 y MCF7 como líneas de células adecuadas para llevar a cabo los ensayos del ATP celular descritos más arriba. Ambas líneas celulares tenían un nivel endógeno relativamente bajo de expresión de SIRT1 y permitieron observar un incremento de la concentración de ATP al exponerlas a un compuesto que activa la sirtuina.

#### **Ejemplo 11: Correlación del incremento de concentración del ATP con el incremento de la masa mitocondrial**

Se llevaron a cabo análisis de inmunotransferencia para correlacionar la observación de un incremento de la concentración del ATP celular al exponer las células a un compuesto activador de la sirtuina, con un incremento de la masa mitocondrial. Se determinó la concentración de tres marcadores independientes diferentes de la masa mitocondrial mediante análisis de inmunotransferencia después de la exposición de las células al activador de la sirtuina, el resveratrol. El incremento observado de la concentración del ATP celular al tratarlas con el resveratrol se correlacionó con el incremento de la concentración de los biomarcadores de la masa mitocondrial.

La figura 15 muestra los resultados de un experimento de inmunotransferencia para determinar la concentración de varios biomarcadores de la masa mitocondrial después de exponer las células a diferentes concentraciones de resveratrol. Se trataron células NCI-H538 durante 48 horas con resveratrol a 0, 1, 10 o 100  $\mu$ M. Luego se prepararon lisados celulares y se cuantificaron las proteínas mitocondriales específicas mediante el análisis de inmunotransferencia con anticuerpos específicos contra las proteínas siguientes: succinato-ubiquinol oxidoreductasa (proteína del complejo mitocondrial II, monoclonal de ratón, Invitrogen, cat. n.º A11142); ATP sintasa F1 F0 (proteína del complejo mitocondrial V, monoclonal de ratón, Invitrogen, cat. n.º A21350); NADH-ubiquinol oxidoreductasa (proteína del complejo mitocondrial I, monoclonal de ratón, Invitrogen, cat. n.º A21344). La normalización se realizó con la tubulina  $\alpha$  mediante un policlonal de conejo (Santa Cruz Biotech, cat. n.º SC -9104). El anticuerpo secundario (de cabra) utilizado para la detección de cada proteína fue anti-IgG de conejo conjugado con AlexaFluor 680 (Rockland Immunochemicals, cat. n.º 610-132-121) y para la expresión de la tubulina fue el anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón con IRDye 800 (Invitrogen, cat. n.º A21076). Se realizó la cuantificación de las proteínas con anticuerpos secundarios marcados con colorante infrarrojo seguida del escaneo de la transferencia con el escáner Licor® Odyssey®.

#### **Ejemplo 12: Ensayo alternativo por espectrometría de masas de la actividad de la sirtuina**

El siguiente ejemplo describe un ensayo alternativo por espectrometría de masas para determinar la actividad desacetilasa de Sirt1. En vez de basarse en la enzima recombinante o purificada, la reacción utiliza la enzima Sirt1 endógena de extractos de células o de tejidos. Esto permite determinar la actividad de la sirtuina endógena. Las células o los tejidos se pueden tratar antes con moduladores de Sirt1 u otros compuestos de control, bien después del aislamiento o bien después de la intervención farmacológica *in vivo*. Alternativamente, esta medición de la actividad de la sirtuina endógena se puede medir en diferentes muestras clínicas después de la manipulación fisiológica (dieta, ejercicio, edad, progresión de la enfermedad, etc.) o después de la intervención farmacológica, que incluye estudios diseñados para estudiar la capacidad de respuesta a la dosis y el escalonamiento, el control de vehículo o con placebo, la posología de la dosis, la politerapia y la sinergia, etc.

Se da a conocer un procedimiento para aislar glóbulos blancos (GB) viables (vivos) (también llamados «células mononucleares de la sangre periférica») de la sangre completa. Este procedimiento parte de aproximadamente 6 ml de sangre completa (formato Vacutainer). Este es el contenido de un tubo estándar (tubos de preparación de células Vacutainer™ CPT™ de Becton Dickinson con heparina de sodio, cat. n.º 362753). Mezclar 10 veces la sangre antes de centrifugarla suavemente por inversión del tubo hacia arriba y abajo. Centrifugar los tubos CPT 20 minutos a 1700 RCF (3100 RPM) a temperatura ambiente (18-25 °C) sin freno. Abrir el tubo CPT y retirar el plasma (4 ml) sin alterar la fase celular. Conservar el plasma si fuera necesario. Retirar la fase celular (unos 2 ml, que contienen glóbulos blancos, plaquetas y algo de plasma) con una pipeta Pasteur (de transferencia) de plástico y transferir esta fase a un tubo Falcon cónico de 15 ml. Añadir disolución salina tamponada con fosfato (PBS) a las células para

llevar el volumen a 13 ml. Mezclar cuidadosamente el tubo por inversión. Centrifugar el tubo cónico de 15 ml a 300 RCF (1200 rpm) durante 15 minutos a temperatura ambiente (18-25 °C, sin freno). Aspirar el sobrenadante (PBS, plaquetas y algo de plasma) sin alterar el sedimento celular, y volver a suspender el sedimento celular (glóbulos blancos) en el resto de PBS (unos 200 µl). Añadir PBS a la suspensión celular restante para llevar el volumen a 13 ml, mezclar cuidadosamente el tubo por inversión. Centrifugar a temperatura ambiente a 300 RCF (1200 rpm) durante 15 minutos a temperatura ambiente (18-25 °C, sin freno). Aspirar el sobrenadante sin alterar el sedimento celular y volver a suspender el sedimento celular en el resto de PBS (unos 200 µl). Añadir PBS a la suspensión celular restante para conseguir un volumen de 10 ml, mezclar cuidadosamente el tubo por inversión. Centrifugar a temperatura ambiente a 300 RCF (1200 rpm) durante 15 minutos a temperatura ambiente (18-25 °C, sin freno). Aspirar el sobrenadante sin alterar el sedimento celular. A partir de este punto, mantener las células en hielo.

Añadir 1 ml de medio de congelación sin SBF (medio RPMI 1640 con L-glutamina; DMSO [sulfóxido de dimetilo], final del 10% [vol:vol]) al sedimento celular restante y resuspender las células con suavidad. Para algunos usos en los que las proteínas plasmáticas no interfieren con el ensayo, p. ej., para la cuantificación del ADNmt (pero NO para la medición de la actividad de CS), se puede resuspender el sedimento de glóbulos blancos y congelarlo en un medio de congelación con SBF (medio RPMI 1640 con L-glutamina; DMSO [sulfóxido de dimetilo], final del 10% [vol:vol]; SBF [suero bovino fetal], inactivado por calor 30 minutos a 56 °C, final del 20% [vol:vol]). Cuando se congela, las proteínas plasmáticas ayudan a mantener la integridad celular. Una vez que el medio de congelación se añade a las células, debe permanecer en hielo húmedo durante el resto del procedimiento y se debe congelar lo antes posible. Transferir la suspensión celular a crioviales (2 alícuotas de 0,5 ml por muestra). Congelar los crioviales colocándolos en un congelador a -80 °C. Mantener las muestras de glóbulos blancos a -80 °C hasta su utilización. Unos 6 ml de sangre dan aproximadamente 10 millones de glóbulos blancos, que contienen unos 4 µg de ARN total, 40 µg de proteínas celulares totales y 0,15 ng de la proteína SIRT1.

De 600 a 800 millones de glóbulos blancos que corresponden aproximadamente a 0,26 nM de SIRT1 en 20 µl de lisado final se utilizan en un experimento de referencia para medir la actividad de SIRT1 con cinco puntos de tiempo por triplicado para dos series dadas de experimentos. La cantidad de SIRT1 en cada preparación se determina inicialmente mediante análisis de inmunotransferencia con diferentes cantidades de glóbulos blancos con un estándar de SIRT1 determinado (SIRT1 purificada, de expresión bacteriana).

Los glóbulos blancos se descongelan y se recogen en un único tubo Falcon de 15 ml a 4 °C. El tampón de ensayo consiste en tampón de reacción a 10x, DTT a 5 mM y SAB al 0,05%. El tampón de reacción se prepara como una solución madre a 10x y consiste en Tris HCl a 500 mM, pH 8,0, NaCl a 1370 mM, KCl a 27 mM y MgCl<sub>2</sub> a 10 mM. El tampón se conserva a temperatura ambiente. Antes de su uso, el tampón del ensayo final se enfría a 4 °C. Se añaden 700 µl del tampón de ensayo a los glóbulos blancos recogidos y se mezclan con suavidad. Se sonicen las células en hielo durante dos minutos con intervalos (sonicación de 15 segundos, pausa de 30 segundos) a un nivel de potencia de salida de 1,5 con una sonda de sonicación pequeña (sonicador Virsonic). Las células sonicadas se centrifugan durante 5 minutos a 3000 rpm y se retira el sobrenadante (citado como «lisado») para su uso posterior en el ensayo de actividad.

Alternativamente se pueden preparar los lisados a partir de tejido, tal como hígado, grasa o músculo. Típicamente, de dos a seis trozos de un hígado (unos 500 mg) o dos trozos de músculo (unos 180 mg) que corresponden a aproximadamente 0,26 nM de SIRT1 en 20 µl de lisado final se utilizan en un experimento de referencia para medir la actividad de SIRT1 con cinco puntos de tiempo por triplicado para dos conjuntos dados de experimentos. De nuevo se determina la cantidad de SIRT1 en cada preparación inicialmente mediante un análisis de inmunotransferencia con cantidades diferentes de lisados de hígado o lisados musculares de ratón con una referencia de SIRT1 determinada (SIRT1 purificada, de expresión bacteriana). Se añaden 700 µl del tampón de ensayo a los tejidos recogidos y se mezcla con suavidad. A continuación, estos tejidos se homogenizan en hielo utilizando un Polytron durante 20 segundos a la velocidad máxima (Omni International GLH). Se centrifugan los tejidos homogenizados durante 5 minutos a 13 000 rpm y se retira el sobrenadante (al que se denomina «lisado») para su uso posterior en el ensayo de la actividad.

Finalmente, se pueden preparar también los lisados a partir de líneas celulares, tal como las procedentes de hígado, músculo, grasa, etc. Lo siguiente describe la preparación de lisados de la línea celular de mioblastos C2C12. Los mioblastos se hacen crecer hasta una confluencia del 80% y se recogen con TrypLE (Invitrogen), luego se lavan dos veces con tampón PBS (Invitrogen) y se conservan a -80 °C hasta su uso. Un sedimento celular de mioblastos C2C12 de aproximadamente 100 a 200 mg que corresponde a aproximadamente 0,26 nM de SIRT1 en 20 µl del lisado final se utiliza para un experimento de referencia para medir la actividad de SIRT1 con cinco puntos de tiempo por triplicado para dos conjuntos dados de experimentos. Se determina la cantidad de SIRT1 en cada preparación inicialmente mediante análisis de inmunotransferencia con diferentes cantidades de células con una referencia de SIRT1 determinada (SIRT1 purificada, de expresión bacteriana). Se añaden 700 µl del tampón de ensayo a los mioblastos recogidos y se mezcla con suavidad. A continuación, estas células se tratan con ultrasonidos en hielo durante 2 minutos con intervalos (sonicación de 15 segundos, pausa de 30 segundos) a un nivel de salida de potencia de 1,5 con una sonda pequeña de sonicador (sonicador Virsonic). Se centrifugan las células sonicadas durante 5 minutos a 3000 rpm y se retira el sobrenadante (al que se denomina «lisado») para su uso posterior en el ensayo de la actividad. Típicamente, se toman 20 µl del lisado para un pocillo de una placa de 96 pocillos con un

volumen de reacción total final de 100  $\mu$ l.

5 Típicamente, se toman 20  $\mu$ l del lisado para un pocillo de una placa de 96 pocillos con un volumen de reacción total final de 100  $\mu$ l. Se añade 1  $\mu$ l de DMSO a cada pocillo para dar una concentración final del 1%. Se añaden 29  $\mu$ l del tampón de ensayo a un volumen inicial de 50  $\mu$ l. Se añade el tampón de parada (ácido tricloroacético al 10% y nicotinamida a 500 mM) a los pocillos designados al punto de tiempo 0. Se comienza el ensayo de actividad añadiendo 50  $\mu$ l del tampón del sustrato a cada pocillo. El tampón del sustrato consiste en el péptido Tamra a 20  $\mu$ M Ac-Glu-Glu-Lys(Biotin)-Gly-Gln-Ser-Thr-Ser-Ser-His-Ser-Lys(Ac)-Nle-Ser-Thr-Glu- Gly-Lys(5TMR)-Glu-Glu-NH<sub>2</sub> (SEQ ID n.º 34) en el que K(Ac) es un resto de lisina acetilado y Nle es una norleucina. El péptido se marca con el fluoróforo 5TMR (excitación a 540 nm/emisión a 580 nm) en el extremo carboxilo para su uso en el ensayo de FP descrito más arriba. Se prepara el sustrato peptídico como una solución madre a 1 mM en agua destilada y se conserva en alícuotas a -20 °C), DTT a 5 mM, SAB al 0,05%, NAD<sup>+</sup> a 4 mM y el tampón de reacción a 10x. Se realiza la reacción a temperatura ambiente. Para cada punto de tiempo, la reacción se parará con el tampón de parada. Después de recoger el último punto de tiempo, se sellan las placas y se analizan mediante espectrometría de masas.

15 Como controles, también se incluyen en el ensayo los inhibidores específicos de HDAC y SIRT1. Se ajustan los volúmenes del lisado de acuerdo con la cantidad necesaria para este ensayo de inhibición. Se utilizan los inhibidores siguientes con sus respectivas concentraciones finales: 6-cloro-2,3,4,9-tetrahidro-1-H-carbazol-1-carboxamida (5  $\mu$ M), TSA (1  $\mu$ M) y nicotinamida (5 mM). La 6-cloro-2,3,4,9-tetrahidro-1-H-carbazol-1-carboxamida y el TSA se preparan en DMSO. Las preparaciones de nicotinamida se realizan en agua. La concentración final de DMSO en cada pocillo es del 1%. Se añade 1  $\mu$ l de DMSO a los pocillos que contienen de inhibidor la nicotinamida. Las reacciones se llevan a cabo por duplicado durante un periodo de tiempo de 90 a 120 minutos y se toman al menos 5 puntos de tiempo.

25 Las placas de ensayo de transfieren a BioTrove, Inc. (Woburn, MA) en hielo seco para el análisis de espectrometría de masas. Se analizan las reacciones descongeladas con una HPLC Agilent 1100 con un automuestreador de microplacas conectado en serie con un espectrómetro de masas Sciex API-4000. Se ha incorporado el equipo correspondiente (desarrollado por BioTrove, Inc) en este sistema LC-MS para permitir la toma de muestras rápida y la limpieza de muestras rápida (de 4 a 5 s por pocillo). Tanto el sustrato como el producto se rastrean en la MS y se devuelven en unidades arbitrarias tanto el área bajo la curva de la MS del producto como la del sustrato.

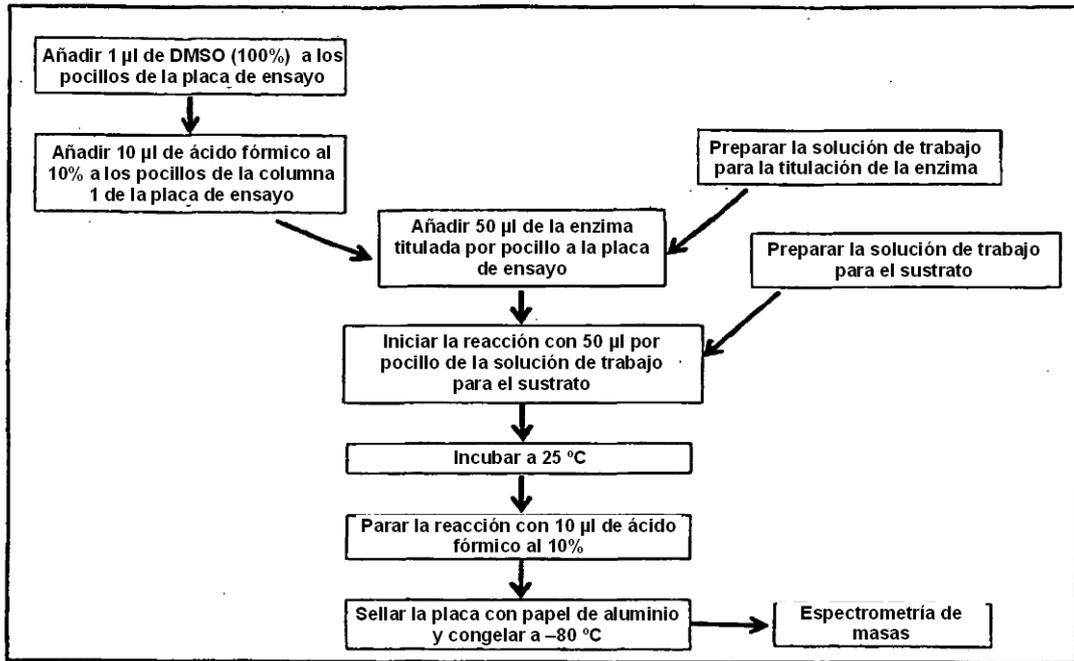
30 Con el uso de Microsoft Excel se representa gráficamente el producto en el eje x y el tiempo de reacción en el eje y en una nube de puntos xy. La reacción se lleva a cabo en condiciones saturantes de sustrato que libra un recambio máximo de sustrato en producto durante un periodo de tiempo fijo, necesario para detectar la actividad de SIRT1. La lectura final será un número/pendiente que describe la acumulación del producto/(tiempo  $\cdot$  ng de la enzima). La inhibición de la actividad enzimática de SIRT1 da lugar a unos rendimientos bajos del producto que permiten la diferenciación entre las HDAC y SIRT1.

35 Las figuras 16A y 16B muestran los resultados de la actividad de la sirtuina en los lisados celulares según se determinó por espectrometría de masas. La figura 16A muestra la actividad de la sirtuina en los lisados de células C2C12 que se pretrataron como se indicó, y la figura 16B muestra la actividad de la sirtuina en los lisados de glóbulos blancos periféricos humanos que se pretrataron como se indicó.

40 Cualesquiera secuencias polinucleotídicas y polipeptídicas que referencian un número de acceso se corresponden con una entrada en una base de datos pública, tal como las mantenidas por el Instituto para la Investigación Genómica (TIGR, por su nombre en inglés) ([www.tigr.org](http://www.tigr.org)) y/o el Centro Estadounidense para Información Biotecnológica (NCBI, por su nombre en inglés) ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para identificar un compuesto que activa una sirtuina, que comprende:
- 5 poner en contacto un conjunto de sustratos peptídicos con una sirtuina en presencia de un compuesto problema, en el que la concentración del sustrato peptídico en el conjunto de sustratos peptídicos está por debajo de la  $K_m$  de la sirtuina para el sustrato peptídico, y en el que los miembros de dicho conjunto de sustratos peptídicos comprenden al menos un resto de lisina acetilado, y
- 10 determinar el nivel de acetilación del conjunto de sustratos peptídicos mediante espectrometría de masas, en el que una reducción del nivel de acetilación del conjunto de sustratos peptídicos en presencia del compuesto problema, en comparación con una reacción de control en la que el compuesto problema no está incluido, es indicativa de un compuesto que activa una sirtuina.
2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el compuesto es una molécula pequeña.
3. Procedimiento para determinar la actividad desacetilasa de una sirtuina, que comprende:
- 15 (a) poner en contacto un conjunto de sustratos peptídicos con una sirtuina, en el que la concentración del sustrato peptídico en el conjunto de sustratos peptídicos está por debajo de la  $K_m$  de la sirtuina para el sustrato peptídico, y en el que los miembros de dicho conjunto de sustratos peptídicos comprenden al menos un resto de lisina acetilado; y
- (b) determinar el nivel de acetilación del conjunto de sustratos peptídicos mediante espectrometría de masas, en el que una reducción del nivel de acetilación del conjunto de sustratos peptídicos es indicativa de actividad desacetilasa de la sirtuina.
- 20 4. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la concentración del sustrato peptídico en el conjunto de sustratos peptídicos está al menos 2 veces por debajo de la  $K_m$  de la desacetilasa para el sustrato peptídico.
5. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la concentración del sustrato peptídico en el conjunto de sustratos peptídicos está al menos 10 veces por debajo de la  $K_m$  de la desacetilasa para el sustrato peptídico.
- 25 6. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que además comprende la determinación de la  $K_m$  de la desacetilasa para el conjunto de sustratos peptídicos.
7. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que se realiza en un formato de alto rendimiento.
- 30 8. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 3, en el que la secuencia del sustrato peptídico procede de p53.
9. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el conjunto de sustratos peptídicos comprende una única especie de péptido.
- 35 10. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el conjunto de sustratos peptídicos comprende una mezcla de dos o más péptidos.
11. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 3, en el que la sirtuina es una proteína SIRT1.
12. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que se identifica un compuesto que activa una sirtuina en mayor grado que el resveratrol.
- 40 13. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 12, en el que se identifica un compuesto que tiene actividad activadora de la sirtuina al menos 5 veces mayor que la actividad activadora de la sirtuina del resveratrol.
14. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la espectrometría de masas es espectrometría de masas por ionización por electronebulización (ESI) o espectrometría de masas por desorción e ionización por láser asistida por una matriz (MALDI).
- 45 15. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la reacción de control incluye un compuesto que tiene un efecto conocido sobre la actividad desacetilasa.



**FIG. 1**

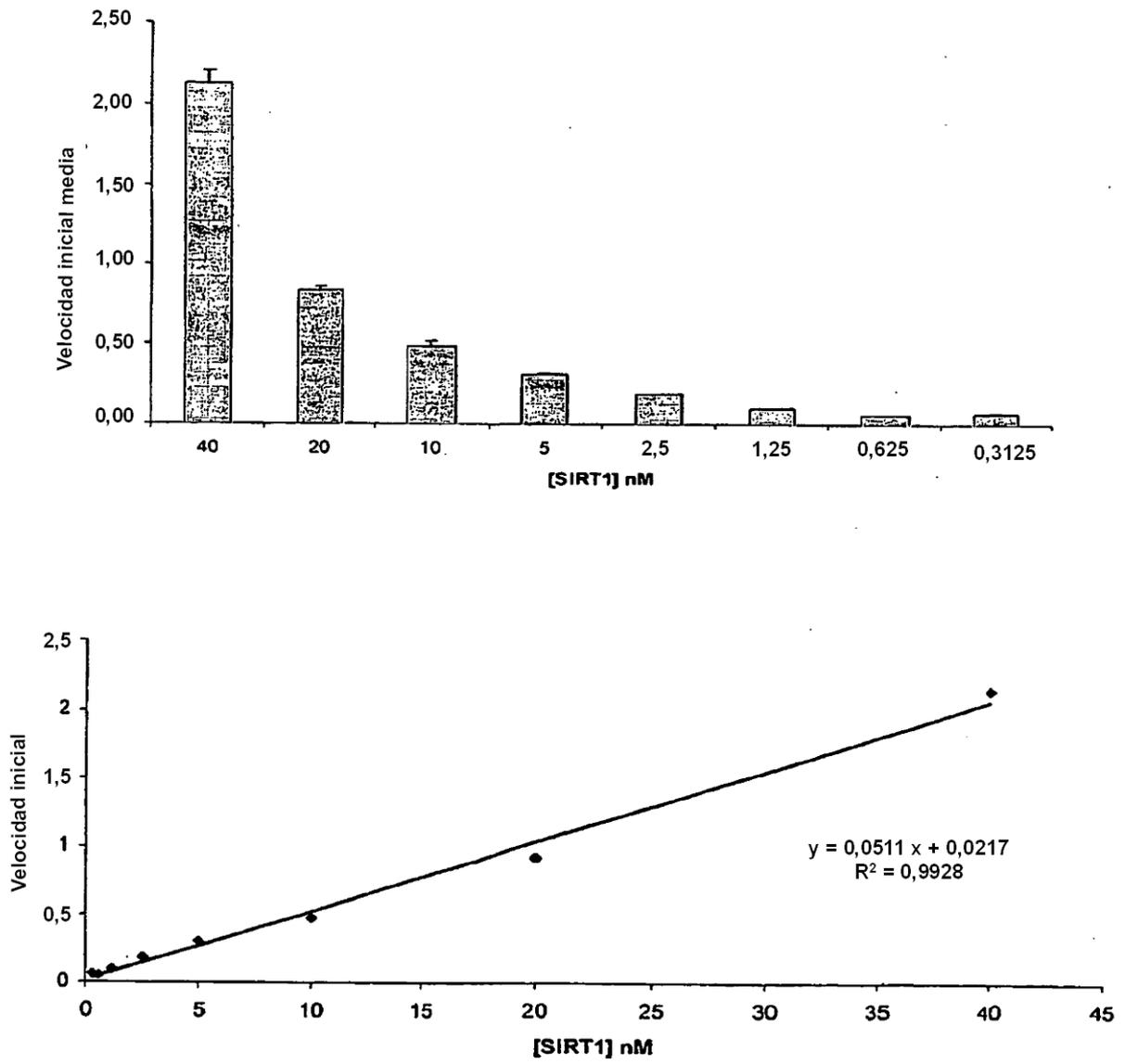
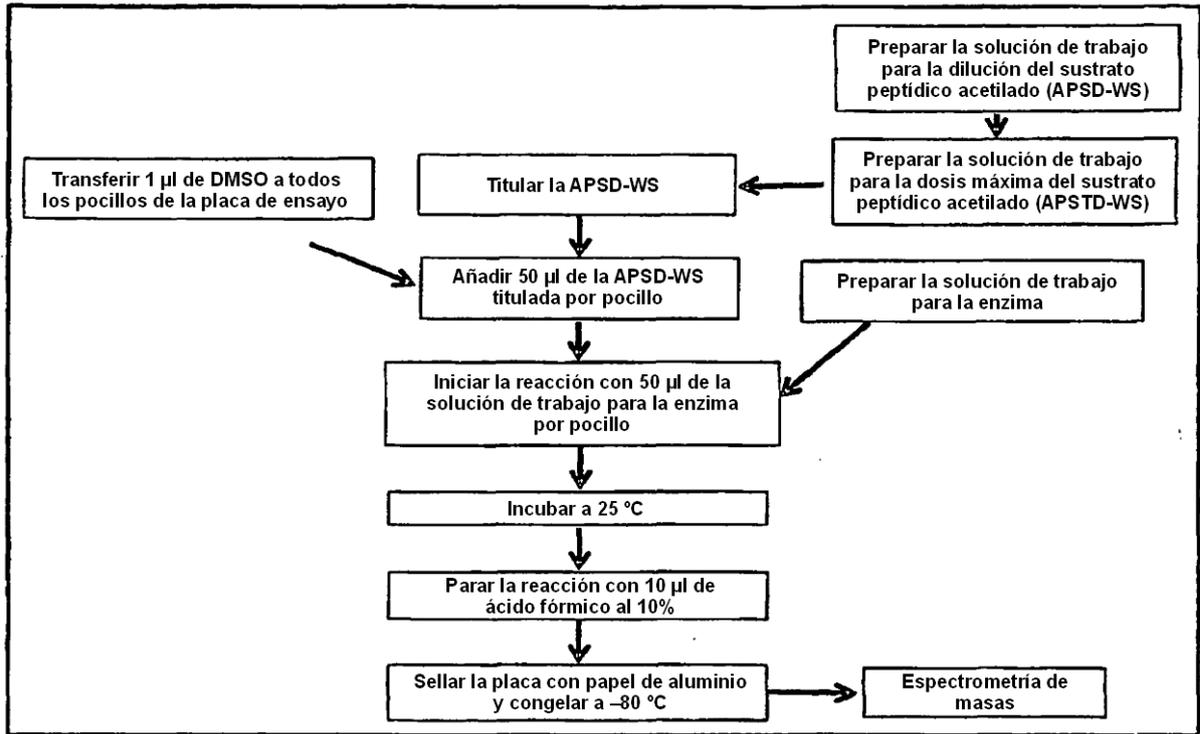
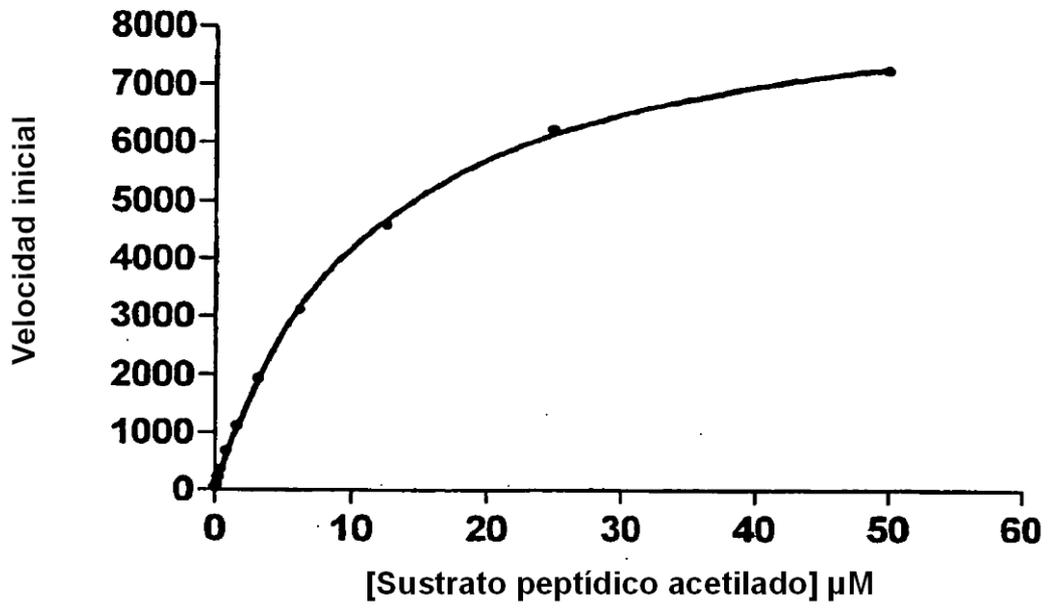


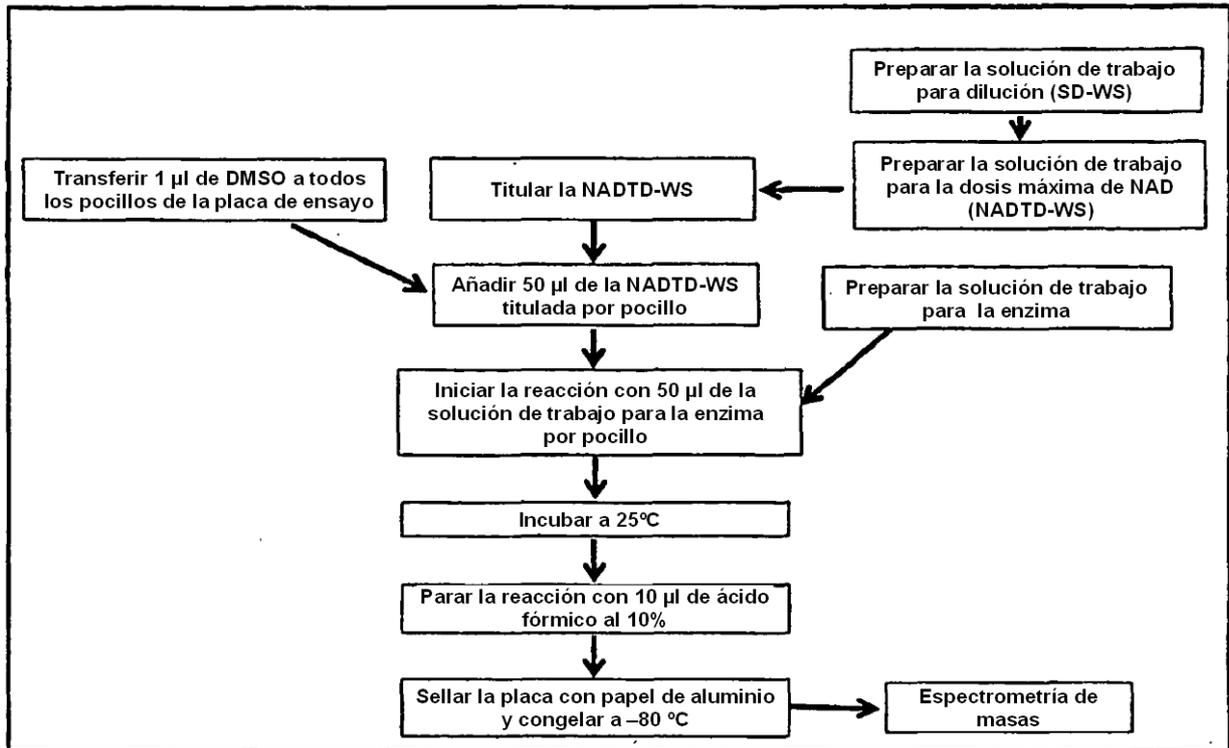
FIG. 2



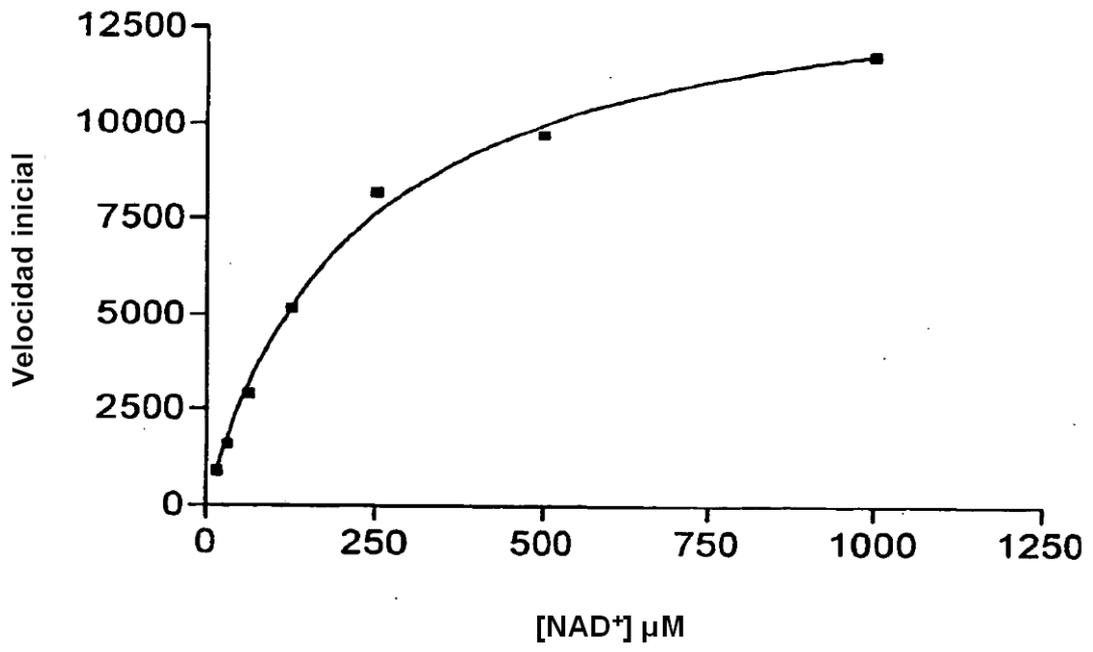
**FIG. 3**



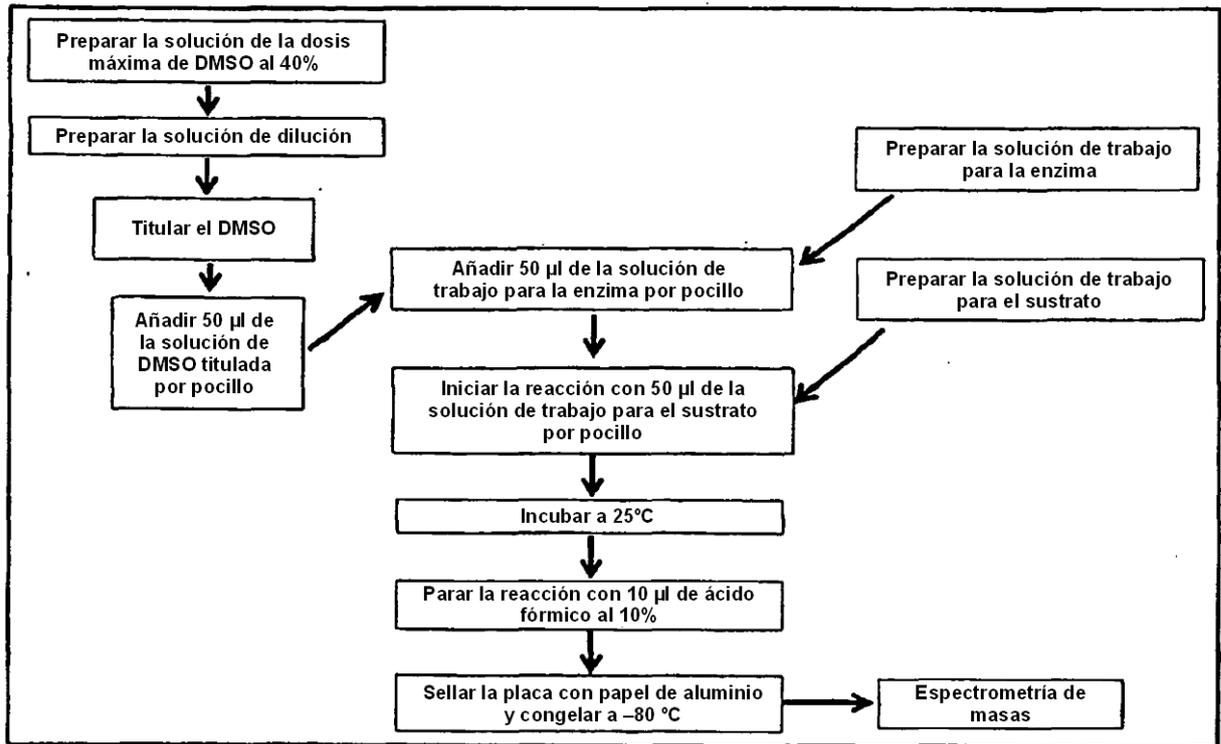
**FIG. 4**



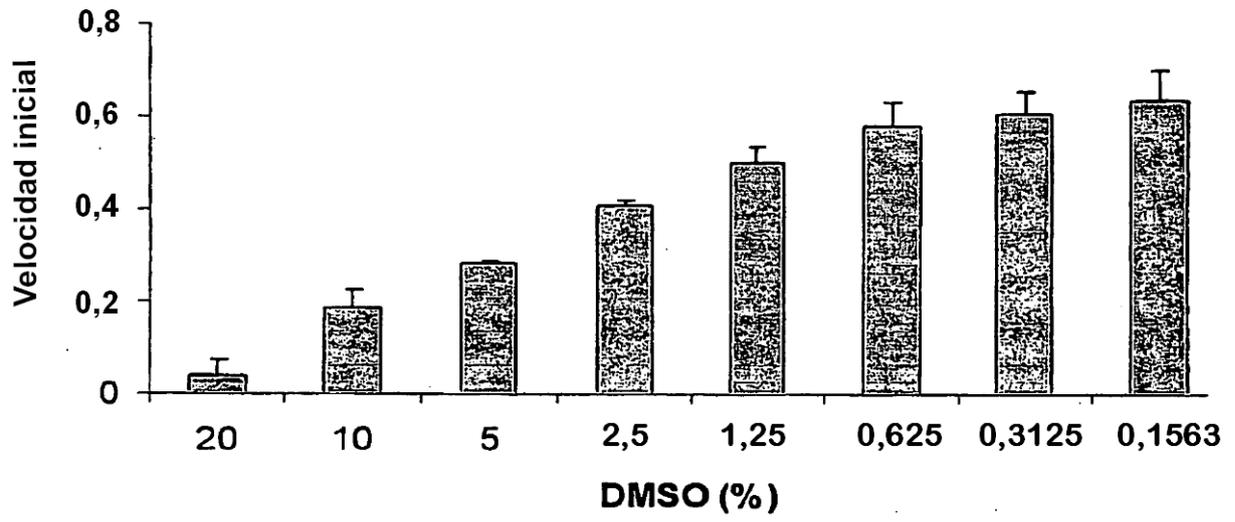
**FIG. 5**



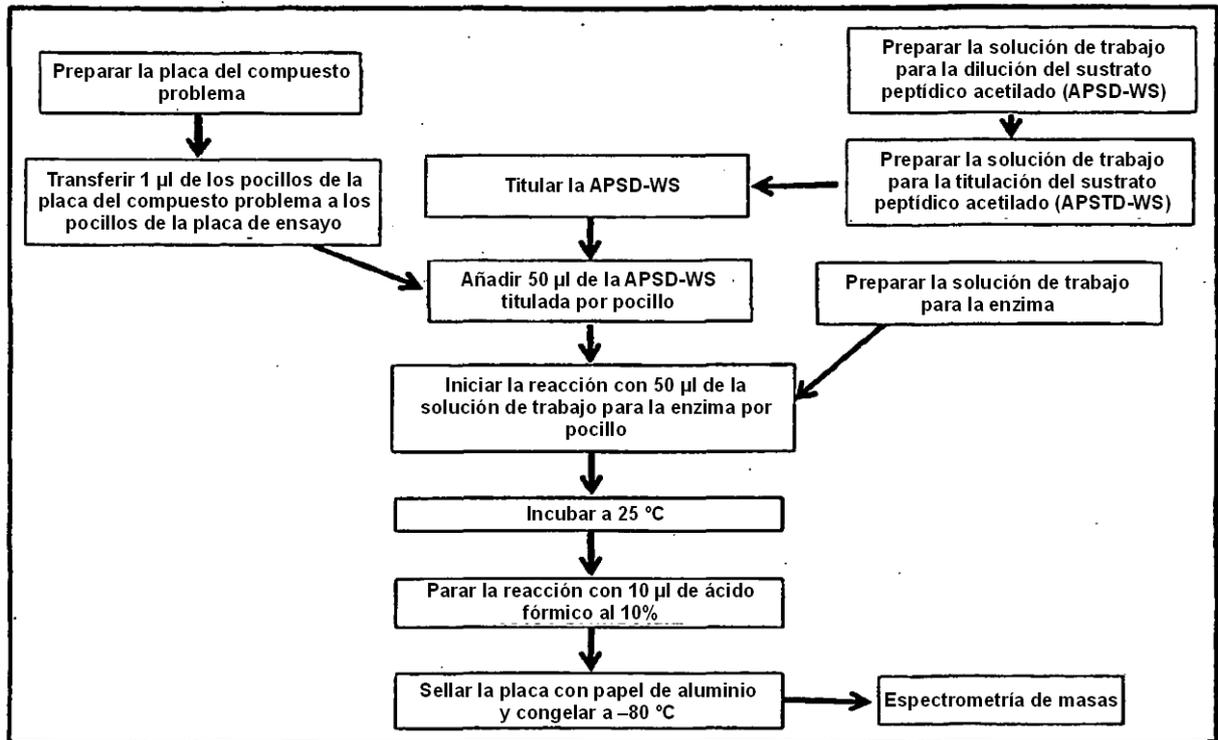
**FIG. 6**



**FIG. 7**



**FIG. 8**



**FIG. 9**

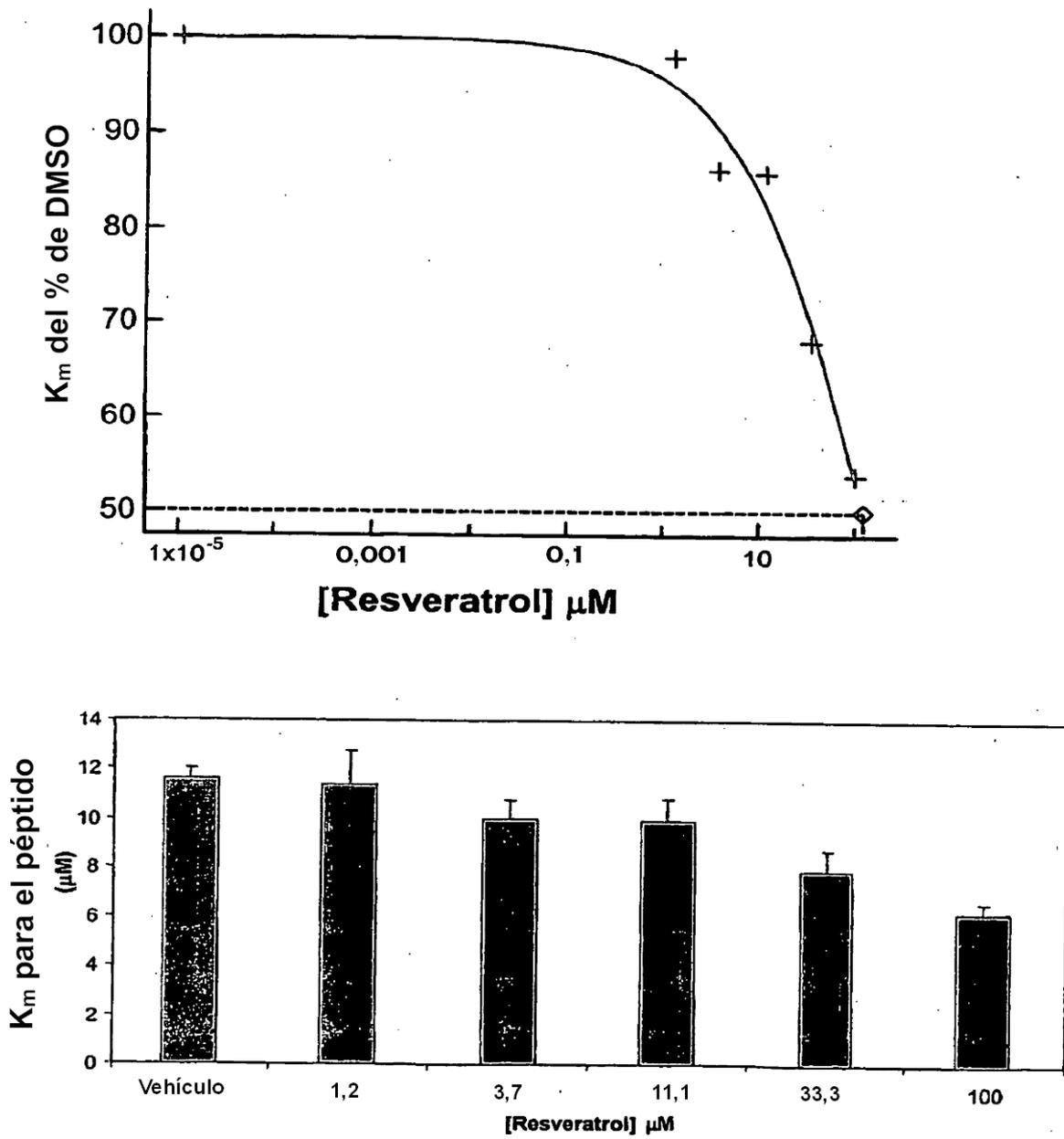
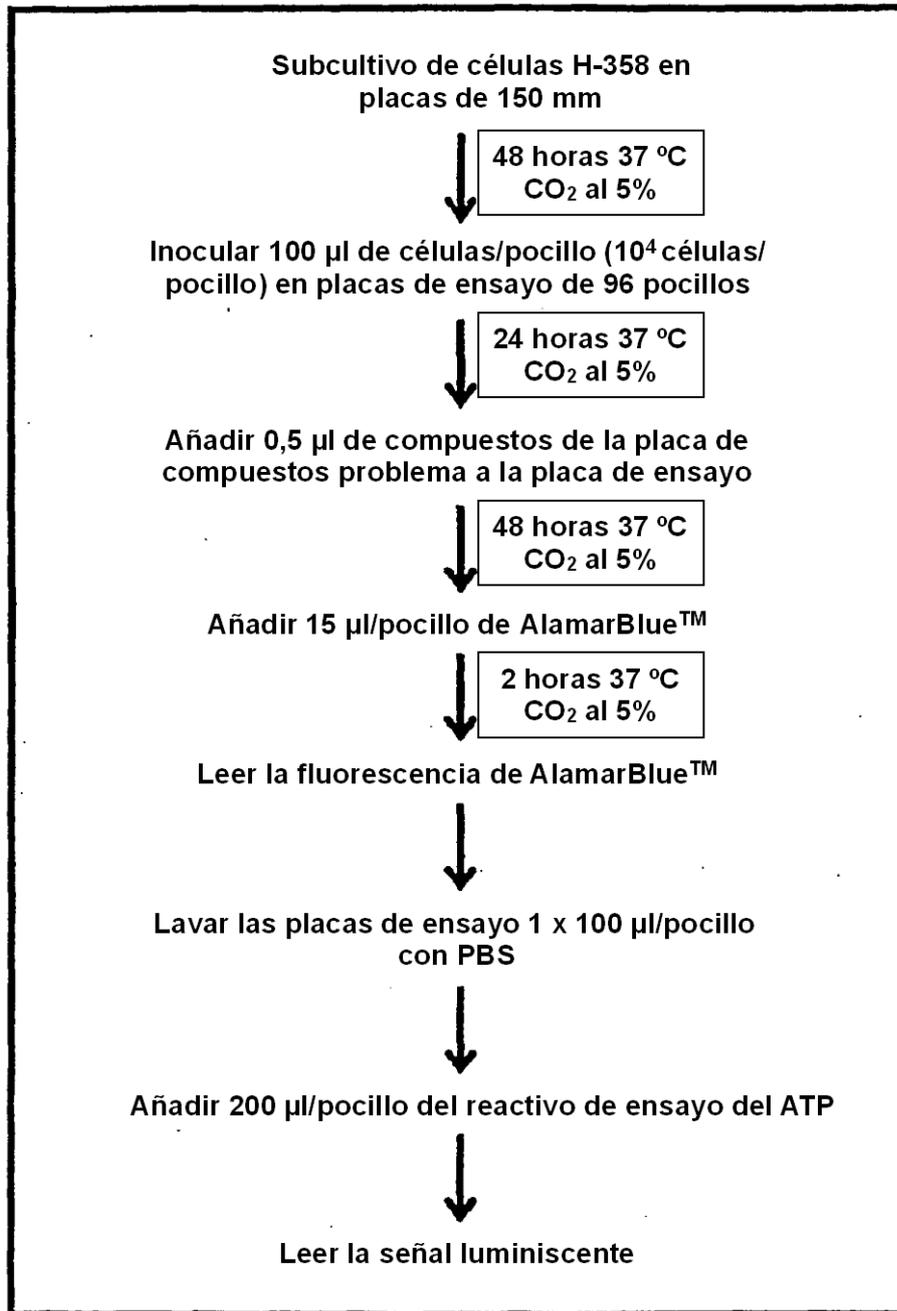


FIG. 10



**FIG. 11**

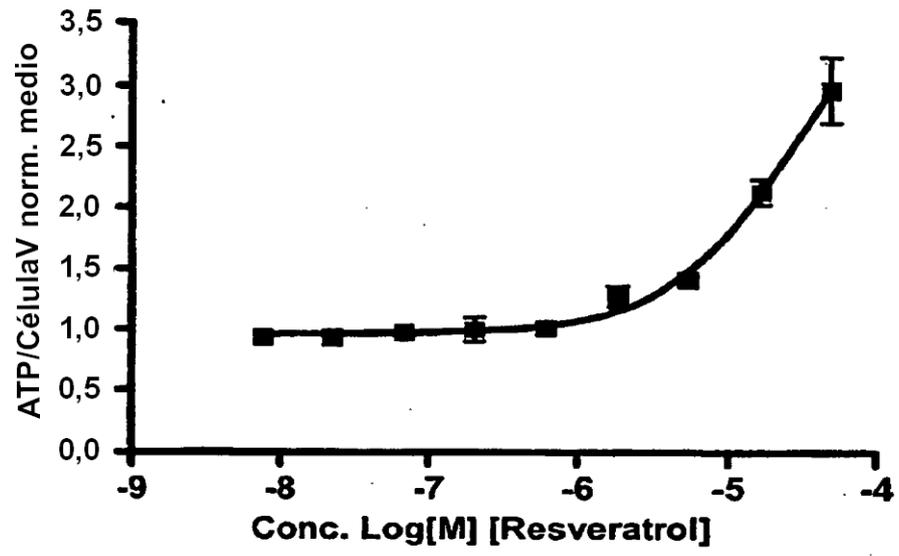


FIG. 12

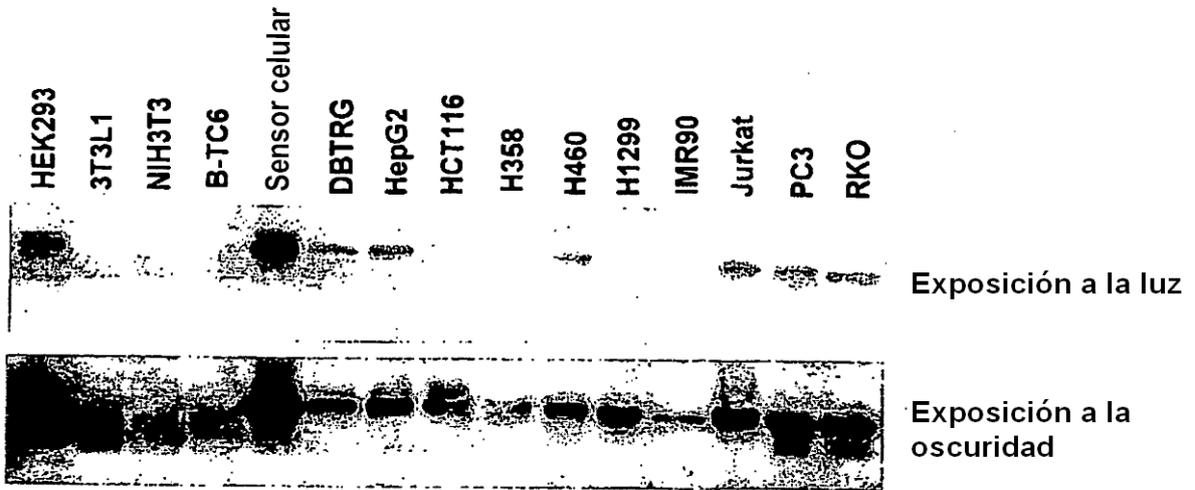


FIG. 13

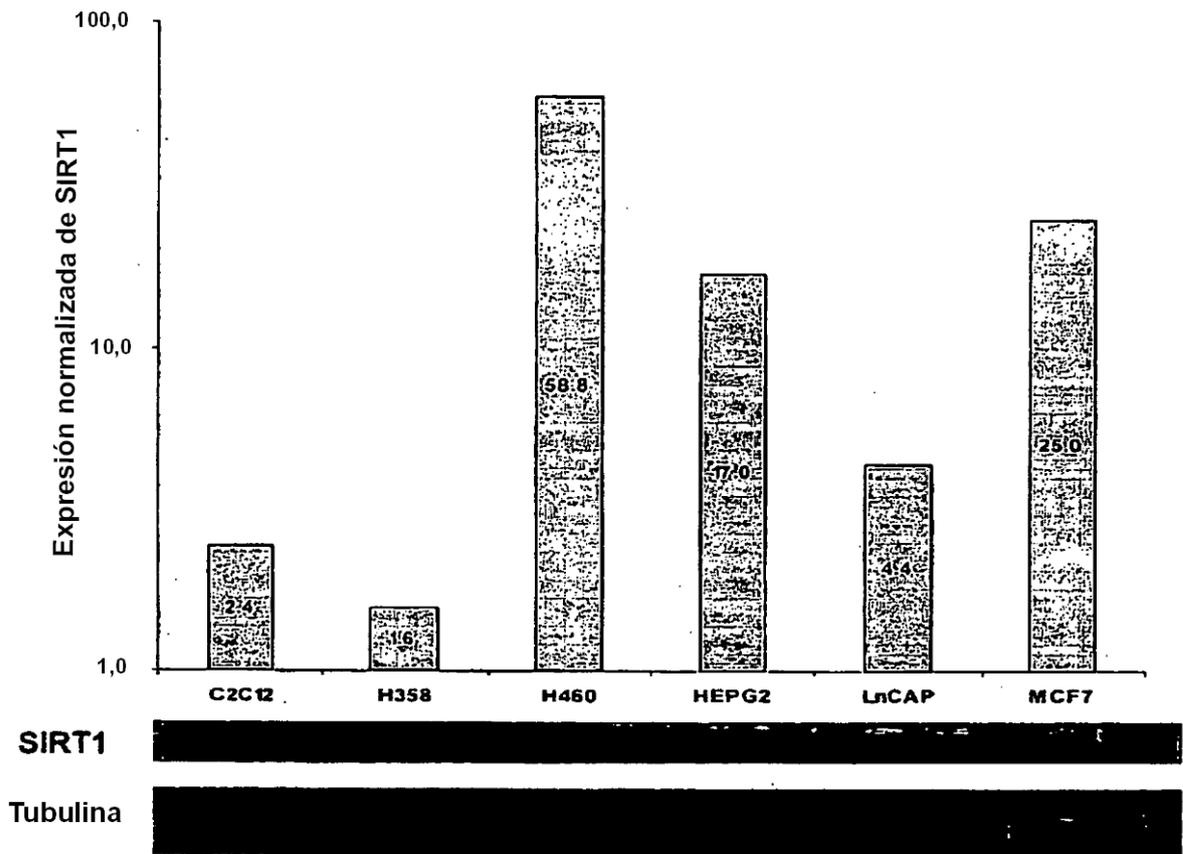


FIG. 14

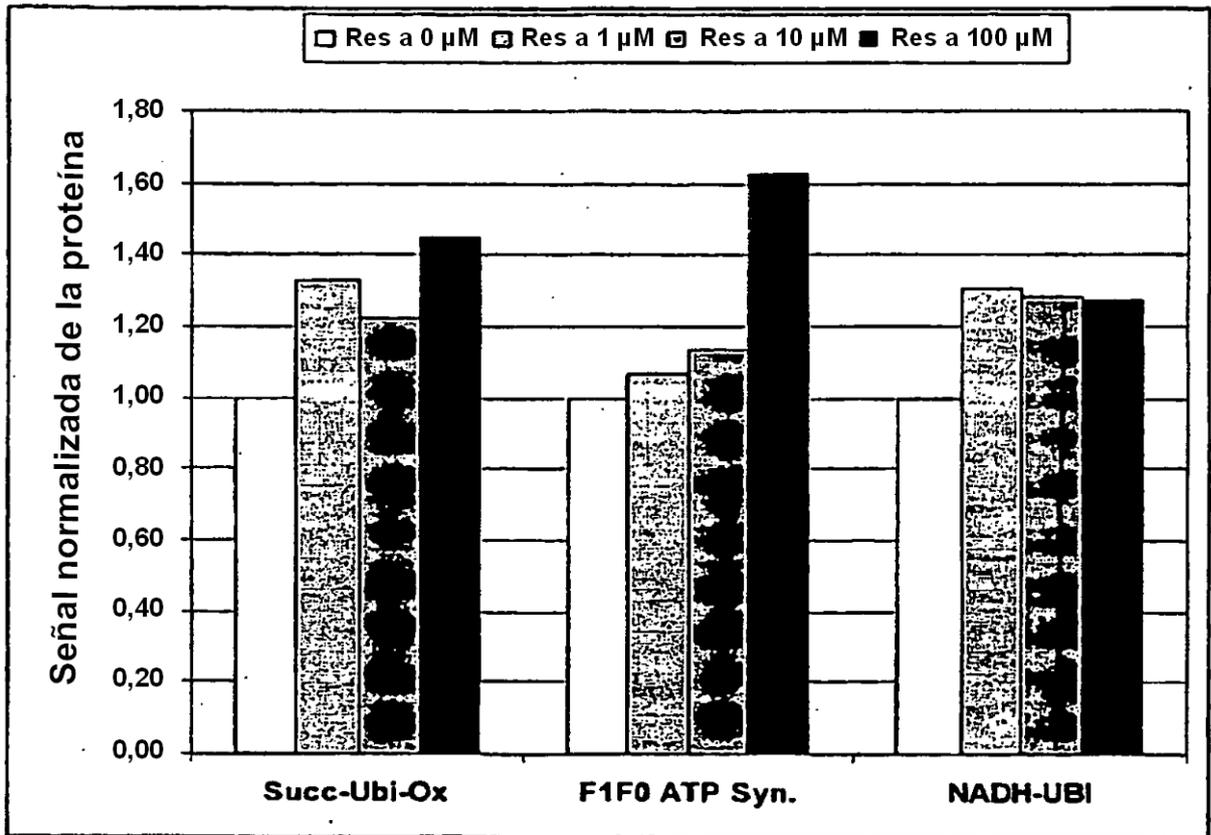


FIG. 15

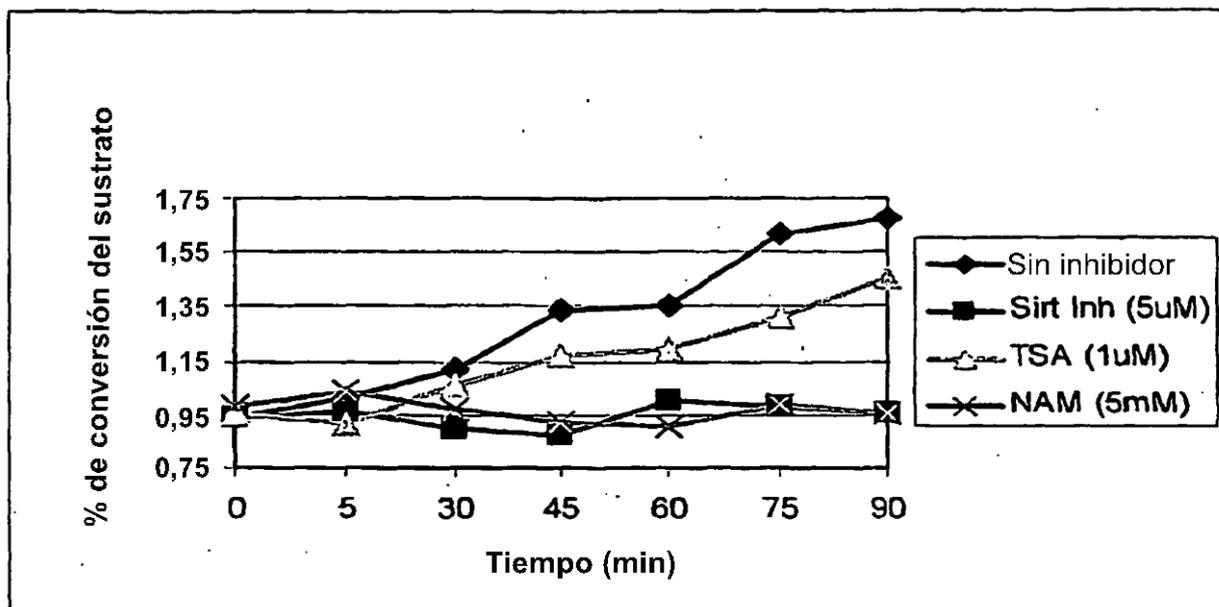


Fig. 16A

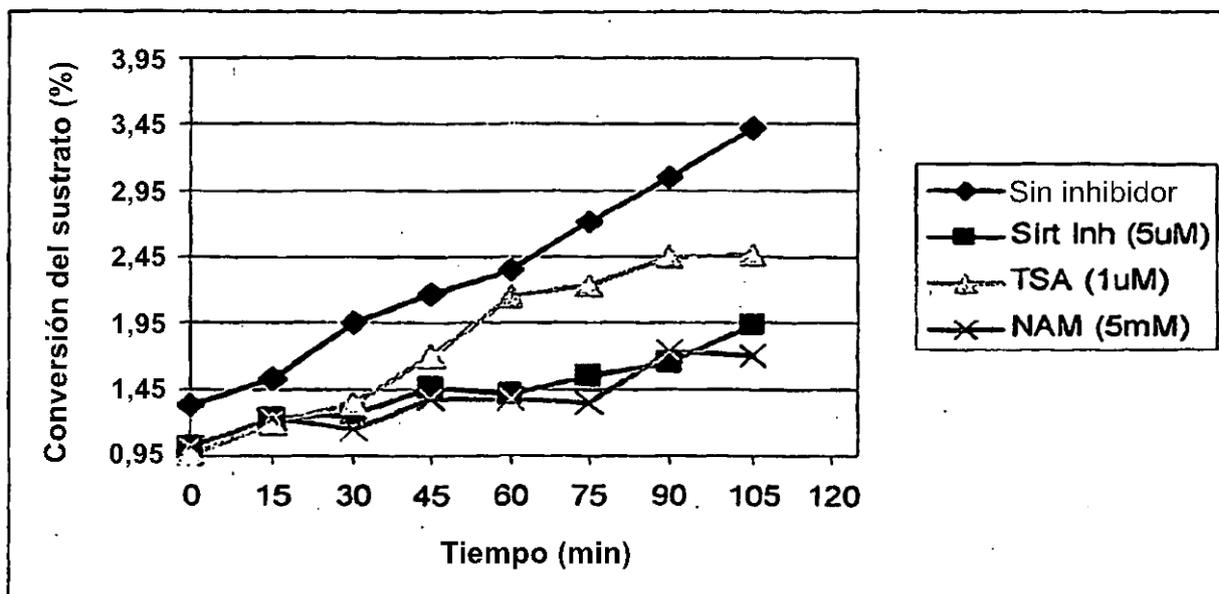


Fig. 16B