

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 396 913**

51 Int. Cl.:

**C07D 235/18** (2006.01)

**A61K 31/41** (2006.01)

**C07D 401/12** (2006.01)

**C07D 403/12** (2006.01)

**C07D 513/04** (2006.01)

**A61K 31/435** (2006.01)

**A61K 31/495** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.08.2006 E 06789431 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.10.2012 EP 1910384**

54 Título: **Compuestos moduladores de sirtuina**

30 Prioridad:

**04.08.2005 US 705612 P**

**02.12.2005 US 741783 P**

**03.03.2006 US 779370 P**

**14.04.2006 US 792276 P**

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

**01.03.2013**

73 Titular/es:

**SIRTRIS PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)  
200 TECHNOLOGY SQUARE, SUITE 300  
CAMBRIDGE, MA 02139, US**

72 Inventor/es:

**NUNES, JOSEPH J.;  
MILNE, JILL;  
BEMIS, JEAN;  
XIE, ROGER;  
VU, CHI B.;  
NG, PUI YEE y  
DISCH, JEREMY S.**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 396 913 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

Compuestos moduladores de sirtuina.

**Antecedentes**

5 La familia de genes Reguladores de Información Silenciosos (SIR) representa un grupo de genes altamente conservados en los genomas de organismos que oscilan entre arqueobacterias y una diversidad de eucariotas (Frye, 2000). Las proteínas SIR codificadas están implicadas en diversos procesos que van desde regulación de silenciamiento de genes hasta reparación de DNA. Las proteínas codificadas por miembros de la familia del gen SIR exhiben alta conservación de secuencias en un dominio de núcleo de 250 aminoácidos. Un gen bien caracterizado  
10 en esta familia es *S. cerevisiae* SIR2, implicado en la silenciación de los locus HM que contienen información que especifica el tipo sexual de levadura, los efectos de la posición del telómero y el envejecimiento celular (Guarente, 1999; Kaeberlein et al., 1999; Shore, 2000). La proteína Sir2 de levadura pertenece a la familia de histona desacetilasas (revisado en Guarente, 2000; Shore, 2000). El homólogo de Sir2, CobB, en *Salmonella typhimurium*, funciona como una ADP-ribosil transferasa dependiente de NAD (nicotinamida adenina dinucleótido) (Tsang y Escalante-Semerena, 1998).

La proteína Sir2 es una desacetilasa de clase III que utiliza NAD como co-sustrato (Imai et al., 2000; Moazed, 2001; Smith et al., 2000; Tanner et al., 2000; Tanny y Moazed, 2001). A diferencia de otras desacetilasas, muchas de las cuales están implicadas en la silenciación de genes, Sir2 es insensible a los inhibidores de histona desacetilasa de clases I y II como tricostatina A (TSA) (Imai et al., 2000; Landry et al., 2000a; Smith et al., 2000).

20 La desacetilación de acetil-lisina por Sir2 está firmemente unida a la hidrólisis de NAD, produciendo nicotinamida y el nuevo compuesto acetil-ADP ribosa (Tanner et al., 2000; Landry et al., 2000b; Tanny y Moazed, 2001). La actividad de la desacetilasa dependiente de NAD de Sir2 es esencial, ya que sus funciones pueden conectar su rol biológico con el metabolismo celular en levadura (Guarente, 2000; Imai et al., 2000; Lin et al., 2000; Smith et al., 2000). Los homólogos de Sir2 mamíferos tienen actividad de histona desacetilasa dependiente de NAD (Imai et al., 2000; Smith et al., 2000). La mayoría de la información sobre las funciones mediadas por Sir2 proviene de estudios en levadura (Gartenberg, 2000; Gottschling, 2000).

Los estudios bioquímicos han demostrado que Sir2 puede desacetilar fácilmente los extremos aminoterminales de las histonas H3 y H4, dando como resultado la formación de 1-O-acetil-ADP-ribosa y nicotinamida. Las cepas con copias adicionales de SIR2 exhiben mayor silenciación de rDNA y una vida 30% más prolongada. Se ha demostrado  
30 recientemente que las copias adicionales del homólogo de SIR2 *C. elegans*, sir-2.1 y el gen *D. melanogaster* dSir2 extienden en gran medida la vida en esos organismos. Esto implica que la vía reguladora dependiente de SIR2 para el envejecimiento surgió temprano en la evolución y se ha conservado bien. Hoy en día, se cree que los genes Sir2 han evolucionado para potenciar la salud y la resistencia al estrés de un organismo para aumentar sus probabilidades de sobrevivir a la adversidad.

35 SIRT3 es un homólogo de SIRT1 conservado en procariontes y eucariotas (P. Onyango et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 99: 13653-13658 (2002)). La proteína SIRT3 está dirigida a las crestas mitocondriales mediante un dominio único situado en el término N. SIRT3 posee actividad de desacetilasa dependiente de NAD<sup>+</sup> y se expresa de manera ubicua, particularmente en los tejidos metabólicamente activos. Tras la transferencia a las mitocondrias, se cree que SIRT3 es escindida en una forma activa más pequeña por peptidasa de procesamiento de matriz mitocondrial (MPP)  
40 (B. Schwer et al., J. Cell Biol. 158: 647-657 (2002)).

Se sabe desde hace más de 70 años que la restricción calórica mejora la salud y extiende la vida de los mamíferos (Masoro, 2000). La vida de la levadura, al igual que la de los metazoos, se extiende con las intervenciones que se asemejan a la restricción calórica, tal como reducción de glucosa. El descubrimiento de que tanto la levadura como las moscas que carecen del gen SIR2 no viven más cuando se las restringe de calorías aporta el dato de que los genes SIR2 median efectos de salud beneficiosos de esta dieta (Anderson et al., 2003; Helfand y Rogina, 2004). Asimismo, las mutaciones que reducen la actividad de la vía dependiente de (PKA) dependiente de cAMP (adenosina 3',5'-monofosfato) sensible a glucosa de levadura extienden la vida en células de tipo salvaje en cepas sir2 mutantes, demostrando que SIR2 probablemente sea un componente en dirección 3' clave de la vía de restricción calórica (Lin et al., 2001).

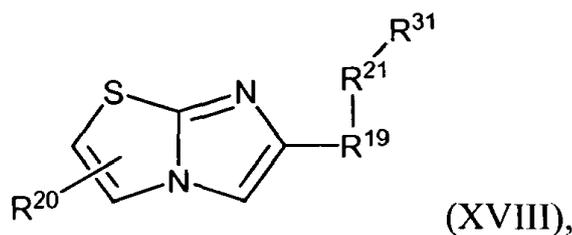
50 Porcu et al (Trends in Pharmacological Sciences, Elsevier, Haywarth, GB, vol 26, núm.. 2, 2005, pág. 94-103) describen una serie de compuestos que se describen como moduladores de sirtuina.

El documento JP07291976 describe una serie de derivados de imidazo[2,1-b]tiazol. El documento WO2006122011 describe inhibidores de HCV basados en tiazol.

**Sumario**

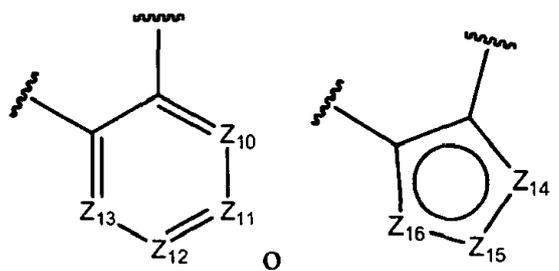
55 En la presente invención se proveen nuevos compuestos moduladores de sirtuina,

En un aspecto, la invención proporciona compuestos moduladores de sirtuina A) de Fórmula Estructural (XVIII):



o su sal farmacéuticamente aceptable, en la que

R<sup>19</sup> se selecciona entre:



5

en la que:

cada Z<sub>10</sub>, Z<sub>11</sub>, Z<sub>12</sub> y Z<sub>13</sub> se selecciona independientemente entre N, CR<sup>20</sup> o CR<sub>1</sub>';

cada Z<sub>14</sub>, Z<sub>15</sub> y Z<sub>16</sub> se selecciona independientemente entre N, NR<sub>1</sub>', S, O, CR<sup>20</sup> o CR<sub>1</sub>';

en la que:

10

cero a dos de Z<sub>10</sub>, Z<sub>11</sub>, Z<sub>12</sub> o Z<sub>13</sub> son N;

por lo menos uno de Z<sub>14</sub>, Z<sub>15</sub> y Z<sub>16</sub> es N, NR<sub>1</sub>', S o O;

cero a uno de Z<sub>14</sub>, Z<sub>15</sub> y Z<sub>16</sub> es S o O;

cero a dos de Z<sub>14</sub>, Z<sub>15</sub> y Z<sub>16</sub> son N o NR<sub>1</sub>';

cero a un R<sup>20</sup> es un grupo solubilizante; y

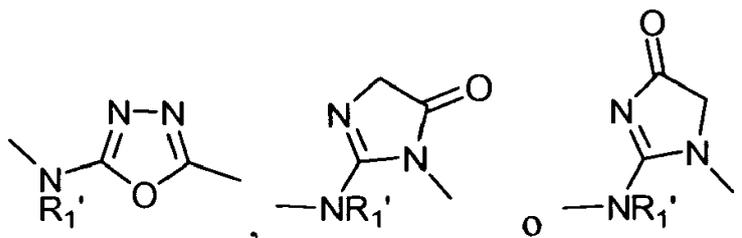
15

cero a un R<sub>1</sub>' es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> lineal o ramificado opcionalmente sustituido;

cada R<sup>20</sup> se selecciona independientemente entre H o un grupo solubilizante;

R<sup>21</sup> se selecciona entre -NR<sub>1</sub>'-C(O)-, -NR<sub>1</sub>'-S(O)<sub>2</sub>-, -NR<sub>1</sub>'-C(O)-NR<sub>1</sub>'-, -NR<sub>1</sub>'-C(S)-NR<sub>1</sub>'-, -NR<sub>1</sub>'-C(S)-NR<sub>1</sub>'-CR<sub>1</sub>'R<sub>1</sub>'-, -NR<sub>1</sub>'-C(O)-CR<sub>1</sub>'R<sub>1</sub>'-NR<sub>1</sub>'-, -NR<sub>1</sub>'-C(=NR<sub>1</sub>')-NR<sub>1</sub>'-, -C(O)-NR<sub>1</sub>'-, -C(O)-NR<sub>1</sub>'-S(O)<sub>2</sub>-, -NR<sub>1</sub>'-, -CR<sub>1</sub>'R<sub>1</sub>'-, -NR<sub>1</sub>'-C(O)-CR<sub>1</sub>'=CR<sub>1</sub>'-, -NR<sub>1</sub>'-S(O)<sub>2</sub>-NR<sub>1</sub>'-, -NR<sub>1</sub>'-C(O)-NR<sub>1</sub>'-S(O)<sub>2</sub>-, -NR<sub>1</sub>'-CR<sub>1</sub>'R<sub>1</sub>'-C(O)-NR<sub>1</sub>'-, -CR<sub>1</sub>'R<sub>1</sub>'-C(O)-NR<sub>1</sub>'-, -NR<sub>1</sub>'-C(O)-CR<sub>1</sub>'=CR<sub>1</sub>'-CR<sub>1</sub>'R<sub>1</sub>'-, -NR<sub>1</sub>'-C(=N-CN)-NR<sub>1</sub>'-, -NR<sub>1</sub>'-C(O)-CR<sub>1</sub>'R<sub>1</sub>'-O-, -NR<sub>1</sub>'-C(O)-CR<sub>1</sub>'R<sub>1</sub>'-CR<sub>1</sub>'R<sub>1</sub>'-O-, -NR<sub>1</sub>'-S(O)<sub>2</sub>-CR<sub>1</sub>'R<sub>1</sub>'-, -NR<sub>1</sub>'-S(O)<sub>2</sub>-CR<sub>1</sub>'R<sub>1</sub>'-CR<sub>1</sub>'R<sub>1</sub>'-, -NR<sub>1</sub>'-C(O)-CR<sub>1</sub>'R<sub>1</sub>'-, -NR<sub>1</sub>'-C(O)-CR<sub>1</sub>'R<sub>1</sub>'-CR<sub>1</sub>'R<sub>1</sub>'-, -NR<sub>1</sub>'-C(S)-NR<sub>1</sub>'-CR<sub>1</sub>'R<sub>1</sub>'-CR<sub>1</sub>'R<sub>1</sub>'-, -NR<sub>1</sub>'-C(O)-O-,

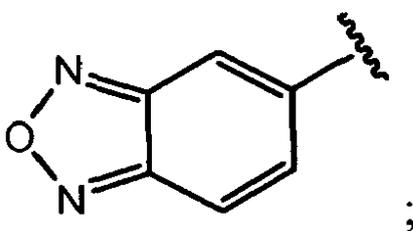
20



25

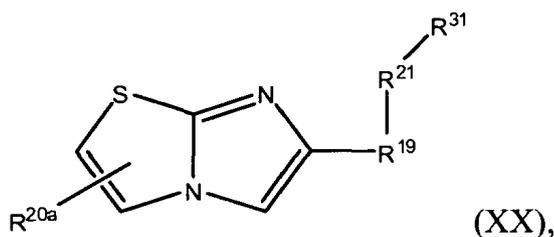
donde cada R<sub>1</sub>' se selecciona independientemente entre H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> lineal o ramificado opcionalmente sustituido; y

R<sup>31</sup> se selecciona entre un arilo monocíclico o bicíclico opcionalmente sustituido, o un heteroarilo monocíclico o bicíclico opcionalmente sustituido, con la salvedad que cuando R<sup>21</sup> es -NR<sub>1</sub>'-C(O)-, R<sup>31</sup> no es 4-cianofenilo o



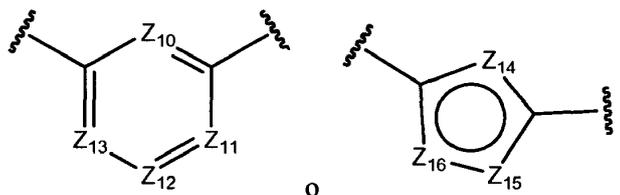
y cuando R<sup>21</sup> es -NR<sub>1</sub>'-S(O)<sub>2</sub>-, R<sup>31</sup> no es 4-metoxifenilo o 4-t-butilfenilo.

En otro aspecto, la invención proporciona compuestos moduladores de sirtuina B) de Fórmula Estructural (XX):



o su sal farmacéuticamente aceptable, en la que

R<sup>19</sup> se selecciona entre:



10 en la que:

cada Z<sub>10</sub>, Z<sub>11</sub>, Z<sub>12</sub> y Z<sub>13</sub> se selecciona independientemente entre N, CR<sup>20</sup> o CR<sub>1</sub>';

cada Z<sub>14</sub>, Z<sub>15</sub> y Z<sub>16</sub> se selecciona independientemente entre N, NR<sub>1</sub>', S, O, CR<sup>20</sup> o CR<sub>1</sub>';

en la que:

cero a dos de Z<sub>10</sub>, Z<sub>11</sub>, Z<sub>12</sub> o Z<sub>13</sub> son N;

15 por lo menos uno de Z<sub>14</sub>, Z<sub>15</sub> y Z<sub>16</sub> es N, NR<sub>1</sub>', O o S;

cero a uno de Z<sub>14</sub>, Z<sub>15</sub> y Z<sub>16</sub> es S o O;

cero a dos de Z<sub>14</sub>, Z<sub>15</sub> y Z<sub>16</sub> son N o NR<sub>1</sub>';

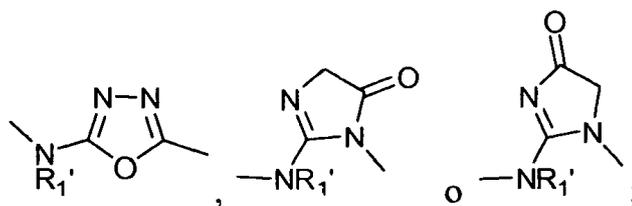
cero a un R<sup>20</sup> es un grupo solubilizante; y

cero a un R<sub>1</sub>' es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> lineal o ramificado opcionalmente sustituido;

20 cada R<sup>20</sup> se selecciona independientemente entre H o un grupo solubilizante;

R<sup>20a</sup> se selecciona independientemente entre H o un grupo solubilizante;

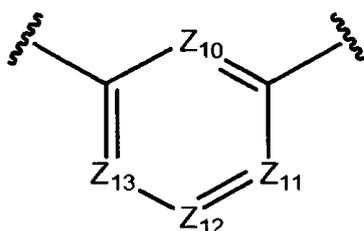
25 R<sup>21</sup> se selecciona entre -NR<sub>1</sub>'-C(O)-, -NR<sub>1</sub>'-S(O)<sub>2</sub>-, -NR<sub>1</sub>'-C(O)-NR<sub>1</sub>'-, -NR<sub>1</sub>'-C(S)-NR<sub>1</sub>'-, -NR<sub>1</sub>'-C(S)-NR<sub>1</sub>'-CR<sub>1</sub>'R<sub>1</sub>'-, -NR<sub>1</sub>'-C(O)-CR<sub>1</sub>'R<sub>1</sub>'-NR<sub>1</sub>'-, -NR<sub>1</sub>'-C(=NR<sub>1</sub>')-NR<sub>1</sub>'-, -C(O)-NR<sub>1</sub>'-, -C(O)-NR<sub>1</sub>'-S(O)<sub>2</sub>-, -CR<sub>1</sub>'R<sub>1</sub>'-, -NR<sub>1</sub>'-C(O)-CR<sub>1</sub>'=CR<sub>1</sub>'-, -NR<sub>1</sub>'-S(O)<sub>2</sub>-NR<sub>1</sub>'-, -NR<sub>1</sub>'-C(O)-NR<sub>1</sub>'-S(O)<sub>2</sub>-, -NR<sub>1</sub>'-CR<sub>1</sub>'R<sub>1</sub>'-C(O)-NR<sub>1</sub>'-, -CR<sub>1</sub>'R<sub>1</sub>'-C(O)-NR<sub>1</sub>'-, -NR<sub>1</sub>'-C(O)-CR<sub>1</sub>'=CR<sub>1</sub>'-CR<sub>1</sub>'R<sub>1</sub>'-, -NR<sub>1</sub>'-C(=N-CN)-NR<sub>1</sub>'-, -NR<sub>1</sub>'-C(O)-CR<sub>1</sub>'R<sub>1</sub>'-O-, -NR<sub>1</sub>'-C(O)-CR<sub>1</sub>'R<sub>1</sub>'-CR<sub>1</sub>'R<sub>1</sub>'-O-, -NR<sub>1</sub>'-S(O)<sub>2</sub>-CR<sub>1</sub>'R<sub>1</sub>'-, -NR<sub>1</sub>'-S(O)<sub>2</sub>-CR<sub>1</sub>'R<sub>1</sub>'-CR<sub>1</sub>'R<sub>1</sub>'-, -NR<sub>1</sub>'-C(O)-CR<sub>1</sub>'R<sub>1</sub>'-, -NR<sub>1</sub>'-C(O)-CR<sub>1</sub>'R<sub>1</sub>'-CR<sub>1</sub>'R<sub>1</sub>'-, -NR<sub>1</sub>'-C(S)-NR<sub>1</sub>'-CR<sub>1</sub>'R<sub>1</sub>'-CR<sub>1</sub>'R<sub>1</sub>'-, -NR<sub>1</sub>'-C(O)-O-



donde

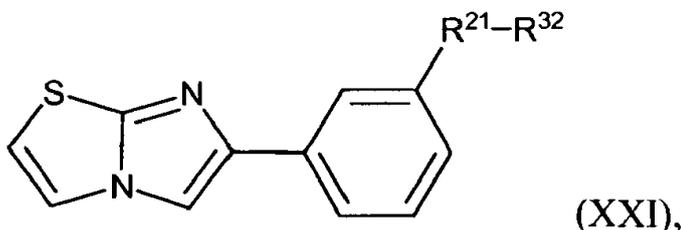
cada  $R_1'$  se selecciona independientemente entre H o alquilo  $C_1$ - $C_3$  lineal o ramificado opcionalmente sustituido; y

- 5  $R^{31}$  se selecciona entre arilo monocíclico o bicíclico opcionalmente sustituido, o un heteroarilo monocíclico o bicíclico opcionalmente sustituido, donde cuando  $R^{19}$  es



y  $Z_{10}$ ,  $Z_{11}$ ,  $Z_{12}$  y  $Z_{13}$  son cada CH,  $R^{20a}$  es un grupo solubilizante.

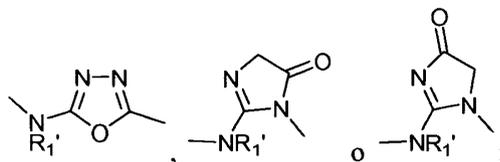
- 10 Incluso en otro aspecto, la invención proporciona compuestos moduladores de sirtuina B) de Fórmula Estructural (XXI):



o su sal farmacéuticamente aceptable, en la que

- 15  $R^{21}$  se selecciona entre  $-NR_1'-C(O)-$ ,  $-NR_1'-S(O)_2-$ ,  $-NR_1'-C(O)-NR_1'-$ ,  $-NR_1'-C(S)-NR_1'-$ ,  $-NR_1'-C(S)-NR_1'-CR_1'R_1'-$ ,  $-NR_1'-C(O)-CR_1'R_1'-NR_1'-$ ,  $-NR_1'-C(=NR_1')-NR_1'-$ ,  $-C(O)-NR_1'-$ ,  $-C(O)-NR_1'-S(O)_2-$ ,  $-NR_1'-$ ,  $-CR_1'R_1'-$ ,  $-NR_1'-C(O)-CR_1'=CR_1'-$ ,  $-NR_1'-S(O)_2-NR_1'-$ ,  $-NR_1'-C(O)-NR_1'-S(O)_2-$ ,  $-NR_1'-CR_1'R_1'-C(O)-NR_1'-$ ,  $-CR_1'R_1'-C(O)-NR_1'-$ ,  $-NR_1'-C(O)-CR_1'=CR_1'-CR_1'R_1'-$ ,  $-NR_1'-C(=N-CN)-NR_1'-$ ,  $-NR_1'-C(O)-CR_1'R_1'-O-$ ,  $-NR_1'-C(O)-CR_1'R_1'-CR_1'R_1'-O-$ ,  $-NR_1'-S(O)_2-CR_1'R_1'-$ ,  $-NR_1'-S(O)_2-CR_1'R_1'-CR_1'R_1'-$ ,  $-NR_1'-C(O)-CR_1'R_1'-$ ,  $-NR_1'-C(O)-CR_1'R_1'-CR_1'R_1'-$ ,  $-NR_1'-C(S)-NR_1'-CR_1'R_1'-CR_1'R_1'-$ ,  $-NR_1'-C(O)-O-$ ,

20

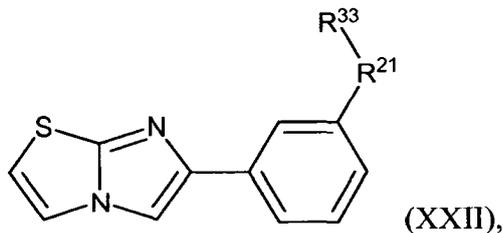


donde cada  $R_1'$  se selecciona independientemente entre H o alquilo  $C_1$ - $C_3$  lineal o ramificado opcionalmente sustituido; y

$R^{32}$  es un heteroarilo monocíclico o bicíclico opcionalmente sustituido, o un arilo bicíclico opcionalmente sustituido, donde:

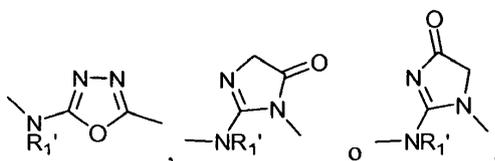
- 25 cuando  $R^{21}$  es  $-NH-C(O)-CH_2-$ ,  $R^{32}$  no es tien-2-ilo no sustituido;  
 cuando  $R^{21}$  es  $-NH-C(O)-$ ,  $R^{32}$  no es furan-2-ilo, 5-bromofuran-2-ilo o 2-fenil-4-metiltiazol-5-ilo;  
 cuando  $R^{21}$  es  $-NH-S(O)_2-$ ,  $R^{32}$  no es naftilo no sustituido o 5-clorotien-2-ilo.

En otro aspecto, la invención proporciona compuestos moduladores de sirtuina D) de Fórmula Estructural (XXII):



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, donde:

- 5  $R^{21}$  se selecciona entre  $-NR_1'-C(O)-$ ,  $-NR_1'-S(O)_2-$ ,  $-NR_1'-C(O)-NR_1'-$ ,  $-NR_1'-C(S)-NR_1'-$ ,  $-NR_1'-C(S)-NR_1'-CR_1'R_1'-$ ,  $-NR_1'-C(O)-CR_1'R_1'-NR_1'-$ ,  $-NR_1'-C(=NR_1')-NR_1'-$ ,  $-C(O)-NR_1'-$ ,  $-C(O)-NR_1'-S(O)_2-$ ,  $-NR_1'-$ ,  $-CR_1'R_1'-$ ,  $-NR_1'-C(O)-CR_1'=CR_1'-$ ,  $-NR_1'-S(O)_2-NR_1'-$ ,  $-NR_1'-C(O)-NR_1'-S(O)_2-$ ,  $-NR_1'-CR_1'R_1'-C(O)-NR_1'-$ ,  $-CR_1'R_1'-C(O)-NR_1'-$ ,  $-NR_1'-C(O)-CR_1'=CR_1'-CR_1'R_1'-$ ,  $-NR_1'-C(=N-CN)-NR_1'-$ ,  $-NR_1'-C(O)-CR_1'R_1'-O-$ ,  $-NR_1'-C(O)-CR_1'R_1'-CR_1'R_1'-O-$ ,  $-NR_1'-S(O)_2-CR_1'R_1'-$ ,  $-NR_1'-S(O)_2-CR_1'R_1'-CR_1'R_1'-$ ,  $-NR_1'-C(O)-CR_1'R_1'-$ ,  $-NR_1'-C(O)-CR_1'R_1'-CR_1'R_1'-$ ,  $-NR_1'-C(S)-NR_1'-CR_1'R_1'-CR_1'R_1'-$ ,  $-NR_1'-C(O)-O-$ ,
- 10

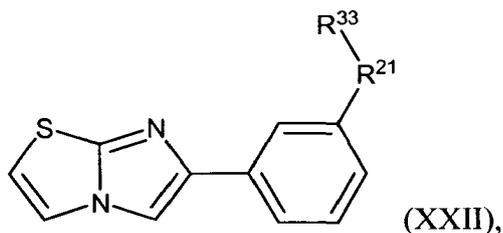


donde cada  $R_1'$  se selecciona independientemente entre H o alquilo  $C_1-C_3$  lineal o ramificado opcionalmente sustituido; y

$R^{33}$  es un fenilo opcionalmente sustituido, donde:

- 15 cuando  $R^{21}$  es  $-NR_1'-C(O)-$ ,  $R_1'$  no es H;
- cuando  $R^{21}$  es  $-NH-C(O)-CH_2$  o  $-NH-C(O)-CH_2-O-$ ,  $R^{33}$  no es fenilo no sustituido o 4-halofenilo; y
- cuando  $R^{21}$  es  $-NH-S(O)_2-$ ,  $R^{33}$  es fenilo no sustituido, 2,4- o 3,4-dimetilfenilo, 2,4-dimetil-5-metoxifenilo, 2-metoxi-3,4-diclorofenilo, 2-metoxi-5-bromofenil-3,4-dioxietilenofenilo, 3,4-dimetoxifenilo, 3,4-diclorofenilo, 3,4-dimetilfenilo, 3- o 4-metilfenilo, 4-alcoxifenilo, 4-fenoxifenilo, 4-halofenilo, 4-bifenilo o 4-acetilaminofenilo.

- 20 En un aspecto, la invención proporciona compuestos moduladores de sirtuina E) de Fórmula Estructural (XXII):

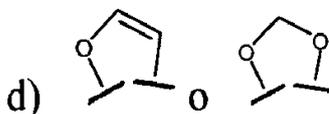


o su sal farmacéuticamente aceptable, donde:

$R^{21}$  se selecciona entre  $-NH-C(O)-$  o  $-NH-C(O)-CH_2-$ ; y

$R^{33}$  es fenilo sustituido con

- 25 a) un grupo  $-N(CH_3)_2$  ;
- b) un grupo CN en la posición 3;
- c) un grupo  $-S(CH_3)$ ; o



uniendo en puente las posiciones 3 y 4.

En cualquiera de las opciones A), B), C) o D), donde  $R_1'$  está sustituido,  $R_1'$  está sustituido con uno o más de -OH, halógeno, -OR<sup>a</sup>, -O-COR<sup>a</sup>, -COR<sup>a</sup>, -C(O)R<sup>a</sup>, -CN, -NO<sub>2</sub>, -COOH, -COOR<sup>a</sup>, -OCO<sub>2</sub>R<sup>a</sup>, -C(O)NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -OC(O)NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -SO<sub>3</sub>H, -NH<sub>2</sub>, -NHR<sup>a</sup>, -N(R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>), -COOR<sup>a</sup>, -CHO, -CONH<sub>2</sub>, -CONHR<sup>a</sup>, -CON(R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>), -NHCOR<sup>a</sup>, -NRCOR<sup>a</sup>, -NHCONH<sub>2</sub>, -NHCONR<sup>a</sup>H, -NHCON(R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>), -NR<sup>c</sup>CONH<sub>2</sub>, -NR<sup>c</sup>CONR<sup>a</sup>H, -NR<sup>c</sup>CON(R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>), -C(=NH)-NH<sub>2</sub>, -C(=NH)-NHR<sup>a</sup>, -C(=NH)-N(R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>), -C(=NR<sup>c</sup>)-NH<sub>2</sub>, -C(=NR<sup>c</sup>)-NHR<sup>a</sup>, -C(=NR<sup>c</sup>)-N(R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>), -NH-C(=NH)-NH<sub>2</sub>, -NH-C(=NH)-NHR<sup>a</sup>, -NH-C(=NH)-N(R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>), -NH-C(=NR<sup>c</sup>)-NH<sub>2</sub>, -NH-C(=NR<sup>c</sup>)-NHR<sup>a</sup>, -NH-C(=NR<sup>c</sup>)-N(R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>), -NR<sup>d</sup>H-C(=NH)-NH<sub>2</sub>, -NR<sup>d</sup>-C(=NH)-NHR<sup>a</sup>, -NR<sup>d</sup>-C(=NH)-N(R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>), -NR<sup>d</sup>-C(=NR<sup>c</sup>)-NH<sub>2</sub>, -NR<sup>d</sup>-C(=NR<sup>c</sup>)-NHR<sup>a</sup>, -NR<sup>d</sup>-C(=NR<sup>c</sup>)-N(R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>), -NHNH<sub>2</sub>, -NHNHR<sup>a</sup>, -NHR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, -SO<sub>2</sub>NHR<sup>a</sup>, -SO<sub>2</sub>NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -CH=CHR<sup>a</sup>, -CH=CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -CR<sup>c</sup>=CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, CR<sup>c</sup>=CHR<sup>a</sup>, -CR<sup>c</sup>=CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -CCR<sup>a</sup>, -SH, -SO<sub>k</sub>R<sup>a</sup>, -S(O)<sub>k</sub>OR<sup>a</sup> y -NH-C(=NH)-NH<sub>2</sub>, donde

k es 0, 1 o 2

R<sup>a</sup>-R<sup>d</sup> son cada uno independientemente un grupo alifático, alifático sustituido, bencilo, bencilo sustituido, aromático o aromático sustituido; y

15 -NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, tomados juntos, pueden tener también la forma de un grupo heterocíclico no aromático, sustituido o no sustituido;

donde un grupo heterocíclico no aromático, grupo bencilo o grupo arilo puede también tener un grupo alifático o alifático sustituido como sustituyente; un grupo alifático sustituido puede también tener un anillo heterocíclico no aromático, un anillo heterocíclico no aromático sustituido, bencilo, bencilo sustituido, arilo o arilo sustituido como sustituyente; y un grupo heterocíclico no aromático, alifático, sustituido, arilo sustituido o bencilo sustituido puede tener más de un sustituyente.

También se proveen composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más compuestos de Fórmulas XVIII - XXII, o sus sales.

En otro aspecto, la solicitud considera métodos para usar compuestos moduladores de sirtuina, o composiciones que comprenden compuestos moduladores de sirtuina. En ciertas realizaciones, los compuestos moduladores de sirtuina que pueden aumentar el nivel y/o la actividad de una proteína de sirtuina se pueden usar para una diversidad de aplicaciones terapéuticas que incluyen, por ejemplo, aumentar la vida de una célula, y tratar y/o prevenir una amplia variedad de enfermedades y trastornos que incluyen, por ejemplo, enfermedades o trastornos relacionados con el envejecimiento o el estrés, diabetes, obesidad, enfermedades neurodegenerativas, neuropatía inducida por sustancias quimioterapéuticas, neuropatía asociada con un episodio isquémico, enfermedades y/o trastornos oculares, enfermedad cardiovascular, trastornos de coagulación de la sangre, inflamación y/o calores, etc. Los compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina también se pueden utilizar para tratar una enfermedad o trastorno en un sujeto que se beneficiaría con el aumento de la actividad mitocondrial, para potenciar el rendimiento muscular, para incrementar los niveles de ATP en los músculos o para tratar o prevenir el daño a los tejidos y a los músculos asociado con hipoxia o isquemia. En otras realizaciones, los compuestos moduladores de sirtuina que disminuyen el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina se pueden usar para una diversidad de aplicaciones terapéuticas que incluyen, por ejemplo, aumentar la sensibilidad celular al estrés, aumentar la apoptosis, tratar el cáncer, estimular el apetito y/o estimular el aumento de peso, etc. Como se describirá en más detalle a continuación, los métodos comprenden administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad farmacéuticamente eficaz de un compuesto modulador de sirtuina.

En ciertos aspectos, los compuestos moduladores de sirtuina pueden administrarse solos o combinados con otros compuestos, incluidos otros compuestos moduladores de sirtuina u otros agentes terapéuticos.

### Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra una vista esquemática del Ensayo de ATP Celular descrito en el Ejemplo 5.

45 La Figura 2 muestra una curva de dosis y respuesta para niveles de ATP en células después del tratamiento con resveratrol.

### Descripción detallada

#### 1. Definiciones

50 Tal como se emplean en la presente memoria, los siguientes términos y expresiones tendrán los significados expuestos a continuación. A menos que se defina otra cosa, todos los términos científicos y tecnológicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que se comprende comúnmente por un experto en la materia.

Las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen la referencia a los plurales salvo que el contexto indique claramente lo contrario.

El término "agente" se utiliza en la presente memoria para indicar un compuesto químico, una mezcla de compuestos químicos, una macromolécula biológica (como un ácido nucleico, un anticuerpo, una proteína o su porción, p. ej., un péptido), o un extracto hecho a partir de materiales biológicos tales como bacterias, plantas, hongos o tejidos o células animales (particularmente de mamíferos). La actividad de dichos agentes puede tornarlos adecuados como "agentes terapéuticos", es decir, sustancias biológicamente, fisiológicamente o farmacológicamente activas que actúan local o sistémicamente en un sujeto.

El término "biodisponible" cuando se refiere a un compuesto se reconoce en la técnica y se refiere a una forma de un compuesto que le permite al mismo, o a una porción o cantidad del mismo, administrarse, ser absorbida por, incorporada a o estar fisiológicamente disponible para un sujeto o paciente al que se administra.

"Porción de una sirtuina biológicamente activa" se refiere a una porción de una proteína sirtuina que tiene una actividad biológica, tal como la capacidad de desacetilarse. Las porciones biológicamente activas de una sirtuina pueden comprender el dominio central de sirtuinas. Las porciones biológicamente activas de SIRT1 que tienen núm. de acceso en GenBank NP\_036370 que abarcan el dominio de unión NAD<sup>+</sup> y el dominio de unión al sustrato, por ejemplo, pueden incluir sin limitación, aminoácidos 62-293 de núm. de acceso en GenBank NP\_036370, codificados por los nucleótidos 237 a 932 de núm. de acceso en GenBank NM\_012238. En consecuencia, esta región algunas veces se denomina dominio central. Otras porciones biológicamente activas de SIRT1, también algunas veces denominadas dominios centrales, incluyen los aminoácidos 261 a 447 de núm. de acceso en GenBank NP\_036370, codificados por los nucleótidos 834 a 1394 con núm. de acceso en GenBank NM\_012238; los aminoácidos 242 a 493 con núm. de acceso en GenBank NP\_036370, codificados por los nucleótidos 777 a 1532 con núm. de acceso en GenBank NM\_012238; o los aminoácidos 254 a 495 con núm. de acceso en GenBank NP\_036370, codificados por los nucleótidos 813 a 1538 con núm. de acceso en GenBank NM\_012238.

La expresión "animales de compañía" se refiere a perros y gatos. Tal como se emplea en la presente memoria, el término "perro(s)" indica cualquier miembro de la especie *Canis familiaris*, de la cual existe un gran número de razas distintas. El término "gato(s)" se refiere a un animal felino, incluyendo gatos domésticos y otros miembros de la familia Felidae, genus Felis.

La expresión "que comprende" y el término "comprende/n" se utilizan en el sentido abierto e inclusivo que indica que pueden incluirse elementos adicionales.

La expresión "residuo conservado" se refiere a un aminoácido que es miembro de un grupo de aminoácidos que tienen ciertas propiedades en común. La expresión "sustitución de aminoácidos conservadores" se refiere a la sustitución (conceptualmente o de otro modo) de un aminoácido de dicho grupo con un aminoácido distinto del mismo grupo. Un modo funcional de definir propiedades comunes entre aminoácidos individuales es analizar las frecuencias normalizadas de cambios de aminoácidos entre las correspondientes proteínas de organismos homólogos (Schulz, G. E. y R. H. Schirmer., *Principles of Protein Structure*, Springer-Verlag). De acuerdo con dichos análisis, pueden definirse los grupos de aminoácidos en los que los aminoácidos dentro de un grupo se intercambian preferencialmente unos con otros, y por lo tanto se asemejan unos a otros, principalmente en su impacto sobre la estructura de la proteína en general (Schulz, G. E. y R. H. Schirmer, *Principles of Protein Structure*, Springer-Verlag). Un ejemplo de un conjunto de aminoácidos definido en este modo incluye: (i) un grupo cargado, que consiste en Glu y Asp, Lys, Arg y His, (ii) un grupo positivamente cargado, que consiste en Lys, Arg y His, (iii) un grupo negativamente cargado, que consiste en Glu y Asp, (iv) un grupo aromático, que consiste en Phe, Tyr y Trp, (v) un grupo con anillo de nitrógeno, que consiste en His y Trp, (vi) un gran grupo alifático no polar, que consiste en Val, Leu y Ile, (vii) un grupo ligeramente polar, que consiste en Met y Cys, (viii) un grupo de residuos 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 pequeño grupo hidroxilo, que consiste en Ser y Thr.

"Diabetes" se refiere a hiperglucemia o cetoacidosis, como también a anomalías metabólicas generales y crónicas que surgen de un estado de hiperglucemia prolongado o de una reducción en la tolerancia a la glucosa. "Diabetes" abarca tanto las formas de tipo I y de tipo II (Diabetes mellitus no insulino dependiente o NIDDM) de la enfermedad. Los factores de riesgo de diabetes incluyen los siguientes: cintura de más de 40 pulgadas en los hombres o 35 pulgadas en las mujeres, presión arterial de 130/85 mmHg o mayor, triglicéridos encima de 150 mg/dl, glucosa en ayunas superior a 100 mg/dl o lipoproteína de alta densidad de menos de 40 mg/dl en hombres o 50 mg/dl en mujeres.

Un "activador directo" de una sirtuina es una molécula que activa una sirtuina uniéndose a ella. Un "inhibidor" de una sirtuina es una molécula que inhibe una sirtuina uniéndose a ella.

El término "ED<sub>50</sub>" se conoce en la técnica. En determinadas realizaciones, ED<sub>50</sub> significa la dosis de un fármaco que produce 50% de su respuesta o efecto máximo, o alternativamente, la dosis que produce una respuesta pre-determinada en 50% de los sujetos o preparaciones de ensayo. El término "LD<sub>50</sub>" se conoce en la técnica. En determinadas realizaciones, LD<sub>50</sub> significa la dosis de un fármaco que es mortal en 50% de los sujetos de ensayo. La expresión "índice terapéutico" es una expresión reconocida en la técnica que se refiere al índice terapéutico de un fármaco, definido como LD<sub>50</sub>/ED<sub>50</sub>.

El término "hiperinsulinemia" se refiere a un estado en un individuo en el que el nivel de insulina en la sangre es mayor que el normal.

5 La expresión "que incluye" se utiliza para expresar "que incluye, aunque sin limitarse a ello". "que incluye" y "que incluye, aunque sin limitarse a ello" se utilizan de manera intercambiable.

La expresión "resistencia a insulina" se refiere a un estado en el que una cantidad normal de insulina produce una respuesta biológica subnormal en relación a la respuesta biológica en un sujeto que no experimenta resistencia a insulina.

10 Un "trastorno de resistencia a insulina," como se analiza en la presente memoria, se refiere a cualquier enfermedad o afección que es causada por la resistencia a la insulina o donde la resistencia a insulina contribuye a dicho trastorno. Los ejemplos incluyen: diabetes, obesidad, síndrome metabólico, síndromes de resistencia a insulina, síndrome X, resistencia a insulina, hipertensión arterial, hipertensión, colesterol, dislipidemia, hiperlipidemia, dislipidemia, enfermedad aterosclerótica que incluye accidentes cerebrovasculares, enfermedad de las arterias coronarias o infarto de miocardio, hiperglucemia, hiperinsulinemia y/o hiperproinsulinemia, intolerancia a la glucosa, liberación demorada de insulina, complicaciones diabéticas que incluyen cardiopatías coronarias, angina de pecho, insuficiencia cardíaca congestiva, apoplejía, funciones cognitivas en demencia, retinopatía, neuropatía periférica, nefropatía, glomerulonefritis, glomerulosclerosis, síndrome nefrótico, nefrosclerosis hipertensiva, algunos tipos de cáncer (como de endometrio, mama, próstata y colon), complicaciones del embarazo, mala salud reproductiva femenina (como irregularidades menstruales, esterilidad, ovulación irregular, síndrome del ovario poliquístico (PCOS)), lipodistrofia, trastornos relacionados con el colesterol, como cálculos biliares, colecistitis y coledocistitis, gota, apnea del sueño obstructiva y problemas respiratorios, artrosis, y prevención y tratamiento de pérdida ósea, p. ej., osteoporosis.

25 El término "ganado" se refiere a cuadrúpedos domesticados, lo que incluye aquellos criados para carne y diversos derivados, p. ej., un animal bovino, incluyendo vacas y otros miembros del género Bos, un animal porcino que incluye porcinos domésticos y otros miembros del género Sus, un animal ovino que incluye ovejas y otros miembros del género Ovis, cabras domésticas y otros miembros del género Capra; cuadrúpedos domesticados criados para tareas especializadas tales como uso como bestia de carga, p. ej., un equino, incluyendo caballos domésticos y otros miembros de la familia Equidae, género Equus.

30 El término "mamífero" se conoce en la técnica, y los ejemplos de mamíferos incluyen seres humanos, primates, ganado (incluidos bovinos, porcinos, etc.), animales de compañía (p. ej., caninos, felinos, etc.) y roedores (p. ej., ratones y ratas).

35 La expresión "forma natural" cuando se refiere a un compuesto significa un compuesto que está en una forma, p. ej., una composición, en la que puede hallarse naturalmente. Por ejemplo, ya que el resveratrol puede hallarse en el vino tinto, está presente en el vino tinto en una forma natural. Un compuesto no se encuentra en una forma natural si, p. ej., el compuesto ha sido purificado y separado de por lo menos algunas de las otras moléculas que se hallan con el compuesto por naturaleza. Un "compuesto natural" se refiere a un compuesto que puede hallarse en la naturaleza, es decir, un compuesto que no ha sido diseñado por el hombre. Un compuesto natural puede haber sido hecho por el hombre o por la naturaleza.

40 Un "compuesto natural" se refiere a un compuesto que puede hallarse en la naturaleza, es decir, un compuesto que no ha sido diseñado por el hombre. Un compuesto natural puede haber sido hecho por el hombre o por la naturaleza. Por ejemplo, el resveratrol es un compuesto natural. Un "compuesto no natural" es un compuesto que no se sabe que existe en la naturaleza o que no ocurre de la naturaleza.

Individuos "obesos" o individuos que padecen obesidad son en general individuos que tienen un índice de masa corporal (IMC) de por lo menos 25 o más. La obesidad puede o no asociarse con la resistencia a la insulina.

45 Las expresiones "administración parenteral" y "administrado parenteralmente" se conocen en la técnica y se refieren a modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, usualmente por inyección, e incluyen sin limitación la inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intra-articular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal e intraesternal.

50 "Paciente", "sujeto", "individuo" u "hospedante" se refiere o bien a un ser humano o a un animal no humano.

55 La expresión "porcentaje idéntico" se refiere a una identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de nucleótidos. La identidad puede determinarse comparando una posición en cada secuencia que puede alinearse para fines comparativos. Cuando una posición equivalente en las secuencias comparadas es ocupada por la misma base o aminoácido, entonces las moléculas son idénticas en esa posición; cuando el sitio equivalente ocupado por el mismo residuo de aminoácidos o por uno similar (p. ej., de naturaleza estérica y/o electrónica similar), entonces las moléculas pueden considerarse homólogas (similares) en esa posición. La expresión como porcentaje de homología, similitud o identidad se refiere a una función del número de aminoácidos idénticos o similares en las posiciones compartidas por las secuencias comparadas. La expresión como porcentaje

de homología, similitud o identidad se refiere a una función del número de aminoácidos idénticos o similares en las posiciones compartidas por las secuencias comparadas. Se pueden usar diversos algoritmos y/o programas de alineación, incluidos FASTA, BLAST o ENTREZ. FASTA y BLAST, disponibles como parte del paquete de análisis de secuencias GCG (University of Wisconsin, Madison, Wis.), y se pueden emplear con, p. ej., configuraciones predeterminadas. ENTREZ está disponible a través de National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, National Institutes of Health, Bethesda, MD. En una realización, el porcentaje de identidad de dos secuencias puede determinarse con el programa GCG con un peso del hueco de 1, p. ej., cada hueco de aminoácido se pesa como si fuese un solo aminoácido o nucleótido desigual entre las dos secuencias.

- 5
- 10 Otras técnicas para alineación 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. Preferiblemente, se utiliza un programa de alineación que permite huecos en la secuencia para alinear las secuencias. Smith-Waterman es un tipo de algoritmo que permite huecos en las alineaciones de secuencias. Véase *Meth. Mol. Biol.* 70: 173-187 (1997). También puede emplearse el programa
- 15 GAP que usa el método de alineación de Needleman y Wunsch para alinear secuencias. Una estrategia de búsqueda alternativa utiliza el software MPSRCH, que se ejecuta en un ordenador MASPAR. MPSRCH utiliza un algoritmo Smith-Waterman para calificar secuencias en un ordenador masivamente paralelo. Este planteamiento mejora la capacidad de escoger parejas distantemente relacionadas, y tolera especialmente pequeños huecos y errores en las secuencias de nucleótidos. Se pueden usar secuencias de aminoácidos codificadas con ácido
- 20 nucleico para buscar tanto las bases de datos de proteínas como de DNA.

La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" se conoce en la técnica y se refiere a un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como una carga líquida o sólida, diluyente, excipiente, disolvente o material encapsulante, implicado en llevar o transportar cualquier composición o sus componentes. Cada vehículo debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con la composición en cuestión y sus componentes, y no debe ser perjudicial para el paciente. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; (2) almidones, tales como almidón de maíz y almidón de patata; (3) celulosa y sus derivados, tales como carboximetilcelulosa sódica, etilcelulosa y acetato de celulosa; (4) tragacanto en polvo; (5) malta; (6) gelatina; (7) talco; (8) excipientes, tales como manteca de cacao y supositorios de cera; (9) aceites, tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla 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) agentes tampón, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; (15) ácido alginico; (16) agua libre de pirógenos; (17) disolución salina isotónica; (18) disolución de Ringer; (19) alcohol etílico; (20) disoluciones tampón de fosfato; y (21) otras sustancias compatibles no tóxicas empleadas en formulaciones farmacéuticas.

El término "polinucleótido" y la expresión "ácido nucleico" se utilizan intercambiabilmente. Se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, o bien desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, o sus análogos. Los polinucleótidos pueden tener cualquier estructura tridimensional y pueden realizar cualquier función, conocida o desconocida. Los siguientes son ejemplos no limitativos de polinucleótidos: regiones codificantes o no codificantes de un gen o fragmento de gen, locus definidos a partir de análisis de unión, exones, intrones, RNA mensajero (mRNA), RNA de transferencia, RNA ribosómico, ribozimas, cDNA, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos ramificados, plásmidos, vectores, DNA aislado de cualquier secuencia, RNA aislado de cualquier secuencia, sondas de ácido nucleico y cebadores. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y análogos de nucleótidos. Si están presentes, se pueden impartir modificaciones a la estructura del polinucleótido antes o después del ensamblaje polimérico. La secuencia de nucleótidos puede ser interrumpida por componentes no nucleótidos. Un polinucleótido puede además modificarse, tal como por conjugación con un componente de etiquetado. La expresión polinucleótido "recombinante" significa un polinucleótido de origen genómico, de cDNA, semisintético o sintético, que o bien no ocurre en la naturaleza o está unido a otro polinucleótido en una disposición no natural.

50 La expresión tratamiento "profiláctico" o "terapéutico" se conoce en la técnica y se refiere a la administración de un fármaco a un hospedante. Si se administra antes de la manifestación clínica de la condición indeseada (p. ej., enfermedad o estado no deseado del animal hospedante), entonces el tratamiento es profiláctico, es decir, protege al hospedante contra el desarrollo de la condición no deseada, mientras que si se administra después de la manifestación de la condición no deseada, el tratamiento es terapéutico (es decir, tiene como fin disminuir, aliviar o

55 mantener la condición indeseada existente o los efectos colaterales derivados de ella).

La expresión "grupo protector" se conoce en la técnica y se refiere a sustituyentes temporales que protegen un grupo funcional potencialmente reactivo de las transformaciones químicas no deseadas. Los ejemplos de dichos grupos protectores incluyen ésteres de ácidos carboxílicos, silil éteres de alcoholes y acetales y cetales de aldehídos y cetonas, respectivamente. El campo de la química de grupos protectores ha sido revisado por Greene y Wuts en *Protective Groups in Organic Synthesis* (2ª ed., Wiley: Nueva York, 1991).

La expresión "libre de pirógenos", con referencia a una composición, se refiere a una composición que no contiene un pirógeno en una cantidad que conduciría a un efecto adverso (p. ej., irritación, fiebre, inflamación, diarrea,

problemas respiratorios, choque endotóxico, etc.) en un sujeto al cual se le ha administrado la composición. Por ejemplo, la expresión pretende abarcar composiciones que están libres, o prácticamente libres, de una endotoxina tal como, por ejemplo, un lipopolisacárido (LPS).

5 "Vida replicativa" de una célula se refiere al número de células hijas producidas por una "célula madre" individual. "Edad cronológica" o "vida cronológica," por otra parte, se refiere a la longitud de tiempo que una población de células no divididas permanece viable cuando se le agotan los nutrientes. "Aumento de la vida de una célula" o "extensión de la vida de una célula," aplicado a células u organismos, se refiere a aumentar el número de células hijas producidas por una célula; Aumentar la capacidad de las células u organismos para lidiar con el estrés y combatir el daño, p. ej., a DNA, proteínas; y/o aumentar la capacidad de las células u organismos de sobrevivir y existir en estado vivo por más tiempo bajo una condición particular, p. ej., estrés (por ejemplo, choque térmico, estrés osmótico, radiación de alta energía, estrés inducido químicamente, daño al DNA, nivel de sal inadecuado, nivel de nitrógeno inadecuado o nivel de nutrientes inadecuado). La vida puede aumentarse en por lo menos 20%, 30%, 40%, 50%, 60% o entre 20% y 70%, 30% y 60%, 40% y 60% o más, usando los métodos descritos en la presente memoria.

20 "Compuesto activador de sirtuina" se refiere a un compuesto que aumenta el nivel de una proteína sirtuina y/o aumenta por lo menos una actividad de una proteína sirtuina. En una realización ilustrativa, un compuesto activador de sirtuina puede incrementar por lo menos una actividad biológica de una proteína sirtuina en por lo menos aproximadamente 10%, 25%, 50%, 75%, 100% o más. Las actividades biológicas ilustrativas de las proteínas sirtuina incluyen desacetilación, p. ej., de histonas y p53; extensión de la vida; aumento de la estabilidad genómica; silenciamiento de la transcripción; y control de la segregación de proteínas oxidadas entre células madre e hija.

25 "Compuesto inhibidor de sirtuina" se refiere a un compuesto que reduce el nivel de una proteína sirtuina y/o reduce por lo menos una actividad de una proteína sirtuina. En una realización ilustrativa, un compuesto inhibidor de sirtuina puede reducir por lo menos una actividad biológica de una proteína sirtuina en por lo menos aproximadamente 10%, 25%, 50%, 75%, 100% o más. Las actividades biológicas ilustrativas de las proteínas sirtuina incluyen desacetilación, p. ej., de histonas y p53; extensión de la vida; aumento de la estabilidad genómica; silenciamiento de la transcripción; y control de la segregación de proteínas oxidadas entre células madre e hija.

30 "Compuesto modulador de sirtuina" se refiere a un compuesto de Fórmulas XVIII - XXII tal como se describe en la presente memoria. En realizaciones ilustrativas, un compuesto modulador de sirtuina puede o bien incrementar (p. ej., activar o estimular), reducir (p. ej., inhibir o suprimir) o de algún otro modo cambiar la propiedad funcional o la actividad biológica de una proteína sirtuina. Los compuestos moduladores de sirtuina pueden actuar para modular una proteína sirtuina o bien directa o indirectamente. En determinadas realizaciones, un compuesto modulador de sirtuina puede ser un compuesto activador de sirtuina o un compuesto inhibidor de sirtuina.

35 "Proteína sirtuina" se refiere a un miembro de la familia de proteínas sirtuina desacetilasa, o preferiblemente a la familia sir2, que incluyen las proteínas de levadura Sir2 (Núm. de acceso en GenBank P53685), *C. elegans* Sir-2.1 (Núm. de acceso en GenBank NP\_501912) y SIRT1 humana (Núm. de acceso en GenBank NM\_012238 y NP\_036370 (o AF083106)) y SIRT2 (Núm. de acceso en GenBank NM\_012237, NM\_030593, NP\_036369, NP\_085096 y AF083107). Otros miembros de la familia incluyen genes adicionales de tipo levadura Sir2 denominados "genes *HST*" (homólogos de Sir dos) HST1, HST2, HST3 y HST4, y los 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). Las sirtuinas preferidas son aquellas con mayores similitudes con SIRT1, es decir, hSIRT1, y/o Sir2 que con SIRT2, como aquellos miembros que tienen por lo menos parte de la secuencia N-terminal presente en SIRT1 y ausente en SIRT2, tal como SIRT3.

45 "Proteína SIRT1" se refiere a un miembro de la familia sir2 de sirtuina desacetilasas. En una realización, una proteína SIRT1 incluye las proteínas de levadura Sir2 (Núm. de acceso en GenBank P53685), *C. elegans* Sir-2.1 (Núm. de acceso en GenBank NP\_501912), SIRT1 humana (Núm. de acceso en GenBank NM\_012238 o NP\_036370 (o AF083106)) y SIRT2 humana (Núm. de acceso en GenBank NM\_012237, NM\_030593, NP\_036369, NP\_085096 o AF083107) y sus equivalentes y fragmentos. 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 expuesta en los núm. de acceso en GenBank NP\_036370, NP\_501912, NP\_085096, NP\_036369 o P53685. Las proteínas SIRT1 incluyen polipéptidos que comprenden toda o una porción de la secuencia de aminoácidos expuesta en los núm. de acceso en GenBank NP\_036370, NP\_501912, NP\_085096, NP\_036369 o P53685; la secuencia de aminoácidos expuesta en los núm. de acceso en 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 de aminoácidos conservadoras; una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a los núm. de acceso en GenBank NP\_036370, NP\_501912, NP\_085096, NP\_036369 o P53685, y sus fragmentos funcionales. Los polipéptidos de la invención también incluyen homólogos (p. ej., ortólogos y parálogos), variantes o fragmentos, de núm. de acceso en GenBank NP\_036370, NP\_501912, NP\_085096, NP\_036369 o P53685.

60 "Proteína SIRT3" se refiere a un miembro de la familia de proteínas sirtuina desacetilasa y/o a un homólogo de una proteína SIRT1. En una realización, una proteína SIRT3 incluye las proteínas SIRT3 humana (núm. de acceso en

GenBank AAH01042, NP\_036371 o NP\_001017524) y SIRT3 de ratón (número de acceso en GenBank NP\_071878), y sus equivalentes y fragmentos. 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 expuesta en los números de acceso en GenBank AAH01042, NP\_036371, NP\_001017524 o NP\_071878. Las proteínas SIRT3 incluyen los polipéptidos que comprenden toda o una porción de la secuencia de aminoácidos expuesta en los números de acceso en GenBank AAH01042, NP\_036371, NP\_001017524 o NP\_071878; la secuencia de aminoácidos expuesta en los números de acceso en GenBank 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 de aminoácidos conservadoras; una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a los números de acceso en GenBank AAH01042, NP\_036371, NP\_001017524 o NP\_071878, y sus fragmentos funcionales. Los polipéptidos de la invención también incluyen homólogos (p. ej., ortólogos y parálogos), variantes o fragmentos, de números de acceso en GenBank AAH01042, NP\_036371, NP\_001017524 o NP\_071878. En una realización, una proteína SIRT3 incluye un fragmento de la proteína SIRT3 que es producido por escisión con una peptidasa de procesamiento de matriz mitocondrial (MPP) y/o una peptidasa intermedia a mitocondrial (MIP).

La expresión "sustancialmente homóloga" cuando se usa en relación con secuencias de aminoácidos, se refiere a secuencias que son sustancialmente idénticas o similares en secuencia unas con otras, dando origen a una homología de conformación y por lo tanto a la retención, hasta un grado útil, de una o más actividades biológicas (incluidas inmunológicas). La expresión no tiene como fin implicar una evolución común de las secuencias.

El término "sintético" se conoce en la técnica y se refiere a la producción por síntesis química o enzimática *in vitro*.

Las expresiones "administración sistémica," "administrado sistémicamente," "administración periférica" y "administrado periféricamente" se conocen en la técnica y se refieren a la administración de una composición, sustancia terapéutica u otro material que no sea directamente al sistema nervioso central, de modo tal que ingrese en el sistema del paciente y, por ende, esté sujeto a metabolismo y otros procesos similares.

La expresión "agente terapéutico" se conoce en la técnica y se refiere a cualquier resto químico que es una sustancia biológica, fisiológica o farmacológicamente activa que actúa local o sistémicamente en un sujeto. La expresión también significa cualquier sustancia para uso en el diagnóstico, la cura, mitigación, tratamiento o prevención de enfermedad o en la mejoría del desarrollo físico o mental y/o de afecciones en un animal o un ser humano.

La expresión "efecto terapéutico" se conoce en la técnica y se refiere a un efecto local o sistémico en animales, particularmente mamíferos, y más particularmente seres humanos, causado por una sustancia farmacológicamente activa. La frase "cantidad terapéuticamente eficaz" significa que la cantidad de dicha sustancia produce cierto efecto deseado local o sistémico con una relación razonable beneficio/riesgo aplicable a cualquier tratamiento. La cantidad terapéuticamente eficaz de dicha sustancia variará dependiendo del sujeto y de la enfermedad que se está tratando, el peso y la edad del sujeto, la gravedad de la enfermedad, el modo de administración y similares, que el experto en la técnica puede determinar fácilmente. Por ejemplo, ciertas composiciones descritas en esta memoria pueden administrarse en una cantidad suficiente para producir un efecto deseado con una relación razonable beneficio/riesgo aplicable a dicho tratamiento.

"Secuencia reguladora transcripcional" es una expresión genérica utilizada en toda la memoria para hacer referencia a secuencias de DNA, tales como señales de iniciación, potenciadores y promotores, que inducen o controlan la transcripción de las secuencias que codifican la proteína con la que están operativamente unidas. En las realizaciones preferidas, la transcripción de uno de los genes recombinantes está bajo el control de una secuencia promotora (u otra secuencia reguladora transcripcional) que controla la expresión del gen recombinante en un tipo de célula cuya expresión se tiene como intención. También se ha de entender que el gen recombinante puede estar bajo el control de secuencias reguladoras transcripcionales que son iguales o distintas de aquellas secuencias que controlan la transcripción de las formas naturales de los genes descritos en la presente invención.

"Tratar" una afección o enfermedad se refiere a curar como también a aliviar por lo menos un síntoma de la afección o enfermedad.

Un "vector" es una molécula de ácido nucleico de autorreplicación que transfiere una molécula de ácido nucleico insertada en y/o entre células hospedantes. El término incluye vectores que funcionan principalmente para inserción de una molécula de ácido nucleico en una célula, replicación de vectores que funcionan principalmente para la replicación de ácido nucleico, y vectores de expresión que funcionan para la transcripción y/o traducción del DNA o RNA. También se incluyen vectores que proporcionan más de una de las funciones anteriormente mencionadas. Tal como se emplea en la presente memoria, "vectores de expresión" se definen como polinucleótidos que, cuando se introducen en una célula hospedante apropiada, pueden transcribirse y traducirse en polipéptido(s). Un "sistema de expresión" usualmente connota una célula hospedante adecuada comprendida por un vector de expresión que puede funcionar para producir un producto de expresión deseado.

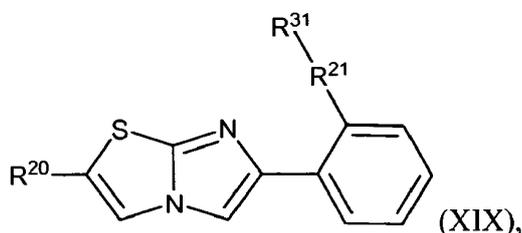
La expresión "deterioro de la visión" se refiere a disminución de la visión, que con frecuencia se revierte solo parcialmente o es irreversible tras el tratamiento (p. ej., cirugía). El deterioro de la visión particularmente intenso se

denomina "ceguera" o "pérdida de la visión", lo cual se refiere a una pérdida de la visión total, a la visión peor que 20/200 y que no puede mejorarse con lentes correctoras, o a un campo visual de menos de 20 grados de diámetro (radio de 10 grados).

5 2. Moduladores de sirtuina

En un aspecto, la invención proporciona nuevos compuestos moduladores de sirtuina para tratar y/o prevenir una amplia variedad de enfermedades y trastornos, lo que incluye, por ejemplo, enfermedades o trastornos relacionados con el envejecimiento o el estrés, diabetes, obesidad, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades y trastornos oculares, enfermedad cardiovascular, trastornos de coagulación de la sangre, inflamación, cáncer y/o calores, etc. Los compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina pueden también utilizarse para tratar una enfermedad o trastorno en un sujeto que se beneficiaría con un aumento de la actividad mitocondrial, para potenciar el rendimiento muscular, para aumentar los niveles de ATP musculares o para tratar o prevenir el daño al tejido muscular asociado con hipoxia e isquemia. Otros compuestos descritos en la presente memoria pueden ser adecuados para uso en una composición farmacéutica y/o uno o más métodos descritos en la presente memoria.

En determinadas realizaciones, los compuestos de Fórmula Estructural (XVIII) tienen la fórmula:



o su sal farmacéuticamente aceptable, donde

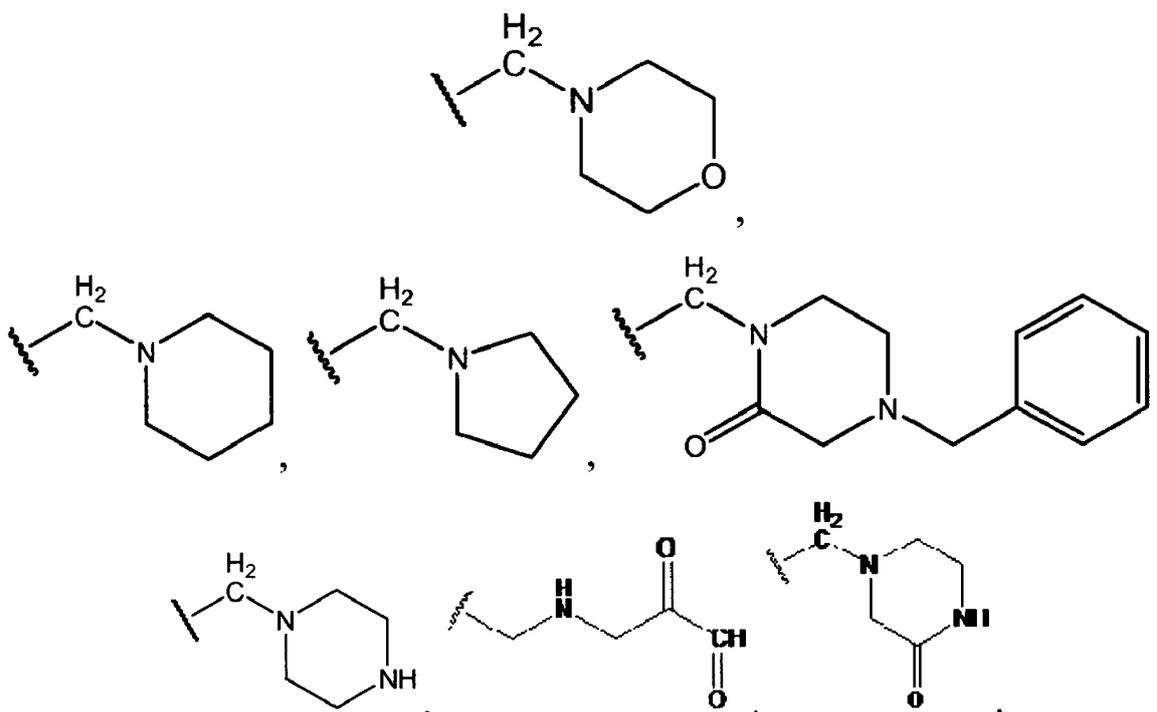
R<sup>20</sup> se selecciona entre H o un grupo solubilizante;

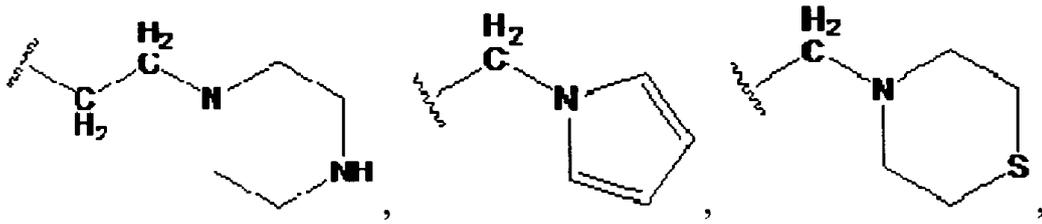
20 R<sup>21</sup> se selecciona entre -NH-C(O)- o -NH-C(O)-CH<sub>2</sub>-; y

R<sup>31</sup> se selecciona entre un arilo monocíclico o bicíclico opcionalmente sustituido, o un heteroarilo monocíclico o bicíclico opcionalmente sustituido.

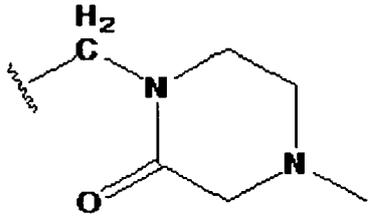
Típicamente, R<sup>19</sup> en los compuestos de la Fórmula Estructural (XVIII) se selecciona entre fenilo, piridilo, tienilo o furilo, particularmente fenilo opcionalmente sustituido.

25 Típicamente, R<sup>20</sup> se selecciona entre H, -CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>,





y

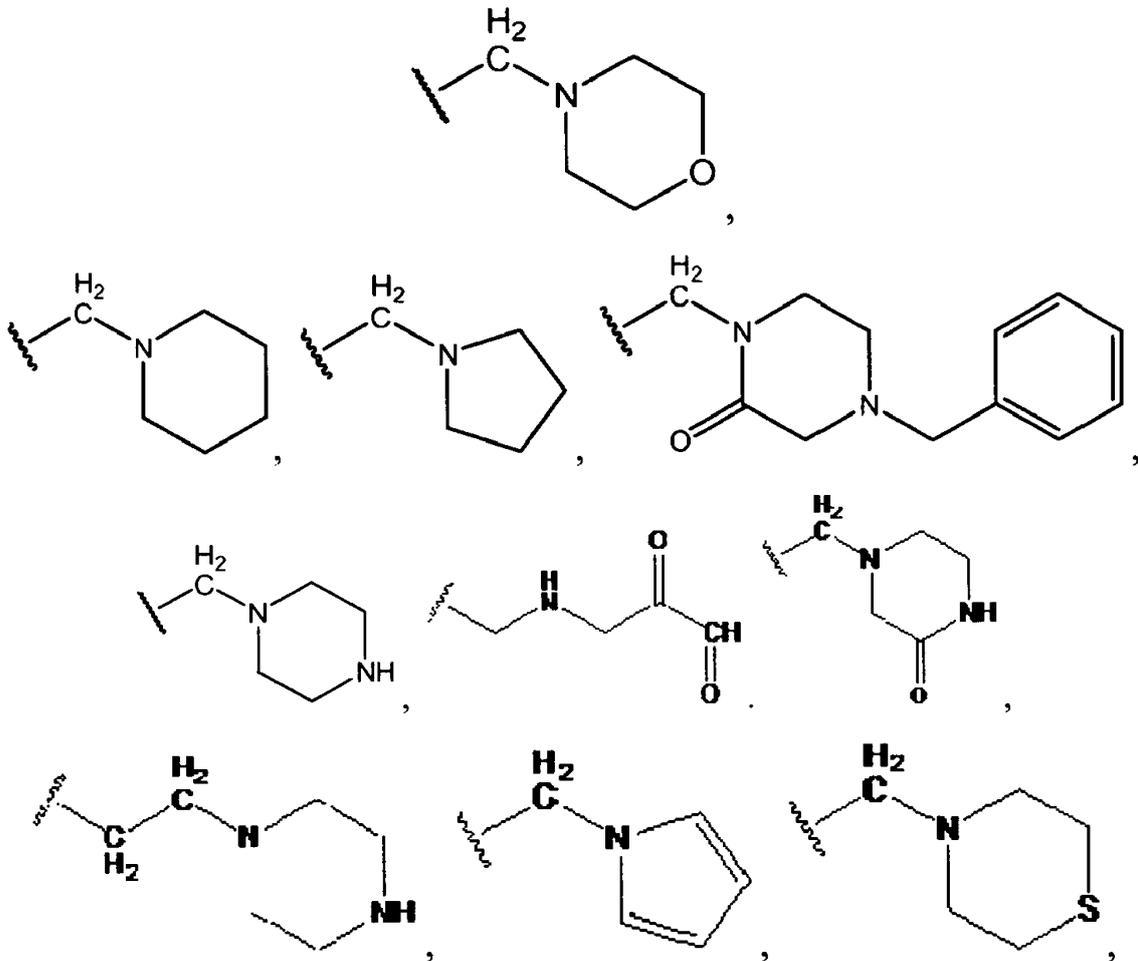


- 5 Típicamente,  $R^{31}$  se selecciona entre fenilo, pirazolilo, furilo, piridilo, pirimidinilo, tienilo, naftilo, benzopirazolilo, benzofurilo, quinoxalinilo, quinoxalinilo o benzotienilo y donde  $R^{31}$  está opcionalmente sustituido.

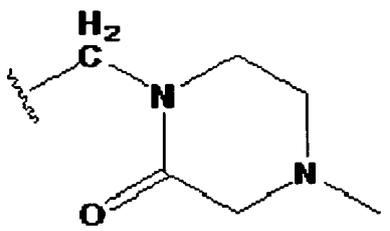
Típicamente,  $R^{21}$  se selecciona entre  $-NH-C(O)-$  o  $-NH-C(O)-CH_2-$ ;

Típicamente,  $R^{19}$  en los compuestos de la Fórmula Estructural (XX) se selecciona entre fenilo, piridilo, tienilo o furilo, particularmente fenilo opcionalmente sustituido. Típicamente,  $R^{20a}$  se selecciona entre H,  $-CH_2-N(CH_3)_2$ ,

10



y



Típicamente, R<sup>31</sup> se selecciona entre fenilo, pirazolilo, furilo, piridilo, pirimidinilo, tienilo, naftilo, benzopirazolilo, benzofurilo, quinolinilo, quinoxalinilo o benzotienilo y donde R<sup>31</sup> está opcionalmente sustituido.

5 Típicamente, R<sup>21</sup> se selecciona entre -NH-C(O)- o -NH-C(O)-CH<sub>2</sub>-;

En determinadas realizaciones de los compuestos de Fórmula Estructural (XXI), R<sup>32</sup> se selecciona entre pirroliilo, pirazolilo, pirazinilo, furilo, piridilo, pirimidinilo o tienilo, y R<sup>32</sup> está opcionalmente sustituido y está opcionalmente benzocondensado.

10 En determinadas realizaciones de los compuestos de Fórmula Estructural (XXI), R<sup>32</sup> se selecciona entre benzofurilo, metilfurilo, benzotienilo, piridilo, pirazinilo, pirimidinilo, pirazolilo, donde dicho metilfurilo, piridilo, pirazinilo, pirimidinilo o pirazolilo está opcionalmente benzocondensado y donde R<sup>32</sup> está opcionalmente sustituido o adicionalmente sustituido.

En los compuestos de Fórmula Estructural (XXII), preferiblemente R<sup>21</sup> se selecciona entre -NH-C(O)- o -NH-C(O)-CH<sub>2</sub>-.

15 Los compuestos de la invención, incluyendo los nuevos compuestos de la invención, pueden también utilizarse en los métodos descritos en esta memoria.

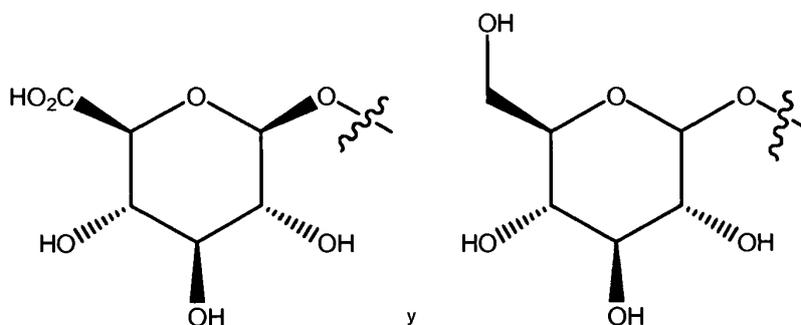
Los compuestos y sus sales descritos en la presente invención también incluyen sus correspondientes hidratos (p. ej., hemihidrato, monohidrato, dihidrato, trihidrato, tetrahidrato) y solvatos. Los disolventes adecuados para la preparación de solvatos e hidratos pueden en general ser seleccionados por el experto en la materia.

20 Los compuestos y sus sales pueden estar presentes en formas amorfas o cristalinas (incluidas las formas co-cristalina y polimórfica).

25 En los compuestos anteriormente descritos, los grupos bivalentes descritos como posibles valores para variables pueden tener cualquier orientación, siempre que dicha orientación resulte en una molécula estable. Preferiblemente, no obstante, el lado izquierdo de un grupo bivalente (p. ej., -NR<sub>1</sub>'-C(O)-) está unido a un grupo arileno o heteroarileno bivalente (p. ej.,

R<sup>19</sup>) y el lado derecho de un grupo bivalente está unido a un grupo arilo monovalente (p. ej., R<sup>31</sup>).

30 Los compuestos moduladores de sirtuina de la invención que tienen sustituyentes de hidroxilo, a menos que se indique lo contrario, pueden también formar los metabolitos secundarios relacionados, tales como fosfato, sulfato, derivados de acilo (p. ej., acetilo, acilo de ácido graso) y azúcar (p. ej., glucuronato, glucosa) (p. ej., de grupos hidroxilo), particularmente los derivados de sulfato, acilo y azúcar. En otros términos, los grupos sustituyentes -OH también incluyen -OSO<sub>3</sub><sup>-</sup> M<sup>+</sup>, donde M<sup>+</sup> es un catión adecuado (preferiblemente H<sup>+</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> o un ión de metal alcalino tal como Na<sup>+</sup> o K<sup>+</sup>) y azúcares tales como



Estos grupos son en general escindibles a -OH por hidrólisis o por escisión metabólica (p. ej., enzimática).

35 En determinadas realizaciones, los compuestos de la invención excluyen una o más de las especies descritas en la Tabla 4.

Los compuestos moduladores de sirtuina de la invención ventajosamente modulan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina, particularmente la actividad de desacetilasa de la proteína sirtuina.

5 Separadamente o además de las propiedades recién mencionadas, ciertos compuestos moduladores de sirtuina de la invención no tienen sustancialmente una o más de las siguientes actividades: La inhibición de PI3-cinasa, la inhibición de aldorreductasa, inhibición de tirosina cinasa, transactivación de EGFR tirosina cinasa, dilatación coronaria o actividad espasmolítica, a concentraciones del compuesto que son eficaces para modular la actividad de desacetilación de una proteína sirtuina (p. ej., tal como una proteína SIRT1 y/o SIRT3).

10 Un grupo alquilo es un hidrocarburo de cadena lineal, ramificado o cíclico, no aromático que está completamente saturado. Típicamente, un grupo alquilo de cadena lineal o ramificado tiene entre 1 y aproximadamente 20 átomos de carbono, preferiblemente entre 1 y aproximadamente 10, y un grupo alquilo cíclico tiene entre 3 y aproximadamente 10 átomos de carbono, preferiblemente entre 3 y aproximadamente 8. Los ejemplos de grupos alquilo de cadena lineal y ramificados incluyen metilo, etilo, n-propilo, iso-propilo, n-butilo, sec-butilo, terc-butilo, pentilo, hexilo, pentilo y octilo. Un grupo alquilo de cadena lineal o ramificado C1-C4 también se denomina grupo "alquilo inferior".

15 Un grupo alqueno es un hidrocarburo no aromático de cadena lineal, ramificado o cíclico que contiene un o más dobles enlaces. Típicamente, los dobles enlaces no están situados en el extremo del grupo alqueno, de modo tal que el doble enlace no es adyacente a otro grupo funcional.

20 Un grupo alquino es un hidrocarburo no aromático de cadena lineal, ramificado o cíclico, que contiene un o más triples enlaces. Típicamente, los triples enlaces no están situados en el extremo del grupo alquino, de modo tal que el triple enlace no es adyacente a otro grupo funcional.

Un anillo (p. ej., un anillo de 5 a 7 miembros) o un grupo cíclico incluye anillos carbocíclicos y heterocíclicos. Dichos anillos pueden estar saturados o insaturados, incluidos los aromáticos. Los anillos heterocíclicos típicamente contienen 1 a 4 heteroátomos, aunque los átomos de oxígeno y azufre no pueden estar adyacentes unos de otros.

25 Los grupos aromáticos (arilo) incluyen grupos aromáticos carbocíclicos tales como fenilo, naftilo y antracilo, y grupos heteroarilo tales como imidazolilo, tienilo, furilo, piridilo, pirimidilo, piranilo, pirazolilo, pirrolilo, pirazinilo, tiazolilo, oxazolilo y tetrazolilo.

30 Los grupos aromáticos también incluyen sistemas de anillos aromáticos policíclicos, condensados en los que un anillo aromático carbocíclico o un anillo heteroarilo está condensado a uno o más anillos heteroarilo. Los ejemplos incluyen benzotienilo, benzofurilo, indolilo, quinolinilo, benzotiazol, benzoxazol, bencimidazol, quinolinilo, isoquinolinilo e isoindolilo.

35 Los anillos heterocíclicos no aromáticos son anillos carbocíclicos no aromáticos que incluyen uno o más heteroátomos tales como nitrógeno, oxígeno o azufre en el anillo. El anillo puede tener cinco, seis, siete u ocho miembros. Los ejemplos incluyen tetrahidrofurilo, tetrahidrotiofenilo, morfolino, tiomorfolino, pirrolidinilo, piperazinilo, piperidinilo y tiazolidinilo, junto con la forma cíclica de azúcares.

Un anillo condensado a un segundo anillo comparte por lo menos un enlace en común.

40 Los sustituyentes adecuados en un grupo alquilo, alqueno, alquino, arilo o arilo no aromático heterocíclico (carbocíclico y heteroarilo) son aquellos que no interfieren sustancialmente con la capacidad de los compuestos descritos de tener una o más de las propiedades descritas en la presente memoria. Un sustituyente interfiere sustancialmente con las propiedades de un compuesto cuando la magnitud de la propiedad se reduce en más de aproximadamente 50% en un compuesto con el sustituyente comparado con un compuesto sin el sustituyente. Los ejemplos de sustituyentes adecuados incluyen -OH, halógeno (-Br, -Cl, -I y -F), -OR<sup>a</sup>, -O-COR<sup>a</sup>, -COR<sup>a</sup>, -C(O)R<sup>a</sup>, -CN, -NO<sup>2</sup>, -COOH, -COOR<sup>a</sup>, -OCO<sub>2</sub>R<sup>a</sup>, -C(O)NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -OC(O)NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -SO<sub>3</sub>H, -NH<sub>2</sub>, -NHR<sup>a</sup>, -N(R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>), -COOR<sup>a</sup>, -CHO, -CONH<sub>2</sub>, -CONHR<sup>a</sup>, -CON(R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>), -NHCOR<sup>a</sup>, -NRCOR<sup>a</sup>, -NHCONH<sub>2</sub>, -NHCONR<sup>a</sup>H, -NHCON(R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>), -NR<sup>c</sup>CONH<sub>2</sub>, -NR<sup>c</sup>CONR<sup>a</sup>H, -NR<sup>c</sup>CON(R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>), -C(=NH)-NH<sub>2</sub>, -C(=NH)-NHR<sup>a</sup>, -C(=NH)-N(R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>), -C(=NR<sup>c</sup>)-NH<sub>2</sub>, -C(=NR<sup>c</sup>)-NHR<sup>a</sup>, -C(=NR<sup>c</sup>)-N(R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>), -NH-C(=NH)-NH<sub>2</sub>, -NH-C(=NH)-NHR<sup>a</sup>, -NH-C(=NH)-N(R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>), -NH-C(=NR<sup>c</sup>)-NH<sub>2</sub>, -NH-C(=NR<sup>c</sup>)-NHR<sup>a</sup>, -NH-C(=NR<sup>c</sup>)-N(R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>), -NR<sup>d</sup>H-C(=NH)-NH<sub>2</sub>, -NR<sup>d</sup>-C(=NH)-NHR<sup>a</sup>, -NR<sup>d</sup>-C(=NH)-N(R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>), -NR<sup>d</sup>-C(=NR<sup>c</sup>)-NH<sub>2</sub>, -NR<sup>d</sup>-C(=NR<sup>c</sup>)-NHR<sup>a</sup>, -NR<sup>d</sup>-C(=NR<sup>c</sup>)-N(R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>), -NHNH<sub>2</sub>, -NHNHR<sup>a</sup>, -NHR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, -SO<sub>2</sub>NHR<sup>a</sup>, -SO<sub>2</sub>NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -CH=CHR<sup>a</sup>, -CH=CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -CR<sup>c</sup>=CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, CR<sup>c</sup>=CHR<sup>a</sup>, -CR<sup>c</sup>=CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -CCR<sup>a</sup>, -SH, -SO<sub>k</sub>R<sup>a</sup> (k es 0, 1 o 2), -S(O)<sub>k</sub>OR<sup>a</sup> (k es 0, 1 o 2) y -NH-C(=NH)-NH<sub>2</sub>. R<sup>a</sup>-R<sup>d</sup> son cada uno independientemente un grupo alifático, alifático sustituido, bencilo, bencilo sustituido, aromático o aromático sustituido, preferiblemente un grupo alquilo, bencílico o arilo. Además, -NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, tomados juntos, pueden tener también la forma de un grupo heterocíclico no aromático, sustituido o no sustituido. Un grupo heterocíclico no aromático, grupo bencilo o grupo arilo puede también tener un grupo alifático o alifático sustituido como sustituyente. Un grupo alifático sustituido puede también tener un anillo heterocíclico no aromático, un anillo heterocíclico no aromático sustituido, bencilo, bencilo sustituido, arilo o arilo sustituido como sustituyente. Un grupo heterocíclico no aromático, alifático, sustituido, arilo sustituido o bencilo sustituido puede tener más de un sustituyente.

Las combinaciones de sustituyentes y variables contempladas por la presente invención son solamente aquellas que producen la formación de compuestos estables. Tal como se emplea en la presente memoria, el término "estable" se refiere a compuestos que poseen la estabilidad suficiente para permitir la fabricación, y que mantienen la integridad del compuesto por un periodo de tiempo suficiente para ser útiles a los fines que se detallan en la presente memoria.

Un grupo donante de enlaces de hidrógeno es un grupo funcional que tiene un átomo de hidrógeno positivamente cargado (p. ej., -OH, -NH<sub>2</sub>, -SH) o un grupo (p. ej., un éster) que se metaboliza en un grupo capaz de donar un enlace de hidrógeno.

Tal como se emplea en la presente memoria, un "grupo solubilizante" es un resto que tiene carácter hidrófilo suficiente para mejorar o aumentar la solubilidad en agua del compuesto en el que se incluye, en comparación con un compuesto análogo que no incluye el grupo. El carácter hidrófilo puede lograrse por cualquier medio, tal como la inclusión de grupos funcionales que se ionizan bajo las condiciones de uso para formar restos cargados (p. ej., ácidos carboxílicos, ácidos sulfónicos, ácidos fosfóricos, aminas, etc.); grupos que incluyen cargas permanentes (p. ej., grupos amonio cuaternario); y/o heteroátomos o grupos heteroatómicos (p. ej., O, S, N, NH, N-(CH<sub>2</sub>)<sub>y</sub>-R<sup>a</sup>, N-(CH<sub>2</sub>)<sub>y</sub>-C(O)R<sup>a</sup>, N-(CH<sub>2</sub>)<sub>y</sub>-C(O)OR<sup>a</sup>, N-(CH<sub>2</sub>)<sub>y</sub>-S(O)<sub>2</sub>R<sup>a</sup>, N-(CH<sub>2</sub>)<sub>y</sub>-S(O)<sub>2</sub>OR<sup>a</sup>, N-(CH<sub>2</sub>)<sub>y</sub>-C(O)NR<sup>a</sup>R<sup>a</sup>, etc., donde R<sup>a</sup> se selecciona entre hidrógeno, alquilo inferior, cicloalquilo inferior, (C6-C14) arilo, fenilo, naftilo, arilalquilo (C7-C20) y bencilo, donde R<sup>a</sup> está opcionalmente sustituido; y y es un entero entre 0 y 6), grupos heterocíclicos opcionalmente sustituidos (p. ej., -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-R<sup>b</sup>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-C(O)-R<sup>b</sup>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-R<sup>b</sup>, donde R<sup>b</sup> se selecciona entre un heterociclo monocíclico saturado opcionalmente sustituido, un heterociclo condensado bicíclico saturado opcionalmente sustituido, un heterociclo espiro bicíclico saturado opcionalmente sustituido, un heteroarilo opcionalmente sustituido y un heterociclo no arilo parcialmente sustituido y opcionalmente sustituido; y n es un entero entre 0 y 2). Se ha de entender que los sustituyentes presentes en R<sup>a</sup> o R<sup>b</sup> no deben mejorar o aumentar la solubilidad en agua en comparación con sus contrapartes no sustituidas para estar dentro del alcance de la presente definición. Se requiere que dichos sustituyentes no reviertan significativamente el avance en solubilidad en agua provisto por el resto R<sup>a</sup> o R<sup>b</sup> no sustituido.

En una realización, el grupo solubilizante aumenta la solubilidad en agua del correspondiente compuesto que carece del grupo solubilizante por lo menos 5 veces, preferiblemente por lo menos 10 veces, más preferiblemente por lo menos 20 veces y lo más preferiblemente por lo menos 50 veces.

En una realización preferida, el grupo solubilizante es un resto de la fórmula: -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-R<sup>100</sup>-N(R<sup>101</sup>)(R<sup>101</sup>), en la que:

n se selecciona entre 0, 1 o 2;

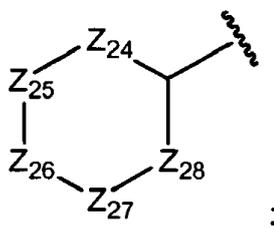
R<sup>100</sup> se selecciona entre un enlace, -C(O)- o -O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>; y

cada R<sup>101</sup> se selecciona independientemente entre:

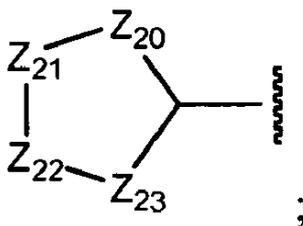
a. hidrógeno;

b. alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> lineal o ramificado, donde dicho alquilo está opcionalmente sustituido con halo, CN, OH, O- (alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> lineal o ramificado), N(R<sub>1</sub>')(R<sub>1</sub>') o =O;

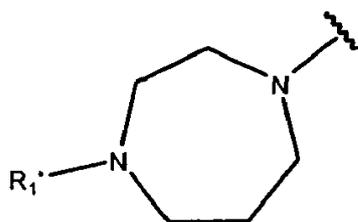
c.



d.

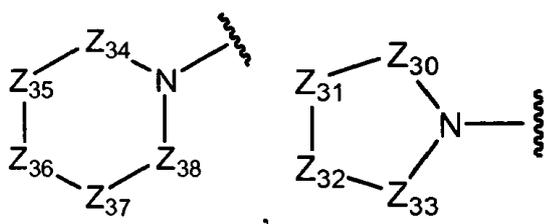


e.

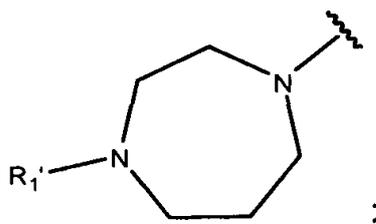


o

5 f. ambos restos  $R^{101}$  se toman junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos para formar un anillo de la estructura



o



o

10 g. ambos restos  $R^{101}$  se toman junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos para formar un anillo heteroarilo de 5 miembros que contiene 1 a 3 átomos N adicionales, donde dicho anillo heteroarilo está opcionalmente sustituido con  $R_1'$ ;

en la que:

cada Z se selecciona independientemente entre -O-, -S-, -NR<sub>1'</sub>- o -C(R<sup>50</sup>)(R<sup>50</sup>)-, donde:

15 por lo menos tres de Z<sub>20</sub>, Z<sub>21</sub>, Z<sub>22</sub> y Z<sub>23</sub> son -C(R<sup>50</sup>)(R<sup>50</sup>)-;

por lo menos tres de Z<sub>24</sub>, Z<sub>25</sub>, Z<sub>26</sub>, Z<sub>27</sub> y Z<sub>28</sub> son -C(R<sup>50</sup>)(R<sup>50</sup>)-;

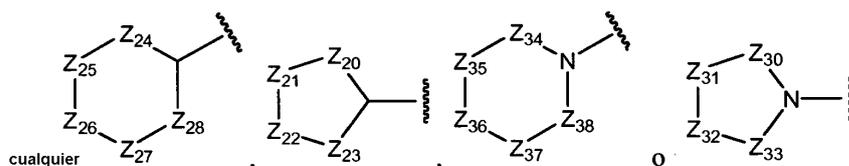
por lo menos cuatro de Z<sub>30</sub>, Z<sub>31</sub>, Z<sub>32</sub> y Z<sub>33</sub> son -C(R<sup>50</sup>)(R<sup>50</sup>)-; y

por lo menos cuatro de Z<sub>34</sub>, Z<sub>35</sub>, Z<sub>36</sub>, Z<sub>37</sub> y Z<sub>38</sub> son -C(R<sup>50</sup>)(R<sup>50</sup>)-;

20 cada R<sub>1</sub> se selecciona independientemente entre hidrógeno o un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> lineal o ramificado opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados entre halo, -CN, -OH, -OCH<sub>3</sub>, -NH<sub>2</sub>, -NH(CH<sub>3</sub>), -N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> o =O;

cada R<sup>50</sup> se selecciona independientemente entre R<sub>1'</sub>, halo, CN, OH, O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> lineal o ramificado), N(R<sub>1'</sub>)(R<sub>1'</sub>), =CR<sub>1'</sub>, SR<sub>1'</sub>, =NR<sub>1'</sub>, =NOR<sub>1'</sub> o =O;

25 dos R<sup>50</sup> cualesquiera no cíclicos adecuados están opcionalmente unidos entre sí directamente o mediante un puente alquileo, alquenileno o alcanodilideno C<sub>1</sub> a C<sub>2</sub> para producir un anillo bicíclico condensado o espiro; y



la estructura de anillo está opcionalmente benzocondensada o condensada a un heteroarilo monocíclico para producir un anillo bicíclico.

- 5 Para fines de claridad, la expresión "puente alquileo, alquilenilo o alcanodilideno C<sub>1</sub> a C<sub>2</sub>" significa las estructuras multivalentes -CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH=, =CH-, -CH=CH- o =CH-CH=. Los dos restos R<sup>50</sup> que están opcionalmente unidos entre sí pueden o bien estar en el mismo átomo de carbono o en átomos de carbono distintos. La primera opción produce un anillo bicíclico espiro, mientras que la segunda produce un anillo bicíclico condensado. Será obvio para los expertos en la materia que cuando dos R<sup>50</sup> estén unidos entre sí para formar un anillo (o bien directamente o a través de uno de los puentes mencionados), se perderán uno o más átomos de hidrógeno terminales en cada R<sup>50</sup>. Por consiguiente, un resto "R<sup>50</sup> no cíclico adecuado" disponible para formar un anillo es un resto R<sup>50</sup> no cíclico que comprende por lo menos un átomo de hidrógeno terminal.

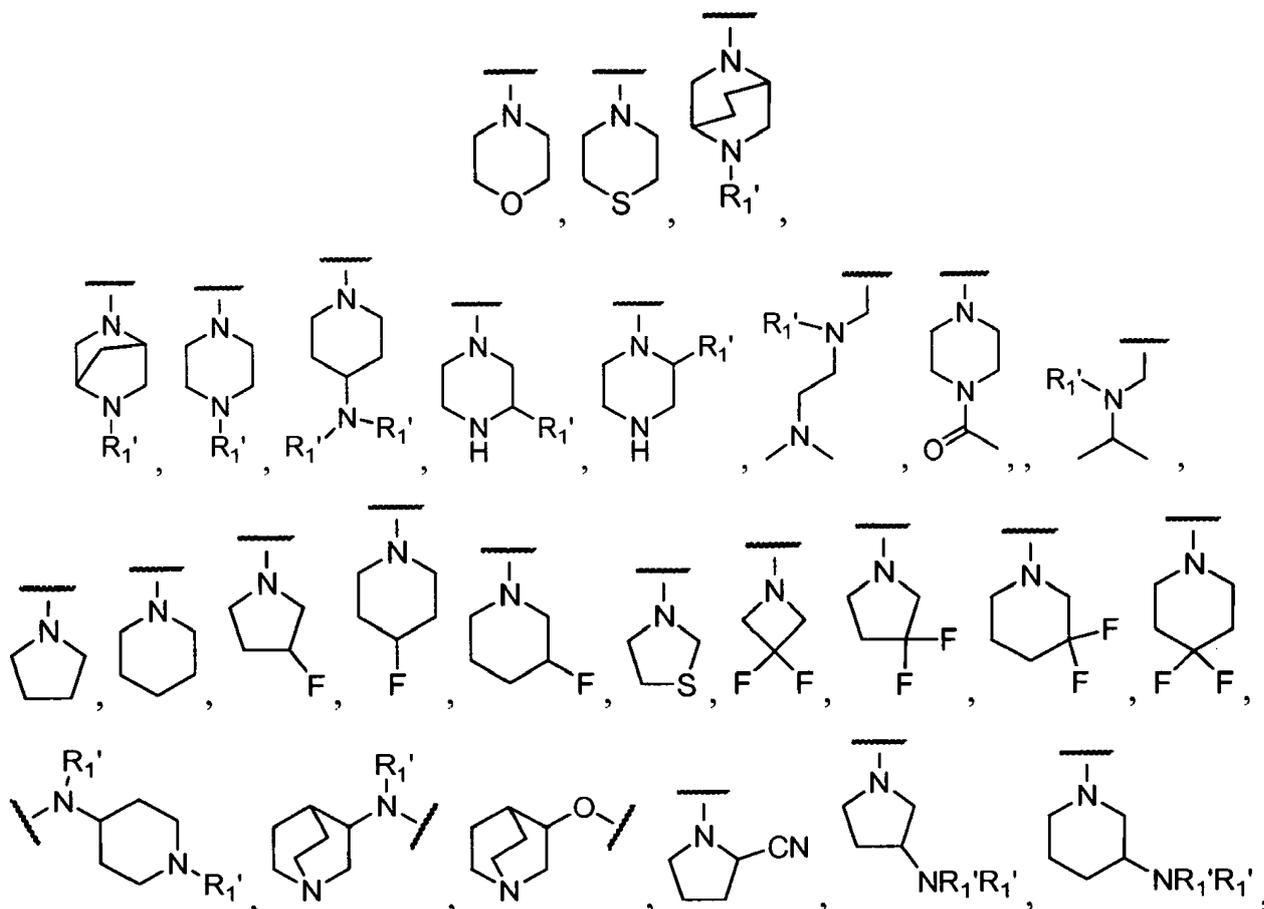
10

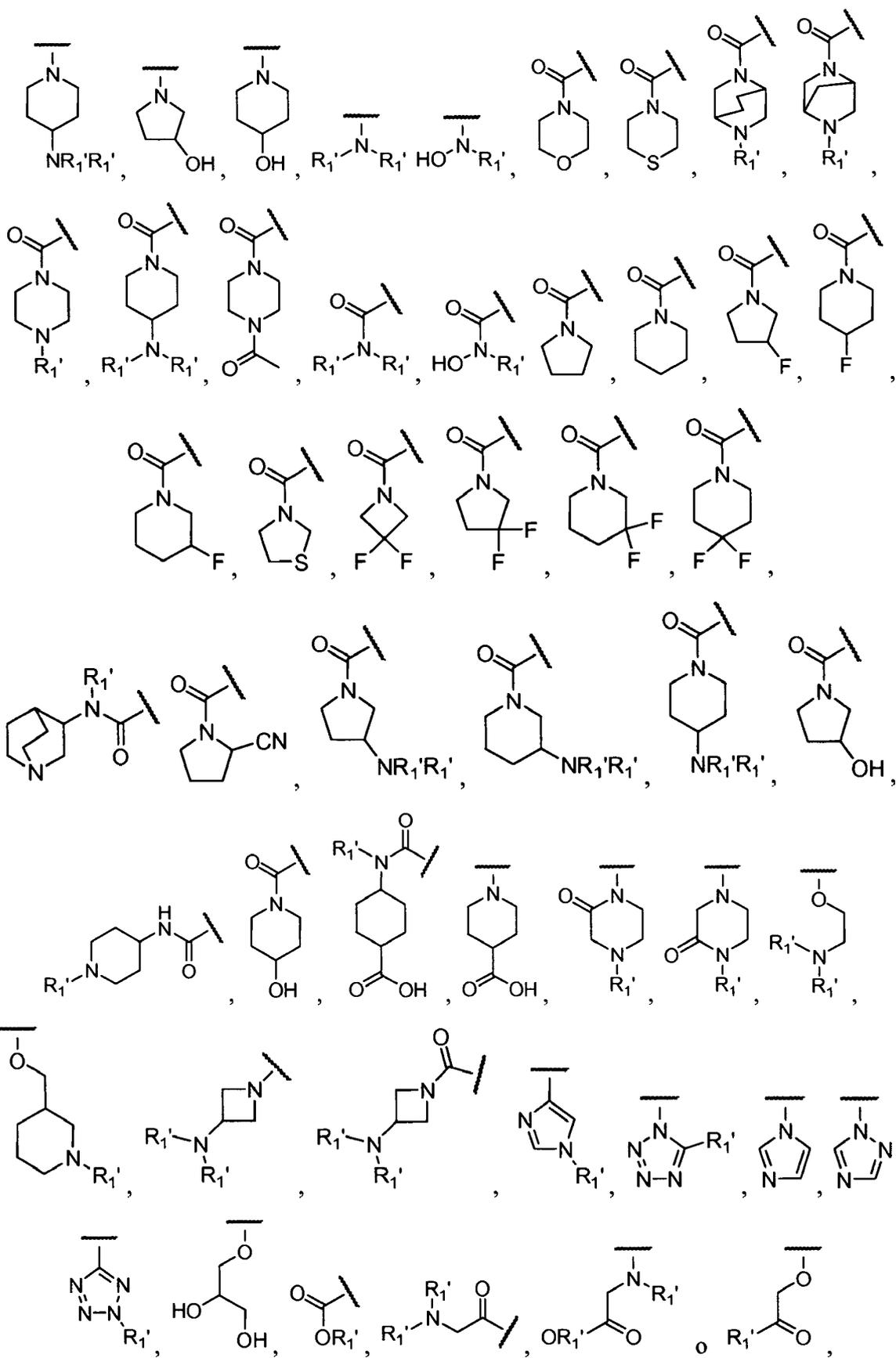
En otra realización preferida, el grupo solubilizante es un resto de la fórmula: -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-O-R<sup>101</sup>, donde n y R<sup>101</sup> son como se definió anteriormente.

- 15 En otra realización preferida, el grupo solubilizante es un resto de la fórmula: -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-C(O)-R<sub>1</sub>', donde n y R<sub>1</sub>' son como se definió anteriormente.

En una realización preferida, un grupo solubilizante se selecciona entre -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-R<sup>102</sup>, donde n es 0, 1 o 2; y R<sup>102</sup> se selecciona entre

20





5

donde R<sub>1</sub>' son como se definió anteriormente.

En una realización incluso más preferida, un grupo solubilizante se selecciona entre 2-dimetilaminoetilcarbamoilo, piperazin-1-ilcarbonilo, piperazinilmetilo, dimetilaminometilo, 4-metilpiperazin-1-ilmetilo, 4-aminopiperidin-1-il-metilo, 4-fluoropiperidin-1-il-metilo, morfolinometilo, pirrolidin-1-ilmetilo, 2-oxo-4-bencilpiperazin-1-ilmetilo, 4-bencilpiperazin-1-ilmetilo, 3-oxopiperazin-1-ilmetilo, piperidin-1-ilmetilo, piperazin-1-ilmetilo, 2,3-dioxopropilaminometilo, tiazolidin-3-ilmetilo, 4-acetilpiperazin-1-ilmetilo, 4-acetilpiperazin-1-ilo, morfolino, 3,3-difluoroazetidín-1-ilmetilo, 2*H*-tetrazol-5-ilmetilo, tiomorfolin-4-ilmetilo, 1-oxotiomorfolin-4-ilmetilo, 1,1-dioxotiomorfolin-4-ilmetilo, 1*H*-imidazol-1-ilmetilo, 3,5-dimetilpiperazin-1-ilmetilo, 4-hidroxipiperidin-1-ilmetilo, *N*-metil(1-acetilpiperidin-4-il)-aminometilo, *N*-metilquinuclidin-3-ilaminometilo, 1*H*-1,2,4-triazol-1-ilmetilo, 1-metilpiperidin-3-il-oximetilo o 4-fluoropiperidin-1-ilo.

En la medida en que no se incluya dentro de alguna de las definiciones expuestas anteriormente, la expresión "grupo solubilizante" también incluye restos descritos como unidos a la posición 7 de ácido 1-ciclopropil-6-fluoro-1,4-dihidro-4-oxoquinolina-3-carboxílico (ciprofloxacín) y sus derivados, como se describe en las publicaciones PCT WO 2005026165, WO 2005049602 y WO 2005033108, y en las publicaciones de patentes europeas EP 0343524, EP 0688772, EP 0153163, EP 0159174; como también "grupos solubilizantes en agua" descritos en la publicación de patente estadounidense 2006/0035891. La descripción de cada una de estas publicaciones de patentes se incorpora a la presente memoria por referencia.

Los dobles enlaces indicados en una estructura como:



tienen como fin incluir tanto la configuración (E) como (Z). Preferiblemente, los dobles enlaces están en la configuración (E).

Un azúcar es un derivado de aldehído o cetona de un alcohol polihidroxi de cadena lineal, que contiene por lo menos tres átomos de carbono. Un azúcar puede existir como una molécula lineal o, preferiblemente, como una molécula cíclica (p. ej., en la forma de piranosa o furanosa). Preferiblemente, un azúcar es un monosacárido tal como glucosa o ácido glucurónico. En realizaciones de la invención en las que, por ejemplo, se desea la residencia prolongada de un compuesto derivado con un azúcar, el azúcar es preferiblemente un azúcar no natural. Por ejemplo, uno o más grupos hidroxilo son sustituidos con otro grupo, tal como un halógeno (p. ej., cloro). La configuración estereoquímica en uno o más átomos de carbono puede también alterarse, en comparación con un azúcar natural. Un ejemplo de un azúcar no natural adecuado es sucralosa.

Un ácido graso es un ácido carboxílico que tiene un resto hidrocarbonado de cadena larga. Típicamente, un ácido graso tiene un número par de átomos de carbono en el intervalo de 12 a 24, a menudo de 14 a 20. Los ácidos grasos pueden ser saturados o insaturados y sustituidos o no sustituidos. Los ácidos grasos pueden ser naturales o no naturales. En realizaciones de la invención en las que, por ejemplo, se desea la residencia prolongada de un compuesto que tiene un resto de ácido graso, el ácido graso es preferiblemente un azúcar no natural. El grupo acilo de un ácido graso consiste en el resto hidrocarbonado y en el resto carbonilo de la funcionalidad de ácido carboxílico, pero excluye el resto -OH asociado con la funcionalidad de ácido carboxílico.

También se incluyen en la presente invención sales, particularmente las sales farmacéuticamente aceptables, de los compuestos moduladores de sirtuina descritos en la presente memoria. Los compuestos de la presente invención que poseen suficiente carácter ácido, suficiente carácter de base, o ambos grupos funcionales, pueden reaccionar con cualquiera de un número de bases inorgánicas, y ácidos inorgánicos y orgánicos para formar una sal. Alternativamente, los compuestos que están inherentemente cargados, tales como aquellos con un nitrógeno cuaternario, pueden formar una sal con un contraión apropiado (p. ej., un haluro tal como bromuro, cloruro o fluoruro, particularmente bromuro).

Los ácidos comúnmente empleados para formar sales de adición de ácidos son ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido hidroyódico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico y similares, y los ácidos orgánicos tales como ácido p-toluenosulfónico, ácido metanosulfónico, ácido oxálico, ácido p-bromofenil-sulfónico, ácido carbónico, ácido succínico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido acético y similares. Los ejemplos de dichas sales incluyen sulfato, piro-sulfato, bisulfato, sulfito, bisulfito, fosfato, monohidrogenfosfato, dihidrogenfosfato, metafosfato, pirofosfato, cloruro, bromuro, yoduro, acetato, propionato, decanoato, caprilato, acrilato, formato, isobutirato, caproato, heptanoato, propiolato, oxalato, malonato, succinato, suberato, sebacato, fumarato, maleato, butino-1,4-dioato, hexino-1,6-dioato, benzoato, clorobenzoato, metilbenzoato, dinitrobenzoato, hidroxibenzoato, metoxibenzoato, ftalato, sulfonato, xilenosulfonato, fenilacetato, fenilpropionato, fenilbutirato, citrato, lactato, gamma-hidroxibutirato, glicolato, tarttrato, metanosulfonato, propanosulfonato, naftaleno-1-sulfonato, naftaleno-2-sulfonato, mandelato y similares.

Las sales de adición de bases incluyen aquellas derivadas de bases inorgánicas, tales como amonio o hidróxidos alcalinos o de metal alcalino térreo, carbonatos, bicarbonatos y similares. Dichas bases útiles para preparar las sales de la presente invención incluyen por lo tanto hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de amonio, carbonato de potasio y similares.

De acuerdo con otra realización, la presente invención proporciona métodos para producir los compuestos moduladores de sirtuina anteriormente definidos. Los compuestos pueden sintetizarse usando técnicas convencionales. Ventajosamente, estos compuestos se sintetizan convenientemente a partir de materiales de partida fácilmente disponibles.

Las transformaciones y metodologías de química sintética útiles para sintetizar los compuestos moduladores de sirtuina descritos en la presente invención se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, aquellas descritas en R. Larock, *Comprehensive Organic Transformations* (1989); T. W. Greene y P. G. M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 2ª Ed. (1991); L. Fieser y M. Fieser, *Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis* (1994); y L. Paquette, ed., *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis* (1995).

En una realización ilustrativa, un compuesto modulador de sirtuina puede atravesar la membrana citoplásmica de una célula. Por ejemplo, un compuesto puede tener una permeabilidad celular de por lo menos aproximadamente 20%, 50%, 75%, 80%, 90% o 95%.

Los compuestos moduladores de sirtuina descritos en la presente memoria también tienen una o más de las siguientes características: el compuesto puede ser esencialmente no tóxico para una célula o sujeto; el compuesto modulador de sirtuina puede ser una molécula orgánica o una molécula pequeña de 2000 amu o menos, 1000 amu o menos; un compuesto puede tener una semivida bajo condiciones atmosféricas normales de por lo menos aproximadamente 30 días, 60 días, 120 días, 6 meses o 1 año; el compuesto puede tener una semivida en disolución de por lo menos aproximadamente 30 días, 60 días, 120 días, 6 meses o 1 año; un compuesto modulador de sirtuina puede ser más estable en disolución que resveratrol por al menos un factor de aproximadamente 50%, 2 veces, 5 veces, 10 veces, 30 veces, 50 veces o 100 veces; un compuesto modulador de sirtuina puede promover la desacetilación del factor de reparación de DNA Ku70; un compuesto modulador de sirtuina puede promover la desacetilación de Rc1A/p65; un compuesto puede incrementar la velocidad de recambio y potenciar la sensibilidad de las células a la apoptosis inducida por TNF.

En determinadas realizaciones, un compuesto modulador de sirtuina no tiene ninguna capacidad sustancial de inhibir una histona desacetilasa (HDAC) de clase I, una HDAC de clase II o HDAC I y II, a concentraciones (p. ej., *in vivo*) eficaces para modular la actividad de la desacetilasa de la sirtuina. Por ejemplo, en realizaciones preferidas, el compuesto modulador de sirtuina es un compuesto activador de sirtuina y se elige que tenga un valor EC<sub>50</sub> para activar la actividad de la sirtuina desacetilasa de por lo menos 5 veces menos que el valor EC<sub>50</sub> para inhibición de un HDAC I y/o HDAC II, e incluso más preferiblemente por lo menos 10 veces, 100 veces o incluso 1000 veces menos. Los métodos para ensayar la actividad de HDAC I y/o HDAC II se conocen en la técnica, y los kits para realizar dichos ensayos pueden adquirirse en el mercado. Véanse p. ej., BioVision, Inc. (Mountain View, CA; world wide web at biovision.com) y Thomas Scientific (Swedesboro, NJ; world wide web tomassci.com).

En determinadas realizaciones, un compuesto modulador de sirtuina no tiene ninguna capacidad sustancial de modular los homólogos de sirtuina. En una realización, un activador de la proteína sirtuina humana puede no tener ninguna capacidad sustancial de activar una proteína sirtuina proveniente de eucariotas inferiores, particularmente de levadura o patógenos humanos, a concentraciones (p. ej., *in vivo*) eficaces para activar la actividad de la desacetilasa de sirtuina humana. Por ejemplo, se puede elegir un compuesto activador de sirtuina que tenga un valor EC<sub>50</sub> para activar una sirtuina humana, como SIRT1 y/o SIRT3, la actividad de desacetilasa que es por lo menos 5 veces menor que el valor EC<sub>50</sub> para activar una sirtuina de levadura, tal como Sir2 (como *Candida*, *S. cerevisiae*, etc.), e incluso más preferiblemente por lo menos 10 veces, 100 veces o incluso 1000 veces menos. En otra realización, un inhibidor de una proteína sirtuina proveniente de eucariotas inferiores, particularmente de patógenos humanos o de levadura, no tiene ninguna capacidad sustancial de inhibir una proteína sirtuina de seres humanos a concentraciones (p. ej., *in vivo*) eficaces para inhibir la actividad de la desacetilasa de una proteína sirtuina de una eucariota inferior. Por ejemplo, se puede elegir un compuesto inhibidor de sirtuina que tenga un valor CI<sub>50</sub> para inhibir una sirtuina humana, como SIRT1 y/o SIRT3, la actividad de desacetilasa que es por lo menos 5 veces menor que el valor CI<sub>50</sub> para inhibir una sirtuina de levadura, tal como Sir2 (como *Candida*, *S. cerevisiae*, etc.), e incluso más preferiblemente por lo menos 10 veces, 100 veces o incluso 1000 veces menos.

En determinadas realizaciones, un compuesto modulador de sirtuina puede tener la capacidad de modular uno o más homólogos de la proteína sirtuina, tales como por ejemplo, una o más SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6 o SIRT7 humanas. En una realización, un compuesto modulador de sirtuina tiene la capacidad de modular tanto una proteína SIRT1 como SIRT3.

En otras realizaciones, un modulador de SIRT1 no tiene ninguna capacidad sustancial de modular otros homólogos de la proteína sirtuina, tales como por ejemplo, una o más de SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6 o SIRT7 humanas, a concentraciones (p. ej., *in vivo*) eficaces para modular la actividad de la desacetilasa de SIRT1 humana. Por ejemplo, se puede elegir un compuesto modulador de sirtuina que tenga un valor ED<sub>50</sub> para modular la actividad

de desacetilasa de SIRT1 humana que sea por lo menos 5 veces inferior al valor ED<sub>50</sub> para modular una o más SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6 o SIRT7 humanas, e incluso más preferiblemente por lo menos 10 veces, 100 veces o incluso 1000 veces inferior. En una realización, un modulador de SIRT1 no tiene ninguna capacidad sustancial de modular una proteína SIRT3.

En otras realizaciones, un modulador de SIRT1 no tiene ninguna capacidad sustancial de modular otros homólogos de la proteína sirtuina, tales como por ejemplo, una o más de SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6 o SIRT7 humanas, a concentraciones (p. ej., *in vivo*) eficaces para modular la actividad de la desacetilasa de SIRT3 humana. Por ejemplo, se puede elegir un compuesto modulador de sirtuina que tenga un valor ED<sub>50</sub> para modular la actividad de desacetilasa de SIRT3 humana que sea por lo menos 5 veces inferior al valor ED<sub>50</sub> para modular una o más SIRT1, SIRT2, SIRT4, SIRT5, SIRT6 o SIRT7 humanas, e incluso más preferiblemente por lo menos 10 veces, 100 veces o incluso 1000 veces inferior. En una realización, un modulador de SIRT3 no tiene ninguna capacidad sustancial de modular una proteína SIRT1.

En determinadas realizaciones, un compuesto modulador de sirtuina puede tener una afinidad de unión hacia una proteína sirtuina de aproximadamente 10<sup>-9</sup>M, 10<sup>-10</sup>M, 10<sup>-11</sup>M, 10<sup>-12</sup>M o menos. Un compuesto modulador de sirtuina puede reducir (activador) o incrementar (inhibidor) el valor Km aparente de una proteína sirtuina para su sustrato o NAD<sup>+</sup> (u otro cofactor) por un factor de por lo menos aproximadamente 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 50 o 100. En determinadas realizaciones, los valores Km se determinan usando el ensayo de espectrometría de masas descrito en la presente memoria. Los compuestos activadores preferidos reducen el valor Km de una sirtuina para su sustrato o cofactor hasta un grado mayor que el causado por resveratrol en una concentración similar, o reducen el valor Km de una sirtuina para su sustrato o cofactor similar a aquel causado por resveratrol en una concentración inferior. Un compuesto modulador de sirtuina puede incrementar el valor Vmax de una proteína sirtuina por un factor de por lo menos aproximadamente 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 50 o 100. Un compuesto modulador de sirtuina puede tener un valor ED<sub>50</sub> para modular la actividad de desacetilasa de una proteína SIRT1 y/o SIRT3 de menos de aproximadamente 1 nM, menos de aproximadamente 10 nM, menos de aproximadamente 100 nM, menos de aproximadamente 1 μM, menos de aproximadamente 10 μM, menos de aproximadamente 100 μM, o entre aproximadamente 1-10 nM, entre aproximadamente 10-100 nM, entre aproximadamente 0,1-1 μM, entre aproximadamente 1-10 μM o entre aproximadamente 10-100 μM. Un compuesto modulador de sirtuina puede modular la actividad de la desacetilasa de una proteína SIRT1 y/o SIRT3 por un factor de por lo menos aproximadamente 5, 10, 20, 30, 50 o 100, según lo medido en un ensayo celular o en un ensayo basado en células. Un compuesto activador de sirtuina puede causar por lo menos aproximadamente 10%, 30%, 50%, 80%, 2 veces, 5 veces, 10 veces, 50 veces o 100 veces mayor inducción de la actividad de desacetilasa de una proteína sirtuina en relación con la misma concentración de resveratrol. Un compuesto modulador de sirtuina puede tener un valor ED<sub>50</sub> para modular SIRT5 por lo menos aproximadamente 10 veces, 20 veces, 30 veces, 50 veces mayor que aquel para modular SIRT1 y/o SIRT3.

### 3. Usos ilustrativos

En ciertos aspectos, la aplicación considera métodos para modular el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina y métodos para su uso.

En determinadas realizaciones, la invención considera métodos para uso de compuestos moduladores de sirtuina en los que los compuestos moduladores de sirtuina activan una proteína sirtuina, p. ej., aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina. Los compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina pueden ser útiles para una diversidad de aplicaciones terapéuticas que incluyen, por ejemplo, aumentar la vida de una célula y tratar y/o prevenir una amplia gama de enfermedades y trastornos que incluyen, por ejemplo, enfermedades o trastornos relacionados con el envejecimiento o el estrés, diabetes, obesidad, enfermedades neurodegenerativas, enfermedad cardiovascular, trastornos de coagulación de la sangre, inflamación, cáncer y/o sofocos, etc. Los métodos comprenden administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad farmacéuticamente eficaz de un compuesto modulador de sirtuina, p. ej., un compuesto activador de sirtuina.

En otras realizaciones, la solicitud considera métodos para uso de compuestos moduladores de sirtuina en los que los compuestos moduladores de sirtuina reducen la actividad de la sirtuina, p. ej., reducen el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina. Los compuestos moduladores de sirtuina que reducen el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina pueden ser útiles para una variedad de aplicaciones terapéuticas que incluyen, por ejemplo, aumentar la sensibilidad celular al estrés (incluyendo aumentar la radiosensibilidad y/o la quimiosensibilidad), aumentar la cantidad y/o el índice de apoptosis, tratamiento de cáncer (opcionalmente en combinación con otro agente quimioterapéutico), estimulación del apetito y/o estimulación del aumento de peso, etc. Los métodos comprenden administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad farmacéuticamente eficaz de un compuesto modulador de sirtuina, p. ej., un compuesto inhibidor de sirtuina.

Si bien los solicitantes no desean estar influenciados por la teoría, se cree que los activadores e inhibidores de la presente invención pueden interactuar con una sirtuina en el mismo sitio dentro de la proteína sirtuina (p. ej., sitio activo o sitio que afecta el valor Km o Vmax del sitio activo). Se cree que ésta es la razón por la cual ciertas clases de activadores e inhibidores de sirtuina pueden tener similitud estructural sustancial.

En determinadas realizaciones, los compuestos moduladores de sirtuina descritos en la presente memoria pueden tomarse solos o combinados con otros compuestos. En una realización, una mezcla de dos o más compuestos moduladores de sirtuina puede administrarse a un sujeto que lo necesita. En otra realización, un compuesto modulador de sirtuina que aumenta el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina puede administrarse con uno o más de los siguientes compuestos: resveratrol, butein, fisetin, piceatannol o quercetin. En una realización ilustrativa, un compuesto modulador de sirtuina que aumenta el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina puede administrarse en combinación con ácido nicotínico. En otra realización, un compuesto modulador de sirtuina que reduce el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina puede administrarse con uno o más de los siguientes compuestos: nicotinamida (NAM), suranim; NF023 (un antagonista de proteína G); NF279 (un antagonista del receptor purinérgico); Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8,tetrametilcroman-2-carboxílico); (-)-epigallocatequina (hidroxi en los sitios 3,5,7,3',4', 5'); (-)-epigallocatequina galato (sitios Hidroxi 5,7,3',4',5' y galato éster en 3); cloruro de cianidin (cloruro de 3,5,7,3',4'-pentahidroxi-flavilium); cloruro de delfinidin (cloruro de 3,5,7,3',4',5'-hexahidroxi-flavilium); miricetin (cannabiscetin; 3,5,7,3',4',5'-hexahidroxi-flavona); 3,7,3',4',5'-pentahidroxi-flavona; gossypetin (3,5,7,8,3',4'-hexahidroxi-flavona); sirtinol; y esplitomicina (véanse p. ej., Howitz et al. (2003) Nature 425:191; Grozinger et al. (2001) J. Biol. Chem. 276:38837; Dedalov et al. (2001) PNAS 98:15113; y Hirao et al. (2003) J. Biol. Chem 278:52773). Incluso en otra realización, uno o más compuestos moduladores de sirtuina pueden administrarse con uno o más agentes terapéuticos para el tratamiento o la prevención de diversas enfermedades, incluyendo por ejemplo, cáncer, diabetes, enfermedades neurodegenerativas, enfermedad cardiovascular, coagulación de la sangre, inflamación, sofocos, obesidad, envejecimiento, estrés, etc. En diversas realizaciones, las terapias combinadas que comprenden un compuesto modulador de sirtuina pueden referirse a (1) composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más compuestos moduladores de sirtuina combinados con uno o más agentes terapéuticos (p. ej., uno o más agentes terapéuticos descritos en la presente memoria); y (2) co-administración de uno o más compuestos moduladores de sirtuina con uno o más agentes terapéuticos donde el compuesto modulador de sirtuina y el agente terapéutico no han sido formulados en las mismas composiciones (pero pueden estar presentes dentro del mismo kit o paquete, tal como un envase blíster u otro paquete de múltiples cámaras; recipientes conectados, sellados separadamente (p. ej., bolsas de aluminio) que pueden ser separados por el usuario; o un kit en el que el compuesto(s) modulador de sirtuina y el otro agente(s) terapéutico estén en recipientes separados). Cuando se usan formulaciones separadas, el compuesto modulador de sirtuina puede administrarse simultáneamente, de manera intermitente, escalonada, anterior, posterior o sus combinaciones, a la administración de otro agente terapéutico.

En determinadas realizaciones, los métodos para reducir, prevenir o tratar enfermedades o trastornos usando un compuesto modulador de sirtuina pueden también comprender aumentar el nivel de una proteína sirtuina, tal como SIRT1, SIRT2 y/o SIRT3 humana, o sus homólogos. Aumentar los niveles de proteína puede lograrse introduciendo en una célula una o más copias de un ácido nucleico que codifica una sirtuina. Por ejemplo, el nivel de una sirtuina puede aumentarse en una célula mamífera, introduciendo en la célula mamífera un ácido nucleico que codifica la sirtuina, p. ej., aumentar el nivel de SIRT1 introduciendo un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos expuesta en el núm. de acceso en GenBank NP\_036370 y/o aumentar el nivel de SIRT3 introduciendo un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos expuesta en el núm. de acceso en GenBank AAH01042. El ácido nucleico puede estar bajo el control de un promotor que regula la expresión del ácido nucleico de SIRT1 y/o SIRT3. Alternativamente, el ácido nucleico puede introducirse en la célula en un sitio en el genoma que esté en dirección 3' de un promotor. Los métodos para incrementar el nivel de una proteína usando estos métodos se conocen en la técnica.

Un ácido nucleico que se introduce en una célula para aumentar el nivel de proteína de una sirtuina puede codificar una proteína que es por lo menos aproximadamente 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de una sirtuina, p. ej., proteína SIRT1 (núm. de acceso en GenBank NP\_036370) y/o SIRT3 (núm. de acceso en GenBank AAH01042). Por ejemplo, el ácido nucleico que codifica la proteína puede ser por lo menos aproximadamente 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% idéntico a un ácido nucleico que codifica una proteína SIRT1 (p. ej., núm. de acceso en GenBank NM\_012238) y/o SIRT3 (p. ej., núm. de acceso en GenBank BC001042). El ácido nucleico puede también ser un ácido nucleico que se hibrida, preferiblemente bajo condiciones de hibridación rigurosas, a un ácido nucleico que codifica una sirtuina de tipo salvaje, p. ej., la proteína SIRT1 (núm. de acceso en GenBank NMM\_012238) y/o SIRT3 (p. ej., núm. de acceso en GenBank BC001042). Las condiciones de hibridación rigurosas pueden incluir hibridación y un lavado en 0,2 x SSC a 65 °C. Cuando se usa un ácido nucleico que codifica una proteína que es diferente de una proteína sirtuina de tipo salvaje, tal como una proteína que es un fragmento de una sirtuina de tipo salvaje, la proteína es preferiblemente biológicamente activa, p. ej., es capaz de desacetilación. Solamente es necesario expresar en una célula una porción de la sirtuina que es biológicamente activa. Por ejemplo, una proteína que difiere de SIRT1 de tipo salvaje, que tiene núm. de acceso en GenBank NP\_036370, preferiblemente su estructura de núcleo. La estructura de núcleo algunas veces se refiere a los aminoácidos 62-293 de núm. de acceso en GenBank NP\_036370, que están codificados por los nucleótidos 237 a 932 de núm. de acceso en GenBank NM\_012238, que abarca la unión NAD como también los dominios de unión al sustrato. El dominio de núcleo de SIRT1, también puede referirse a aproximadamente los aminoácidos 261 a 447 de núm. de acceso en GenBank NP\_036370, codificados por los nucleótidos 834 a 1394 con núm. de acceso en GenBank NM\_012238; a aproximadamente los aminoácidos 242 a 493 con núm. de acceso en GenBank NP\_036370, codificados por los nucleótidos 777 a 1532 con núm. de acceso en GenBank NM\_012238; o hasta aproximadamente los aminoácidos 254 a 495 con núm. de acceso en GenBank NP\_036370, codificados por los nucleótidos 813 a

1538 con núm. de acceso en GenBank NM\_012238. Si una proteína retiene o no una función biológica, p. ej., capacidad de desacetilación, puede determinarse de acuerdo con métodos conocidos en la técnica.

5 En determinadas realizaciones, los métodos para reducir, prevenir o tratar enfermedades o trastornos usando un compuesto modulador de sirtuina pueden también comprender reducir el nivel de una proteína sirtuina, tal como SIRT1, SIRT2 y/o SIRT3 humana, o sus homólogos. Reducir el nivel de una proteína sirtuina puede lograrse de acuerdo con los métodos conocidos en la materia. Por ejemplo, un siRNA, un ácido nucleico antisentido o una ribozima dirigida a la sirtuina pueden expresarse en la célula. También se puede usar un mutante de sirtuina negativo dominante, p. ej., un mutante que no es capaz de desacetilación. Por ejemplo, se puede usar el mutante H363Y de SIRT1, descrito, p. ej., en Luo et al. (2001) Cell 107:137. Alternativamente, pueden usarse agentes que inhiben la transcripción.

Los métodos para modular los niveles de la proteína sirtuina también incluyen métodos para modular la transcripción de genes que codifican sirtuinas, métodos para estabilizar/desestabilizar los correspondientes mRNA y otros métodos conocidos en la técnica.

15 *Envejecimiento/Estrés*

En una realización, la solicitud considera un método que extiende la vida de una célula, extiende la capacidad proliferativa de una célula, demora el envejecimiento de una célula, promueve la supervivencia de una célula, demora la senescencia celular en una célula, imita los efectos de la restricción calórica, aumenta la resistencia de una célula al estrés o previene la apoptosis de una célula, contactando la célula con un compuesto modulador de sirtuina de la invención que aumenta el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina. En una realización ilustrativa, los métodos comprenden contactar la célula con un compuesto activador de sirtuina.

Los métodos descritos en la presente memoria pueden utilizarse para incrementar la cantidad de tiempo en que las células, particularmente las células primarias (es decir, células obtenidas de un organismo, p. ej., un ser humano), pueden mantenerse vivas en un cultivo celular. Las células madre embrionarias (ES) y las células pluripotentes, como también las células diferenciadas provenientes de éstas, pueden también tratarse con un compuesto modulador de sirtuina que incrementa el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina para mantener las células, o su descendencia, en cultivo por periodos de tiempo más prolongados. Dichas células pueden también utilizarse para trasplante en un sujeto, p. ej., después de modificación *ex vivo*.

En una realización, las células que tienen como fin ser conservadas por largos periodos de tiempo pueden ser tratadas con un compuesto modulador de sirtuina que aumenta el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina. Las células pueden estar en suspensión (p. ej., células sanguíneas, suero, medios de crecimiento biológico, etc.) o en tejidos u órganos. Por ejemplo, la sangre extraída de un individuo para fines de transfusión puede tratarse con un compuesto modulador de sirtuina que aumenta el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina para conservar las células sanguíneas por periodos de tiempo más prolongados. Además, la sangre que se usará para fines forenses puede también conservarse empleando un compuesto modulador de sirtuina que aumente el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina. Otras células que pueden tratarse para extender su vida o para proteger contra apoptosis incluyen células para consumo, p. ej., células de mamíferos no humanos (como carne) o células vegetales (como verduras).

Los compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina pueden también aplicarse durante fases de desarrollo y crecimiento en mamíferos, plantas, insectos o microorganismos, con el fin de, p. ej., alterar, retardar o acelerar los procesos de desarrollo y/o crecimiento.

En otra realización, los compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina pueden usarse para tratar células útiles para trasplante o terapia celular, incluyendo por ejemplo injertos de tejido sólido, trasplantes de órganos, suspensiones celulares, células madre, células de médula ósea, etc. Las células o el tejido pueden consistir en un autoinjerto, un aloinjerto, un isoinjerto o un xenoinjerto. Las células o el tejido pueden tratarse con el compuesto modulador de sirtuina antes de la administración/implante, concurrentemente con la administración/implante y/o post-administración/implante en un sujeto. Las células o el tejido pueden tratarse antes de la extracción de las células del donante, *ex vivo* después de la extracción de las células o el tejido del donante post-implante en el receptor. Por ejemplo, el donante o receptor puede tratarse sistémicamente con un compuesto modulador de sirtuina o puede tener un subconjunto de células/tejido tratado localmente con un compuesto modulador de sirtuina que incremente el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina. En determinadas realizaciones, las células o el tejido (o los donantes/receptores) pueden además tratarse con otro agente terapéutico útil para prolongar la supervivencia del injerto, tal como, por ejemplo, un agente inmunosupresor, una citocina, un factor angiogénico, etc.

55 Incluso en otras realizaciones, las células pueden tratarse con un compuesto modulador de sirtuina que aumenta el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina *in vivo*, p. ej., para aumentar su vida o prevenir la apoptosis. Por ejemplo, la piel puede protegerse del envejecimiento (p. ej., desarrollo de arrugas, pérdida de elasticidad, etc.) tratando la piel o las células epiteliales con un compuesto modulador de sirtuina que incremente el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina. En una realización ilustrativa, la piel se pone en contacto con una composición

5 farmacéutica o cosmética que comprende un compuesto modulador de sirtuina que incrementa el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina. Las dolencias de la piel o afecciones cutáneas ilustrativas que pueden tratarse de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria incluyen trastornos o enfermedades asociadas con o  
 10 causadas por inflamación, daño solar o envejecimiento natural. Por ejemplo, las composiciones encuentran utilidad en la prevención o el tratamiento de dermatitis de contacto (incluida la dermatitis de contacto irritante y la dermatitis de contacto alérgica), dermatitis atópica (también conocida como eccema alérgico), queratosis actínica, trastornos de queratinización (incluido eccema), enfermedades de epidermólisis bullosa (incluido el pénfigo), dermatitis exfoliativa, dermatitis seborreica, eritemas (incluidos eritema multiforme y eritema nodoso), daño causado por el sol u otras fuentes de luz, lupus eritematoso discoide, dermatomiositis, psoriasis, cáncer de piel y los efectos del envejecimiento natural. En otra realización, los compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina pueden usarse para el tratamiento de heridas y/o quemaduras para promover la cicatrización, incluyendo por ejemplo quemaduras de primero, segundo o tercer grado y/o quemaduras térmicas, químicas o eléctricas. Las formulaciones pueden administrarse tópicamente, a la piel o al tejido mucoso, como un unguento, loción, crema, microemulsión, gel, disolución o similar, como se describirá más detalladamente en esta memoria, dentro del contexto de un régimen de administración eficaz para lograr el resultado deseado.

Las formulaciones tópicas que comprenden uno o más compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina pueden también utilizarse como composiciones preventivas, p. ej., quimiopreventivas. Cuando se usan en un método quimiopreventivo, la piel susceptible se trata antes de cualquier condición visible en un individuo particular.

Los compuestos moduladores de sirtuina pueden administrarse local o sistémicamente a un sujeto. En una realización, un compuesto modulador de sirtuina se administra localmente al tejido u órgano de un sujeto por inyección, formulación tópica, etc.

En otra realización, un compuesto modulador de sirtuina que aumenta el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina puede usarse para tratar o prevenir una enfermedad o afección inducida por senescencia celular en un sujeto; métodos para reducir el índice de senescencia de un sujeto, p. ej., después del inicio de la senescencia; métodos para extender la vida de un sujeto; métodos para tratar o prevenir una enfermedad o afección relacionada con la vida; métodos para tratar o prevenir una enfermedad o afección relacionada con la capacidad proliferativa de las células; y métodos para tratar o prevenir una enfermedad o afección proveniente de daño o muerte celular. En determinadas realizaciones, el método no actúa reduciendo el índice de aparición de enfermedades que acortan la vida de un sujeto. En determinadas realizaciones, un método no actúa reduciendo la mortalidad causada por una enfermedad, tal como cáncer.

Incluso en otra realización, un compuesto modulador de sirtuina que aumenta el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina puede administrarse a un sujeto con el fin de aumentar en general la vida de sus células y de proteger sus células contra estrés y/o contra apoptosis. Se cree que tratar a un sujeto con un compuesto descrito en la presente memoria es similar a someter al sujeto a hormesis, es decir, estrés leve que es beneficioso para los organismos y puede extender su vida.

Los compuestos moduladores de sirtuina que incrementan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina pueden administrarse a un sujeto para prevenir el envejecimiento y las consecuencias relacionadas con el envejecimiento, como accidentes cerebrovasculares, cardiopatías, insuficiencia cardíaca, artritis, hipertensión arterial y enfermedad de Alzheimer. Otras afecciones que pueden tratarse incluyen trastornos oculares, p. ej., asociados con el envejecimiento del ojo, como cataratas, glaucoma y degeneración macular. Los compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina pueden también administrarse a sujetos para el tratamiento de enfermedades, p. ej., enfermedades crónicas, asociadas con la muerte celular, con el fin de proteger a las células de muerte celular. Las enfermedades ilustrativas incluyen aquellas asociadas con muerte celular neuronal, disfunción neuronal o muerte o disfunción celular muscular, tal como enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica y disftrofia muscular; sida; hepatitis fulminante; enfermedades asociadas con degeneración del cerebro, tal como enfermedad de Creutzfeld-Jakob, retinitis pigmentosa y degeneración cerebelar; mielodisplasia tal como anemia aplásica; enfermedades isquémicas tales como infarto de miocardio y apoplejía; enfermedades hepáticas tales como hepatitis alcohólica, hepatitis B y hepatitis C; enfermedades de las articulaciones tales como artrosis; aterosclerosis; alopecia; daño a la piel provocado por la luz UV; liquen plano; atrofia de la piel; cataratas; y rechazo de injertos. La muerte celular también puede ser causada por cirugía, farmacoterapia, exposición química o exposición a radiación.

Los compuestos moduladores de sirtuina que incrementan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina pueden también administrarse a un sujeto que padece una enfermedad aguda, p. ej., daño a un órgano o tejido, p. ej., un sujeto que padece apoplejía o infarto de miocardio o un sujeto que padece una lesión en la médula espinal. Los compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina pueden también emplearse para reparar un hígado alcohólico.

*Enfermedad cardiovascular*

En otra realización, la solicitud considera un método para tratar y/o prevenir una enfermedad cardiovascular, administrando a un sujeto que lo necesita un compuesto modulador de sirtuina que aumenta el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina.

5 Las enfermedades cardiovasculares que pueden tratarse o prevenirse usando los compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina incluyen cardiomiopatía o miocarditis; tales como cardiomiopatía idiopática, cardiomiopatía metabólica, cardiomiopatía alcohólica, cardiomiopatía inducida por drogas, cardiomiopatía isquémica y cardiomiopatía hipertensiva. Además, tratables o prevenibles con el uso de los compuestos y métodos descritos en esta memoria son los trastornos ateromatosos de los vasos sanguíneos principales (enfermedad macrovascular) tales como la aorta, las arterias coronarias, las arterias carótidas, las arterias cerebrovasculares, las arterias renales, las arterias ilíacas, las arterias femorales y las arterias popliteas. Otras vasculopatías que pueden tratarse o prevenirse incluyen aquellas relacionadas con la agregación de plaquetas, las arteriolas retinianas, las arteriolas glomerulares, los vasos de los nervios, arteriolas cardíacas y lechos capilares asociados del ojo, el riñón, el corazón y los sistemas nerviosos central y periférico. Los compuestos modulateores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina pueden también utilizarse para aumentar los niveles de HDL en plasma de un individuo.

Incluso otros trastornos que pueden tratarse con los compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina incluyen restenosis, p. ej., que le sigue a una intervención coronaria, y trastornos relacionados con un nivel anormal de colesterol de alta densidad o baja densidad.

20 En una realización, un compuesto modulador de sirtuina que aumenta el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina puede administrarse como parte de una terapia combinada con agente cardiovascular incluyendo, por ejemplo, un agente antiarrítmico, un agente antihipertensivo, un bloqueante de los canales de calcio, una disolución a cardioplégica, un agente cardiotónico, un agente fibrinolítico, una disolución esclerosante, un vasoconstrictor, un vasodilatador, un donante de óxido nítrico, un bloqueante de los canales de potasio, un bloqueante de los canales de sodio, estatinas o un agente naturiurético.

En una realización, un compuesto modulador de sirtuina que aumenta el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina puede administrarse como parte de una terapia combinada con un agente anti-arritmia. Los agentes anti-arritmia con frecuencia se organizan en cuatro grupos principales de acuerdo con su mecanismo de acción: tipo I, bloqueo de los canales de sodio; tipo II, bloqueo beta-adrenérgico; tipo III, prolongación de repolarización; y tipo IV, bloqueo de los canales de calcio. Los agentes anti-arritmicos de tipo I incluyen lidocaína, moricizina, mexiletina, tocainida, procainamida, encainida, flecanida, tocainida, fenitoína, propafenona, quinidina, disopiramida y flecainida. Los agentes anti-arritmicos de tipo II incluyen propranolol y esmolol. Los agentes de tipo III incluyen agentes que actúan prolongando la duración del potencial de acción, como amiodarona, artilde, bretilio, clofilio, isobutilida, sotalol, azimilida, dofetilida, dronedarona, ersentilida, ibutilida, tedisamil y trecetilida. Los agentes anti-arritmicos de tipo IV incluyen verapamil, diltiazem, digitalis, adenosina, cloruro de níquel y iones de magnesio.

40 En otra realización, un compuesto modulador de sirtuina que aumenta el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina puede administrarse como parte de una terapia combinada con otro agente cardiovascular. Los ejemplos de agentes cardiovasculares incluyen vasodilatadores, por ejemplo, hidralazina; inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, por ejemplo, captopril; agentes anti-angina, por ejemplo nitrato de isosorbida, gliceril trinitrato y pentaeritrol tetranitrato; agentes anti-arritmicos, por ejemplo, quinidina, procainalida t lignocaína; cardioglucósidos, por ejemplo, digoxina y digitoxina; antagonistas de calcio, por ejemplo, verapamil y nifedipina; diuréticos, tales como tiazidas y compuestos relacionados, por ejemplo, bendrofluazida, clorotiazida, clorotalidona, hidroclorotiazida y otros diuréticos, por ejemplo, furosemida y triamtereno, y sedantes, por ejemplo, nitrazepam, flurazepam y diazepam.

45 Otros agentes cardiovasculares ilustrativos incluyen, por ejemplo, un inhibidor de ciclooxigenasa tal como aspirina o indometacina, un inhibidor de agregación de plaquetas tal como clopidogrel, ticlopideno o aspirina, antagonistas de fibrinógeno o un diurético tal como clorotiazida, hidroclorotiazida, flumetiazida, hidroflumetiazida, bendroflumetiazida, metilclortiazida, triclorometiazida, politiazida o benzotiazida como también ácido etacrínico tricrinafen, clortalidona, furosemida, musolimina, bumetanida, triamtereno, amilorida y espirolactona y sales de dichos compuestos, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina tales como captopril, zofenopril, fosinopril, enalapril, ceranopril, cilazopril, delapril, pentopril, quinapril, ramipril, lisinopril y sales de dichos compuestos, antagonistas de angiotensina II tales como losartan, irbesartan o valsartan, agentes trombolíticos tales como activador de plasminógeno de tejidos (tPA), tPA recombinante, estreptocinasa, urocina, prourocinasa y complejo activado de plasminógeno estreptocinasa anisolidado (APSAC, Eminase, Beecham Laboratories), o activadores del plasminógeno de la glándula salival animal, bloqueantes de los canales de calcio tales como verapamil, nifedipina o diltiazem, antagonistas de los receptores de tromboxano tales como ifetroban, miméticos de prostaciclina o inhibidores de fosfodiesterasa. Dichos productos de combinación, si se formulan como una dosis fija, emplean los compuestos de la presente invención dentro del intervalo de dosificación descrito anteriormente y el otro agente farmacéuticamente activo dentro de su intervalo de dosificación aprobado.

60 Incluso otros agentes cardiovasculares ilustrativos incluyen, por ejemplo, vasodilatadores, p. ej., benciclano, cinnarizina, citicolina, ciclandelato, ciclónico, ebumamonina, fenoxezil, flunarizina, ibudilast, ifenprodil, lomerizina, naflole, nikamato, nosergolina, nimodipina, papaverina, pentifilina, nopedolina, vincamin, vinpocetina, vichizil,

pentoxifilina, derivados de prostaciclina (tales como prostaglandina E1 y prostaglandina I2), un fármaco bloqueante de los receptores de endotelina (como bosentan), diltiazem, nicorandil y nitroglicerina. Los ejemplos del fármaco protector del cerebro incluyen depuradores de radicales (como edaravone, vitamina E y vitamina C), antagonistas de glutamato, antagonistas de AMPA, antagonistas de kainato, antagonistas de NMDA, agonistas de GABA, factores de crecimiento, antagonistas de opioides, precursores de fosfatidilcolina, agonistas de serotonina, inhibidores de los canales de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  y fármacos de apertura de los canales de  $\text{K}^+$ . Los ejemplos de estimulantes metabólicos cerebrales incluyen amantadina, tiapride y ácido gamma-aminobutírico. Los ejemplos del anticoagulante incluyen heparinas (tales como heparina sódica, heparina de potasio, dalteparina de sodio, dalteparina de calcio, heparina de calcio, parnaparina de sodio sodium y danaparoid de sodio), warfarina, enoxaparina, argatroban, batroxobin y citrato de sodio. Los ejemplos de fármacos antiplaquetarios incluyen hidrocloreuro de ticlopidina, dipiridamol, cilostazol, icosapentato de etilo, hidrocloreuro de sarpogrelato, hidrocloreuro de dilazep, trapidil, un agente antiinflamatorio no esteroideo (como aspirina), beraprostsodio, iloprost e indobufeno. Los ejemplos de fármacos trombolíticos incluyen urocinasa, activadores del plasminógeno de tipo tejido (como alteplasa, tisocinasa, nateplasa, pamiteplasa, monteplasa y rateplasa) y nasaruplase. Los ejemplos del fármaco antihipertensivo incluyen inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (como captopril, alacepril, lisinopril, imidapril, quinapril, temocapril, delapril, benazepril, cilazapril, trandolapril, enalapril, ceronapril, fosinopril, imadapril, mobertpril, perindopril, ramipril, spirapril y randolapril), antagonistas de angiotensina II (como losartan, candesartan, valsartan, eprosartan e irbesartan), bloqueantes de los canales de calcio (como aranidipina, efonidipina, nicardipina, bamidipina, benidipina, manidipina, cilnidipina, nisoldipina, nitrendipina, nifedipina, nilvadipina, felodipina, amlodipina, diltiazem, bepridil, clentiazem, fendilil, galopamil, mibefradil, prenilamina, semotiadil, terodilina, verapamil, cilnidipina, elgodipina, isradipina, lacidipina, lercanidipina, nimodipina, cinnarizina, flunarizina, lidoflazina, lomerizina, benciclan, etafenona y perhexilina), bloqueantes de los receptores de  $\beta$ -adrenalina (propranolol, pindolol, indenolol, carteolol, bunitrolol, atenolol, acebutolol, metoprolol, timolol, nipradilol, penbutolol, nadolol, tilisolol, carvedilol, bisoprolol, betaxolol, celiprolol, bopindolol, bevantolol, labetalol, alprenolol, amosulalol, arotinolol, befunolol, bucumolol, bufetolol, buferalol, buprandolol, butilidina, butofilolol, carazolol, cetamolol, cloranolol, dilevalol, epanolol, levobunolol, mepindolol, metipranolol, moprolol, nadoxolol, nevilolol, oxprenolol, practol, pronetalol, sotalol, sufinalol, talindolol, tertalol, toliprolol, xybenolol y esmolol), bloqueantes del  $\alpha$ -receptor (como amosulalol, prazosin, terazosin, doxazosin, bunazosin, urapidil, fentolamina, arotinolol, dapiprazol, fenspirida, indoramin, labetalol, naftopidil, nicergolina, tamsulosin, tolazolina, trimazosin y yohimbina), inhibidores de los nervios simpáticos (como clonidina, guanfacina, guanabenz, metildopa y reserpina), hidralazina, todralazina, budralazina y cadralazina. Los ejemplos del fármaco antiangina incluyen fármacos de nitrato (como amil nitrato, nitroglicerina e isosorbida), bloqueantes del receptor  $\beta$ -adrenalina (como propranolol, pindolol, indenolol, carteolol, bunitrolol, atenolol, acebutolol, metoprolol, timolol, nipradilol, penbutolol, nadolol, tilisolol, carvedilol, bisoprolol, betaxolol, celiprolol, bopindolol, bevantolol, labetalol, alprenolol, amosulalol, arotinolol, befunolol, bucumolol, bufetolol, buferalol, buprandolol, butilidina, butofilolol, carazolol, cetamolol, cloranolol, dilevalol, epanolol, levobunolol, mepindolol, metipranolol, moprolol, nadoxolol, nevilolol, oxprenolol, practol, pronetalol, sotalol, sufinalol, talindolol, tertalol, toliprolol, andxibenolol), bloqueantes de los canales de calcio (como aranidipina, efonidipina, nicardipina, bamidipina, benidipina, manidipina, cilnidipina, nisoldipina, nitrendipina, nifedipina, nilvadipina, felodipina, amlodipina, diltiazem, bepridil, clentiazem, fendilina, galopamil, mibefradil, prenilamina, semotiadil, terodilina, verapamil, cilnidipina, elgodipina, isradipina, lacidipina, lercanidipina, nimodipina, cinnarizina, flunarizina, lidoflazina, lomerizina, benciclan, etafenona y perhexilina) trimetazidina, dipiridamol, etafenona, dilazep, trapidil, nicorandil, enoxaparin y aspirina. Los ejemplos de diuréticos incluyen diuréticos de tiazida (como hidroclorotiazida, meticlotiazida, triclormetiazida, bencilhidroclorotiazida y penflutizida), diuréticos de asa (como furosemida, ácido etacrínico, bumetanida, piretanida, azosemida y torasemida), diuréticos ahorradores de  $\text{K}^+$  (espironolactona, triamtereno y canrenoato de potasio), diuréticos osmóticos (como isosorbida, D-mannitol y glicerina), diuréticos de nontiazida (como meticrano, tripamida, clortalidona y mefrusida) y acetazolamida. Los ejemplos del cardiotónico incluyen formulaciones digitálicas (como digitoxina, digoxina, metildigoxina, deslanosida, vesnarinona, lanatosida C y proscillaridina), formulaciones de xantina (como aminofilina, colina teofilina, diprofilina y proxifilina), formulaciones de catecolamina (como dopamina, dobutamina y docarpamina), inhibidores de PDE III (como amrinona, olprinona y milrinona), denopamina, ubidecarenona, pimobendan, levosimendan, ácido aminoetilsulfónico, vesnarinona, carperitida y colforsin daropato. Los ejemplos de fármacos antiarrítmicos incluyen ajmalina, pirmenol, procainamida, cibenzolina, disopiramida, quinidina, aprindina, mexiletino, lidocaína, feniloína, pilsicainida, propafenona, flecainida, atenolol, acebutolol, sotalol, propranolol, metoprolol, pindolol, amiodarona, nifekalant, diltiazem, bepridil y verapamil. Los ejemplos del fármaco antihiperlipidémico incluyen atorvastatina, simvastatina, pravastatina sódica, fluvastatina sódica, clinofibrato, clofibrato, simfibrato, fenofibrato, bezafibrato, colestimidc y colestiramina. Los ejemplos del inmunosupresor incluyen azatioprina, mizoribina, ciclosporina, tacrolimus, gusperimus y metotrexato.

#### *Muerte celular/Cáncer*

Los compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina pueden administrarse a sujetos que han recibido recientemente o probablemente recibirán una dosis de radiación o toxina. En una realización, la dosis de radiación o toxina se recibe como parte de un procedimiento médico o relacionado con el trabajo, p. ej., trabajo en una planta de energía nuclear, volar en un avión, rayos X, tomografías, o la administración de un tinte radiactivo para imágenes médicas; En dicha realización, el compuesto se administra como medida profiláctica. En otra realización, la radiación o toxina se recibe no intencionalmente, p. ej., como consecuencia de un accidente industrial, habitar un sitio de radiación natural, acto terrorista o acto de guerra que

implica material radiactivo o tóxico. En tal caso, el compuesto preferiblemente se administra lo antes posible después de la exposición para inhibir la apoptosis y el subsiguiente desarrollo de síndrome de radiación agudo.

5 Los compuestos moduladores de sirtuina pueden también utilizarse para tratar y/o prevenir cáncer. En determinadas realizaciones, los compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina pueden utilizarse para tratar y/o prevenir el cáncer. La restricción calórica se ha asociado a una reducción en la incidencia de trastornos relacionados con la edad, incluido el cáncer (véanse p. ej., Bordone y Guarente, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* (2005 epub); Guarente y Picard, *Cell* 120: 473-82 (2005); Berrigan, et al., *Carcinogenesis* 23: 817-822 (2002); y Heilbronn y Ravussin, *Am. J. Clin. Nutr.* 78: 361-369 (2003)). Además, se ha demostrado que la proteína Sir2 de levadura se requiere para la extensión de la vida por restricción de glucosa (véanse p. ej., Lin et al., *Science* 289: 2126-2128 (2000); Anderson et al., *Nature* 423: 181-185 (2003)), un modelo de levadura para restricción calórica. Por consiguiente, un incremento en el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina puede ser útil para tratar y/o prevenir la incidencia de trastornos relacionados con la edad, como por ejemplo cáncer. En otras realizaciones, los compuestos moduladores de sirtuina que reducen el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina pueden utilizarse para tratar y/o prevenir el cáncer. Por ejemplo, los compuestos inhibidores se pueden utilizar para estimular la acetilación de sustratos tales como p53 y por lo tanto aumentar la apoptosis, como también reducir la vida de células y organismos, tornarlos más sensibles al estrés, y/o aumentar la radiosensibilidad y/o quimiosensibilidad de una célula u organismo. Por lo tanto, los compuestos inhibidores se pueden utilizar, p. ej., para tratar cáncer. Los tipos de cáncer ilustrativos que se pueden tratar usando un compuesto modulador de sirtuina son los de cerebro y riñón; cáncer dependiente de hormonas, lo cual incluye cáncer de mama, próstata, testículo y ovario; linfomas y leucemias. En cáncer asociado con tumores sólidos, un compuesto modulador puede administrarse directamente al tumor. El cáncer de las células sanguíneas, p. ej., leucemia, puede tratarse administrando un compuesto modulador al torrente circulatorio o a la médula ósea. También se puede tratar el desarrollo de células benignas, p. ej., verrugas. Otras enfermedades que pueden tratarse incluyen enfermedades autoinmunitarias, p. ej., lupus eritematoso sistémico, esclerodermia y artritis, donde las células autoinmunitarias deberían eliminarse. Las infecciones víricas tales como herpes, VIH, adenovirus y los trastornos malignos y benignos asociados con HTLV-1 pueden también tratarse con la administración de un compuesto modulador de sirtuina. Alternativamente, las células pueden obtenerse de un sujeto, tratarse *ex vivo* para eliminar ciertas células indeseables, p. ej., células de cáncer, y administrarse nuevamente al mismo sujeto o a un sujeto diferente.

30 Otros agentes quimioterapéuticos que pueden coadministrarse con los compuestos moduladores descritos en la presente memoria por tener actividad anti-cancerosa (p. ej., los compuestos que inducen apoptosis, compuestos que reducen la vida o compuestos que tornan las células sensibles al estrés) incluyen: aminoglutetimida, amsacrina, anastrozol, asparaginasa, bcg, bicalutamida, bleomicina, buserelina, busulfán, campotecina, capecitabina, carboplatino, carmustina, clorambucil, cisplatino, cladribina, clodronato, colquicina, ciclofosfamida, ciproterona, citarabina, dacarbazina, dactinomicina, daunorrubicina, dienestrol, dietilstilbestrol, docetaxel, doxorubicina, epirubicina, estradiol, estramustina, etopósido, exemestano, filgrastim, fludarabina, fludrocortisona, fluorouracil, fluoximesterona, flutamida, gemcitabina, genisteína, goserelin, hidroxiurea, idarrubicina, ifosfamida, imatinib, interferón, irinotecan, ironotecan, letrozol, leucovorin, leuprolida, levamisol, lomustina, mecloretamina, medroxiprogesterona, megestrol, melfalán, mercaptopurina, mesna, metotrexato, mitomicina, mitotano, mitoxantrona, nilutamida, nocodazol, octreotida, oxaliplatino, paclitaxel, pamidronato, pentostatina, plicamicina, porfímero, procarbazona, raltitrexed, rituximab, estreptozocina, suramin, tamoxifeno, temozolomida, tenipósido, testosterona, tioguanina, tiotepa, dicloruro de titanoceno, topotecan, trastuzumab, tretinoína, vinblastina, vincristina, vindesina y vinorelbina.

45 Estos agentes quimioterapéuticos pueden categorizarse por su mecanismo de acción en, por ejemplo, los siguientes grupos: agentes anti-metabolito/anti-cáncer, como análogos de pirimidina (5-fluorouracilo, floxuridina, capecitabina, gemcitabina y citarabina) y análogos de purina, antagonistas de folato e inhibidores relacionados (mercaptopurina, tioguanina, pentostatina y 2-clorodesoxiadenosina (cladribina)); agentes antiproliferativos/antimitóticos, incluyendo productos naturales tales como vinca alcaloides (vinblastina, vincristina y vinorelbina), disruptores de microtúbulos tales como taxano (paclitaxel, docetaxel), vincristina, vinblastina, nocodazol, epotilonas y navelbina, epididodofilotoxinas (tenipósido), agentes que dañan el DNA (actinomicina, amsacrina, antraciclinas, bleomicina, busulfán, campotecina, carboplatino, clorambucil, cisplatino, ciclofosfamida, citoxán, dactinomicina, daunorrubicina, docetaxel, doxorubicina, epirubicina, hexametilmelaminóxalipatino, ifosfamida, melfalán, mecloretamina, mitomicina, mitoxantrona, nitrosourea, paclitaxel, plicamicina, procarbazona, tenipósido, trietilenotiofosforamida y etopósido (VP16)); antibióticos tales como dactinomicina (actinomicina D), daunorrubicina, doxorubicina (adriamicina), idarrubicina, antraciclinas, mitoxantrona, bleomicinas, plicamicina (mitramicina) y mitomicina; enzimas (L-asparaginasa que metaboliza sistémicamente L-asparagina y bloquea las células que no tienen la capacidad de sintetizar su propia asparagina); agentes antiplaquetarios; agentes alquilizantes antiproliferativos/antimitóticos tales como mostazas de nitrógeno (mecloretamina, ciclofosfamida y análogos, melfalán, clorambucil), etileniminas y metilmelaminas (hexametilmelamina y tiotepa), alquil sulfonatos-busulfán, nitrosoureas (carmustina (BCNU) y análogos, estreptozocina), trazenos - dacarbazina (DTIC); antimetabolitos antiproliferativos/antimitóticos tales como análogos de ácido fólico (metotrexato); complejos de coordinación de platino (cisplatino, carboplatino), procarbazona, hidroxiurea, mitotano, aminoglutetimida; hormonas, análogos de inhibidores de hormonas (estrógeno, tamoxifeno, goserelina, bicalutamida, nilutamida) y aromatasa (letrozol, anastrozol); anticoagulantes (heparina, sales de heparina sintéticas y otros inhibidores de trombina); agentes fibrinóticos (tales como activador del

5 plasminógeno de tejido, estreptocinasa y urocinasa), aspirina, inhibidores de COX-2, dipyridamol, ticlopidina, clopidogrel, abciximab; agentes antimigratorios; agentes antisegregantes (breveldin); inmunosupresores (ciclosporina, tacrolimus (FK-506), sirolimus (rapamicina), azatioprina, micofenolato mofetil); compuestos anti-  
 10 angiogénicos (TNP-470, genisteína) e inhibidores de factores de crecimiento (factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), inhibidor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) , inhibidores del factor de crecimiento epidérmico (EGF)); bloqueante de los receptores de angiotensina; donantes de óxido nítrico; oligonucleótidos antisentido; anticuerpos (trastuzumab); inhibidores del ciclo celular e inductores de diferenciación (tretinoína); inhibidores de mTOR, inhibidores de topoisomerasa (doxorrubicina (adriamicina), amsacrina, camptotecina, daunorrubicina, dactinomicina, enipósido, epirubicina, etopósido, idarrubicina, irinotecán (CPT-11) y mitoxantrona, topotecán, irinotecán), corticosteroides (cortisona, dexametasona, hidrocortisona, metilprednisolona, prednisona y prenisolona); inhibidores de cinasa de transducción de señales del factor de crecimiento; inductores de disfunción mitocondrial y activadores de caspasa; disruptores de cromatina.

15 Estos agentes quimioterapéuticos se pueden usar por si mismos con un compuesto modulador de sirtuina descrito en la presente memoria por inducir la muerte celular o reducir la vida o aumentar la sensibilidad al estrés y/o en combinación con otros agentes quimioterapéuticos. Se han creado muchas terapias combinatorias, incluidas, sin limitarse a ello, aquellas enumeradas en la Tabla 1.

Tabla 1: Terapias combinatorias ilustrativas para el tratamiento del cáncer.

Denominación	Agentes terapéuticos
ABV	Doxorrubicina, Bleomicina, Vinblastina
ABVD	Doxorrubicina, Bleomicina, Vinblastina, Dacarbazina
AC (Mama)	Doxorrubicina, Ciclofosfamida
AC (Sarcoma)	Doxorrubicina, Cisplatino
AC (Neuroblastoma)	Ciclofosfamida, Doxorrubicina
ACE	Ciclofosfamida, Doxorrubicina, Etopósido
ACE	Ciclofosfamida, Doxorrubicina
AD	Doxorrubicina, Dacarbazina
AP	Doxorrubicina, Cisplatino
ARAC-DNR	Citarabina, Daunorrubicina
B-CAVe	Bleomicina, Lomustina, Doxorrubicina, Vinblastina
BCVPP	Carmustina, Ciclofosfamida, Vinblastina, Procarbazina, Prednisona
BEACOPP	Bleomicina, Etopósido, Doxorrubicina, Ciclofosfamida, Vincristina, Procarbazina, Prednisona, Filgrastim
BEP	Bleomicina, Etopósido, Cisplatino
BIP	Bleomicina, Cisplatino, Ifosfamida, Mesna
BOMP	Bleomicina, Vincristina, Cisplatino, Mitomicina
CA	Citarabina, Asparaginasa
CABO	Cisplatino, Metotrexato, Bleomicina, Vincristina
CAF	Ciclofosfamida, Doxorrubicina, Fluorouracil
CAL-G	Ciclofosfamida, Daunorrubicina, Vincristina, Prednisona, Asparaginasa

ES 2 396 913 T3

<b>Denominación</b>	<b>Agentes terapéuticos</b>
CAMP	Ciclofosfamida, Doxorubicina, Metotrexato, Procarbazina
CAP	Ciclofosfamida, Doxorubicina, Cisplatino
CaT	Carboplatino, Paclitaxel
CAV	Ciclofosfamida, Doxorubicina, Vincristina
CAVE ADD	CAV y Etopósido
CA-VP16	Ciclofosfamida, Doxorubicina, Etopósido
CC	Ciclofosfamida, Carboplatino
CDDP/VP-16	Cisplatino, Etopósido
CEF	Ciclofosfamida, Epirubicina, Fluorouracil
CEPP(B)	Ciclofosfamida, Etopósido, Prednisona, con o sin/ Bleomicina
CEV	Ciclofosfamida, Etopósido, Vincristina
CF	Cisplatino, Fluorouracil o Carboplatino Fluorouracil
CHAP	Ciclofosfamida o Ciclofosfamida, Altretamina, Doxorubicina, Cisplatino
Ch1VPP	Clorambucil, Vinblastina, Procarbazina, Prednisona
CHOP	Ciclofosfamida, Doxorubicina, Vincristina, Prednisona
CHOP-BLEO	Añadir Bleomicina a CHOP
CISCA	Ciclofosfamida, Doxorubicina, Cisplatino
CLD-BOMP	Bleomicina, Cisplatino, Vincristina, Mitomicina
CMF	Metotrexato, Fluorouracil, Ciclofosfamida
CMFP	Ciclofosfamida, Metotrexato, Fluorouracil, Prednisona
CMFVP	Ciclofosfamida, Metotrexato, Fluorouracil, Vincristina, Prednisona
CMV	Cisplatino, Metotrexato, Vinblastina
CNF	Ciclofosfamida, Mitoxantrona, Fluorouracil
CNOP	Ciclofosfamida, Mitoxantrona, Vincristina, Prednisona
COB	Cisplatino, Vincristina, Bleomicina
CODE	Cisplatino, Vincristina, Doxorubicina, Etopósido
COMLA	Ciclofosfamida, Vincristina, Metotrexato, Leucovorin, Citarabina
COMP	Ciclofosfamida, Vincristina, Metotrexato, Prednisona
Régimen de cobre	Ciclofosfamida, Metotrexato, Fluorouracil, Vincristina, Prednisona
COP	Ciclofosfamida, Vincristina, Prednisona

ES 2 396 913 T3

<b>Denominación</b>	<b>Agentes terapéuticos</b>
COPE	Ciclofosfamida, Vincristina, Cisplatino, Etopósido
COPP	Ciclofosfamida, Vincristina, Procarbazina, Prednisona
CP(leucemia linfocítica crónica)	Clorambucil, Prednisona
CP (cáncer de ovario)	Ciclofosfamida, Cisplatino
CT	Cisplatino, Paclitaxel
CVD	Cisplatino, Vinblastina, Dacarbazina
CVI	Carboplatino, Etopósido, Ifosfamida, Mesna
CVP	Ciclofosfamida, Vincristina, Prednisona
CVPP	Lomustina, Procarbazina, Prednisona
CYVADIC	Ciclofosfamida, Vincristina, Doxorrubicina, Dacarbazina
DA	Daunorrubicina, citarabina
DAT	Daunorrubicina, Citarabina, Tioguanina
DAV	Daunorrubicina, Citarabina, Etopósido
DCT	Daunorrubicina, Citarabina, Tioguanina
DHAP	Cisplatino, Citarabina, Dexametasona
DI	Doxorrubicina, Ifosfamida
DTIC/Tamoxifeno	Dacarbazina, Tamoxifeno
DVP	Daunorrubicina, Vincristina, Prednisona
EAP	Etopósido, Doxorrubicina, Cisplatino
EC	Etopósido, Carboplatino
EFP	Etopósido, Fluorouracil, Cisplatino
ELF	Etopósido, Leucovorin, Fluorouracil
EMA 86	Mitoxantrona, Etopósido, Citarabina
EP	Etopósido, Cisplatino
EVA	Etopósido, Vinblastina
FAC	Fluorouracil, Doxorrubicina, Ciclofosfamida
FAM	Fluorouracil, Doxorrubicina, Mitomicina
FAMTX	Metotrexato, Leucovorin, Doxorrubicina
FAP	Fluorouracil, Doxorrubicina, Cisplatino

ES 2 396 913 T3

<b>Denominación</b>	<b>Agentes terapéuticos</b>
F-CL	Fluorouracil, Leucovorin
FEC	Fluorouracil, Ciclofosfamida, Epirubicina
FED	Fluorouracil, Etopósido, Cisplatino
FL	Flutamida, Leuprolida
FZ	Flutamida, implante de acetato de goserelina
HDMTX	Metotrexato, Leucovorin
Hexa-CAF	Altretamina, Ciclofosfamida, Metotrexato, Fluorouracil
ICE-T	Ifosfamida, Carboplatino, Etopósido, Paclitaxel, Mesna
IDMTX/6-MP	Metotrexato, Mercaptopurina, Leucovorin
IE	Ifosfamida, Etopósido, Mesna
IfoVP	Ifosfamida, Etopósido, Mesna
IPA	Ifosfamida, Cisplatino, Doxorrubicina
M-2	Vincristina, Carmustina, Ciclofosfamida, Prednisona, Melfalán
MAC-III	Metotrexato, Leucovorin, Dactinomicina, Ciclofosfamida
MACC	Metotrexato, Doxorrubicina, Ciclofosfamida, Lomustina
MACOP-B	Metotrexato, Leucovorin, Doxorrubicina, Ciclofosfamida, Vincristina, Bleomicina, Prednisona
MAID	Mesna, Doxorrubicina, Ifosfamida, Dacarbazina
m-BACOD	Bleomicina, Doxorrubicina, Ciclofosfamida, Vincristina, Dexametasona, Metotrexato, Leucovorin
MBC	Metotrexato, Bleomicina, Cisplatino
MC	Mitoxantrona, Citarabina
MF	Metotrexato, Fluorouracil, Leucovorin
MICE	Ifosfamida, Carboplatino, Etopósido, Mesna
MINE	Mesna, Ifosfamida, Mitoxantrona, Etopósido
mini-BEAM	Carmustina, Etopósido, Citarabina, Melfalán
MOBP	Bleomicina, Vincristina, Cisplatino, Mitomicina
MOP	Mecloretamina, Vincristina, Procarbazina
MOPP	Mecloretamina, Vincristina, Procarbazina, Prednisona
MOPP/ABV	Mecloretamina, Vincristina, Procarbazina, Prednisona, Doxorrubicina, Bleomicina, Vinblastina

ES 2 396 913 T3

<b>Denominación</b>	<b>Agentes terapéuticos</b>
MP (mieloma múltiple)	Melfalán, Prednisona
MP (cáncer de próstata)	Mitoxantrona, Prednisona
MTX/6-MO	Metotrexato, Mercaptopurina
MTX/6-MP/VP	Metotrexato, Mercaptopurina, Vincristina, Prednisona
MTX-CDDPAdr	Metotrexato, Leucovorin, Cisplatino, Doxorubicina
MV (cáncer de mama)	Mitomicina, Vinblastina
MV (leucemia mielocítica aguda)	Mitoxantrona, Etopósido
M-VAC Metotrexato	Vinblastina, Doxorubicina, Cisplatino
MVP Mitomicina	Vinblastina, Cisplatino
MVPP	Mecloretamina, Vinblastina, Procarbazina, Prednisona
NFL	Mitoxantrona, Fluorouracil, Leucovorin
NOVP	Mitoxantrona, Vinblastina, Vincristina
OPA	Vincristina, Prednisona, Doxorubicina
OPPA	Añadir Procarbazina a OPA.
PAC	Cisplatino, Doxorubicina
PAC-I	Cisplatino, Doxorubicina, Ciclofosfamida
PA-CI	Cisplatino, Doxorubicina
PC	Paclitaxel, Carboplatino o Paclitaxel, Cisplatino
PCV	Lomustina, Procarbazina, Vincristina
PE	Paclitaxel, Estramustina
PFL	Cisplatino, Fluorouracil, Leucovorin
POC	Prednisona, Vincristina, Lomustina
ProMACE	Prednisona, Metotrexato, Leucovorin, Doxorubicina, Ciclofosfamida, Etopósido
ProMACE/cytaBOM	Prednisona, Doxorubicina, Ciclofosfamida, Etopósido, Citarabina, Bleomicina, Vincristina, Metotrexato, Leucovorin, Cotrimoxazol
PRoMACE/MOPP	Prednisona, Doxorubicina, Ciclofosfamida, Etopósido, Mecloretamina, Vincristina, Procarbazina, Metotrexato, Leucovorin
Pt/VM	Cisplatino, Tenipósido
PVA	Prednisona, Vincristina, Asparaginasa
PVB	Cisplatino, Vinblastina, Bleomicina

Denominación	Agentes terapéuticos
PVDA	Prednisona, Vincristina, Daunorrubicina, Asparaginasa
SMF	Estreptozocina, Mitomicina, Fluorouracil
TAD	Mecloretamina, Doxorrubicina, Vinblastina, Vincristina, Bleomicina, Etopósido, Prednisona
TCF	Paclitaxel, Cisplatino, Fluorouracil
TIP	Paclitaxel, Ifosfamida, Mesna, Cisplatino
TTT	Metotrexato, Citarabina, Hidrocortisona
Topo/CTX	Ciclofosfamida, Topotecán, Mesna
VAB-6	Ciclofosfamida, Dactinomicina, Vinblastina, Cisplatino, Bleomicina
VAC	Vincristina, Dactinomicina, Ciclofosfamida
VACAdr	Vincristina, Ciclofosfamida, Doxorrubicina, Dactinomicina, Vincristina
VAD	Vincristina, Doxorrubicina, Dexametasona
VATH	Vinblastina, Doxorrubicina, Tiotepa, Flouximesterona
VBAP	Vincristina, Carmustina, Doxorrubicina, Prednisona
VBCMP	Vincristina, Carmustina, Melfalán, Ciclofosfamida, Prednisona
VC	Vitiorcibina, Cisplatino
VCAP	Vincristina, Ciclofosfamida, Doxorrubicina, Prednisona
VD	Vilforcibina, Doxorrubicina
VeIP	Vinblastina, Cisplatino, Ifosfamida, Mesna
VIP	Etopósido, Cisplatino, Ifosfamida, Mesna
VM	Mitomicina, Vinblastina
VMCP	Vincristina, Melfalán, Ciclofosfamida, Prednisona
VP	Etopósido, Cisplatino
V-TAD	Etopósido, Tioguanina, Daunorrubicina, Citarabina
5+2	Citarabina, Daunorrubicina, Mitoxantrona
7 + 3	Citarabina con/, Daunorrubicina o Idarrubicina o Mitoxantrona
"8 en 1"	Metilprednisolona, Vincristina, Lomustina, Procarbazina, Hidroxiurea, Cisplatino, Citarabina, Dacarbazina

Además de los agentes quimioterapéuticos convencionales, los compuestos moduladores de sirtuina descritos en esta memoria, como capaces de inducir la muerte celular o de reducir la vida, también pueden utilizarse con RNAi o RNA antisentido, o con otros polinucleótidos para inhibir la expresión de los componentes celulares que contribuyen a la proliferación celular indeseada que son blanco de quimioterapia convencional. Dichos blancos son, exclusivamente a modo ilustrativo, factores de crecimiento, receptores de los factores de crecimiento, proteínas reguladoras del ciclo celular, factores de transcripción o cinasas de transducción de señales.

Las terapias de combinación que comprenden los compuestos moduladores de sirtuina y un agente quimioterapéutico convencional pueden ser ventajosas frente a las terapias de combinación conocidas en la técnica, ya que la combinación permite que el agente quimioterapéutico convencional ejerza un mayor efecto en una dosis inferior. En una realización preferida, la dosis eficaz (ED<sub>50</sub>) para un agente quimioterapéutico, o la combinación de agentes quimioterapéuticos convencionales, cuando se usa en combinación con un compuesto modulador de sirtuina, es por lo menos 2 veces menor que la ED<sub>50</sub> del agente quimioterapéutico solo, e incluso más preferiblemente 5 veces, 10 veces o incluso 25 veces. De modo inverso, el índice terapéutico (TI) para dicho agente quimioterapéutico o combinación de dicho agente quimioterapéutico utilizado en combinación con el compuesto modulador de sirtuina descrito en la presente memoria puede ser por lo menos 2 veces mayor que el TI de un régimen quimioterapéutico convencional solo, e incluso más preferiblemente 5 veces, 10 veces o incluso 25 veces mayor

#### *Trastornos/enfermedades neuronales*

En ciertos aspectos, los compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina pueden utilizarse para tratar a pacientes que padecen enfermedades neurodegenerativas, y lesión traumática o mecánica al sistema nervioso central (SNC), a la médula espinal o al sistema nervioso periférico (SNP). La enfermedad neurodegenerativa típicamente implica reducciones en la masa y el volumen del cerebro humano, que pueden deberse a la atrofia y/o muerte de las células cerebrales, que son mucho más profundas que aquellas en una persona sana en donde se atribuyen al envejecimiento. Las enfermedades neurodegenerativas pueden evolucionar gradualmente, después de un periodo prolongado de funcionamiento normal del cerebro, debido a la degeneración progresiva (p. ej., disfunción y muerte de las células nerviosas) de regiones del cerebro específicas. Alternativamente, las enfermedades neurodegenerativas pueden tener un inicio rápido, tal como aquellos asociados con traumatismo o toxinas. El inicio real de degeneración del cerebro puede preceder a la expresión clínica por muchos años. Los ejemplos de enfermedades neurodegenerativas incluyen, aunque sin limitarse a ello, enfermedad de Alzheimer (AD), enfermedad de Parkinson (PD), enfermedad de Huntington (HD), esclerosis lateral amiotrófica (ALS; enfermedad de Lou Gehrig), enfermedad de cuerpos de Lewy difusos, corea-acantocitosis, esclerosis lateral primaria, enfermedades oculares (neuritis ocular), neuropatías inducidas por quimioterapia (p. ej., por vincristina, paclitaxel, bortezomib), neuropatías inducidas por diabetes y ataxia de Friedreich. Los compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina pueden utilizarse para tratar estos trastornos y otros que se describirán a continuación.

AD es un trastorno del SNC crónico, incurable y que no se puede detener. Ocurre gradualmente, produce amnesia, conducta inusual, cambios de personalidad y un declive en las habilidades de razonamiento. Estas pérdidas se asocian con la muerte de tipos específicos de células cerebrales, y la descomposición de conexiones y sus redes de soporte (p. ej., células gliales) entre ellas. La AD se ha descrito en el desarrollo de la infancia de manera inversa. En la mayoría de las personas con AD, los síntomas aparecen a los 60 años de edad. Los síntomas más tempranos incluyen pérdida de la memoria reciente, falta de juicio y cambios de personalidad. Más adelante durante la enfermedad, las personas con AD pueden olvidarse cómo realizar tareas sencillas, como lavarse las manos. Eventualmente, las personas con AD pierden toda la capacidad de razonamiento y se vuelven dependientes de otra gente para su cuidado diario. Finalmente, la enfermedad se torna tan debilitante que los pacientes quedan confinados a una cama y típicamente desarrollan enfermedades coexistentes.

PD es un trastorno del SNC crónico, incurable y que no se puede detener. Ocurre gradualmente y produce movimientos corporales descontrolados, rigidez, temblores y discinesia. Estos problemas del sistema motor se relacionan con la muerte de las células cerebrales en un área del cerebro que produce dopamina, una sustancia química que ayuda a controlar la actividad muscular. En la mayoría de las personas con PD, los síntomas aparecen a los 50 años de edad. Los síntomas iniciales de PD consisten en un temblor pronunciado que afecta las extremidades, notablemente en las manos o los labios. Los síntomas característicos subsiguientes de PD son rigidez o retardo del movimiento, una marcha arrastrada, postura encorvada y deterioro del equilibrio. Existe una amplia gama de síntomas secundarios tales como amnesia, demencia, depresión, cambios emocionales, dificultades para deglutir, discurso anormal, disfunción sexual y problemas de vejiga e intestino. Estos síntomas comenzarán a interferir con las actividades de rutina, tales como sostener un tenedor o leer un periódico. Finalmente, las personas con PD se vuelven tan incapacitadas que por lo general quedan confinadas a una cama.

La ALS (enfermedad neuronal motora) es un trastorno del SNC crónico, incurable que no se puede detener. Ataca las neuronas motoras, los componentes del SNC que conectan el cerebro con los músculos esqueléticos. En ALS, las neuronas motoras se deterioran y eventualmente mueren, y si bien el cerebro de una persona normalmente permanece totalmente en funcionamiento y alerta, el comando para mover el nervio alcanza los músculos. La mayoría de la gente que padece ALS tiene entre 40 y 70 años de edad. Las primeras neuronas motoras que se debilitan son aquellas que controlan los brazos y las piernas. Las personas con ALS pueden tener problemas para caminar, pueden dejar caer las cosas, caerse, tener un discurso confuso y reírse o llorar descontroladamente. Eventualmente, los músculos de las extremidades comienzan a atrofiarse por el desuso. Esta debilidad muscular se torna debilitante y la persona necesita una silla de ruedas o incluso no puede funcionar fuera de una cama.

Las causas de estas enfermedades neurológicas se han desconocido por largo tiempo. Convencionalmente se definen como enfermedades distintas, incluso presentan claramente similitudes en los procesos básicos y

comúnmente demuestran síntomas superpuestos mucho mayores que los que se esperarían por casualidad solos. Las definiciones de la enfermedad actuales no pueden tratarse adecuadamente con el problema de superposición y se ha generado una nueva clasificación de los trastornos neurodegenerativos.

5 HD es otra enfermedad neurodegenerativa que proviene de la degeneración genéticamente programada de las neuronas en ciertas áreas del cerebro. Esta degeneración causa movimientos descontrolados, pérdida de las facultadas intelectuales y alteraciones emocionales. HD es una enfermedad familiar, que se pasa de padre a hijo a través de una mutación dominante en el gen de tipo salvaje. Algunos síntomas tempranos de HD son cambios de ánimo, depresión, irritabilidad o dificultad para conducir, aprender cosas nuevas, recordar un hecho o tomar una  
10 decisión. A medida que la enfermedad avanza, la concentración en las tareas intelectuales se vuelve cada vez más difícil y el paciente tienen dificultad para alimentarse a sí mismo y para deglutir.

15 La enfermedad de Tay-Sachs y la enfermedad de Sandhoff son enfermedades de almacenamiento de glucolípidos causadas por la falta de  $\beta$ -hexosaminidasa liosomal (Gravel et al., en *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, eds. Scriver et al., McGraw-Hill, Nueva York, pág. 2839-2879, 1995). En ambos trastornos, el gangliósido GM2 y glucolípido-sustratos relacionados para  $\beta$ -hexosaminidasa se acumulan en el sistema nervioso y desencadenan neurodegeneración aguda. En las formas más severas, el inicio de los síntomas tiene lugar en la primera infancia. Tiene lugar luego un curso neurodegenerativo precipitoso, con niños afectados que presentan disfunción motora, convulsiones, pérdida visual y sordera. La muerte por lo general se produce entre los 2-5 años de edad. Se ha demostrado la pérdida neuronal a través de un mecanismo apoptótico (Huang et al., *Hum. Mol. Genet.* 6: 1879-1885,  
20 1997).

25 Se sabe que la apoptosis cumple una función en la patogénesis del sida en el sistema inmunitario. No obstante, el VIH-1 también induce enfermedad neurológica. Shi et al. (*J. Clin. Invest.* 98: 1979-1990, 1996) examinaron la apoptosis inducida por la infección del VIH-1 en el SNC en un modelo *in vitro* y en tejido cerebral de pacientes con sida, y descubrieron la infección por el VIH-1 de apoptosis inducida en cultivos de cerebro primarios en neuronas y astrocitos *in vitro*. La apoptosis de neuronas y astrocitos también se detectó en tejido de cerebro de 10/11 pacientes con sida, incluidos 5/5 pacientes con VIH-1 con demencia y 4/5 sin demencia.

Existen cuatro neuropatías periféricas principales asociadas con el VIH, a saber, neuropatía sensorial, AIDP/CIDP, neuropatía inducida por fármacos y neuropatía relacionada con CMV.

30 El tipo más frecuente de neuropatía asociada con el sida es la polineuropatía simétrica distal (DSPN). Este síndrome es consecuencia de una degeneración nerviosa y se caracteriza por entumecimiento y una sensación de pinchazos y agujas. La DSPN causa algunas anomalías graves y principalmente produce entumecimiento u hormigueo en los pies y reflejos más lentos en los tobillos. En general ocurre con inmuodepresión más intensa y es gradualmente progresiva. El tratamiento con antidepresivos tricíclicos alivia los síntomas pero no afecta el daño nervioso subyacente.

35 Un tipo de neuropatía menos frecuente pero más severo se conoce como polineuropatía desmielinante inflamatoria aguda o crónica (AIDP/CIDP). En AIDP/CIDP, se produce un daño en la membrana grasa que cubre los impulsos nerviosos. Esta clase de neuropatía implica inflamación y se asemeja al deterioro muscular a menudo identificado con el uso a largo plazo de AZT. Puede ser la primera manifestación de la infección por el VIH, donde el paciente puede no referir dolor, pero no puede responder a las pruebas de reflejos convencionales. Esta clase de neuropatía  
40 puede estar asociada con seroconversión, en cuyo caso puede a veces resolverse espontáneamente. Puede servir como signo de infección por el VIH e indicar que podría ser momento de considerar una terapia antivírica. La AIDP/CIDP puede ser de origen autoinmunitario.

45 Las neuropatías inducidas por fármacos o tóxicas pueden ser muy dolorosas. Los fármacos antivíricos comúnmente causan neuropatía periférica, como lo hacen otros fármacos, p. ej., vincristina, dilantin (un medicamento anticonvulsionante), altas dosis de vitaminas, isoniazid y antagonistas del ácido fólico. La neuropatía periférica con frecuencia se usa en ensayos clínicos para antivíricos como efecto colateral limitante de la dosis, lo que significa que más fármacos deberían no administrarse. Además, el uso de dichos fármacos puede exacerbar neuropatías que de otro modo serían leves. Usualmente, esta neuropatías inducidas por fármacos son reversibles con la discontinuación del fármaco.

50 CMV causa varios síndromes neurológicos en sida, incluyendo encefalitis, mielitis y polirradiculopatía.

55 La pérdida neuronal es también un rasgo saliente de enfermedades anteriores, como la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob en seres humanos, BSE en ganado (enfermedad de la vaca loca), enfermedad de Scrapie en ovejas y cabras, y encefalopatía espongiiforme felina (FSE) en gatos. Los compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina pueden ser útiles para tratar o prevenir pérdida neuronal debido estas enfermedades anteriores.

En otra realización, un compuesto modulador de sirtuina que aumenta el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina puede usarse para tratar o prevenir cualquier enfermedad o trastorno que implique axonopatía. La axonopatía distal es un tipo de neuropatía periférica que proviene de alguna alteración metabólica o tóxica de las neuronas del sistema nervioso periférico (SNP). Es la respuesta más frecuente de los nervios a alteraciones

metabólicas o tóxicas, y como tal puede ser causada por enfermedades metabólicas tales como la diabetes, insuficiencia renal, síndromes de deficiencia como desnutrición y alcoholismo, o los efectos de toxinas o fármacos. La causa más común de axonopatía distal es la diabetes, y la causa más común de axonopatía distal es la neuropatía diabética. Las porciones más distales de los axones son por lo general las primeras en degenerarse, y la atropía axonal avanza lentamente hacia el cuerpo celular del nervio. Si el estímulo nocivo es eliminado, es posible la regeneración, aunque el pronóstico se reduce dependiendo de la duración y la intensidad del estímulo. Las personas con axonopatías distales usualmente experimentan alteraciones motoras y sensoriales en guante y en calcetín. Las funciones de los tendones profundos y del sistema nervioso autónomo (SNA) también se pierden o disminuyen en áreas afectadas.

Las neuropatías diabéticas son trastornos neuropáticos asociados con diabetes mellitus. Estas afecciones por lo general resultan de lesiones microvasculares diabéticas que implican a los vasos sanguíneos pequeños que suministran a los nervios (vasa nervorum). Las afecciones relativamente frecuentes que pueden estar asociadas con la neuropatía diabética incluyen parálisis del tercer nervio; mononeuropatía; mononeuritis múltiple; amiotrofia diabética; polineuropatía dolorosa; ; y neuropatía toracoabdominal. Las manifestaciones clínicas de neuropatía diabética incluyen, por ejemplo, polineuropatía sensoriomotora tal como entumecimiento, pérdida sensorial, disestesia y dolor nocturno; la neuropatía autónoma tal como vaciamiento gástrico demorado o gastroparesia; y neuropatía craneal tal como neuropatías oculomotoras (3er) o Mononeuropatías de los nervios espinales torácicos o lumbares.

Neuropatía periférica es el término médico para daño a los nervios del sistema nervioso periférico, que puede ser causado o bien por enfermedades del nervio o por efectos colaterales de enfermedad sistémica. Las neuropatías periféricas varían en su presentación y origen, y pueden afectar al nervio o a la articulación neuromuscular. Las causas principales de la neuropatía periférica incluyen convulsiones, deficiencias nutricionales y VIH, aunque la diabetes es la causa más probable. La presión mecánica de mantenerse en una posición por mucho tiempo, un tumor, hemorragia intraneural, exposición del cuerpo a condiciones extremas tales como radiación, temperaturas frías o sustancias tóxicas pueden también causar neuropatía periférica.

En una realización ilustrativa, un compuesto modulador de sirtuina que aumenta el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina puede utilizarse para tratar o prevenir la esclerosis múltiple (MS), incluyendo MS recidivante y MS monosimpática, y otras afecciones desmielinantes, tales como, por ejemplo, polineuropatía desmielinante inflamatoria crónica (CIDP), o síntomas asociados con éstas.

MS es una enfermedad crónica, con frecuencia incapacitante, del sistema nervioso central. Diversas líneas convergentes de evidencia señalan la posibilidad de que la enfermedad sea causada por una alteración en la función inmunitaria, aunque la causa de esta alteración no ha sido establecida. La alteración permite que las células del sistema inmunitario "ataquen" la mielina, la grasa que contiene la vaina aislante que rodea los axones nerviosos situados en el sistema nervioso central ("SNC"). Cuando se daña la mielina, los pulsos eléctricos no pueden viajar rápida o normalmente por las vías de las fibras nerviosas en el cerebro y en la médula espinal. Esto produce la ruptura de la conductividad eléctrica normal dentro de los axones, fatiga y alteraciones de la visión, fuerza, coordinación, equilibrio, sensación y funcionamiento de la vejiga y los intestinos.

Como tal, la MS es ahora un trastorno neurológico frecuente y conocido caracterizado por episodios de inflamación y desmielinación que ocurren en alguna parte del SNC. No obstante, prácticamente siempre sin compromiso de los nervios periféricos asociados. La desmielinación produce una situación análoga a aquella que resulta de grietas o desgarros en un aislante que rodea a un cable eléctrico. Es decir, cuando la vaina aislante se rompe, el circuito entra en "cortocircuito" y el aparato eléctrico asociado funcionará de manera intermitente o no funcionará en absoluto. Dicha pérdida de mielina que rodea a las fibras nerviosas produce cortocircuitos en los nervios que atraviesan el cerebro y la médula espinal, lo que en consecuencia produce síntomas de MS. Se ha observado también que dicha desmielinación ocurre en zonas, en oposición a todo el SNC central. Además, dicha desmielinación puede ser intermitente. Por lo tanto, dichas placas se diseminan tanto en tiempo como en espacio.

Se cree que la patogénesis implica una ruptura local de la barrera hematoencefálica que causa una respuesta inmunitaria localizada e inflamatoria, con consecuente daño a la mielina y a las neuronas.

Clínicamente, la MS existe en ambos sexos y puede ocurrir a cualquier edad. No obstante, su presentación más frecuente es en el adulto relativamente joven, por lo general con una lesión focal simple tal como daño del nervio óptico, un área de anestesia (pérdida de sensación) o parestesia (localización de pérdida de sensación) o debilidad muscular. A su vez, el vértigo, la doble visión, dolor localizado, incontinencia y dolor en brazos y piernas pueden ocurrir al flexionar el cuello, como también una gran variedad de síntomas menos frecuentes.

Un ataque inicial de MS es por lo general pasajero, y pueden pasar semanas, meses o años hasta un nuevo ataque. Algunas personas pueden gozar de una vida estable, relativamente libre de episodios por una gran cantidad de años, mientras que otras menos afortunadas experimentan un curso cuesta abajo hasta una parálisis completa. Comúnmente hay una serie de remisiones y recaídas, en las que cada recaída deja al paciente algo peor que antes. Las recaídas pueden ser desencadenadas por episodios de estrés, infecciones víricas o toxinas. La temperatura corporal elevada, es decir una fiebre, empeorará el estado, o una reducción de la temperatura, por ejemplo, por un baño frío, podría mejorar el estado.

Incluso en otra realización, un compuesto modulador de sirtuina que aumenta el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina puede usarse para tratar traumatismo a los nervios, incluyendo traumatismo debido a enfermedad, lesión (incluida una intervención quirúrgica) o traumatismo ambiental (p. ej., neurotoxinas, alcoholismo, etc.).

5 Los compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina pueden también ser útiles para prevenir, tratar y aliviar síntomas de diversos trastornos del SNP, como aquellos descritos a continuación. El SNP está compuesto por los nervios que conducen a o se ramifican desde la médula espinal y el SNC. Los nervios periféricos manipulan una diversa gama de funciones del organismo, incluyendo las funciones sensoriales, motoras y autónomas. Cuando una persona padece neuropatía periférica, los nervios del SNP se han  
10 dañado. El daño nervioso puede surgir de una serie de causas, tales como enfermedad, lesión física, intoxicación o desnutrición. Estos agentes pueden afectar los nervios aferentes o eferentes. Dependiendo de la causa del daño, el axón de las células nerviosas, su vaina de mielina protectora, o ambos, pueden dañarse o destruirse.

La expresión "neuropatía periférica" abarca una amplia gama de trastornos en los que los nervios fuera del cerebro y la médula espinal, los nervios periféricos, se han dañado. La neuropatía periférica puede también denominarse neuritis periférica, o si están implicados muchos nervios, se pueden usar los términos polineuropatía o polineuritis.  
15

La neuropatía periférica es un trastorno propagado que tiene muchas causas subyacentes. Algunas de estas causas son frecuentes, como la diabetes, y otras son extremadamente excepcionales, como la intoxicación por acrilamida y ciertos trastornos heredados. La causa más frecuente de la neuropatía periférica en todo el mundo es la lepra. La lepra es causada por la bacteria *Mycobacterium leprae*, que ataca los nervios periféricos de la gente afectada.

20 La lepra es extremadamente infrecuente en los Estados Unidos, donde la diabetes es la causa más frecuente de neuropatía periférica. Se ha estimado que más de 17 millones de personas en los Estados Unidos y Europa padecen polineuropatía relacionada con la diabetes. Muchas neuropatías son idiopáticas; de causa desconocida. La más frecuente de las neuropatías heredadas en los Estados Unidos es la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, que afecta a aproximadamente 125.000 personas.

25 Otras de las neuropatías periféricas más conocidas es el síndrome de Guillain-Barré, que surge de complicaciones asociadas con enfermedades víricas, como citomegalovirus, virus de Epstein-Barr y virus de inmunodeficiencia humana (VIH), o infección bacteriana que incluyen la enfermedad de *Campilobacter jejuni* y Lyme. La tasa de incidencia mundial es de aproximadamente 1,7 casos cada 100.000 personas por año. Otras causas conocidas de neuropatías periféricas incluyen alcoholismo crónico, infección del virus varicela-zoster, botulismo y poliomielitis. La neuropatía periférica puede desarrollarse como un síntoma primario, o puede deberse a otra enfermedad. Por ejemplo, la neuropatía periférica es solamente un síntoma de enfermedades tales como neuropatía amiloidea, ciertos tipos de cáncer o trastornos neurológicos hereditarios. Dichas enfermedades pueden afectar el SNP y el SNC, como también otros tejidos del cuerpo.  
30

Otras enfermedades del SNP tratables con los compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina incluyen: neuropatías del plexo braquial (enfermedades de las raíces cervical y primera torácica, tronco nervioso y componentes nerviosos periféricos del plexo braquial. Las manifestaciones clínicas incluyen dolor regional, parestesia; debilidad muscular y reducción de la sensación en las extremidades superiores. Estos trastornos pueden asociarse a traumatismo, incluyendo lesiones congénitas; síndrome de salida torácica; neoplasias, neuritis, radioterapia; y otras dolencias. Véase Adams et al., *Principles of Neurology*, 6ª ed, pág 1351-2); neuropatías diabéticas (trastornos periféricos, autónomos de los nervios craneales asociados con diabetes mellitus). Estas afecciones por lo general resultan de lesiones microvasculares diabéticas que implican a los vasos sanguíneos pequeños que suministran a los nervios (*vasa nervorum*). Las afecciones relativamente frecuentes que pueden estar asociadas con la neuropatía diabética incluyen parálisis del tercer nervio; mononeuropatía; mononeuritis múltiple; amiotrofia diabética; polineuropatía dolorosa; ; y neuropatía toracoabdominal (véase Adams et al., *Principles of Neurology*, 6ª ed, p1325); mononeuropatías (enfermedad o traumatismo que implica un nervio periférico individual aislado, o fuera de proporción para indicar una disfunción del nervio periférico difusa). Mononeuritis múltiple se refiere a una afección caracterizada por lesiones nerviosas aisladas múltiples. Las mononeuropatías pueden provenir de una amplia variedad de causas que incluyen isquemia; lesión traumática; compresión; enfermedades del tejido conjuntivo; trastornos de traumatismos acumulativos; y otras dolencias.; neuralgia (dolor intenso que ocurre junto con el curso o la distribución de un nervio periférico o craneal); neoplasias del sistema nervioso periférico (neoplasias que surgen del tejido nervioso periférico). Esto incluye neurofibromas; Schwannomas; tumores de células granulares; tumores malignos de la vaina del nervio periférico (véase DeVita Jr et al., *Cancer: Principles and Practice of Oncology*, 5ª ed, pág1750-1); y síndromes de compresión nerviosa (compresión mecánica de los nervios o las raíces nerviosas por causas internas o externas). Esto puede producir un bloqueo de conducción a los impulsos nerviosos debido a, por ejemplo, disfunción de la vaina de mielina o pérdida axonal. Las lesiones del nervio y la vaina nerviosa pueden ser causadas por isquemia; inflamación; o un efecto mecánico directo; neuritis (un término general que indica inflamación de un nervio periférico o craneal). Las manifestaciones clínicas pueden incluir dolor; parestesias; paresia o hiperestesia; polineuropatías (enfermedades de múltiples nervios periféricos). Las diversas formas se categorizan por el tipo de nervio afectado (p. ej., sensorial, motor o autónomo), por la distribución de la lesión nerviosa (p. ej., distal vs. proximal), por el componente nervioso primariamente afectado (p. ej., desmielinante vs. axonal), por etiología o por patrón hereditario.  
35  
40  
45  
50  
55  
60

En otra realización, se puede usar un compuesto activador de sirtuina para tratar o prevenir neuropatía inducida por agentes quimioterapéuticos. Los compuestos moduladores de sirtuina pueden administrarse antes de la administración del agente quimioterapéutico, simultáneamente con la administración del fármaco quimioterapéutico y/o después del inicio de la administración del fármaco quimioterapéutico. Si el compuesto activador de sirtuina se administra después del inicio de la administración del fármaco quimioterapéutico, es conveniente que el compuesto activador de sirtuina se administre antes, o con los primeros signos, de la neuropatía inducida por agentes quimioterapéuticos.

Los fármacos de quimioterapia pueden dañar cualquier parte del sistema nervioso. Afortunadamente, la encefalopatía y la mielopatía son muy infrecuentes. El daño a los nervios nerviosos es mucho más frecuente y puede ser un efecto colateral del tratamiento experimentado por gente con cáncer, como linfoma. La mayoría de las neuropatías afectan a los nervios sensoriales más que a los nervios motores. Por consiguiente, los síntomas frecuentes son hormigueo, entumecimiento o pérdida del equilibrio. Los nervios más largos del cuerpo parecen ser los más sensibles, es por eso que la mayoría de los pacientes manifiestan entumecimiento o pinchazos en las manos y los pies.

Los fármacos quimioterapéuticos más comúnmente asociados con neuropatía son vinca-alcaloides (fármacos anti-cáncer originalmente derivados de un miembro de la planta vincapervinca) y un fármaco que contiene platino llamado Cisplatino. Los vinca-alcaloides incluyen los fármacos de vinblastina, vincristina y vindesina. Muchos tratamientos de quimioterapia combinada para linfoma, por ejemplo CHOP y CVP, contienen vincristina, que es el fármaco conocido por causar este problema con mayor frecuencia. De hecho, es el riesgo de neuropatía lo que limita la dosis de vincristina que puede administrarse.

Los estudios realizados han demostrado que la mayoría de los pacientes perderán algunos reflejos en las piernas como consecuencia del tratamiento con vincristina, y muchos experimentarán algún grado de hormigueo (parestesia) en los dedos de las manos y los pies. La neuropatía usualmente no se manifiesta propiamente dicha al comienzo del tratamiento, sino que en general sucede al cabo de algunas semanas. No es esencial detener el fármaco al inicio de los síntomas, pero si la neuropatía avanza, tal vez pueda ser necesario. Es muy importante que los pacientes informen dichos síntomas a los médicos, dado que el daño nervioso es ampliamente reversible si se discontinúa el fármaco. La mayoría de los médicos por lo general reducirán la dosis de vincristina o cambiarán por otra forma de Vinca-alcaloide tal como vinblastina o vindesina si los síntomas son leves. En ocasiones, los nervios que suministran a los intestinos se ven afectados, causando dolor abdominal y constipación.

En otra realización, se puede usar un compuesto activador de sirtuina para tratar o prevenir una enfermedad por poliglutamina. La enfermedad de Huntington (HD) y la ataxia espinocerebelar de tipo 1 (SCA1) son solo dos ejemplos de una clase de enfermedades genéticas causadas por mutaciones dinámicas que implican la expansión de repeticiones de secuencias de tripletes. En referencia a este mecanismo común, estos trastornos se denominan enfermedades de repetición de trinucleótidos. Se conocen por lo menos 14 de dichas enfermedades que afectan a seres humanos. Nueve de ellas, incluyendo SCA1 y enfermedad de Huntington, tienen CAG como la secuencia repetida (véase la Tabla 2 a continuación). Ya que CAG codifica un aminoácido llamado glutamina, estos nueve trastornos de repetición de trinucleótidos se conocen colectivamente como enfermedades de poliglutamina.

Si bien los genes implicados en distintas enfermedades de poliglutamina tienen poco en común, los trastornos que causan siguen un curso asombrosamente similar. Cada enfermedad se caracteriza por una degeneración progresiva de un grupo distinto de células nerviosas. Los síntomas principales de estas enfermedades son similares, aunque no idénticos, y usualmente afectan a personas de mediana edad. Dadas las similitudes en los síntomas, se hipotetiza que las enfermedades de poliglutamina avanzan mediante mecanismos celulares en común. En los últimos años, los científicos han hecho grandes avances para revelar cuáles son esos mecanismos.

Por encima de cierto umbral, cuanto más grande sea el número de repeticiones de glutamina en una proteína, más temprano será el inicio de la enfermedad y más graves serán los síntomas. Esto indica que las vías de glutamina anormalmente largas tornan a su proteína hospedante tóxica para las células nerviosas.

Para ensayar esta hipótesis, los científicos han generado ratones genéticamente modificados que expresan proteínas con largas vías de poliglutamina. Independientemente de si los ratones expresan proteínas de longitud total o solamente aquellas porciones de las proteínas que contienen las vías de glutamina, desarrollan síntomas de enfermedades de poliglutamina. Esto indica que una vía larga de poliglutamina está dañando por sí misma a las células y no tiene que ser parte de una proteína funcional para causar su daño.

Por ejemplo, se cree que los síntomas de SCA1 no son causados directamente por la pérdida de la función de ataxina-1 normal sino en cambio por la interacción entre ataxina-1 y otra proteína llamada LANP. La proteína LANP es necesaria para que las células nerviosas se comuniquen entre sí, y por lo tanto, para supervivencia. Cuando la proteína ataxina-1 mutante se acumula dentro de las células nerviosas, "atrapa" la proteína LANP, interfiriendo con su funcionamiento normal. Después de un tiempo, la ausencia de funcionamiento de LANP parece causar el malfuncionamiento de las células nerviosas.

Tabla 2. Resumen de enfermedades de poliglutamina.

Enfermedad	Nombre del gen	Ubicación cromosómica	Patrón hereditario	Proteína	Longitud de repetición normal	Longitud de repetición con la enfermedad
Atrofia espinobulbar muscular (enfermedad de Kennedy)	<i>AR</i>	Xq13-21	recesivo vinculado a X	receptor de andrógenos (AR)	9-36	38-62
Enfermedad de Huntington	<i>HD</i>	4p16,3	dominante autosómico	huntingtin	6-35	36-121
Atrofia dentatorubralpalidolusiana (Haw River syndrome)	<i>DRPLA</i>	12p13.31	dominante autosómico	atrofina-1	6-35	49-88
Ataxia espinocerebelar tipo 1	<i>SCA1</i>	6p23	dominante autosómico	ataxina-1	6-44	39-82
Ataxia espinocerebelar tipo 2	<i>SCA2</i>	12q24.1	dominante autosómico	ataxina-2	15-31	36-63
Ataxia espinocerebelar tipo 3 (Machado-Enfermedad de Joseph)	<i>SCA3</i>	14q32.1	dominante autosómico	ataxina-3	12-40	55-84
Ataxia espinocerebelar tipo 6	<i>SCA6</i>	19p13	dominante autosómico	subunidad de los canales de calcio dependientes del voltaje $\alpha_{1A}$	4-18	21-33
Ataxia espinocerebelar tipo 7	<i>SCA7</i>	3p12-13	dominante autosómico	ataxina-7	4-35	37-306
<i>Ataxia espinocerebelar tipo 17</i>	<i>SCA17</i>	<i>6q27</i>	<i>dominante autosómico</i>	proteína de unión a TATA	25-42	45-63

También se han hallado muchos factores de transcripción en las inclusiones neuronales de distintas enfermedades. Es posible que estos factores de transcripción interactúen con las proteínas que contienen poliglutamina y entonces queden atrapados en las inclusiones neuronales. Esto a su vez podría evitar que los factores de transcripción tornaran a los genes intermitentes según lo necesiten las células. Otra observación es la hipoacetilación de histonas en células afectadas. Esto ha conducido a la hipótesis de que los inhibidores de Histona Desacetilasa de Clase I/II (HDAC I/II), que se conocen por aumentar la acetilación de histona, pueden ser una nueva terapia para las enfermedades de poliglutamina (solicitud de patente estadounidense 10/476,627; "Method of treating neurodegenerative, psychiatric, and other disorders with deacetylase inhibitors").

Incluso en otra realización, la solicitud proporciona un método para tratar o prevenir una neuropatía relacionada con lesiones o enfermedades isquémicas, como por ejemplo cardiopatía coronaria (incluyendo insuficiencia cardíaca congestiva e infartos de miocardio), apoplejía, enfisema, choque hemorrágico, enfermedad vascular periférica (extremidades superiores e inferiores) y lesiones relacionadas con trasplantes.

En determinadas realizaciones, la solicitud proporciona un método para tratar una célula del sistema nervioso central a fin de prevenir el daño en respuesta a una disminución en el torrente circulatorio a la célula. Típicamente, la intensidad del daño que puede prevenirse dependerá en gran parte del grado de reducción en el torrente circulatorio y de la duración de la reducción. A modo de ejemplo, la cantidad normal de perfusión a la materia gris del cerebro en seres humanos es de aproximadamente 60 a 70 mL/100 g de tejido cerebral/min. La muerte de las células del sistema nervioso central típicamente ocurre cuando el flujo de sangre disminuye por debajo de aproximadamente 8-10 mL/100 g de tejido cerebral/min, mientras que a niveles ligeramente superiores (es decir, 20-35 mL/100 g de

tejido cerebral/min) el tejido permanece vivo pero no es capaz de funcionar. En una realización, la muerte celular apoptótica o necrótica puede prevenirse. Incluso en otra realización, el daño mediado por isquemia, tal como edema citotóxico o anoxemia del tejido del sistema nervioso central, puede prevenirse. En cada realización, la célula del sistema nervioso central puede ser una célula espinal o una célula cerebral.

Otro aspecto abarca administrar un compuesto activador de sirtuina a un sujeto para tratar un cuadro isquémico del sistema nervioso central. Se puede tratar una serie de cuadros isquémicos del sistema nervioso central con los compuestos activadores de sirtuina descritos en la presente memoria. En una realización, el cuadro isquémico es una apoplejía que produce cualquier tipo de daño isquémico al sistema nervioso central, como muerte celular apoptótica o necrótica, edema citotóxico o anoxia del tejido del sistema nervioso central. La apoplejía puede impactar en cualquier área del cerebro o ser causada por cualquier causa conocida por causar comúnmente una apoplejía. En una alternativa a esta realización, la apoplejía es una apoplejía del tronco encefálico. En términos generales, las apoplejías del tronco encefálico afectan al tronco encefálico, que controla involuntariamente las funciones que sostienen la vida tales como la respiración, la presión arterial y los latidos cardíacos. En otra alternativa a esta realización, la apoplejía es una apoplejía cerebelar. Típicamente, las apoplejías cerebelares impactan en el área del cerebelo del cerebro, que controla el equilibrio y la coordinación. Incluso en otra realización, la apoplejía es una apoplejía embólica. En términos generales, las apoplejías embólicas pueden impactar en cualquier región del cerebro y típicamente producen el bloqueo de una arteria por una vasoclusión. Incluso en otra alternativa, la apoplejía puede ser una apoplejía hemorrágica. Como las apoplejías isquémicas, las apoplejías hemorrágicas pueden impactar en cualquier región del cerebro y por lo general producen la ruptura de un vaso sanguíneo caracterizada por hemorragia (sangrado) dentro del cerebro o en las áreas circundantes. En otra realización, la apoplejía es una apoplejía trombótica. Típicamente, las apoplejías trombóticas resultan del bloqueo de un vaso sanguíneo por depósitos acumulados.

En otra realización, el cuadro isquémico puede provenir de un trastorno que ocurre en una parte del cuerpo del sujeto fuera del sistema nervioso central, pero que causa una reducción en el flujo sanguíneo hacia el sistema nervioso central. Estos trastornos pueden incluir, aunque sin limitarse a ello, un trastorno vascular periférico, una trombosis venosa, una embolia pulmonar, arritmia (p. ej., fibrilación auricular, un ataque isquémico transitorio, angina inestable o anemia de células falciformes. A su vez, el cuadro isquémico del sistema nervioso central puede ocurrir como consecuencia de un procedimiento quirúrgico. A modo de ejemplo, el sujeto puede someterse a una cirugía del corazón, cirugía de pulmón, cirugía espinal, cirugía del cerebro, cirugía vascular, cirugía abdominal o cirugía de trasplante de órgano. La cirugía de trasplante de órgano puede incluir cirugía de trasplante de corazón, pulmón, páncreas, riñón o hígado. A su vez, el cuadro isquémico del sistema nervioso central puede ocurrir como consecuencia de un traumatismo o lesión a una parte del cuerpo del sujeto fuera del sistema nervioso central. A modo de ejemplo, el traumatismo o la lesión puede causar un grado de sangrado que reduce significativamente el volumen total de sangre en el cuerpo del sujeto. Debido a esta reducción del volumen total, la cantidad de flujo sanguíneo hacia el sistema nervioso central se reduce de manera concomitante. Como otro ejemplo, el traumatismo o la lesión puede también provocar la formación de una vasoclusión que restrinja el flujo sanguíneo hacia el sistema nervioso central.

Desde ya, se contempla que los compuestos activadores de sirtuina pueden emplearse para tratar el cuadro isquémico del sistema nervioso central independientemente de la causa de la afección. En una realización, el cuadro isquémico proviene de una vasoclusión. La vasoclusión puede ser cualquier tipo de oclusión, pero típicamente es una trombosis o una embolia cerebral. En otra realización, el cuadro isquémico puede ser causado por una hemorragia. La hemorragia puede ser cualquier tipo de hemorragia, pero en general es una hemorragia cerebral o una hemorragia subaracnoidea. Incluso en otra realización, el cuadro isquémico puede ser causado por el estrechamiento de un vaso. En términos generales, el vaso puede estrecharse como consecuencia de una vasoconstricción, como ocurre durante los vasoespasmos, o debido a arteriosclerosis. Incluso en otra realización, el cuadro isquémico proviene de una lesión al cerebro o a la columna vertebral.

En otro aspecto, un compuesto activador de sirtuina puede administrarse para reducir el tamaño del infarto del núcleo isquémico después de un cuadro isquémico del sistema nervioso central. Asimismo, el compuesto activador de sirtuina puede también administrarse beneficiosamente para reducir el tamaño de la penumbra isquémica o de la zona transicional que le sigue a un cuadro isquémico del sistema nervioso central.

En una realización, un régimen de fármacos combinados puede incluir fármacos o compuestos para el tratamiento o la prevención de trastornos neurodegenerativos o afecciones secundarias asociados con estos cuadros. Por lo tanto, un régimen de fármacos combinados puede incluir uno o más activadores de sirtuina y uno o más agentes anti-neurodegeneración. Por ejemplo, pueden combinarse uno o más compuestos activadores de sirtuina con una cantidad eficaz de uno o más de: L-DOPA; un agonista de dopamina; un antagonista de los receptores de adenosina A<sub>2</sub>A; un inhibidor de COMT; un inhibidor de MAO; un inhibidor de N-NOS; un antagonista del canal de sodio; un antagonista de los receptores selectivos de N-metil D-aspartato (NMDA); un antagonista de los receptores de AMPA/kainato; un antagonista del canal de calcio; un agonista del receptor de GABA-A; un inhibidor de acetil-colina esterasa; un inhibidor de metaloproteasa de matriz; un inhibidor de PARP; un inhibidor de p38 MAP cinasa o c-jun-N-terminal cinasas; TPA; antagonistas de NDA; beta-interferones; factores de crecimiento; inhibidores de glutamato; y/o como parte de una terapia celular.

Los inhibidores de N-NOS ilustrativos incluyen 4-(6-amino-piridin-2-il)-3-metoxifenol 6-[4-(2-dimetilamino-etoxi)-2-metoxi-fenil]-piridin-2-il-amina, 6-[4-(2-dimetilamino-etoxi)-2,3-dimetil-fenil]-piridin-2-il-amina, 6-[4-(2-pirrolidinil-etoxi)-2,3-dimetil-fenil]-piridin-2-il-amina, 6-[4-(4-(n-metil)piperidiniloxi)-2,3-dimetil-fenil]-piridin-2-il-amina, 6-[4-(2-dimetilamino-etoxi)-3-metoxi-fenil]-piridin-2-il-amina, 6-[4-(2-pirrolidinil-etoxi)-3-metoxi-fenil]-piridin-2-il-amina, 6-[4-[2-(6,7-dimetoxi-3,4-dihidro-1h-isoquinolin-2-il)-etoxi]-3-metoxi-fenil]-piridin-2-il-amina, 6-{3-metoxi-4-[2-(4-fenetil-piperazin-1-il)-etoxi]-fenil]-piridin-2-il-amina, 6-{3-metoxi-4-[2-(4-metil-piperazin-1-il)-etoxi]-fenil]-piridin-2-il-amina, 6-[4-(2-dimetilamino-etoxi)-3-metoxi-fenil]-piridin-2-il-amina, 6-[4-(2-dimetilamino-etoxi)-3-etoxi-fenil]-piridin-2-il-amina, 6-[4-(2-dimetilamino-etoxi)-2-isopropil-fenil]-piridin-2-il-amina, 4-(6-amino-piridin-il)-3-ciclopropil-fenol 6-[2-ciclopropil-4-(2-dimetilamino-etoxi)-fenil]-piridin-2-il-amina, 6-[2-ciclopropil-4-(2-pirrolidin-1-il-etoxi)-fenil]-piridin-2-il-amina, éster terc-butílico de ácido 3-[3-(6-amino-piridin-2-il)-4-ciclopropil-fenoxi]-pirrolidina-1-carboxílico, 6-[2-ciclopropil-4-(1-metil-pirrolidin-3-il-oxi)-fenil]-piridin-2-il-amina, 4-(6-amino-piridin-2-il)-3-ciclobutil-fenol 6-[2-ciclobutil-4-(2-dimetilamino-etoxi)-fenil]-piridin-2-il-amina, 6-[2-ciclobutil-4-(2-pirrolidin-1-il-etoxi)-fenil]-piridin-2-il-amina, 6-[2-ciclobutil-4-(1-metil-pirrolidin-3-il-oxi)-fenil]-piridin-2-il-amina, 4-(6-amino-piridin-2-il)-3-ciclopentil-fenol 6-[2-ciclopentil-4-(2-dimetilamino-etoxi)-fenil]-piridin-2-il-amina, 6-[2-ciclopentil-4-(2-pirrolidin-il-etoxi)-fenil]-piridin-2-il-amina, éster terc-butílico de ácido 3-[4-(6-amino-piridin-2-il)-3-metoxi-fenoxi]-pirrolidina-1-carboxílico 6-[4-(1-metil-pirrolidin-3-il-oxi)-2-metoxi-fenil]-piridin-2-il-amina, éster terc-butílico de ácido 4-[4-(6-amino-piridin-2-il)-3-metoxi-fenoxi]-piperidina-1-carboxílico 6-[2-metoxi-4-(1-metil-piperidin-4-il-oxi)-fenil]-piridin-2-il-amina, 6-[4-(aliloxi)-2-metoxi-fenil]-piridin-2-il-amina, 4-(6-amino-piridin-2-il)-3-metoxi-6-alilfenol 12 y 4-(6-amino-piridin-2-il)-3-metoxi-2-alil-fenol 13 4-(6-amino-piridin-2-il)-3-metoxi-6-propil-fenol 6-[4-(2-dimetilamino-etoxi)-2-metoxi-5-propil-fenil]-piridin-il-amina, 6-[2-isopropil-4-(pirrolidin-3-il-oxi)-fenil]-piridin-2-il-amina, 6-[2-isopropil-4-(piperidin-3-il-oxi)-fenil]-piridin-2-il-amina, 6-[2-isopropil-4-(1-metil-azetid-3-il-oxi)-fenil]-piridin-2-il-amina, 6-[2-isopropil-4-(1-metil-piperidin-4-il-oxi)-fenil]-piridin-2-il-amina, 6-[2-isopropil-4-(1-metil-piperidin-4-il-oxi)-fenil]-piridin-2-il-amina, 6-[2-isopropil-4-(1-metil-pirrolidin-3-il-oxi)-fenil]-piridin-2-il-amina, 6-[2-isopropil-4-(1-metil-pirrolidin-3-il-oxi)-fenil]-piridin-2-il-amina, 6-[2-isopropil-4-(2-metil-2-aza-biciclo[2.2.1]hept-5-il-oxi)-fenil]-piridin-2-il-amina, 6-[4-(2-dimetilamino-etoxi)-2-metoxi-fenil]-piridin-2-il-amina, 6-[4-[2-(bencil-metil-amino)-etoxi]-2-metoxi-fenil]-piridin-2-il-amina, 6-[2-metoxi-4-(2-pirrolidin-1-il-etoxi)-fenil]-piridin-2-il-amina, 2-(6-amino-piridin-2-il)-5-(2-dimetilamino-etoxi)-fenol 2-[4-(6-amino-piridin-2-il)-3-metoxi-fenoxi]-acetamida 6-[4-(2-amino-etoxi)-2-metoxi-fenil]-piridin-2-il-amina, 6-{4-[2-(3,4-dihidro-1h-isoquinolin-2-il)-etoxi]-2-metoxi-fenil]-piridin-2-il-amina, 2-[4-(6-amino-piridin-2-il)-3-metoxi-fenoxi]-etanol 6-[2-metoxi-4-[2-(2,2,6,6-tetrametil-piperidin-1-il)-etoxi]-fenil]-piridin-2-il-amina, 6-{4-[2-(2,5-dimetil-pirrolidin-1-il)-etoxi]-2-metoxi-fenil]-piridin-2-il-amina, 6-[4-[2-(2,5-dimetil-pirrolidin-1-il)-etoxi]-2-metoxi-fenil]-piridin-2-il-amina, 2-[4-(6-amino-piridin-2-il)-3-metoxi-fenoxi]-1-(2,2,6,6-tetrametil-piperidin-1-il)-etanona 6-[2-metoxi-4-(1-metil-pirrolidin-2-il-metoxi)-fenil]-piridin-2-il-amina, 6-[4-(2-dimetilamino-etoxi)-2-propoxi-fenil]-piridin-2-il-amina, 6-{4-[2-(bencil-metil-amino)-etoxi]-2-propoxi-fenil]-piridin-2-il-amina 6-[4-(2-etoxi-etoxi)-2-metoxi-fenil]-piridin-2-il-amina, 6-[4-(2-dimetilamino-etoxi)-2-isopropoxi-fenil]-piridin-2-il-amina, 6-[4-(2-etoxi-etoxi)-2-isopropoxi-fenil]-piridin-2-il-amina, 6-[2-metoxi-4-(3-metil-butoxi)-fenil]-piridin-2-il-amina, 6-[4-(2-dimetilamino-etoxi)-2-etoxi-fenil]-piridin-2-il-amina, 6-{4-[2-(bencil-metil-amino)-etoxil-2-etoxi-fenil]-piridin-2-il-amina, 6-[2-etoxi-4-(3-metil-butoxi)-fenil]-piridin-2-il-amina, 1-(6-amino-3-aza-biciclo[3.1.0]hex-3-il)-2-[4-(6-amino-piridin-2-il)-3-etoxi-fenoxi]-etanona 6-[2-etoxi-4-(2-pirrolidin-1-il-etoxi)-fenil]-piridin-2-il-amina, 3-{2-[4-(6-amino-piridin-2-il)-3-etoxi-fenoxi]-etil}-3-aza-biciclo[3.1.0]hex-6-il-amina, 1-(6-amino-3-aza-biciclo[3.1.0]hex-3-il)-2-[4-(6-amino-piridin-2-il)-3-metoxi-fenoxi]-etanona 3-{2-[4-(6-amino-piridin-2-il)-3-metoxi-fenoxi]-etil}-3-aza-biciclo[3.-1.0]hex-6-il-amina, 6-[2-isopropoxi-4-(2-pirrolidin-1-il-etoxi)-fenil]-piridin-2-il-amina, 6-[4-[2-(bencil-metil-amino)-etoxi]-2-isopropoxi-fenil]-piridin-2-il-amina, 6-[4-(2-dimetilamino-etoxi)-2-metoxi-5-propil-fenil]-piridin-2-il-amina, 6-[5-alil-4-(2-dimetilamino-etoxi)-2-metoxi-fenil]-piridin-2-il-amina, 6-[5-alil-2-metoxi-4-(2-pirrolidin-1-il-etoxi)-fenil]-piridin-2-il-amina, 6-[3-alil-4-(2-dimetilamino-etoxi)-2-metoxi-fenil]-piridin-2-il-amina, 6-[2-metoxi-4-(pirrolidin-3-il-oxi)-fenil]-piridin-2-il-amina, 6-[2-metoxi-4-(1-metil-pirrolidin-3-il-oxi)-fenil]-piridin-2-il-amina, 6-[2-metoxi-4-(1-metil-pirrolidin-3-il-oxi)-fenil]-piridin-2-il-amina, 6-[2-metoxi-4-(1-metil-piperidin-4-il-oxi)-fenil]-piridin-2-il-amina, 6-[4-(1-etil-piperidin-4-il-oxi)-2-metoxi-fenil]-piridin-2-il-amina, 6-[5-alil-2-metoxi-4-(1-metil-pirrolidin-3-il-oxi)-fenil]-piridin-2-il-amina, 6-[4-(2-dimetilamino-etoxi)-2,6-dimetil-fenil]-piridin-2-il-amina, 6-[2,6-dimetil-4-(3-piperidin-1-il-propoxi)-fenil]-piridin-2-il-amina, 6-[2,6-dimetil-4-(2-pirrolidin-1-il-etoxi)-fenil]-piridin-2-il-1-amina, 6-[2,6-dimetil-4-[3-(4-metil-piperazin-1-il)-propoxi]-fenil]-piridin-2-il-amina, 6-[2,6-dimetil-4-(2-morfolin-4-il-etoxi)-fenil]-piridin-2-il-amina, 6-[4-[2-(bencil-metil-amino)-etoxi]-2,6-dimetil-fenil]-piridin-2-il-amina, 2-[4-(6-amino-piridin-2-il)-3,5-dimetil-fenoxi]-acetamida 6-[4-(2-amino-etoxi)-2,6-dimetil-fenil]-piridin-2-il-amina, 6-[2-isopropil-4-(2-pirrolidin-1-il-etoxi)-fenil]-piridin-2-il-amina, 2-(2,5-dimetil-pirrolidin-1-il)-6-[2-isopropil-4-(2-pirrolidin-1-il-etoxi)-fenil]-piridina 6-[4-[2-(3,5-dimetil-piperidin-1-il)-etoxi]-2-isopropil-fenil]-piridin-2-il-amina, 6-[4-(2-dimetilamino-etoxi)-2-isopropil-fenil]-piridin-2-il-amina, 6-[2-terc-butil-4-(2-dimetilamino-etoxi)-fenil]-piridin-2-il-amina, 6-[2-terc-butil-4-(2-pirrolidin-1-il-etoxi)-fenil]-piridin-2-il-amina, 6-[4-(2-pirrolidinil-etoxi)-2,5-dimetil-fenil]-piridin-2-il-amina, 6-[4-(2-dimetilamino-etoxi)-2,5-dimetil-fenil]-piridin-2-il-amina, 6-[2-ciclopropil-4-(2-dimetilamino-1-metil-etoxi)-fenil]-piridin-2-il-amina, 6-[ciclobutil-4-(2-dimetilamino-1-metil-etoxi)-fenil]-piridin-2-il-amina, 6-[4-(aliloxi)-2-ciclobutil-fenil]-piridin-2-il-amina, 2-alil-4-(6-amino-piridin-2-il)-3-ciclobutil-fenol and 2-alil-4-(6-amino-piridin-2-il)-5-ciclobutil-fenol 4-(6-amino-piridin-2-il)-5-ciclobutil-2-propil-fenol 4-(6-amino-piridin-2-il)-3-ciclobutil-2-propil-fenol 6-[2-

- ciclobutil-4-(2-dimetilamino-1-metil-etoxi)-5-propil-fenil]-piridin-2-il-amina, 6-[2-ciclobutil-4-(2-dimetilamino-1-metil-etoxi)-3-propil-1-fenil]-piridin-2-il-amina, 6-[2-ciclobutil-4-(2-dimetilamino-etoxi)-5-propil-fenil]-piridin-2-il-amina, 6-[2-ciclobutil-4-(2-dimetilamino-etoxi)-3-propil-fenil]-piridin-2-il-amina, 6-[2-ciclobutil-4-(1-metil-pirrolidin-3-il-oxi)-3-propil-fenil]-piridin-2-il-amina, 2-(4-benciloxi-5-hidroxi-2-metoxi-fenil)-6-(2,5-dimetil-pirrol-1-il)-piridina 6-[4-(2-dimetilamino-etoxi)-5-etoxi-2-metoxi-fenil]-piridin-2-il-amina, 6-[5-etil-2-metoxi-4-(1-metil-piperidin-4-il-oxi)-fenil]-piridin-2-il-amina, 6-[5-etil-2-metoxi-4-(piperidin-4-il-oxi)-fenil]-piridin-2-il-amina, 6-[2,5-dimetoxi-4-(1-metil-pirrolidin-3-il-oxi)-fenil]-piridin-2-il-amina, 6-[4-(2-dimetilamino-etoxi)-5-etil-2-metoxi-fenil]-piridin-2-il-amina.
- Los antagonistas ilustrativos del receptor de NMDA incluyen (+)-(1S, 2S)-1-(4-hidroxifenil)-2-(4-hidroxi-4-fenilpiperidino)-1-propanol, (1S, 2S)-1-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-2-(4-hidroxi-4-fenilpiperidino)-1-propanol, (3R, 4S)-3-(4-(4-fluorofenil)-4-hidroxipiperidin-1-il)-croman-4,7-diol, (1R\*, 2R\*)-1-(4-hidroxi-3-metilfenil)-2-(4-(4-fluoro-fenil)-4-hidroxipiperidin-1-il)-propan-1-ol-mesilato o su sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable.
- Los agonistas de dopamina ilustrativos incluyen ropinilol; inhibidores de L-dopa descarboxilasa tales como carbidopa o benserazida, bromocriptina, dihidroergocriptina, etisulergina, AF-14, alaptida, pergolida, piribedil; agonistas del receptor de dopamina D1 tales como A-68939, A-77636, dihidrexina y SKF-38393; agonistas de los receptores de dopamina D2 tales como carbergolina, lisurida, N-0434, naxagolida, PD-118440, pramipexol, quinpirol y ropinirol; agonistas de los receptores de dopamina/ $\beta$ -adrenérgica tales como DPDMS y dopexamina; agonistas del inhibidor de captación de dopamina/5-HT/5-HT-1 A tales como roxindol; agonistas de los receptores de dopamina/opioides tales como NIH-10494; antagonista  $\alpha$ 2-adrenérgico/agonistas de dopamina tales como tergurida; antagonista  $\alpha$ 2-adrenérgico/agonistas de dopamina D2 tales como ergolinas y talipexol; inhibidores de captación de dopamina tales como GBR-12909, GBR-13069, GYKI-52895 y NS-2141; inhibidores de monoamina oxidasa-B, tales como selegilina, N-(2-butil)-N-metilpropargilamina, N-metil-N-(2-pentil)propargilamina, AGN-1133, derivados de ergot, lazabemida, LU-53439, MD-280040 y mofegilina; e inhibidores de COMT tales como CGP-28014.
- Los inhibidores de acetil colinesterasa ilustrativos incluyen donepizil, 1-(2-metil-1H-bencimidazol-5-il)-3-[1-(fenilmetil)-4-piperidinil]-1-propanona; 1-(2-fenil-1H-bencimidazol-5-il)-3-[1-(fenilmetil)-4-piperidinil]-1-propanona; 1-(1-etil-2-metil-1H-bencimidazol-5-il)-3-[1-(fenilmetil)-4-piperidinil]-1-propanona; 1-(2-metil-6-benzotiazolil)-3-[1-(fenilmetil)-4-piperidinil]-1-propanona; 1-(2-metil-6-benzotiazolil)-3-[1-(2-metil-4-tiazolil)metil]-4-piperidinil]-1-propanona; 1-(5-metil-benzo[b]tiazol-2-il)-3-[1-(fenilmetil)-4-piperidinil]-1-propanona; 1-(6-metil-benzo[b]tiazol-2-il)-3-[1-(fenilmetil)-4-piperidinil]-1-propanona; 1-(3,5-dimetil-benzo[b]tiazol-2-il)-3-[1-(fenilmetil)-4-piperidinil]-1-propanona; 1-(benzo[b]tiazol-2-il)-3-[1-(fenilmetil)-4-piperidinil]-1-propanona; 1-(2-benzofuran-2-il)-3-[1-(fenilmetil)-4-piperidinil]-1-propanona; 1-(1-fenilsulfonil-6-metil-indol-2-il)-3-[1-(fenilmetil)-4-piperidinil]-1-propanona; 1-(6-metil-indol-2-il)-3-[1-(fenilmetil)-4-piperidinil]-1-propanona; 1-(1-fenilsulfonil-5-amino-indol-2-il)-3-[1-(fenilmetil)-4-piperidinil]-1-propanona; 1-(5-amino-indol-2-il)-3-[1-(fenilmetil)-4-piperidinil]-1-propanona; y 1-(5-acetilamino-indol-2-il)-3-[1-(fenilmetil)-4-piperidinil]-1-propanona. 1-(6-quinolil)-3-[1-(fenilmetil)-4-piperidinil]-1-propanona; 1-(5-indolil)-3-[1-(fenilmetil)-4-piperidinil]-1-propanona; 1-(5-benzotiazolil)-3-[1-(fenilmetil)-4-piperidinil]-1-propanona; 1-(6-quinazolil)-3-[1-(fenilmetil)-4-piperidinil]-1-propanona; 1-(6-benzoxazolil)-3-[1-(fenilmetil)-4-piperidinil]-1-propanona; 1-(5-benzofuril)-3-[1-(fenilmetil)-4-piperidinil]-1-propanona; 1-(5-metil-bencimidazol-2-il)-3-[1-(fenilmetil)-4-piperidinil]-1-propanona; 1-(6-metil-bencimidazol-2-il)-3-[1-(fenilmetil)-4-piperidinil]-1-propanona; 1-(5-cloro-benzo[b]tiazol-2-il)-3-[1-(fenilmetil)-4-piperidinil]-1-propanona; 1-(5-azaindol-2-il)-3-[1-(fenilmetil)-4-piperidinil]-1-propanona; 1-(6-azabenzotiazol-2-il)-3-[1-(fenilmetil)-4-piperidinil]-1-propanona; 1-(1H-2-oxo-pirrol-2-il)-3-[1-(fenilmetil)-4-piperidinil]-1-propanona; 1-(6-metil-benzotiazol-2-il)-3-[1-(fenilmetil)-4-piperidinil]-1-propanona; 1-(6-metoxi-indol-2-il)-3-[1-(fenilmetil)-4-piperidinil]-1-propanona; 1-(6-metoxi-benzo[b]tiazol-2-il)-3-[1-(fenilmetil)-4-piperidinil]-1-propanona; 1-(6-acetilamino-benzo[b]tiazol-2-il)-3-[1-(fenilmetil)-4-piperidinil]-1-propanona; 1-(5-acetilamino-benzo[b]tiazol-2-il)-3-[1-(fenilmetil)-4-piperidinil]-1-propanona; 6-hidroxi-3-[2-[1-(fenilmetil)-4-piperidinil]etil]-1,2-bencisoxazol; 5-metil-3-[2-[1-(fenilmetil)-4-piperidinil]etil]-1,2-bencisoxazol; 6-metoxi-3-[2-[1-(fenilmetil)-4-piperidinil]etil]-1,2-bencisoxazol; 6-acetamida-3-[2-[1-(fenilmetil)-4-piperidinil]etil]-1,2-bencisoxazol; 6-amino-3-[2-[1-(fenilmetil)-4-piperidinil]etil]-1,2-bencisoxazol; 6-(4-morfolinil)-3-[2-[1-(fenilmetil)-4-piperidinil]etil]-1,2-bencisoxazol; 5,7-dihidro-3-[2-[1-(fenilmetil)-4-piperidinil]etil]-6H-pirrol-4,5-f]-1,2-bencisoxazol-6-ona; 3-[2-[1-(fenilmetil)-4-piperidinil]etil]-1,2-bencisotiazol; 3-[2-[1-(fenilmetil)-4-piperidinil]etenil]-1,2-bencisoxazol; 6-fenilamino-3-[2-[1-(fenilmetil)-4-piperidinil]etil]-1,2-bencisoxazol; 6-(2-tiazolil)-3-[2-[1-(fenilmetil)-4-piperidinil]etil]-1,2-bencisoxazol; 6-(2-oxazolil)-3-[2-[1-(fenilmetil)-4-piperidinil]etil]-1,2-bencisoxazol; 6-pirrolidinil-3-[2-[1-(fenilmetil)-4-piperidinil]etil]-1,2-bencisoxazol; 5,7-dihidro-5,5-dimetil-3-[2-[1-(fenilmetil)-4-piperidinil]etil]-6H-pirrol-4,5-f]-1,2-bencisoxazol-6-ona; 6,8-dihidro-3-[2-[1-(fenilmetil)-4-piperidinil]etil]-7H-pirrol-4,5-g]-1,2-bencisoxazol-7-ona; 3-[2-[1-(fenilmetil)-4-piperidinil]etil]-5,6,8-trihidro-7H-isoxazol-4,5-g]-quinolin-7-ona; 1-bencil-4-((5,6-dimetoxi-1-indanon)-2-il)metilpiperidina, 1-bencil-4-((5,6-dimetoxi-1-indanon)-2-il)ilidencilmetilpiperidina, 1-bencil-4-((5-metoxi-1-indanon)-2-il)metilpiperidina, 1-bencil-4-((5,6-dietoxi-1-indanon)-2-il)metilpiperidina, 1-bencil-4-((5,6-metileno-dioxi-1-indanon)-2-il)metilpiperidina, 1-(m-nitrobencil)-4-((5,6-dimetoxi-1-indanon)-2-il)metilpiperidina, 1-cicloheximetil-4-((5,6-dimetoxi-1-indanon)-2-il)metilpiperidina, 1-(m-florobencil)-4-((5,6-dimetoxi-1-indanon)-2-il)metilpiperidina, 1-bencil-4-((5,6-dimetoxi-1-indanon)-2-il)propilpiperidina y 1-bencil-4-((5-isopropoxi-6-metoxi-1-indanon)-2-il)metilpiperidina.

Los antagonistas de los canales de calcio ilustrativos incluyen diltiazem, omega-conotoxina GVIA, metoxiverapamil, amlodipina, felodipina, lacidipina y mibefradil.

Los moduladores del receptor de GABA-A ilustrativos incluyen clometiazol; IDDB; gaboxadol (4,5,6,7-tetrahidroisoxazolo[5,4-c]piridin-3-ol); ganaxolona (3 $\alpha$ -hidroxi-3 $\beta$ -metil-5 $\alpha$ -pregnan-20-ona); fengabina (2-[(butilimino)-(2-clorofenil)metil]-4-clorofenol); 2-(4-metoxifenil)-2,5,6,7,8,9-hexahidro-pirazolo[4,3-c]cinolin-3-ona; 7-ciclobutil-6-(2-metil-2H-1,2,4-triazol-3-ilmetoxi)-3-fenil-1,2,4-triazolo[4,3-b]piridazina; (3-fluoro-4-metil)fenil-N-({-1-[(2-metilfenil)metil]-bencimidazol-2-il}metil)-N-pentilcarboxamida; y ácido 3-(aminometil)-5-metilhexanoico.

Los abridores de los canales de potasio ilustrativos incluyen diazóxido, flupirtina, pinacidil, levromakalim, rilmakalim, cromakalim, PCO-400 y SKP-450 (2-[2''(1'',3''-dioxolona)-2-metil]-4-(2'-oxo-1'-pirrolidinil)-6-nitro-2H-1-benzopiran).

Los antagonistas de los receptores de AMPA/kainato ilustrativos incluyen 6-ciano-7-nitroquinoxalin-2,3-diona (CNQX); 6-nitro-7-sulfamoilbenzo[f]quinoxalina-2,3-diona (NBQX); 6,7-dinitroquinoxalina-2,3-diona (DNQX); hidrocioruro de 1-(4-aminofenil)-4-metil-7,8-metilenodioxi-5H-2,3-benzodiazepina; y 2,3-dihidroxi-6-nitro-7-sulfamoilbenzo-[f]quinoxalina.

Los antagonistas de los canales de sodio ilustrativos incluyen ajmalina, procainamida, flecainida y riluzol.

Los inhibidores de metaloproteasa de matriz ilustrativos incluyen hidroxiamida de ácido 4-[4-(4-fluorofenoxi)benzenosulfonilamino]tetrahidropiran-4-carboxílico; 5-Metil-5-(4-(4'-fluorofenoxi)-fenoxi)-pirimidina-2,4,6-triona; 5-n-Butil-5-(4-(4'-fluorofenoxi)-fenoxi)-pirimidina-2,4,6-triona y prinomistat.

Poli(ADP ribosa) polimerasa (PARP) es una abundante enzima nuclear activada por quiebres individuales de la cadena de DNA para sintetizar poli (ADP ribosa) de NAD. Bajo condiciones normales, PARP está implicada en la reparación de escisión base por estrés oxidativo mediante la activación y el reclutamiento de enzimas de reparación de DNA en el núcleo. Por lo tanto, PARP cumple una función en la necrosis celular y en la reparación de DNA. PARP también participa en la regulación de la expresión de citocinas que media la inflamación. Bajo condiciones en las que el daño al DNA es excesivo (como por exposición excesiva aguda a una lesión patológica), PARP se activa resultando excesivamente en insuficiencia energética basada en las células que se caracteriza por agotamiento de NAD y conduce a consumo de ATP, necrosis celular, lesión tisular y daño/falla orgánica. Se cree que PARP contribuye a la neurodegeneración, agotando la nicotinamida adenina dinucleótido (NAD<sup>+</sup>) que luego reduce adenosina trifosfato (ATP; Cosi y Marien, Ann. N.Y. Acad. Sci., 890:227, 1999) contribuyendo a la muerte celular que puede prevenirse con los inhibidores de PARP. Los inhibidores ilustrativos de PARP pueden hallarse en Southan and Szabo, Current Medicinal Chemistry, 10:321, 2003.

Los inhibidores ilustrativos de p38 MAP cinasa y c-jun-N-terminal cinasas incluyen piridil imidazoles, tales como PD 169316, PD isomérico 169316, SB 203580, SB 202190, SB 220026 y RWJ 67657. Otros se describen en la patente estadounidense 6.288.089, y se incorporan por referencia a la presente memoria.

En una realización ilustrativa, una terapia de combinación para tratar o prevenir MS comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina y uno o más de Avonex<sup>®</sup> (interferón beta-1a), Tysabri<sup>®</sup> (natalizumab) o Fumaderm<sup>®</sup> (BG-12/Fumarato oral).

En otra realización, una terapia de combinación para tratar o prevenir neuropatía o dolencias asociadas con diabetes comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina y uno o más antidepresivos tricíclicos (TCA) (incluyendo, por ejemplo, imipramina, amitriptilina, desipramina y nortriptilina), inhibidores de recaptación de serotonina (SSRI) (incluyendo, por ejemplo, fluoxetina, paroxetina, sertraleno y citalopram) y fármacos antiepilépticos (AED) (incluyendo por ejemplo gabapentina, carbamazepina y topiramato).

En otra realización, la solicitud provee un método para tratar o prevenir una enfermedad de poliglutamina que usa una combinación que comprende por lo menos un compuesto activador de sirtuina y por lo menos un inhibidor de HDAC I/II. Los ejemplos de inhibidores de HDAC I/II incluyen ácidos hidroxámicos, péptidos cíclicos, ácidos grasos de cadena corta y depudecin.

Los ejemplos de ácidos hidroxámicos y derivados de ácido hidroxámico incluyen, aunque sin limitarse a ello, tricostatina A (TSA), ácido suberoilánilida hidroxámico (SAHA), oxamflatin, ácido subérico bishidroxámico (SBHA), ácido m-carboxi-cinámico-ácido bishidroxámico (CBHA), ácido valproico y piroxamida. Se aisló TSA como antibiótico antifúngico (Tsuji et al (1976) J. Antibiot (Tokio) 29:1-6) y se halló que es un potente inhibidor de HDAC de mamíferos (Yoshida et al. (1990) J. Biol. Chem. 265:17174-17179). El hallazgo de que las líneas celulares resistentes a TSA tienen un HDAC alterado demuestra que esta enzima es una diana importante para TSA. Otros inhibidores de HDAC basados en ácido hidroxámico, SAHA, SBHA y CBHA son compuestos sintéticos capaces de inhibir HDAC a una concentración micromolar o inferior *in vitro* o *in vivo*. Glick et al. (1999) Cancer Res. 59:4392-4399. Estos inhibidores de HDAC basados en ácido hidroxámico poseen todos una característica estructural esencial: una terminal hidroxámica polar unida a través de un espaciador de metileno hidrófobo (p. ej., 6 carbonos de longitud) a otro sitio polar que está unido a un resto hidrófobo terminal (p. ej., anillo benceno). Los compuestos desarrollados que tienen dichas características esenciales también están dentro del alcance de los ácidos hidroxámicos que se pueden usar como inhibidores de HDAC.

Los péptidos cíclicos utilizados con inhibidores de HDAC son principalmente tetrapéptidos cíclicos. Los ejemplos de péptidos cíclicos incluyen, aunque sin limitarse a ello, trapoxin A, apicidin y depsipéptido. Trapoxin A es un tetrapéptido cíclico que contiene un resto 2-amino-8-oxo-9,10-epoxi-decanoílo (AOE). Kijima et al. (1993) J. Biol. Chem. 268:22429-22435. Apicidin es un metabolito fúngico que exhibe potente actividad antiprotoso de amplio espectro e inhibe la actividad de HDAC a concentraciones nanomolares. Darkin-Rattray et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 93:13143-13147. El depsipéptido se aísla de *Chromobacterium violaceum*, y se ha demostrado que inhibe la actividad de HDAC a concentraciones micromolares.

Los ejemplos de benzamidas incluyen, aunque sin limitarse a ello, MS-27-275. Saito et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 96:4592-4597. Los ejemplos de ácidos grasos de cadena corta incluyen, aunque sin limitarse a ello, butiratos (p. ej., ácido butírico, arginina butirato y fenilbutirato (PB)). Newmark et al. (1994) Cancer Lett. 78:1-5; y Carducci et al. (1997) Anticancer Res. 17:3972-3973. Además, depudecin, que se ha demostrado que inhibe HDAC a concentraciones micromolares (Kwon et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 95:3356-3361), también recae dentro del alcance del inhibidor de histona desacetilasa, como se describe en la presente memoria.

#### Trastornos de coagulación de la sangre

En otros aspectos, los compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina pueden usarse para tratar o prevenir trastornos de coagulación de la sangre (o trastornos hemostáticos). Tal como se usan intercambiamente en la presente memoria, el término "hemostasis" y la expresión "coagulación de la sangre" se refieren al control del sangrado, incluyendo las propiedades fisiológicas de vasoconstricción y coagulación. La coagulación de la sangre ayuda a mantener la integridad de la circulación mamífera después de lesión, inflamación, enfermedad, defecto congénito, disfunción u otra alteración. Después del inicio de la coagulación, la coagulación de la sangre procede a través de la activación secuencial de ciertas proenzimas en plasma hacia su forma de enzima (véase, por ejemplo, Coleman, R. W. et al. (eds.) Hemostasis and Thrombosis, Segunda edición, (1987)). Estas glucoproteínas del plasma, incluyendo el Factor XII, Factor XI, Factor IX, Factor X, Factor VII, y la protrombina, son zimógenos de serina proteasas. La mayoría de estas enzimas de coagulación de la sangre son eficaces en una escala fisiológica solamente cuando se ensamblan en complejos sobre las superficies de membrana con cofactores de proteína tales como el Factor VIII y el Factor V. Otros factores sanguíneos modulan y localizan la formación de coágulos, o disuelven coágulos sanguíneos. La proteína activada C es una enzima específica que inactiva los componentes procoagulantes. Los iones de calcio están implicados en muchas de las reacciones a los componentes. La coagulación sanguínea sigue o bien la ruta intrínseca, donde todos los componentes de proteína están presentes en la sangre, o la ruta extrínseca, donde el factor de tejido de proteínas de membrana celular cumple una función crítica. La formación de coágulos ocurre cuando el fibrinógeno es escindido por trombina para formar fibrina. Los coágulos de sangre están compuestos por plaquetas activadas y fibrina.

Además, la formación de coágulos sanguíneos no solamente limita el sangrado en caso de una lesión (hemostasis), sino que puede conducir a daño orgánico grave y a muerte en el contexto de enfermedades ateroscleróticas por oclusión de una arteria o vena importante. La trombosis es por ende la formación de coágulos sanguíneos en el momento y el lugar equivocados. Implica una cascada de reacciones bioquímicas complicadas y reguladas entre las proteínas sanguíneas circulantes (factores de coagulación), las células sanguíneas (en particular plaquetas) y elementos de la pared de un vaso dañado.

Por consiguiente, la presente solicitud provee tratamientos anticoagulación y antitrombóticos que apuntan a inhibir la formación de coágulos sanguíneos con el fin de prevenir o tratar trastornos de coagulación de la sangre, tales como infarto de miocardio, apoplejía, pérdida de una extremidad por arteriopatía periférica o embolia pulmonar.

Tal como se utilizan intercambiamente en la presente memoria, "modular o modulación de hemostasis" y "regular o regulación de hemostasis" incluyen la inducción (p. ej., estimulación o aumento) de hemostasis, como también la inhibición (p. ej., reducción o disminución) de hemostasis.

En un aspecto, la solicitud provee un método para reducir o inhibir la hemostasis en un sujeto, administrando un compuesto modulador de sirtuina que aumenta el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina. Las composiciones y métodos descritos en la presente memoria son útiles para el tratamiento o la prevención de enfermedades trombóticas. Tal como se emplea en la presente memoria, la expresión "trastorno trombótico" incluye cualquier trastorno o afección caracterizada por coagulación o actividad hemostática excesiva o indeseada, o un estado hipercoagulable. Los trastornos trombóticos incluyen enfermedades o trastornos que implican adhesión de plaquetas y formación de trombos, y pueden manifestarse como un aumento de propensión a la formación de trombosis, p. ej., un mayor número de trombos, trombosis a una edad temprana, una tendencia familiar a la trombosis, y trombosis en sitios inusuales. Los ejemplos de trastornos trombóticos incluyen, aunque sin limitarse a ello, tromboembolia, trombosis venosa profunda, embolia pulmonar, apoplejía, infarto de miocardio, aborto espontáneo, trombofilia asociada con deficiencia antitrombina III, deficiencia de proteína C, deficiencia de proteína S, resistencia a proteína activada C, disfibrinogenemia, trastornos fibrinolíticos, homocistinuria, embarazo, trastornos inflamatorios, trastornos mieloproliferativos, arteriosclerosis, angina, p. ej., angina inestable, coagulación intravascular diseminada, púrpura trombocitopénica trombótica, metástasis de cáncer, enfermedad de células falciformes, nefritis glomerular y trombocitopenia inducida por fármacos (incluyendo, por ejemplo, trombocitopenia inducida por heparina). Además,

los compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina pueden administrarse para prevenir episodios trombóticos o para prevenir re-oclusión durante o después de lisis de coagulación terapéutica o procedimientos tales como angioplastia o cirugía.

- 5 En otra realización, un régimen de fármacos combinados puede incluir fármacos o compuestos para el tratamiento o la prevención de trastornos de coagulación de la sangre o afecciones secundarias asociadas con estos cuadros. Por lo tanto, un régimen de fármacos combinados puede incluir uno o más compuestos moduladores de sirtuina que aumenten el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina y uno o más agentes anticoagulación o antitrombosis. Por ejemplo, pueden combinarse uno o más compuestos moduladores de sirtuina con una cantidad eficaz de uno o más de: aspirina, heparina y Warfarina oral que inhibe los factores dependientes de Vit K, heparinas de bajo peso molecular que inhiben los factores X y II, inhibidores de trombina, inhibidores de receptores de plaquetas GP IIb/IIIa, inhibidores de factor de tejido (TF), inhibidores del factor humano von Willebrand, inhibidores de uno o más factores implicados en la hemostasis (en particular en la cascada de coagulación). Además, los compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina pueden combinarse con agentes trombolíticos, tales como t-PA, estreptocinasa, reptilasa, TNK-t-PA y estafilocinasa.

#### Control del peso

- En otro aspecto, los compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina pueden usarse para tratar o prevenir aumento de peso u obesidad en un sujeto. Por ejemplo, los compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina pueden usarse, por ejemplo, para tratar o prevenir obesidad hereditaria, obesidad dietaria, obesidad relacionada con las hormonas, obesidad relacionada con la administración de medicamentos, para reducir el peso de un sujeto, o para reducir o prevenir el aumento de peso en un sujeto. Un sujeto que necesita dicho tratamiento puede ser un sujeto obeso, propenso a convertirse en obeso, con sobrepeso o propenso a tener sobrepeso. Los sujetos propensos a convertirse en obesos o a tener sobrepeso pueden identificarse, por ejemplo, en base a los antecedentes familiares, la dieta, el nivel de actividad, la ingesta de medicación o sus diversas combinaciones.

- Incluso en otras realizaciones, los compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina pueden administrarse a sujetos que padecen una diversidad de otras enfermedades y afecciones que pueden tratarse o prevenirse promoviendo el adelgazamiento en el sujeto. Dichas enfermedades incluyen, por ejemplo, hipertensión arterial, hipertensión, altos niveles de colesterol en sangre, dislipidemia, diabetes de tipo 2, resistencia a insulina, intolerancia a la glucosa, hiperinsulinemia, arteriopatía coronaria, angina de pecho, insuficiencia cardíaca congestiva, apoplejía, cálculos biliares, colecistitis y colelitiasis, gota, artrosis, apnea obstructiva del sueño y problemas respiratorios, algunos tipos de cáncer (como de endometrio, mama, próstata y colon), complicaciones del embarazo, mala salud reproductiva femenina (como irregularidades menstruales, esterilidad, ovulación irregular), problemas de control de vejiga (como incontinencia urinaria de esfuerzo); nefrolitiasis de ácido úrico; trastornos psicológicos (como depresión, trastornos de la alimentación, imagen corporal distorsionada y baja autoestima). Stunkard AJ, Wadden TA. (Editores) Obesity: theory and therapy, Segunda Edición. Nueva York: Raven Press, 1993. Finalmente, los pacientes con sida pueden presentar lipodistrofia o resistencia a insulina en respuesta a las terapias combinadas para el sida.

- En otra realización, los compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina pueden usarse para inhibir la adipogénesis o la diferenciación de células grasas, o bien *in vitro* o *in vivo*. En particular, los altos niveles circulantes de insulina y/o factor de crecimiento de tipo insulina (IGF) 1 se prevendrán reclutando preadipocitos para diferenciar en adipocitos. Dichos métodos pueden usarse para tratar o prevenir la obesidad.

- En otras realizaciones, los compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina pueden usarse para reducir el apetito y/o aumentar la saciedad, causando así adelgazamiento o evitando un aumento de peso. Un sujeto que necesita dicho tratamiento puede ser un sujeto con sobrepeso, obeso, o un sujeto propenso a tener sobrepeso o convertirse en obeso. El método puede comprender administrar diariamente o día por medio, o una vez por semana, una dosis, p. ej., en la forma de una píldora, a un sujeto. La dosis puede ser una "dosis reductora del apetito".

- En otras realizaciones, un compuesto modulador de sirtuina que reduce el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina puede utilizarse para estimular el apetito y/o el aumento de peso. Un método puede comprender administrar a un sujeto, tal como un sujeto que lo necesita, una cantidad farmacéuticamente eficaz de un agente modulador de sirtuina que reduce el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina, tal como SIRT1 y/o SIRT3. Un sujeto que necesita dicho tratamiento puede ser un sujeto que padece caquexia o puede ser propenso a padecer caquexia. También se puede administrar una combinación de agentes. Un método puede además comprender monitorear en el sujeto el estado de la enfermedad o la activación de sirtuinas, por ejemplo en tejido adiposo.

Los métodos para estimular la acumulación de grasa en las células pueden utilizarse *in vitro*, para establecer modelos celulares de aumento de peso, que se pueden emplear, p. ej., para identificar otros fármacos que prevengan el aumento de peso.

También se proveen métodos para modular la adipogénesis o la diferenciación de células grasas, ya sea *in vitro* o *in vivo*. En particular, los altos niveles circulantes de insulina y/o factor de crecimiento de tipo insulina (IGF) 1 se prevendrán reclutando preadipocitos para diferenciar en adipocitos. Dichos métodos pueden usarse para modular la obesidad. Un método para estimular la adipogénesis puede comprender contactar una célula con un agente modulador de sirtuina que disminuye el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina.

En otra realización, la solicitud provee métodos para reducir el metabolismo de grasa o de lípidos en un sujeto, administrando un compuesto modulador de sirtuina que reduce el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina. El método incluye administrar a un sujeto una cantidad de un compuesto modulador de sirtuina, p. ej., en una cantidad eficaz para reducir la movilización de grasa hacia la sangre de células WAT y/o para reducir la quema de grasa por las células BAT.

Los métodos para promover el apetito y/o el aumento de peso pueden incluir, por ejemplo, identificar primero a un sujeto como en necesidad de reducción de metabolismo de grasa o lípido, p. ej., pesando al sujeto, determinando su IMC o evaluando el contenido de grasa del sujeto o la actividad de sirtuina en las células del sujeto. El método puede también incluir monitorear al sujeto, p. ej., durante y/o después de la administración de un compuesto modulador de sirtuina. La administración puede incluir una o más dosis, p. ej., administradas en bolo o continuamente. El monitoreo puede incluir evaluar una hormona o un metabolito. Las hormonas ilustrativas incluyen leptina, adiponectina, resistina e insulina. Los metabolitos ilustrativos incluyen triglicéridos, colesterol y ácidos grasos

En una realización, un compuesto modulador de sirtuina que reduce el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina puede usarse para modular (p. ej., aumentar) la cantidad de grasa subcutánea en un tejido, p. ej., en el tejido facial o en otro tejido asociado con la superficie del cuello, la mano, la pierna o los labios. El compuesto modulador de sirtuina puede usarse para aumentar la rigidez, la retención de agua o las propiedades de soporte del tejido. Por ejemplo, el compuesto modulador de sirtuina puede aplicarse tópicamente, p. ej., en asociación con otro agente, p. ej., para tratamiento de tejido asociado con la superficie. El compuesto modulador de sirtuina puede también inyectarse subcutáneamente, p. ej., dentro de la región en la que se desea una alteración en la grasa subcutánea.

Un método para modular el peso puede además comprender monitorear el peso del sujeto y/o el nivel de modulación de sirtuinas, por ejemplo, en el tejido adiposo.

En una realización ilustrativa, un compuesto modulador de sirtuina que aumenta el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina puede administrarse como una terapia combinada para tratar o prevenir aumento de peso u obesidad en un sujeto. Por ejemplo, uno o más compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina pueden administrarse en combinación con uno o más agentes antiobesidad. Los agentes antiobesidad ilustrativos incluyen, por ejemplo, fenilpropanolamina, efedrina, pseudoefedrina, fentermina, un agonista de colecistocinina A, un inhibidor de recaptación de monoamina (como sibutramina), un agente simpatomimético, un agente serotoninérgico (como dexfenfluramina o fenfluramina), un agonista de dopamina (como bromocriptina), un agonista o mimético de los receptores de la hormona estimuladora de melanocitos, un análogo de la hormona estimuladora de melanocitos, un antagonista de los receptores cannabinoides, un antagonista de la hormona concentradora de melanina, la proteína OB (leptina), un análogo de leptina, un agonista de los receptores de leptina, un antagonista de galanina o un inhibidor o reductor de lipasa GI (como orlistat). Otros agentes anoréxicos incluyen agonistas de bombesina, deshidroepiandrosterona o sus análogos, agonistas y antagonistas de los receptores de glucocorticoides, antagonistas de los receptores de orexina, antagonistas de la proteína de unión a urocortina, agonistas del receptor de péptido 1 de tipo glucagón tales como Exendina y factores neurotróficos ciliares tales como Axokine.

En otra realización, los compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina pueden administrarse para reducir el aumento de peso inducido por fármacos. Por ejemplo, un compuesto modulador de sirtuina que aumenta el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina puede administrarse como una terapia combinada con medicamentos que pueden estimular el apetito o causar aumento de peso, en particular, aumento de peso debido a factores que no sean la retención de líquido. Los ejemplos de medicamentos que pueden provocar aumento de peso incluyen, por ejemplo, tratamientos para la diabetes, incluyendo por ejemplo sulfonilureas (como glipizida y gliburida), tiazolidinadonas (tales como pioglitazona y rosiglitazona), meglitinidas, nateglinida, repaglinida, medicinas con sulfonilurea e insulina; antidepresivos, incluyendo por ejemplo antidepresivos tricíclicos (como amitriptilina e imipramina), inhibidores de monoamina oxidasa irreversible (MAOI), inhibidores selectivos de recaptación de serotonina (SSRI), bupropión, paroxetina y mirtazapina; esteroides, tales como por ejemplo prednisona; terapia hormonal; carbonato de litio; ácido valproico; carbamazepina; clorpromazina; tiotixeno; betabloqueantes (como propranolol); alfabloqueantes (como clonidina, prazosin y terazosin); y anticonceptivos, incluyendo anticonceptivos orales (píldoras anticonceptivas) u otros anticonceptivos que contienen estrógeno y/o progesterona (Depo-Provera, Norplant, Ortho), testosterona o Megestrol. En otra realización ilustrativa, los compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una sirtuina pueden administrarse como parte de un programa para dejar de fumar, para prevenir el aumento de peso o reducir el aumento ya obtenido.

*Diabetes/Trastornos metabólicos*

En otro aspecto, los compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina se pueden usar para tratar o prevenir un trastorno metabólico, como resistencia a insulina, un estado prediabético, diabetes de tipo II y/o sus complicaciones. La administración de compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina puede aumentar la sensibilidad a insulina y/o reducir los niveles de insulina en un sujeto. Un sujeto que necesita dicho tratamiento puede ser un sujeto que tenga resistencia a insulina u otro síntoma precursor de diabetes de tipo II, que tenga diabetes de tipo II o que sea propenso a padecer alguna de estas dolencias. Por ejemplo, el sujeto puede ser un sujeto que tenga resistencia a insulina, p. ej., que tenga altos niveles circulantes de insulina y/o afecciones asociadas, como hiperlipidemia, dislipogénesis, hipercolesterolemia, intolerancia a la glucosa, altos niveles de glucosa en sangre, otras manifestaciones de síndrome X, hipertensión, aterosclerosis y lipodistrofia.

En una realización ilustrativa, un compuesto modulador de sirtuina que aumenta el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina puede administrarse como una terapia combinada para tratar o prevenir un trastorno metabólico. Por ejemplo, uno o más compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina pueden administrarse en combinación con uno o más agentes antidiabéticos. Los agentes antidiabéticos ilustrativos incluyen, por ejemplo, un inhibidor de aldosa reductasa, un inhibidor de glucógeno fosforilasa, un inhibidor de sorbitol deshidrogenasa, un inhibidor de proteína tirosina fosfatasa 1 B, un inhibidor de dipeptidil proteasa, insulina (incluyendo preparaciones de insulina oralmente biodisponibles), un mimético de insulina, metformina, acarbosa, un ligando del receptor activado del proliferador de peroxisoma  $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ) tal como troglitazona, rosiglitazona, pioglitazona o GW-1929, una sulfonilurea, glipazida, gliburida o clorpropamida, donde las cantidades del primero y el segundo compuestos resultan en un efecto terapéutico. Otros agentes antidiabéticos incluyen un inhibidor de glucosidasa, un péptido de tipo glucagón 1 (GLP-1), insulina, un agonista dual de PPAR  $\alpha/\gamma$ , una meglitimida y un inhibidor de  $\alpha$ P2. En una realización ilustrativa, un agente antidiabético puede ser un inhibidor de dipeptidil peptidasa IV (DP-IV o DPP-IV) tal como, por ejemplo, LAF237 de Novartis (NVP DPP728; 1-[[[2-[(5-cianopiridin-2-il)amino]etil]amino]acetil]-2-ciano-(S)-pirrolidina] o MK-04301 de Merck (véase p. ej., Hughes et al., *Biochemistry* 38: 11597-603 (1999)).

#### *Enfermedades inflamatorias*

En otros aspectos, los compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina pueden usarse para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno asociado con inflamación. Los compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina pueden administrarse antes del inicio, durante o después del comienzo de la inflamación. Cuando se usan de manera profiláctica, los compuestos se proveen preferiblemente con antelación a cualquier respuesta o síntoma inflamatorio. La administración de los compuestos puede prevenir o atenuar las respuestas o síntomas inflamatorios.

Las afecciones inflamatorias ilustrativas incluyen, por ejemplo, esclerosis múltiple, artritis reumatoidea, artritis psoriásica, enfermedad articular degenerativa, espondiloartropatías, artritis gotosa, lupus eritematoso sistémico, artritis juvenil, artritis reumatoidea, artrosis, osteoporosis, diabetes (p. ej., diabetes mellitus dependiente de insulina o diabetes de inicio juvenil), espasmos menstruales, fibrosis quística, enfermedad inflamatoria de los intestinos, síndrome de intestino irritable, enfermedad de Crohn, colitis mucosa, colitis ulcerativa, gastritis, esofagitis, pancreatitis, peritonitis, enfermedad de Alzheimer, choque, espondilitis anquilosante, gastritis, conjuntivitis, pancreatitis (aguda o crónica), síndrome de lesión orgánica múltiple (p. ej., secundaria a septicemia o traumatismo), infarto de miocardio, aterosclerosis, apoplejía, lesión por reperfusión (p. ej., debido a un bypass cardiopulmonar o diálisis renal), glomerulonefritis aguda, vasculitis, lesión térmica (es decir, quemaduras solares), enterocolitis necrotizante, síndrome asociado a la transfusión de granulocitos y/o síndrome de Sjogren. Los cuadros inflamatorios de la piel ilustrativos incluyen, por ejemplo, eccema, dermatitis atópica, dermatitis de contacto, urticaria, esclerodermia, psoriasis y dermatosis con componentes inflamatorios agudos.

En otra realización, los compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina pueden usarse para tratar o prevenir alergias y afecciones respiratorias, que incluyen asma, bronquitis, fibrosis pulmonar, rinitis alérgica, toxicidad de oxígeno, enfisema, bronquitis crónica, síndrome de dificultad respiratoria aguda y cualquier otra enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). Los compuestos se pueden usar para tratar hepatitis crónica, incluyendo hepatitis B y hepatitis C.

Además, los compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina pueden utilizarse para tratar enfermedades autoinmunitarias y/o inflamación asociada con enfermedades autoinmunitarias tales como enfermedades autoinmunitarias de órganos y tejidos (p. ej., síndrome de Raynaud), esclerodermia, miastenia grave, rechazo de trasplante, choque endotóxico, septicemia, psoriasis, eccema, dermatitis, esclerosis múltiple, tiroiditis autoinmunitaria, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Addison, enfermedad poliglandular autoinmunitaria (también conocida como síndrome poliglandular autoinmunitario) y enfermedad de Grave.

En determinadas realizaciones, uno o más compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina pueden tomarse solos o combinados con otros compuestos útiles para tratar o prevenir la inflamación. Los agentes antiinflamatorios ilustrativos incluyen, por ejemplo, esteroides (p. ej., cortisol, cortisona, fludrocortisona, prednisona, 6 $\alpha$ -metilprednisona, triamcinolona, betametasona o dexametasona), fármacos

antinflamatorios no esteroideos (AINE (p. ej., aspirina, acetaminofeno, tolmetin, ibuprofeno, ácido mefenámico, piroxicam, nabumetona, rofecoxib, celecoxib, etodolac o nimesulida). En otra realización, el otro agente terapéutico es un antibiótico (p. ej., vancomicina, penicilina, amoxicilina, ampicilina, cefotaxima, ceftriaxona, cefixima, rifampinmetronidazol, doxiciclina o estreptomina). En otra realización, el otro agente terapéutico es un inhibidor de PDE4 (p. ej., roflumilast o rolipram). En otra realización, el otro agente terapéutico es una antihistamina (p. ej., ciclizina, hidroxizina, prometazina o difenhidramina). En otra realización, el otro agente terapéutico es un agente anti-malaria (p. ej., artemisinina, arteméter, artesunato, fosfato de cloroquina, hidrocloreto de mefloquina, doxiciclina hidrato, hidrocloreto de proguanil, atovacuona o halofantrina). En una realización, el otro agente terapéutico es drotrecogin alfa.

Otros ejemplos de agentes antiinflamatorios incluyen, por ejemplo, aceclofenac, acetaminofeno, acetaminosalol, acetanilida, ácido acetilsalicílico, S-adenosilmetionina, alclofenac, alclometasona, alfentanil, algestona, aliprodina, alminoprofen, aloxiprin, alfaprodina, bis(acetilsalicilato) de aluminio, aminonida, amfenac, aminoclorfenoxazina, ácido 3-amino-4-hidroxi-butírico, 2-amino-4-picolina, aminopropilona, aminopirina, amixetina, salicilato de amonio, ampiroxicam, amtolmetin guacil, anileridina, antipirina, antrafenina, apazona, beclometasona, bendazac, benorilato, benoxaprofen, benzpiperilona, bencidamina, bencilmorfina, bermoprofen, betametasona, betametasona-17-valerato, bezitramida,  $\alpha$ -bisabolol, bromfenac, p-bromoacetanilida, acetato de ácido 5-bromosalicílico, bromosaligenina, bucetin, ácido buclórico, bucoloma, budesonida, bufexamac, bumadizon, buprenorfina, butacetin, butibufen, butorfanol, carbamazepina, carbifeno, carprofen, carsalam, clorobutanol, cloroprednisona, clortenoxazina, salicilato de colina, cincofeno, cinmetacin, cirmadol, clidanac, clobetasol, clocortolona, clometacin, clonitazeno, clonixin, clopirac, cloprednol, clove, codeína, metil bromuro de codeína, fosfato de codeína, sulfato de codeína, cortisona, cortivazol, cropropamida, crotetamida, ciclazocina, deflazacort, deshidrotestosterona, desomofina, desonida, desoximetasona, dexametasona, dexametasona-21-isonicotinato, dexoadrol, dextromoramide, dextropropoxifeno, desoxicorticosterona, dezocina, diampromida, diamorfona, diclofenac, difenamizol, difenpiramida, diflorasona, diflucortolona, diflunisal, difluprednato, dihidrocodeína, dihidrocodeinona enol acetato, dihidromorfina, dihidroxialuminio acetilsalicilato, dimenoxidol, dimefeptanol, dimetiltiambuteno, dioxafetil butirato, dipipanona, diprocetil, dipirona, ditazol, droxicam, emorfazona, ácido enfenámico, enoxolona, eprizol, eptazocina, etersalato, etenzamida, etoheptazina, etoxazeno, etilmetiltiambuteno, etilmorfina, etodolac, etofenamato, etonitazeno, eugenol, felbinac, fenbufen, ácido fenclórico, fendosal, fenoprofen, fentanil, fentiazac, fepradinol, feprazona, floctafenina, fluazacort, fluclofenona, ácido flufenámico, flumetasona, flunisolida, flunixin, flunoxaprofen, fluocinolona acetona, fluocinonida, fluocinolona acetona, fluocortin butilo, fluocortolona, fluoresona, fluorometolona, fluperolona, flupirtina, fluprednolona, fluprednisolona, fluprocazona, flurandrenolida, flurbiprofen, fluticasona, formocortal, fosfosal, ácido genticónico, glafenina, glucametacin, glicol salicilato, guaiazuleno, halcinonida, halobetasol, halometasona, haloprednolona, heroína, hidrocortona, hidrocortamato, hidrocortisona, acetato de hidrocortisona, succinato de hidrocortisona, hemisuccinato de hidrocortisona, hidrocortisona 21-lisinato, cipionato de hidrocortisona, hidromorfona, hidroxipetidina, ibufenac, ibuprofen, ibuproxam, imidazol salicilato, indometacina, indoprofen, isofezolac, isoflupredona, acetato de isoflupredona, isoladol, isometadona, isonixin, isoxepac, isoxicam, cetobemidona, cetoprofen, cetorolac, p-lactofenol, lefetamina, levalorfan, levorfanol, levofenacil-morfina, lofantinil, lonazolac, lornoxicam, loxoprofen, lisina acetilsalicilato, mazipredona, ácido meclofenámico, medrisona, ácido mefenámico, meloxicam, meperidina, meprednisona, meptazinol, mesalamina, metazocina, metadona, metotrimoprazina, metilprednisolona, acetato de metilprednisolona, metilprednisolona succinato sódico, metilprednisolona suleprinato, ácido metiazínico, metofolina, metopon, mofebutazona, mofezolac, mometasona, morazona, morfina, hidrocloreto de morfina, sulfato de morfina, salicilato de morfina, mirofina, nabumetona, nalbufina, nalorfina, 1-naftil salicilato, naproxen, narceína, nefopam, nicomorfina, nifenazona, ácido niflámico, nimesulida, 5'-nitro-2'-propoxiacetanilida, norlevorfanol, normetadona, normorfina, norpipanona, olsalazina, opio, oxaceprol, oxametacina, oxaprozina, oxicondona, oximorfona, oxifenbutazona, papaveretum, parametasona, paranilina, parsalmida, pentazocina, perisoxal, fenacetin, fenadoxona, fenazocina, hidrocloreto de fenazopiridina, fenocol, fenoperidina, fenopirazona, fenomorfan, fenil acetilsalicilato, fenilbutazona, fenil salicilato, feniramidol, picetoprofen, piminodina, pipebuzona, piperilona, pirazolac, piritramida, piroxicam, pirprofen, pranoprofen, prednicarbo, prednisolona, prednisona, prednival, prednilideno, proglumetacina, proheptazina, promedol, propacetamol, properidina, propiram, propoxifeno, propifenazona, procazona, ácido protizínico, proxazol, ramifenazona, remifentanil, metilsulfato de rimazolol, salacetamida, salicina, salicilamida, salicilamida o o-acético, ácido salicílico, ácido salicilsulfúrico, salsalato, salverina, simetrida, sufentanil, sulfasalazina, sulindac, superóxido dismutasa, suprofen, suxibuzona, talniflumato, tenidap, tenoxicam, terofenamato, tetrandrina, tiazolinobutazona, ácido tiaprofénico, tiaramida, tilidina, tinoridina, tixocortol, ácido tolfenámico, tolmetin, tramadol, triamcinolona, triamcinolona acetona, tropesin, viminol, xenbucin, ximoprofen, zaltoprofen y zomepirac.

En una realización ilustrativa, un compuesto modulador de sirtuina que aumenta el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina puede administrarse con un inhibidor selectivo de COX-2 para tratar o prevenir la inflamación. Los inhibidores selectivos de COX-2 ilustrativos incluyen, por ejemplo, deracoxib, parecoxib, celecoxib, valdecoxib, rofecoxib, etoricoxib, lumiracoxib, 2-(3,5-difluorofenil)-3-- [4-(metilsulfonil)fenil]-2-ciclohexen-1-ona, ácido (S)-6,8-dicloro-2-(trifluorometil)-2H-1-benzopirano-3-carboxílico, 2-(3,4-difluorofenil)-4-(3-hidroxi-3-metil-1-butoxi)-5-[4-(metilsulfonil)fenil]-3-(2H)-piridazinona, 4-[5-(4-fluorofenil)-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il]bencenosulfonamida, bencil-4-[(4-oxopiperidin-1-il)sulfonil]piperidina-4-carboxilato de terc-butilo, 4-[5-(fenil)-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il]bencenosulfonamida, sus sales y sus profármacos.

## Sofocos

5 En otro aspecto, los compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina pueden utilizarse para reducir la incidencia o intensidad de los sofocos que son síntomas de un trastorno. Por ejemplo, el método en cuestión incluye el uso de compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina, solos o combinados con otros agentes, para reducir la incidencia o intensidad de los sofocos en pacientes con cáncer. En otras realizaciones, el método provee el uso de compuestos moduladores de sirtuina que incrementan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina para reducir la incidencia o la intensidad de los sofocos en mujeres menopáusicas y post-menopáusicas.

10 En otro aspecto, los compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina pueden usarse como terapia para reducir la incidencia o intensidad de los sofocos que son efectos secundarios de otra terapia con fármacos, p. ej., sofocos inducidos por fármacos. En determinadas realizaciones, un método para tratar y/o prevenir los sofocos inducidos por fármacos comprende administrar a un paciente que lo necesita una formulación que comprende por lo menos un compuesto inductor de sofocos y por lo menos un compuesto modulador de sirtuina que aumenta el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina. En otras realizaciones, un método para tratar los sofocos inducidos por fármacos comprende administrar separadamente uno o más compuestos que inducen los sofocos y uno o más compuestos moduladores de sirtuina, p. ej., donde el compuesto modulador de sirtuina y el agente inductor de sofocos no se han formulado en las mismas composiciones. Cuando se usan formulaciones separadas, el compuesto modulador de sirtuina puede administrarse 15 (1) al mismo tiempo que la administración del agente inductor de sofocos, (2) intermitentemente con el agente inductor de sofocos, (3) escalonado en relación a la administración del agente inductor de sofocos, (4) antes de la administración del agente inductor de sofocos, (5) subsiguiente a la administración del agente inductor de sofocos, y (6) varias de sus combinaciones. Los agentes inductores de sofocos ilustrativos incluyen, por ejemplo, niacina, faloxifeno, antidepressivos, antipsicóticos, quimioterapéuticos, bloqueantes de los canales de calcio y antibióticos.

25 En una realización, los compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina pueden usarse para reducir los efectos colaterales de sofocos de un vasodilatador o agente antilipémico (incluyendo agentes anticolesterolémicos y agentes lipotrópicos). En una realización ilustrativa, un compuesto modulador de sirtuina que aumenta el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina puede usarse para reducir los sofocos asociados con la administración de niacina.

30 Ácido nicotínico, ácido 3-piridinacarboxílico o niacina, es un agente antilipidémico comercializado, por ejemplo, con los nombres Nicolac<sup>®</sup>, SloNiacin<sup>®</sup>, Nicobid<sup>®</sup> y Time Release Niacin<sup>®</sup>. El ácido nicotínico se ha utilizado durante muchos años en el tratamiento de trastornos lipídicos tales como hiperlipidemia, hipercolesterolemia y aterosclerosis. Se sabe desde hace mucho tiempo que este compuesto exhibe efectos beneficiosos de reducir el colesterol total, las lipoproteínas de baja densidad o "colesterol LDL," los triglicéridos y la apolipoproteína en (Lp(a)) 35 en el cuerpo humano, a la vez que aumenta las lipoproteínas de alta densidad o "colesterol HDL" deseable.

Las dosis típicas oscilan entre aproximadamente 1 gramo y aproximadamente 3 gramos diarios. El ácido nicotínico se administra normalmente dos a cuatro veces después de las comidas, dependiendo de la forma de dosificación seleccionada. El ácido nicotínico se comercializa actualmente en dos formas de dosificación. Una consiste en un comprimido de liberación inmediata o rápida que debe administrarse tres o cuatro veces por día. Las formulaciones 40 con ácido nicotínico de liberación inmediata ("IR") en general liberan prácticamente todo el ácido nicotínico dentro de aproximadamente 30 a 60 minutos después de la ingestión. La otra forma de dosificación es una forma de liberación sostenida que es adecuada para administrar entre dos y cuatro veces por día. En contraste con las formulaciones IR, las formulaciones de ácido nicotínico de liberación sostenida ("SR") están diseñadas para liberar cantidades significativas de fármaco para absorción hacia el torrente circulatorio durante intervalos de tiempo específicos con el fin de mantener niveles terapéuticos de ácido nicotínico durante un periodo extendido tal como de 12 o 24 horas 45 después de la ingestión.

Tal como se emplea en la presente memoria, la expresión "ácido nicotínico" tiene como fin abarcar ácido nicotínico o un compuesto que no sea ácido nicotínico propiamente dicho, que el cuerpo metaboliza en ácido nicotínico, produciendo así esencialmente el mismo efecto que el ácido nicotínico. Los compuestos ilustrativos que producen un efecto similar a aquel del ácido nicotínico incluyen, por ejemplo, tartrato de nicotinil alcohol, hexanicotinato de d- 50 glucitol, nicotinato de aluminio, niceritrol y nicotinato de d,1-alfa-tocoferilo. Cada uno de dichos compuestos se denominará colectivamente en la presente memoria "ácido nicotínico".

En otra realización, la solicitud provee un método para tratar y/o prevenir hiperlipidemia con efectos colaterales de sofocos reducidos. El método comprende las etapas de administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de ácido nicotínico y un compuesto modulador de sirtuina que aumenta el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina en una cantidad suficiente para reducir los sofocos. En una realización ilustrativa, el ácido nicotínico y/o el compuesto modulador de sirtuina puede administrarse por la noche.

En otra realización representativa, el método implica el uso de compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina para reducir los efectos colaterales de sofocos de raloxifeno. El raloxifeno actúa como estrógeno en ciertas partes del cuerpo, pero no es una hormona. Ayuda a prevenir la 60

osteoporosis en las mujeres que han alcanzado la menopausia. La osteoporosis hace que los huesos se afinen gradualmente, se tornen frágiles y más propensos a quebrarse. Evista demora la pérdida de masa ósea que ocurre con la menopausia, reduciendo el riesgo de fracturas espinales debido a osteoporosis. Un efecto colateral frecuente del raloxifeno son los sofocos (sudoración y calores). Esto puede ser incómodo para las mujeres que ya padecen sofocos debido a la menopausia.

En otra realización representativa, el método implica el uso de compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina para reducir los efectos colaterales de sofocos por agentes antidepresivos o antipsicóticos. Por ejemplo, los compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina pueden usarse junto con (administrados separadamente o juntos) un inhibidor de recaptación de serotonina, un antagonista del receptor de 5HT<sub>2</sub>, un anticonvulsionante, un inhibidor de recaptación de norepinefrina, un antagonista del  $\alpha$ -adrenorreceptor, un antagonista de NK-3, un antagonista del receptor de NK-1, un inhibidor de PDE4, un antagonista del receptor de neuropéptidos Y5, un antagonista del receptor de D4, un antagonista del receptor de 5HT<sub>1A</sub>, un antagonista del receptor de 5HT<sub>1D</sub>, un antagonista de CRF, un inhibidor de monoamina oxidasa o un fármaco hipnótico-sedante.

En determinadas realizaciones, los compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina pueden usarse como parte de un tratamiento con un inhibidor de recaptación de serotonina (SRI) para reducir los sofocos. En determinadas realizaciones preferidas, el SRI es un inhibidor selectivo de recaptación de serotonina (SSRI), tal como un fluoxetinoide (fluoxetina, norfluoxetina) o un nefazodonoide (nefazodona, hidroxinefazodona, oxonefazodona). Otros SSRI ilustrativos incluyen duloxetina, venlafaxina, milnacipran, citalopram, fluvoxamina, paroxetina y sertralina. El compuesto modulador de sirtuina que aumenta el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina puede también usarse como parte de un tratamiento con hipnóticos-sedantes, tales como aquellos seleccionados del grupo que consiste en una benzodiazepina (tal como alprazolam, clordiazepóxido, clonazepam, clorazepato, clobazam, diazepam, halazepam, lorazepam, oxazepam y prazepam), zolpidem y barbitúricos. Incluso en otras realizaciones, un compuesto modulador de sirtuina que aumenta el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina puede usarse como parte de un tratamiento con un agonista parcial del receptor de 5-HT<sub>1A</sub>, tal como aquellos seleccionados del grupo que consiste en buspirona, flesinoxan, gepirona e ipsapirona. Los compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina pueden también utilizarse como parte de un tratamiento con un inhibidor de recaptación de norepinefrina, tal como aquellos seleccionados entre tricíclicos de amina terciaria y tricíclicos de amina secundaria. Los tricíclicos de amina terciaria ilustrativos incluyen amitriptilina, clomipramina, doxepin, imipramina y trimipramina. Los tricíclicos de amina secundaria ilustrativos incluyen amoxapina, desipramina, maprotilina, nortriptilina y protriptilina. En determinadas realizaciones, los compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina pueden usarse como parte de un tratamiento con un inhibidor de monoamina oxidasa, tal como aquellos seleccionados del grupo que consiste en isocarboxazid, fenelzina, tranilcipromina, selegilina y moclobemida.

Incluso en otra realización representativa, los compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina pueden usarse para reducir los efectos colaterales de los sofocos provocados por agentes quimioterapéuticos, tales como ciclofosfamida, tamoxifeno.

En otra realización, los compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina pueden usarse para reducir los efectos colaterales de los sofocos provocados por bloqueantes de los canales de calcio, tales como amlodipina.

En otra realización, los compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina pueden utilizarse para reducir los efectos colaterales de sofocos provocados por antibióticos. Por ejemplo, los compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina pueden utilizarse combinados con levofloxacina. La levofloxacina se utiliza para tratar infecciones de los senos paranasales, la piel, los pulmones, oídos, vías respiratorias, huesos y articulaciones causadas por bacterias susceptibles. La levofloxacina también se utiliza frecuentemente para tratar infecciones urinarias, incluyendo aquellas resistentes a otros antibióticos, como también prostatitis. La levofloxacina es eficaz para tratar diarreas infecciosas causadas por las bacterias *E. coli*, *campilobacter jejuni* y *shigella*. La levofloxacina también se emplea para tratar diversas infecciones obstétricas, incluyendo mastitis.

#### *Trastornos oculares*

Un aspecto de la presente solicitud es un método para inhibir, reducir o de algún modo tratar el deterioro de la visión, administrando a un paciente una dosis terapéutica de un modulador de sirtuina seleccionado entre un compuesto descrito en esta memoria o su sal farmacéuticamente aceptable.

En ciertos aspectos, el deterioro de la visión es causado por daño al nervio óptico o al sistema nervioso central. En realizaciones particulares, el daño al nervio óptico es causado por alta presión intraocular, tal como aquella creada por el glaucoma. En otras realizaciones particulares, el daño al nervio óptico es causado por inflamación del nervio, que con frecuencia se asocia con una infección o una respuesta inmunitaria (p. ej., autoinmunitaria) tal como neuritis óptica.

El glaucoma describe un grupo de trastornos que se asocian con un defecto del campo visual, excavación del disco óptico y daño al nervio óptico. Estos trastornos comúnmente se denominan neuropatías ópticas glaucomatosas. La mayoría de los glaucomas por lo general, aunque no siempre, se asocian a una elevación de la presión intraocular.

5 Las formas ilustrativas de glaucoma incluyen glaucoma y queratoplastia penetrante, cierre de ángulo agudo, cierre de ángulo cerrado, ángulo abierto crónico, recesión angular, hifema inducido por fármacos, glaucoma afáquico y pseudoafáquico, tumores intraoculares, glaucoma juvenil, partícula en la lente, de baja tensión, maligno, neovascular, facolítico, facomórfico, pigmentario, de iris en meseta, primario congénito, primario de ángulo abierto, pseudoexfoliación, congénito secundario, sospecha en el adulto, unilateral, uveítico, hipertensión ocular, hipotonía ocular, síndrome de Posner-Schlossman y procedimiento de expansión escleral en hipertensión ocular y glaucoma de ángulo abierto primario.

15 La presión intraocular puede también aumentar con diversos procedimientos quirúrgicos, tales como facoemulsificación (es decir, cirugía de cataratas) e implante de estructuras tales como lentes artificiales. Además, las cirugías espinales en particular, o cualquier cirugía en la que el paciente sea propenso a estar un periodo de tiempo extenso, puede aumentar la presión interocular.

La neuritis óptica (ON) es inflamación del nervio óptico y causa pérdida aguda de la visión. Se asocia mucho con la esclerosis múltiple (MS), ya que 15-25% de los pacientes que padecen MS inicialmente se presentan con ON, y 50-75% de los pacientes con ON reciben diagnóstico de MS. La ON también está asociada a una infección (p. ej., infección vírica, meningitis, sífilis), inflamación (p. ej., de una vacuna), infiltración e isquemia.

20 Otro cuadro que conduce a daño del nervio óptico es la neuropatía óptica isquémica (AION). Hay dos tipos de AION. La AION arterítica debida a arteritis de células gigantes (vasculitis), que conduce a pérdida de visión aguda. La AION no arterítica abarca todos los casos de neuropatía óptica isquémica que no se deban a arteritis de células gigantes. La patofisiología de la AION no está del todo clara, aunque parece incorporar mecanismos tanto inflamatorios como isquémicos.

25 Otro daño al nervio óptico típicamente se asocia con desmielinación, inflamación, isquemia, toxinas o traumatismo al nervio óptico. Los cuadros ilustrativos en los que el nervio óptico está dañado incluyen neuropatía óptica desmielinante (neuritis óptica, neuritis óptica retrobulbar), meningioma de la vaina del nervio óptico, neuritis óptica del adulto, neuritis óptica infantil, neuropatía óptica isquémica anterior, neuropatía óptica isquémica posterior, neuropatía óptica compresiva, edema papilar, pseudo edema papilar y neuropatía óptica tóxica/nutricional.

30 Otros cuadros neurológicos asociados con pérdida de la visión, si bien no directamente relacionados con daño al nervio óptico, incluyen ambliopía, parálisis de Bell, oftalmoplejía externa progresiva crónica, esclerosis múltiple, pseudotumor cerebral y neuralgia trigeminal.

35 En ciertos aspectos, el deterioro de la visión es causado por daño retiniano. En realizaciones particulares, el daño retiniano es causado por alteraciones en el torrente sanguíneo hacia el ojo (p. ej., arteriosclerosis, vasculitis). En realizaciones particulares, el daño retiniano es causado por la ruptura de la mácula (p. ej., degeneración macular exudativa o no exudativa).

40 Las enfermedades retinianas ilustrativas incluyen degeneración macular exudativa relacionada con el envejecimiento, degeneración macular no exudativa relacionada con el envejecimiento, degeneración macular relacionada con la edad por prótesis retiniana electrónica y trasplante RPE, epitelopatía pigmentaria placoide multifocal aguda, necrosis retiniana aguda, enfermedad de Best, oclusión de la rama arterial de la retina, oclusión de la rama venosa de la retina, retinopatías autoinmunitarias asociadas con cáncer, oclusión de la arteria central de la retina, oclusión de la vena central de la retina, coriorretinopatía serosa central, enfermedad de Eales, membrana epimacular, degeneración de la retícula, macroaneurisma, edema macular diabético, edema macular Irvine-Gass, orificio macular, membranas neovasculares subretinianas, neurorretinitis difusa subaguda, edema macular cistoide no pseudofásico, síndrome de presunta histoplasmosis ocular, desprendimiento de retina exudativo, desprendimiento de retina posoperatorio, desprendimiento de retina proliferativo, desprendimiento de retina regmatógeno, desprendimiento de retina traccional, retinitis pigmentosa, retinitis CMV, retinoblastoma, retinopatía prematura, retinopatía en perdigonada, retinopatía diabética de fondo, retinopatía diabética proliferativa, retinopatía por hemoglobinopatías, retinopatía de Purtscher, retinopatía de Valsalva, retinosquiasis juvenil, retinosquiasis senil, síndrome de Terson y síndrome de manchas blancas.

50 Otras enfermedades ilustrativas incluyen infecciones bacterianas oculares (p. ej., conjuntivitis, queratitis, tuberculosis, sífilis, gonorrea), infecciones víricas (p. ej., virus del herpes simple ocular, virus zoster de la varicela, retinitis por citomegalovirus, virus de inmunodeficiencia humana (VIH)) como también necrosis de la retina externa progresiva secundaria a VIH u otras enfermedades oculares asociadas a inmunodeficiencia o al VIH. A su vez, las enfermedades oculares incluyen infecciones fúngicas (p. ej., Candida choroiditis, histoplasmosis), infecciones por protozoos (p. ej., toxoplasmosis) y otras tales como toxocariasis ocular y sarcoidosis.

Un aspecto de la solicitud consiste en un método para inhibir, reducir o tratar el deterioro de la visión en un sujeto que se somete a tratamiento con un fármaco quimioterapéutico (p. ej., un fármaco neurotóxico, un fármaco que

eleva la presión intraocular tal como un esteroide), administrando al sujeto que necesita dicho tratamiento una dosis terapéutica de un modulador de sirtuina descrito en la presente memoria.

5 Otro aspecto de la solicitud es un método para inhibir, reducir o tratar el deterioro de la visión en un sujeto que se somete a cirugía, incluyendo cirugías oculares u otras cirugías realizadas en posición boca abajo, como en la cirugía de la médula espinal, administrando al sujeto que necesita dicho tratamiento una dosis terapéutica de un modulador de sirtuina descrito en esta memoria. Las cirugías oculares incluyen cirugía de cataratas, iridiotomía y reemplazo de lentes. Otro aspecto de la invención es el tratamiento, incluyendo la inhibición y el tratamiento profiláctico, de enfermedades oculares relacionadas con el envejecimiento, incluyendo cataratas, ojos secos, daño a la retina y similares, administrando al sujeto que necesita dicho tratamiento una dosis terapéutica de un modulador de sirtuina descrito en la presente invención.

15 La formación de cataratas se asocia con varios cambios bioquímicos en la lente del ojo, como una reducción en los niveles de antioxidantes, ácido ascórbico y glutatión, aumento de lípidos, oxidación de aminoácidos y proteínas, aumento de calcio y sodio, pérdida de aminoácidos y reducción del metabolismo de la lente. La lente, que carece de vasos sanguíneos, está suspendida en fluidos extracelulares en la parte anterior del ojo. Se requieren nutrientes, tales como ácido ascórbico, glutatión, vitamina E, selenio, bioflavonoides y carotenoides para mantener la transparencia de la lente. Los niveles reducidos de sales de selenio producen un incremento del peróxido de hidrógeno inductor de radicales libres, que se neutraliza con la enzima antioxidante dependiente del selenio glutatión peroxidasa. La glutatión peroxidasa protectora de la lente también depende de los aminoácidos metionina, cisteína, glicina y ácido glutámico.

Las cataratas pueden también aparecer debido a una incapacidad de metabolizar correctamente la galactosa que se halla en los lácteos que contienen lactosa, un disacárido compuesto por el monosacárido galactosa y glucosa. Las cataratas pueden prevenirse, demorarse y posiblemente incluso revertirse, si se detectan temprano y se corrigen metabólicamente.

25 El daño a la retina se atribuye, entre otros, a las reacciones iniciadas por los radicales libres en el glaucoma, la retinopatía diabética y la degeneración macular relacionada con el envejecimiento (AMD). El ojo es una parte del sistema nervioso central y tiene una capacidad regenerativa limitada. La retina está compuesta por numerosas células nerviosas que contienen la más alta concentración de ácidos grasos poli-insaturados (PFA) y está sujeta a oxidación. Los radicales libres son generados por la luz UV que ingresa en el ojo y las mitocondrias en los bastones y conos, que generan la energía necesaria para transformar la luz en impulsos visuales. Los radicales libres causan peroxidación del PFA por radicales de hidroxilo o superóxido que a su vez propagan los radicales libres adicionales. Los radicales libres causan daño temporal o permanente al tejido de la retina.

35 El glaucoma por lo general es visto como un trastorno que causa presión intraocular elevada (IOP), lo cual produce daño permanente a las fibras nerviosas de la retina, pero un sexto de todos los glaucomas no causan IOP elevada. Este trastorno es ahora percibido como uno de perfusión vascular reducida y como un incremento en los factores neurotóxicos. Estudios recientes han implicado niveles elevados de glutamato, óxido nítrico y peroxinitrito en el ojo, como las causas de la muerte de las células ganglionares de la retina. Los agentes neuroprotectores pueden ser el futuro del cuidado del glaucoma. Por ejemplo, los inhibidores de óxido nítrico sintasa bloquean la formación de peroxinitrito de óxido nítrico y superóxido. En un estudio reciente, los animales tratados con aminoguanidina, un inhibidor de óxido nítrico sintasa, tuvieron una reducción en la pérdida de células ganglionares de la retina. Se concluyó que el óxido nítrico en el ojo causó citotoxicidad en muchos tejidos y neurotoxicidad en el sistema nervioso central.

45 La retinopatía diabética ocurre cuando los vasos sanguíneos subyacentes generan anomalías microvasculares que consisten principalmente en microaneurismas y hemorragias intrarretinianas. Los metabolitos oxidativos están implicados directamente con la patogénesis de la retinopatía diabética, y los radicales libres aumentan la generación de factores de crecimiento que conducen a una mayor actividad proliferativa. El óxido nítrico producido por las células endoteliales de los vasos puede también causar que las células de músculo liso se relajen y produzcan la vasodilatación de segmentos del vaso. La isquemia y la hipoxia de la retina ocurren después del engrosamiento de la membrana basal arterial, la proliferación endotelial y la pérdida de pericitos. La oxigenación inadecuada causa la obliteración o no perfusión capilar, shunts arteriovenosos, torrente sanguíneo lento y deterioro en la capacidad de los glóbulos rojos de liberar oxígeno. La peroxidación de lípidos del tejido retiniano también tiene lugar como consecuencia del daño a los radicales libres.

55 La mácula es responsable de nuestra visión central aguda y está compuesta por células sensibles a la luz (conos) mientras que el epitelio pigmentario subyacente de la retina (RPE) y la coroides nutren y ayudan a eliminar los materiales de desecho. El RPE nutre los conos con el sustrato de vitamina A para los pigmentos fotosensibles y digiere las puntas externas del desprendimiento de los conos. El RPE está expuesto a altos niveles de radiación UV, y segrega factores que inhiben la angiogénesis. La coroides contiene una densa red vascular que provee los nutrientes y elimina los materiales de desecho.

60 En AMD, las puntas de los conos desprendidos se tornan indigeribles por el RPE, donde las células se expanden y mueren después de recoger demasiado material no digerido. Las acumulaciones de material de desecho no

digerido, llamadas drusas, se forman debajo del RPE. El daño fotóxico también causa la acumulación de lipofuscina en células de RPE. La lipofuscina intracelular y la acumulación de drusas en la membrana de Bruch interfieren con el transporte de oxígeno y nutrientes a los tejidos de la retina, y en último lugar producen RPE y disfunción del fotorreceptor. En AMD exudativa, los vasos sanguíneos se expanden desde los coriocapilares a través de defectos en la membrana de Bruch y pueden crecer debajo del RPE, desprendiéndolo de la coroides, y filtrando fluido o sangrado.

El pigmento macular, uno de los factores protectores que evitan que la luz solar dañe la retina, está formado por la acumulación de carotenoides derivados de la nutrición, como luteína, el pigmento amarillo graso que sirve como un vehículo de administración para otros nutrientes importantes y zeaxantina. Los antioxidantes, tales como las vitaminas C y E, beta-caroteno y luteína, además de zinc, selenio y cobre, se encuentran todos en la mácula sana. Además de proveer nutrición, estos antioxidantes protegen contra el daño de los radicales libres que inicia la degeneración macular.

Otro aspecto de la solicitud es la prevención o el tratamiento de daño al ojo causado por estrés, agresión química o radiación, administrando al sujeto que necesita dicho tratamiento una dosis de un modulador de sirtuina descrito en la presente memoria. El daño por radiación o el daño electromagnético al ojo pueden incluir aquel causado por CRT o exposición a la luz solar o UV.

En una realización, un régimen de fármacos combinados puede incluir fármacos o compuestos para el tratamiento o la prevención de trastornos oculares o afecciones secundarias asociados con estos cuadros. Por consiguiente, un régimen de fármacos combinados puede incluir uno o más activadores de sirtuina y uno o más agentes terapéuticos para el tratamiento de un trastorno ocular. Por ejemplo, pueden combinarse uno o más compuestos activadores de sirtuina con una cantidad eficaz de uno o más de: un agente que reduce la presión intraocular, un agente para tratar el glaucoma, un agente para tratar neuritis óptica, un agente para tratar retinopatía CMV, un agente para tratar esclerosis múltiple y/o un antibiótico, etc.

En una realización, un modulador de sirtuina puede administrarse junto con una terapia para reducir la presión intraocular. Un grupo de terapias implica bloquear la producción acuosa. Por ejemplo, los antagonistas beta-adrenérgicos tópicos (timolol y betaxolol) disminuyen la producción acuosa. El timolol tópico causa la caída de la IOP en 30 minutos con efectos máximos en 1-2 horas. Un régimen razonable es Timoptic 0,5%, en una gota cada 30 minutos por 2 dosis. El inhibidor de anhidrasa carbónica, acetazolamida, también reduce la producción acuosa y debe administrarse junto con beta-antagonistas tópicos. Se administra una dosis inicial de 500 mg seguida de 250 mg cada 6 horas. Este medicamento puede administrarse por vía oral, intramuscular o intravenosa. Además, los agonistas de alfa 2 (p. ej., Apraclonidina) actúan reduciendo la producción acuosa. Sus efectos son aditivos a los betabloqueantes administrados tópicamente. Han sido aprobados para uso en el control de una elevación aguda de la presión después de procedimientos con láser en la cámara anterior, pero se han descrito como eficaces en el tratamiento de glaucoma de ángulo cerrado agudo. Un régimen razonable es una gota cada 30 minutos por 2 dosis.

Un segundo grupo de terapias para reducir la presión intraocular implica reducir el volumen vítreo. Pueden usarse agentes hiperosmóticos para tratar un ataque agudo. Estos agentes extraen agua del globo, tornando la sangre hiperosmolar. Con frecuencia se utiliza glicerol oral en una dosis de 1 mL/kg en una disolución fría al 50% (mezclada con jugo de limón para que tenga sabor más agradable). El glicerol se convierte a glucosa en el hígado; las personas con diabetes pueden necesitar insulina adicional si se vuelven hipoglucémicas después de recibir el glicerol. La isosorbida oral es un alcohol inerte que también puede emplearse como agente osmótico para pacientes con glaucoma de ángulo cerrado agudo. La dosis usual es de 100 g tomados p.o. (220 cc de una disolución al 45%). Este alcohol inerte no debe confundirse con dinitrato de isosorbida, una medicación cardíaca basada en nitrato que se usa para angina y para insuficiencia cardíaca congestiva. El manitol intravenoso en una dosis de 1,0-1,5 mg/kg también es eficaz y se tolera bien en pacientes con náuseas y vómitos. Estos agentes hiperosmóticos deben usarse con precaución en cualquier paciente con antecedentes de insuficiencia cardíaca congestiva.

Un tercer grupo de terapias implica facilitar el flujo acuoso desde el ojo. Los agentes mióticos traccionan el iris desde el ángulo iridocorneal y pueden ayudar a aliviar la obstrucción de la malla trabecular por el iris periférico. Se puede administrar pilocarpina al 2% (ojos azules)-4% (ojos pardos) cada 15 minutos durante las primeras 1-2 horas. La administración más frecuente o dosis más alta pueden precipitar una crisis colinérgica sistémica. Los AINE algunas veces se utilizan para reducir la inflamación.

Los agentes terapéuticos ilustrativos para reducir la presión intraocular incluyen ALPHAGAN® P (Allergan) (disolución oftálmica de tartrato de brimonidina), AZOPT® (Alcon) (suspensión oftálmica de brinzolamida), BETAGAN® (Allergan) (disolución oftálmica de hidrocloreto de levobunolol, USP), BETIMOL® (Vistakon) (disolución oftálmica de timolol), BÉTOPTIC S® (Alcon) (HCl de betaxolol), TARTRATO DE BRIMONIDINA (Bausch & Lomb), HIDROCLORURO DE CARTEOLOL (Bausch & Lomb), COSOPT® (Merck) (disolución oftálmica de hidrocloreto de dorzolamida-maleato de timolol), LUMIGAN® (Allergan) (disolución oftálmica de bimatoprost), OPTIPRANOLOL® (Bausch & Lomb) (disolución oftálmica de metipranolol), TIMOLOL GFS (Falcon) (disolución formadora de gel oftálmico de maleato de timolol), TIMOPTIC® (Merck) (disolución oftálmica de maleato de timolol), TRAVATAN® (Alcon) (disolución oftálmica de travoprost), TRUSOPT® (Merck) (disolución oftálmica de hidrocloreto de dorzolamida) y XALATAN® (Pharmacia & Upjohn) (disolución oftálmica de latanoprost).

En una realización, un modulador de sirtuina puede administrarse junto con una terapia para tratar y/o prevenir el glaucoma. Un ejemplo de un fármaco para el glaucoma es DARANIDE® comprimidos (Merck) (Diclorfenamida).

5 En una realización, un modulador de sirtuina puede administrarse junto con una terapia para tratar y/o prevenir la neuritis óptica. Los ejemplos de fármacos para neuritis óptica incluyen inyección de fosfato DECADRON® (Merck) (Dexametasona fosfato sódico), DEPO-MEDROL® (Pharmacia & Upjohn)(acetato de metilprednisolona), HYDROCORTONE® comprimidos (Merck) (Hidrocortisona), ORAPRED® (Biomarin) (disolución oral de prednisolona fosfato sódico) y PEDIAPRED® (Celltech) (prednisolona fosfato sódico, USP).

10 En una realización, un modulador de sirtuina puede administrarse junto con una terapia para tratar y/o prevenir retinopatía CMV. Los tratamientos para la retinopatía CMV incluyen CYTOVENE® (cápsulas de ganciclovir) y VALCYTE® (Roche Laboratories) (comprimidos de hidrocloruro de valganciclovir).

15 En una realización, un modulador de sirtuina puede administrarse junto con una terapia para tratar y/o prevenir la esclerosis múltiple. Los ejemplos de dichos fármacos incluyen DANTRIUM® (Procter & Gamble Pharmaceuticals) (dantroleno sódico), NOVANTRONE® (Serono) (mitoxantrona), AVONEX® (Biogen Idec) (Interferón beta-1a), BETASERON® (Berlex) (Interferón beta-1b), COPAXONE® (Teva Neuroscience) (inyección de acetato glatiramer) y REBIF® (Pfizer) (interferón beta-1a).

20 A su vez, los macrólidos y/o el ácido micofenólico, que tiene múltiples actividades, pueden co-administrarse con un modulador de sirtuina. Los antibióticos macrólidos incluyen tacrolimus, ciclosporina, sirolimus, everolimus, ascomicina, eritromicina, azitromicina, claritromicina, clindamicina, lincomicina, diritromicina, josamicina, espiramicina, diacetil-midecamicina, tilosin, roxitromicina, ABT-773, telitromicina, leucomicinas y lincosamida.

#### *Enfermedades y trastornos asociados con mitocondrias*

25 En determinadas realizaciones, la invención considera métodos para tratar enfermedades o trastornos que se beneficiarían con una mayor actividad mitocondrial. Los métodos comprenden administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto activador de sirtuina. Un incremento en la actividad mitocondrial se refiere a aumentar la actividad de la mitocondria a la vez que se mantienen los números generales de mitocondrias (p. ej., masa mitocondrial), aumentando los números de mitocondrias, incrementando así la actividad mitocondrial (p. ej., estimulando la biogénesis mitocondrial), o sus combinaciones. En determinadas realizaciones, las enfermedades y trastornos que se beneficiarían con la actividad mitocondrial incluyen enfermedades o trastornos asociados con disfunción mitocondrial.

30 En determinadas realizaciones, los métodos para tratar enfermedades y trastornos que se beneficiarían con el aumento de la actividad mitocondrial pueden comprender identificar a un sujeto que padece una disfunción mitocondrial. Los métodos para diagnosticar una disfunción mitocondrial pueden implicar análisis genéticos moleculares, patológicos y/o bioquímicos, que se resumen en Cohen and Gold, Cleveland Clinic Journal of Medicine, 68: 625-642 (2001). Un método para diagnosticar una disfunción mitocondrial es la escala de Thor-Byrne-ier (véanse, p. ej., Cohen y Gold, *supra*; Collin S. et al., Eur Neurol. 36: 260-267 (1996)). Otros métodos para determinar el número y la función mitocondrial incluyen, por ejemplo, ensayos enzimáticos (p. ej., una enzima mitocondrial o un factor de biosíntesis de ATP tal como una enzima ETC o una enzima de ciclo Krebs), determinación de masa mitocondrial, volumen mitocondrial y/o número mitocondrial, cuantificación de DNA mitocondrial, monitoreo de homeostasis de calcio intracelular y/o respuestas celulares a perturbaciones de esta homeostasis, evaluación de respuesta a un estímulo apoptogénico, determinación de la producción de radicales libres. Dichos métodos se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, en la publicación de patente estadounidense núm. 2002/0049176 y referencias allí citadas.

45 Las mitocondrias son críticas para la supervivencia y el correcto funcionamiento de casi todos los tipos de células eucarióticas. Las mitocondrias en prácticamente cualquier tipo de célula pueden tener defectos congénitos o adquiridos que afectan su funcionamiento. Por lo tanto, los signos y síntomas clínicamente importantes de los defectos mitocondriales que afectan la función de la cadena respiratoria son heterogéneos y variables, dependiendo de la distribución de las mitocondrias defectuosas entre las células y la gravedad de sus déficits, y de las demandas fisiológicas de las células afectadas. Los tejidos no divisores con grandes requerimientos de energía, p. ej., el tejido nervioso, el músculo esquelético y el músculo cardíaco son particularmente susceptibles a disfunción de la cadena respiratoria, pero cualquier órgano puede verse afectado.

55 Las enfermedades y trastornos asociados con disfunción mitocondrial incluyen enfermedades y trastornos en los que los déficits en la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial contribuyen al desarrollo de dichas enfermedades o trastornos en un mamífero. Esto incluye 1) deficiencias genéticas congénitas en actividad de uno o más componentes de la cadena respiratoria mitocondrial; y 2) deficiencias adquiridas en la actividad de uno o más componentes de la cadena respiratoria mitocondrial, donde dichas deficiencias son causadas por a) daño oxidativo durante el envejecimiento; b) elevación de calcio intracelular; c) exposición de las células afectadas a óxido nítrico; d) hipoxia o isquemia; e) déficits asociados con microtúbulos en el transporte axonal de mitocondrias, o f) expresión de proteínas de desacoplamiento mitocondrial.

Las enfermedades o trastornos que se beneficiarían con el aumento de la actividad mitocondrial en general incluyen, por ejemplo, enfermedades en las que la lesión oxidativa mediada por radicales libres conduce a la degradación de tejido, enfermedades en las que las células se someten inapropiadamente a apoptosis y enfermedades en las que las células no pueden someterse a apoptosis. Las enfermedades o trastornos ilustrativos que se beneficiarían con el aumento de la actividad mitocondrial incluyen, por ejemplo, AD (enfermedad de Alzheimer), ADPD (enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Parkinson), AMDF (Ataxia, Mioclonias y sordera), enfermedades autoinmunitarias, cáncer, CIPO (pseudo-obstrucción intestinal crónica con miopatía y oftalmoplejía), distrofia muscular congénita, CPEO (oftalmoplejía externa progresiva crónica), DEAF (sordera heredada materna o sordera inducida por aminocólico), DEMCHO (demencia y corea), diabetes mellitus (Tipo I o Tipo II), DIDMOAD (Diabetes Insipidus, Diabetes Mellitus, atrofia óptica, sordera), DDMF (Diabetes Mellitus y sordera), distonia, intolerancia al ejercicio, ESOC (epilepsia, apoplejías, atrofia óptica y deterioro cognitivo), FBSN (necrosis estriatal bilateral familiar), FICP (cardiomiopatía infantil fatal más cardiomiopatía asociada a MELAS), GER (reflujo gastrointestinal), HD (enfermedad de Huntington), KSS (síndrome de Kearns Sayre), miopatía de "inicio tardío", LDYT (neuropatía óptica hereditaria de Leber y distonia), síndrome de Leigh, LHON (neuropatía óptica hereditaria de Leber), LIMM (miopatía mitocondrial infantil letal), MDM (miopatía y diabetes mellitus), MELAS (encefalomiopatía mitocondrial, acidosis láctica y episodios de tipo apoplejía), MEPR (epilepsia mioclónica y regresión psicomotora), MERME (enfermedad superpuesta MERRF/MELAS), MERRF (epilepsia mioclónica y fibras musculares rojas rasgadas), MHCM (cardiomiopatía hipertrófica heredada materna), MICM (cardiomiopatía heredada materna), MILS (síndrome de Leigh heredado materno), encefalocardiomiopatía mitocondrial, encefalomiopatía mitocondrial, MM (miopatía mitocondrial), MMC (miopatía y cardiomiopatía materna), MNGIE (miopatía y oftalmoplejía externa, neuropatía, encefalopatía gastrointestinal, encefalopatía), trastorno mitocondrial multisistémico (miopatía, encefalopatía, ceguera, pérdida auditiva, neuropatía periférica), NARP (debilidad muscular neurogénica, ataxia y retinitis pigmentosa; se describe fenotipo alternativo en este locus como enfermedad de Leigh), PD (enfermedad de Parkinson), síndrome de Pearson, PEM (encefalopatía progresiva), PEO (oftalmoplejía externa progresiva), PME (epilepsia mioclónica progresiva), PMPS (síndrome de Pearson médula-páncreas), psoriasis, RTT (síndrome Ret), esquizofrenia, SIDS (muerte súbita del lactante), SNHL (pérdida auditiva sensorio-neural), presentación familiar variada (las manifestaciones clínicas oscilan entre paraparesis espástica y trastorno multisistémico progresivo, y cardiomiopatía fatal hasta ataxia truncal, disartria, pérdida auditiva severa, regresión mental, ptosis, oftalmoparesis, ciclones distales y diabetes mellitus), o síndrome de Wolfram.

Otras enfermedades y trastornos que se beneficiarían con el aumento de la actividad mitocondrial incluyen, por ejemplo, ataxia de Friedreich y otras ataxias, esclerosis lateral amiotrófica (ALS) y otras enfermedades neuromotoras, degeneración macular, epilepsia, síndrome de Alpers, síndrome de eliminación de DNA mitocondrial múltiple, síndrome de eliminación de MtDNA, deficiencia del Complejo I, deficiencia del Complejo II (SDH), deficiencia del Complejo III, deficiencia de citocromo oxidasa (COX, Complejo IV), deficiencia de Complejo V, deficiencia del translocador de adenina nucleótido (ANT), deficiencia de piruvato deshidrogenasa (PDH), aciduria etilmalónica con acidemia láctica, aciduria 3-Metil glutacónica con acidemia láctica, epilepsia refractaria con declives durante una infección, síndrome de Asperger con declives durante una infección, autismo con declives durante una infección, trastorno de hiperactividad con déficit de la atención (ADHD), parálisis cerebral con declives durante una infección, dislexia con declives durante una infección, trombocitopenia heredada materna y síndrome de leucemia, síndrome de MARIAHS (ataxia mitocondrial, infecciones recurrentes, afasia, hipouricemia/hipomielinación, convulsiones y aciduria dicarboxílica), distonia ND6, síndrome de vómitos cíclicos con declives durante una infección, aciduria 3-Hidroxi isobutírica con acidemia láctica, diabetes mellitus con acidemia láctica, síndrome neurológico sensible a uridina (URNS), cardiomiopatía dilatada, linfoma esplénico y acidosis renal tubular/diabetes/síndrome de ataxis.

En otras realizaciones, la invención considera métodos para tratar a un sujeto que padece trastornos mitocondriales que surgen de, aunque sin limitarse a ello, lesión post-traumática en la cabeza y edema cerebral, apoplejía (métodos de la invención útiles para prevenir lesión por reperfusión), demencia con cuerpos de Lewy, síndrome hepatorenal, insuficiencia hepática aguda, NASH (esteatohepatitis no alcohólica), terapia de cáncer anti-metástasis/prodiferenciación, insuficiencia cardíaca congestiva idiopática, fibrilación auricular (no valvular), síndrome de Wolff-Parkinson-White, bloqueo idiopático del corazón, prevención de lesión por reperfusión en infartos de miocardio agudos, migrañas familiares, síndrome de intestino irritable, prevención secundaria de infartos de miocardio sin ondas Q, síndrome premenstrual, prevención de insuficiencia renal en síndrome hepatorenal, síndrome de anticuerpos anti-fosfolípidos, eclampsia/pre-eclampsia, esterilidad por mala respuesta ovárica, cardiopatía isquémica/angina y Shy-Drager y síndromes de falta de autonomía no clasificados.

Incluso en otra realización, se consideran métodos para el tratamiento de trastornos mitocondriales asociados con efectos colaterales relacionados con medicamentos farmacológicos. Los tipos de agentes farmacéuticos asociados con trastornos mitocondriales incluyen inhibidores de transcriptasa inversa, inhibidores de proteasa, inhibidores de DHOD y similares. Los ejemplos de inhibidores de transcriptasa inversa incluyen, por ejemplo, Azidotimidina (AZT), Estavudina (D4T), Zalcitabina (ddC), Didanosina (DDI), Fluoriodoauracil (FIAU), Lamivudina (3TC), Abacavir y similares. Los ejemplos de inhibidores de proteasa incluyen, por ejemplo, Ritonavir, Indinavir, Saquinavir, Nelfinavir y similares. Los ejemplos de inhibidores de dihidro-ortoato deshidrogenasa (DHOD) incluyen, por ejemplo, Leflunomida, Brequinar y similares.

Los inhibidores de transcriptasa inversa no solamente inhiben la transcriptasa inversa, sino también la polimerasa gamma que se requiere para el funcionamiento mitocondrial. La inhibición de la actividad de la polimerasa gamma (p. ej., con el inhibidor de transcriptasa inversa) conduce entonces a la disfunción mitocondrial y/o a una reducción de la masa mitocondrial que se manifiesta en el paciente como hiperlactatemia. Este tipo de cuadro puede beneficiarse con un incremento en el número de mitocondrias y/o con un avance en el funcionamiento mitocondrial, p. ej., por administración de un compuesto activador de sirtuina.

Los síntomas frecuentes de enfermedades mitocondriales incluyen cardiomiopatía, debilidad y atrofia muscular, retrasos del desarrollo (motor, del lenguaje, cognitivo o ejecutivo), ataxia, epilepsia, acidosis tubular renal, neuropatía periférica, neuropatía óptica, neuropatía autónoma, disfunción del intestino neurogénico, sordera sensorineural, disfunción de la vejiga neurogénica, cardiomiopatía dilatada, migraña, insuficiencia hepática, acidemia láctica y diabetes mellitus.

En determinadas realizaciones, la invención considera métodos para tratar una enfermedad o trastorno que se beneficiaría con el aumento de la actividad mitocondrial, que implica administrar a un sujeto que lo necesita uno o más compuestos activadores de sirtuina en combinación con otro agente terapéutico tal como, por ejemplo, un agente útil para tratar la disfunción mitocondrial (como antioxidantes, vitaminas o cofactores de la cadena respiratoria), un agente útil para reducir un síntoma asociado con una enfermedad o trastorno que implica disfunción mitocondrial (como un agente anticonvulsivo, un agente útil para aliviar el dolor neuropático, un agente para tratar disfunción cardíaca), un agente cardiovascular (como se describe a continuación en más detalle), un agente quimioterapéutico (como se describe a continuación en más detalle) o un agente anti-neurodegeneración (como se describe a continuación en más detalle). En una realización ilustrativa, la invención proporciona métodos para tratar una enfermedad o trastorno que se beneficiaría con el aumento de la actividad mitocondrial, que implica administrar a un sujeto que lo necesita, uno o más compuestos activadores de sirtuina en combinación con uno o más de los siguientes: coenzima Q<sub>10</sub>, L-carnitina, tiamina, riboflavin, niacinamida, folato, vitamina E, selenio, ácido lipoico o prednisona. Las composiciones que comprenden dichas combinaciones también se proveen en la presente invención.

En realizaciones ilustrativas, la invención considera métodos para tratar enfermedades o trastornos que se beneficiarían con el aumento de la actividad mitocondrial, administrando a un sujeto que lo necesita, una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto activador de sirtuina. Las enfermedades o trastornos ilustrativos incluyen, por ejemplo, trastornos neuromusculares (p. ej., ataxia de Friedreich, distrofia muscular, esclerosis múltiple, etc.), trastornos de inestabilidad neuronal (p. ej., trastornos de convulsiones, migraña, etc.), retraso del desarrollo, trastornos neurodegenerativos (p. ej., enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, etc.), isquemia, acidosis tubular renal, neurodegeneración relacionada con el envejecimiento y deterioro cognitivo, fatiga por quimioterapia, menopausia o irregularidades en el ciclo menstrual o la ovulación relacionadas con la edad o inducidas por quimioterapia, miopatías mitocondriales, daño mitocondrial (p. ej., acumulación de calcio, excitotoxicidad, exposición a ácido nítrico, hipoxia, etc.), y desregulación mitocondrial.

Un defecto génico subyacente a la ataxia de Friedreich (FA), la ataxia hereditaria más frecuente, se identificó recientemente y se denomina "frataxina". En FA, después de un periodo de desarrollo normal, se desarrollan déficits en la coordinación que avanzan a parálisis y muerte, típicamente entre los 30 y 40 años. Los tejidos más gravemente afectados son la médula espinal, los nervios periféricos, el miocardio y el páncreas. Los pacientes típicamente pierden el control motor y se confinan a sillas de ruedas, y por lo general padecen insuficiencia cardíaca y diabetes. La base genética de la FA implica repeticiones del trinucleótido GAA en una región de intrón del gen que codifica frataxina. La presencia de esta repeticiones produce una reducción en la transcripción y expresión del gen. La frataxina está implicada en la regulación del contenido de hierro mitocondrial. Cuando el contenido de frataxina celular es subnormal, el exceso de hierro se acumula en las mitocondrias, promoviendo daño oxidativo y consecuente degeneración y disfunción mitocondrial. Cuando números intermedios de repeticiones de GAA están presentes en el intrón del gen de frataxina, el fenotipo clínico severo de ataxia no puede desarrollarse. Sin embargo, estas extensiones de trinucleótidos de longitud intermedia se hallan en 25 a 30% de los pacientes con diabetes mellitus no insulino-dependientes, en comparación con aproximadamente 5% de la población no diabética. En determinadas realizaciones, los compuestos activadores de sirtuina pueden usarse para tratar a pacientes con trastornos relacionados con deficiencias o defectos en frataxina, incluyendo la ataxia de Friedreich, disfunción del miocardio, diabetes mellitus y complicaciones de la diabetes como neuropatía periférica.

Distrofia muscular se refiere a una familia de enfermedades que implican deterioro de la estructura y el funcionamiento neuromuscular, con frecuencia resultando en atrofia músculo-esquelética y disfunción del miocardio. En el caso de distrofia muscular de Duchenne, las mutaciones o déficits en una proteína específica están implicados en su etiología. Los ratones con sus genes de distrofina inactivados exhiben algunas características de distrofia muscular y tienen aproximadamente 50% de déficit en la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial. Una ruta común final para la degeneración neuromuscular en la mayoría de los casos es el deterioro mediado por calcio de la función mitocondrial. En determinadas realizaciones, los compuestos activadores de sirtuina se pueden usar para reducir el índice de deterioro en las capacidades funcionales musculares y para mejorar el estado funcional muscular en pacientes con distrofia muscular.

5 La esclerosis múltiple (MS) es una enfermedad neuromuscular caracterizada por degeneración inflamatoria focal y autoinmunitaria de la materia blanca cerebral. Las exacerbaciones o ataques periódicos se correlacionan significativamente con las vías respiratorias superiores y otras infecciones, tanto bacterianas como víricas, indicando que la disfunción mitocondrial cumple una función en la MS. La depresión de la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial neuronal causada por el óxido nítrico (producido por astrocitos y otras células implicadas en inflamación) está implicada como mecanismo molecular que contribuye a la MS. En determinadas realizaciones, los compuestos activadores de sirtuina se pueden usar para el tratamiento de pacientes con esclerosis múltiple, tanto en forma profiláctica como durante los episodios de exacerbación de la enfermedad.

10 La epilepsia con frecuencia está presente en pacientes con citopatías mitocondriales, implicando una gama de intensidad y frecuencia de convulsiones, p. ej., ausencia, tónicas, atónicas, mioclónicas y estado epiléptico, que ocurren en episodios aislados o muchas veces al día. En determinadas realizaciones, los compuestos activadores de sirtuina pueden usarse para tratar a pacientes con convulsiones secundarias a disfunción mitocondrial, incluyendo la reducción de la intensidad y frecuencia de la actividad convulsiva.

15 Los estudios metabólicos en pacientes con migrañas recurrentes indican que los déficits de actividad mitocondrial se asocian frecuentemente con este trastorno, manifestándose como fosforilación oxidativa deteriorada y exceso de producción de lactato. Dichos déficits no se deben necesariamente a defectos genéticos en DNA mitocondrial. Las personas que padecen migrañas son hipersensibles al óxido nítrico, un inhibidor endógeno de citocromo c oxidasa. Además, los pacientes con citopatías mitocondriales, p. ej., MELAS, con frecuencia padecen migrañas recurrentes.  
20 En determinadas realizaciones, los compuestos activadores de sirtuina pueden emplearse para tratar a pacientes con migrañas recurrentes, incluyendo cefaleas resistentes a compuestos de ergot o antagonistas de los receptores de serotonina.

25 Los retrasos en el desarrollo neurológico o neuropsicológico con frecuencia se ven en niños con enfermedades mitocondriales. El desarrollo y la remodelación de conexiones neurales requieren actividad biosintética intensiva, particularmente que implica síntesis de membranas neuronales y mielina, donde ambas requieren pirimidina nucleótidos como cofactores. Los uridina nucleótidos están implicados en la inactivación y transferencia de azúcares a glucolípidos y glucoproteínas. Los citidina nucleótidos derivan de uridina nucleótidos, y son cruciales para la síntesis de constituyentes de fosfolípidos de membranas importantes como fosfatidilcolina, que recibe su resto colina de citidina difosfocolina. En el caso de disfunción mitocondrial (debida o bien a defectos en el DNA mitocondrial o a cualquier de los déficits adquiridos o condicionales como disfunción mitocondrial mediada por óxido nítrico o excitotóxica) u otras afecciones que resultan en deterioro de la síntesis de pirimidina, la proliferación celular y la extensión axonal están deterioradas en etapas cruciales del desarrollo de interconexiones neuronales y circuitos, lo que produce una demora o retraso en el desarrollo de las funciones neuropsicológicas como el lenguaje, la función motora, ejecutiva, y las habilidades cognitivas. En autismo, por ejemplo, las mediciones por espectroscopia de resonancia magnética de compuestos de fosfato cerebral indican que hay una subsíntesis global de membranas y precursores de membranas indicada por los niveles reducidos de uridina difosfo-azúcares, y derivados de citidina nucleótido implicados en la síntesis de las membranas. Los trastornos caracterizados por retraso del desarrollo incluyen síndrome de Rett, retraso del desarrollo generalizado (o PDD-NOS "retraso del desarrollo generalizado no especificado" para distinguirlo de subcategorías específicas como autismo), autismo, síndrome de Asperger y déficit de la atención/trastorno de hiperactividad (ADHD), que se está reconociendo como un retraso en el desarrollo de la actividad del circuito neural subyacente a las funciones ejecutivas. En determinadas realizaciones, los compuestos activadores de sirtuina pueden ser útiles para tratar a pacientes con retrasos del neurodesarrollo (p. ej., motores, del lenguaje, la función ejecutiva y las destrezas cognitivas), u otros retrasos del desarrollo neurológico y neuropsicológico en el sistema nervioso central y del desarrollo somático en tejidos no neurales como músculo y glándulas endocrinas.  
45

Las dos enfermedades neurodegenerativas severas más significativas asociadas con el envejecimiento, enfermedad de Alzheimer (AD) y enfermedad de Parkinson (PD), implican disfunción mitocondrial en su patogénesis. Las deficiencias del Complejo I en particular se hallan frecuentemente no solamente en las neuronas nigrostriatales que degeneran en enfermedad de Parkinson, sino también en tejidos periféricos y en células como músculo y plaquetas de pacientes que padecen enfermedad de Parkinson. En la enfermedad de Alzheimer, la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial con frecuencia está deprimida, especialmente la del Complejo IV (Citocromo c Oxidasa). Asimismo, la función respiratoria mitocondrial está deprimida como consecuencia del envejecimiento, lo que amplía incluso más las secuelas perjudiciales de lesiones moleculares adicionales que afectan la función de la cadena respiratoria. Otros factores además de la disfunción mitocondrial primaria subyacen a la neurodegeneración en AD, PD y trastornos relacionados. La estimulación excitotóxica y el óxido nítrico están implicados en ambas enfermedades, cuyos factores exacerbaban los déficits de la cadena respiratoria mitocondrial y cuyas acciones perjudiciales son exageradas en un antecedente de disfunción de la cadena respiratoria. La enfermedad de Huntington también implica disfunción mitocondrial en regiones afectadas del cerebro, con interacciones cooperativas de estimulación excitotóxica y disfunción mitocondrial, contribuyendo a degeneración neuronal. En determinadas realizaciones, los compuestos activadores de sirtuina pueden ser útiles para tratar y atenuar la progresión de enfermedades neurodegenerativas relacionadas con el envejecimiento, incluyendo AD y PD.  
60

Uno de los defectos genéticos principales en la esclerosis lateral amiotrófica (ALS o enfermedad de Lou Gehrig) es una mutación o deficiencia en dismutasa de superóxido de cobre-zinc (SOD 1), una enzima antioxidante. Las

mitocondrias producen y son dianas primarias para especies de oxígeno reactivas. La transferencia ineficiente de electrones a oxígeno en mitocondrias es la fuente fisiológica más significativa de radicales libres en sistemas mamíferos. Las deficiencias de antioxidantes o enzimas antioxidantes pueden resultar en o exacerbar la degeneración mitocondrial. Los ratones transgénicos para SOD1 mutado desarrollan síntomas y patología similares a aquellos en ALS humana. Se ha demostrado que el desarrollo de la enfermedad en estos animales implica la destrucción oxidativa de las mitocondrias, seguida de deterioro funcional de las neuronas motoras e inicio de síntomas clínicos. El músculo esquelético de pacientes con ALS presenta poca actividad del Complejo I mitocondrial. En determinadas realizaciones, los compuestos activadores de sirtuina pueden ser útiles para tratar ALS, para revertir o demorar el avance de los síntomas clínicos.

La deficiencia de oxígeno produce inhibición directa de la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial, privando células de un aceptor de electrones terminal para reoxidación del citocromo c en el Complejo IV, e indirectamente, especialmente en el sistema nervioso, mediante excitotoxicidad post-anóxica secundaria y formación de óxido nítrico. En cuadros tales como anoxia cerebral, angina o crisis de anemia de células falciformes, los tejidos son relativamente hipóxicos. En tales casos, los compuestos que pueden aumentar la actividad mitocondrial protegen a los tejidos de los efectos nocivos de la hipoxia, atenúan la muerte celular demorada secundaria y aceleran la recuperación del estrés y la lesión del tejido hipóxico. En determinadas realizaciones, los compuestos activadores de sirtuina pueden ser útiles para prevenir la muerte celular demorada (apoptosis en regiones como el hipocampo o la corteza, que ocurre aproximadamente 2 a 5 días después de un episodio de isquemia cerebral) después del ataque isquémico o hipóxico al cerebro.

La acidosis debida a disfunción renal con frecuencia se observa en pacientes con enfermedad mitocondrial, ya sea que la disfunción de la cadena respiratoria subyacente sea congénita o inducida por isquemia o agentes citotóxicos como el cisplatino. La acidosis renal tubular con frecuencia requiere la administración de bicarbonato de sodio exógeno para mantener el pH del tejido y la sangre. En determinadas realizaciones, los compuestos activadores de sirtuina pueden ser útiles para tratar acidosis tubular renal y otras formas de disfunción renal causadas por déficits en la cadena respiratoria mitocondrial.

Durante el envejecimiento normal, hay un deterioro progresivo del funcionamiento de la cadena respiratoria mitocondrial. Comenzando aproximadamente a los 40 años, hay un aumento exponencial en la acumulación de defectos de DNA mitocondrial en seres humanos, y un deterioro concurrente en los elementos regulados nucleares de la actividad respiratoria mitocondrial. Muchas lesiones del DNA mitocondrial tienen una ventaja de selección durante el recambio mitocondrial, especialmente en células postmitóticas. El mecanismo propuesto es que las mitocondrias con una cadena respiratoria defectuosa producen menos daño oxidativo a sí mismas que las mitocondrias con cadenas respiratorias funcionales intactas (la respiración mitocondrial es la fuente primaria de los radicales libres en el cuerpo). Por lo tanto, las mitocondrias que funcionan normalmente acumulan daño oxidativo a los lípidos de las membranas más rápidamente que las mitocondrias defectuosas, y por lo tanto son "etiquetadas" para degradación por los liposomas. Dado que las mitocondrias dentro de las células tienen una semivida de aproximadamente 10 días, una ventaja de selección puede resultar en un rápido reemplazo de las mitocondrias funcionales con aquellas con actividad respiratoria disminuida, especialmente en células de división lenta. El resultado neto es que una vez que ocurre una mutación en un gen para una proteína mitocondrial que reduce el daño oxidativo a las mitocondrias, dichas mitocondrias defectuosas poblarán rápidamente la célula, disminuyendo o eliminando sus capacidades respiratorias. La acumulación de dichas células produce el envejecimiento o la enfermedad degenerativa a nivel del organismo. Esto concuerda con la apariencia de mosaicos progresivos de las células con actividad de transporte de electrones defectuosos en el músculo, donde las células carecen de actividad de Citocromo oxidasa c (COX) entrecolada entre las células con actividad normal, y una incidencia mayor de células COX-negativas en biopsias de sujetos mayores. El organismo, durante el envejecimiento, o en una diversidad de enfermedades mitocondriales, se enfrenta por lo tanto con una situación en la que las células postmitóticas irremplazables (p. ej., neuronas, músculo esquelético y cardíaco) deben conservarse y su función mantenerse hasta un grado significativo, en vista de un deterioro progresivo inexorable en el funcionamiento de la cadena respiratoria mitocondrial. Las neuronas con mitocondrias disfuncionales se tornan progresivamente más sensibles a ataques, como lesión excitotóxica. La falla mitocondrial contribuye a la mayoría de las enfermedades degenerativas (especialmente a la neurodegeneración) que acompañan el envejecimiento. Las enfermedades mitocondriales congénitas a menudo implican neurodegeneración de inicio temprano similar en mecanismo fundamental a los trastornos que ocurren durante el envejecimiento de gente nacida con mitocondrias normales. En determinadas realizaciones, los compuestos activadores de sirtuina pueden ser útiles para tratar o atenuar el deterioro cognitivo y otras consecuencias degenerativas del envejecimiento.

El daño al DNA mitocondrial es más extenso y persiste por más tiempo que el daño al DNA nuclear en células sometidas a estrés oxidativo o agentes de quimioterapia para el cáncer, como el cisplatino, debido a una mayor vulnerabilidad y a reparación menos eficaz del DNA mitocondrial. Si bien el DNA mitocondrial puede ser más sensible a daño que el DNA nuclear, es relativamente resistente, en algunas situaciones, a mutagénesis por carcinógenos químicos. Esto se debe a que las mitocondrias responden a algunos tipos de daño al DNA mitocondrial destruyendo sus genomas defectuosos en lugar de intentar repararlos. Esto produce una disfunción mitocondrial global por un periodo posterior a la quimioterapia citotóxica. El uso clínico de agentes quimioterapéuticos como cisplatino, mitomicina y citoxan a menudo va acompañado de "fatiga por quimioterapia" debilitante, periodos

prolongados de debilidad e intolerancia al ejercicio, que pueden persistir incluso después de la recuperación de las toxicidades hematológicas y gastrointestinales de las toxicidades de dichos agentes. En determinadas realizaciones, los compuestos activadores de sirtuina pueden ser útiles para el tratamiento y la prevención de efectos colaterales de la quimioterapia para el cáncer relacionados con disfunción mitocondrial.

Una función crucial del ovario es mantener la integridad del genoma mitocondrial en ovocitos, ya que las mitocondrias que pasan a un feto derivan todas de aquellas presentes en los ovocitos al momento de la concepción. Las deleciones en el DNA mitocondrial se vuelven detectables alrededor de la edad de la menopausia, y también se asocian con ciclos menstruales anormales. Ya que las células no pueden detectar y responder directamente a los defectos en el DNA mitocondrial, sino que solamente pueden detectar defectos secundarios que afectan al citoplasma, como dificultad en la respiración, estados de oxirreducción o déficits en la síntesis de pirimidina, dichos productos de función mitocondrial participan como una señal para la selección de ovocitos y atresia folicular, desencadenando en última medida la menopausia cuando el mantenimiento de la fidelidad genómica y la actividad funcional mitocondrial ya no pueden garantizarse. Esto es análogo a la apoptosis en células con daño al DNA, que sufren un proceso activo de suicidio celular cuando la fidelidad genómica ya no puede lograrse con procesos de reparación. Las mujeres con citopatías mitocondriales que afectan a las gónadas a menudo experimentan menopausia prematura o exhiben anomalías en el ciclo primario. La quimioterapia citotóxica para el cáncer suele inducir menopausia prematura, con un consecuente aumento del riesgo de osteoporosis. La amenorrea inducida por quimioterapia en general se debe a falla ovárica. La incidencia de amenorrea inducida por quimioterapia aumenta como una función de la edad en mujeres premenopáusicas que reciben quimioterapia, señalando un compromiso mitocondrial. Los inhibidores de respiración mitocondrial o síntesis de proteínas inhiben la ovulación inducida por hormonas y además inhiben la producción de hormonas esteroideas ováricas en respuesta a las gonadotropinas pituitarias. Las mujeres con síndrome de Down típicamente experimentan la menopausia prematuramente, y además están sujetas a un inicio temprano de demencia de tipo Alzheimer. La actividad reducida de citocromo oxidasa se halla consistentemente en tejidos de pacientes con síndrome de Down y en enfermedad de Alzheimer de inicio tardío. El soporte apropiado del funcionamiento mitocondrial o la compensación para la disfunción mitocondrial es por lo tanto útil para proteger contra menopausia o irregularidades del ciclo menstrual o la ovulación inducidas por quimioterapia o relacionadas con el envejecimiento. En determinadas realizaciones, los compuestos activadores de sirtuina pueden ser útiles para tratar y prevenir amenorrea, ovulación irregular, menopausia o consecuencias secundarias de la menopausia.

En determinadas realizaciones, los compuestos activadores de sirtuina pueden ser útiles para el tratamiento de miopatías mitocondriales. Las miopatías mitocondriales oscilan entre debilidad leve, lentamente progresiva de los músculos extraoculares y miopatías infantiles fatales, graves, y encefalomiopatías multisistémicas. Se han definido algunos síndromes, con cierta superposición entre ellos. Los síndromes establecidos que afectan los músculos incluyen oftalmoplejía externa progresiva, síndrome de Kearns-Sayre (con oftalmoplejía, retinopatía pigmentaria, defectos de conducción cardíaca, ataxia cerebelar y sordera sensorineural), síndrome MELAS (encefalomiopatía mitocondrial, acidosis láctica y episodios de tipo apoplejía), síndrome MERFF (epilepsia mioclónica y de fibras rojas rasgadas), debilidad de distribución extremidades-cintura y miopatía infantil (benigna o severa y fatal). Las muestras de biopsia de músculo teñidas con tinte de tricromo de Gomori modificado muestran fibras rojas rasgadas debido a la acumulación excesiva de mitocondrias. Se pueden detectar defectos bioquímicos en el transporte y la utilización de sustrato, el ciclo de Krebs, la fosforilación oxidativa o la cadena respiratoria. Se han descrito numerosas mutaciones y eliminaciones puntuales de DNA mitocondrial, transmitidas en un patrón hereditario materno, no mendeliano. Ocurren mutaciones en las enzimas mitocondriales codificadas a nivel nuclear.

En determinadas realizaciones, los compuestos activadores de sirtuina pueden ser útiles para tratar a pacientes que sufren de daño tóxico a las mitocondrias, como daño tóxico debido a la acumulación de calcio, excitotoxicidad, exposición a ácido nítrico, daño tóxico inducido por fármacos o hipoxia.

Un mecanismo fundamental de la lesión celular, especialmente en tejidos excitables, implica el ingreso excesivo de calcio en las células, como consecuencia o bien de una fuga a través de la membrana plasmática o de defectos en los mecanismos de manipuleo de calcio intracelular. Las mitocondrias son sitios importantes de secuestro de calcio, y preferiblemente utilizan energía de la cadena respiratoria para absorber el calcio, en lugar de la síntesis de ATP, lo que resulta en un espiral descendente de falla mitocondrial, ya que la absorción de calcio en las mitocondrias produce disminución de la capacidad de transducción de energía.

La estimulación excesiva de las neuronas con aminoácidos excitatorios es un mecanismo común de la muerte o lesión de las células del sistema nervioso central. La activación de receptores de glutamato, especialmente del subtipo designado receptores NMDA, produce disfunción mitocondrial, en parte a través de la elevación de calcio intracelular durante la estimulación excitotóxica. A la inversa, los déficits en la respiración mitocondrial y la fosforilación oxidativa sensibilizan las células a los estímulos excitotóxicos, produciendo la muerte o lesión celular durante la exposición a niveles de neurotransmisores excitotóxicos o toxinas que serían inocuos para las células normales.

El óxido nítrico (aproximadamente 1 micromolar) inhibe la citocromo oxidasa (Complejo IV) y en consecuencia la respiración mitocondrial; además, la exposición prolongada a óxido nítrico (NO) reduce irreversiblemente la actividad del Complejo I. Las concentraciones fisiológicas o patofisiológicas de NO inhiben así la biosíntesis de pirimidina. El

óxido nítrico está implicado en una diversidad de trastornos neurodegenerativos que incluyen enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias del sistema nervioso central, y está implicado en la mediación de daño excitotóxico y post-hipóxico a las neuronas.

5 El oxígeno es el aceptor de electrones terminal en la cadena respiratoria. La deficiencia de oxígeno dificulta la actividad de la cadena de transporte de electrones, produciendo menos síntesis de pirimidina como también menos síntesis de ATP mediante fosforilación oxidativa. Las células humanas proliferan y retienen la viabilidad bajo condiciones prácticamente anaeróbicas, si se les proveen uridina y piruvato (o un agente similar de eficaz para oxidar NADH a fin de optimizar la producción de ATP glucolítico).

10 En determinadas realizaciones, los compuestos activadores de sirtuina pueden ser útiles para tratar enfermedades o trastornos asociados con desregulación mitocondrial.

La transcripción de DNA mitocondrial que codifica los componentes de la cadena respiratoria requiere factores nucleares. En los axones neuronales, las mitocondrias deben viajar desde y hacia el núcleo con el fin de mantener la actividad de la cadena respiratoria. Si el transporte axonal es obstaculizado por hipoxia o por fármacos como taxol que afectan la estabilidad de los microtúbulos, las mitocondrias distantes del núcleo sufren pérdida de actividad de citocromo oxidasa. Por consiguiente, el tratamiento con un compuesto activador de sirtuina puede ser útil para promover interacciones mitocondriales nucleares.

Las mitocondrias son la fuente primaria de radicales libres y especies de oxígeno reactivo, debido al desbordamiento desde la cadena respiratoria mitocondrial, especialmente cuando los defectos en uno o más componentes de la cadena obstaculizan la transferencia ordenada de electrones desde intermedios metabólicos hacia oxígeno molecular. Para reducir el daño oxidativo, las células compensan expresando proteínas de desacoplamiento mitocondrial (UCP), de las cuales se han identificado varias. La UCP-2 se transcribe en respuesta al daño oxidativo, citocinas inflamatorias o exceso de cargas de lípido, p. ej., hígado graso y esteatohepatitis. Las UCP reducen el desbordamiento de especies de oxígeno reactivo desde las mitocondrias, descargando gradientes de protones por la membrana interna mitocondrial, en efecto gastando la energía producida por metabolismo y tornando las células vulnerables a estrés energético a cambio de la lesión oxidativa reducida.

#### *Desempeño muscular*

En otras realizaciones, la invención considera métodos para mejorar el desempeño muscular, administrando una cantidad eficaz de un compuesto activador de sirtuina. Por ejemplo, los compuestos activadores de sirtuina pueden ser útiles para mejorar la resistencia física (p. ej., la capacidad de realizar una tarea física tal como ejercicio, trabajo físico, actividades deportivas, etc.), inhibiendo o retardando las fatigas físicas, mejorando los niveles de oxígeno en la sangre, mejorando la energía en personas sanas, mejorando la capacidad de trabajo y la resistencia, reduciendo la fatiga muscular, reduciendo el estrés, aumentando la función cardíaca y cardiovascular, mejorando la capacidad sexual, aumentando los niveles de ATP musculares y/o reduciendo el ácido láctico en la sangre. En determinadas realizaciones, los métodos implican administrar una cantidad de un compuesto activador de sirtuina que aumenta la actividad mitocondrial, aumentar la biogénesis mitocondrial y/o aumentar la masa mitocondrial.

El desempeño deportivo se refiere a la capacidad de los músculos del atleta cuando participa en actividades deportivas. Un mayor rendimiento deportivo, fuerza, velocidad y resistencia se miden con un aumento en la fuerza de la contracción muscular, un aumento en la amplitud de la contracción muscular, un acortamiento en el tiempo de reacción del músculo entre la estimulación y la contracción. Atleta se refiere a un individuo que participa en deportes a cualquier nivel y que busca lograr un mejor nivel de fuerza, velocidad y resistencia en su desempeño, como por ejemplo, físico-culturistas, ciclistas, corredores de larga distancia, corredores de corta distancia, etc. Un atleta puede entrenar arduamente, es decir, realizar actividades deportivas intensamente más de tres días por semana o para competencias. Un atleta puede también ser un entusiasta de la gimnasia, que busca mejorar la salud general y el bienestar, mejorar los niveles de energía, entrena durante aproximadamente 1-2 horas alrededor de 3 veces por semana. El aumento del rendimiento deportivo se manifiesta por la capacidad de superar la fatiga muscular, mantener la actividad por periodos de tiempo más extensos y tener un entrenamiento más eficaz.

En el campo del desempeño muscular de un atleta, se desea crear condiciones que permitan la competencia o el entrenamiento a niveles superiores de resistencia por un periodo de tiempo prolongado. No obstante, el uso anaeróbico agudo e intenso de músculos esqueléticos a menudo produce una obstaculización en el rendimiento atlético, con pérdidas de fuerza y energía, mayor inicio de la fatiga muscular, inflamación y disfunción. Se reconoce ahora que incluso una sola sesión de ejercicio exhaustivo, o cualquier traumatismo agudo al cuerpo tal como lesión muscular, resistencia o ejercicio muscular exhaustivo, o cirugía optativa, se caracteriza por metabolismo perturbado que afecta el desempeño muscular tanto en la fase a corto plazo como a largo plazo. Tanto la actividad metabólica/enzimática del músculo como la expresión génica se ven afectadas. Por ejemplo, la ruptura del metabolismo de nitrógeno del músculo esquelético como también la reducción de fuentes de energía metabólica ocurren durante la actividad muscular extensa. Los aminoácidos, incluyendo los aminoácidos de cadena ramificada, se liberan de los músculos seguidos de su desaminación para elevar amoniaco en suero y oxidación local como fuente de combustible muscular, lo que aumenta la acidosis metabólica. Además, hay un deterioro de la eficiencia catalítica de los eventos de contracción del músculo, como también una alteración de las actividades enzimáticas del

metabolismo de nitrógeno y energía. Asimismo, el catabolismo de proteínas se inicia si el índice de síntesis de proteínas se reduce acoplado con un incremento en la degradación de proteína no contraíble. Estos procesos metabólicos van también acompañados de generación de radicales libres, lo que además daña las células musculares.

La recuperación de la fatiga durante el ejercicio agudo y extendido requiere la reversión de factores de fatiga metabólicos y no metabólicos. Los factores conocidos que participan en la fatiga muscular humana, tales como lactato, amoniaco, iones de hidrógeno, etc., proporcionan una explicación incompleta e insatisfactoria del proceso de fatiga/recuperación, y es probable que participen otros agentes desconocidos (Baker et al., J. Appl. Physiol. 74:2294-2300, 1993; Bazzarre et al., J Am. Coll. Nutr. 11:505-511, 1992; Dohm et al., Fed. Proc. 44:348-352, 1985; Edwards en: Biochemistry of Exercise, Proceedings of the Fifth International Symposium on the Biochemistry of Exercise (Kutrgen, Vogel, Poormans, eds.), 1983; MacDougall et al., Acta Physiol. Scand. 146:403-404, 1992; Walser et al., Kidney Int. 32:123-128, 1987). Varios estudios también han analizado los efectos de los complementos nutricionales y los complementos herbales para aumentar el desempeño muscular.

Al margen del desempeño muscular durante el ejercicio de resistencia, los radicales libres y los parámetros de estrés oxidativo se ven afectados en estados patofisiológicos. Un cuerpo sustancial de datos indica ahora que el estrés oxidativo contribuye a la atrofia muscular progresiva en estados patofisiológicos (revisado en Clarkson, P. M. Antioxidants and physical performance. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 35: 31-41; 1995; Powers, S. K.; Lennon, S. L. Analysis of cellular responses to free radicals: Focus on exercise and skeletal muscle. Proc. Nutr. Soc. 58: 1025-1033; 1999). Por ejemplo, con respecto a trastornos musculares en los que tanto la resistencia como la función muscular están compensadas, no se ha implicado la función del óxido nítrico (NO). En distrofias musculares, especialmente aquellas debidas a defectos en proteínas que componen el complejo distrofina-glucoproteína (DGC), se ha asociado a la enzima que sintetiza NO, óxido nítrico sintasa (NOS). Estudios recientes de distrofias relacionadas con defectos DGC indican que un mecanismo de lesión celular es la isquemia funcional relacionada con alteraciones en NOS celular y ruptura de una acción protectora normal de NO. Esta acción protectora es la prevención de isquemia local durante los incrementos inducidos por contracciones en la vasoconstricción simpática. Rando (Microsc Res Tech 55(4):223-35, 2001), ha demostrado que la lesión oxidativa precede a cambios patológicos y que las células de músculo con defectos en DGC tienen mayor susceptibilidad a retos oxidantes. También se demostró que la peroxidación excesiva de lípidos debida a los radicales libres es un factor en enfermedades miopáticas tales como enfermedad de McArdle (Russo et al., Med Hypotheses. 39(2):147-51, 1992). Asimismo, se sabe que la disfunción mitocondrial se correlaciona con la atrofia muscular progresiva relacionada con el envejecimiento (sarcopenia) y se ha sugerido el daño de los radicales libres, aunque se ha investigado poco, como factor contribuyente (revisado en Navarro, A.; Lopez-Cepero, J. M.; Sanchez del Pino, M. L. Front. Biosci. 6: D26-44; 2001). Otras indicaciones incluyen sarcopenia aguda, por ejemplo atrofia muscular y/o caquexia asociada con quemaduras, reposo en cama, inmovilización de una extremidad o cirugía mayor torácica, abdominal y/u ortopédica. Se contempla que los métodos de la presente invención también serán eficaces en el tratamiento de cuadros patológicos relacionados con los músculos.

En determinadas realizaciones, la invención provee nuevas composiciones dietarias que comprenden moduladores de sirtuina, un método para su preparación y un método para usar las composiciones para mejorar el desempeño deportivo. Por consiguiente, se proveen composiciones, alimentos y bebidas terapéuticos que tienen acciones que mejoran la resistencia física y/o inhiben las fatigas físicas de aquellas personas involucradas en ejercicios ampliamente definidos, incluyendo deportes que exigen resistencia, y trabajos físicos que exigen esfuerzo muscular. Dichas composiciones dietarias pueden comprender electrolitos, cafeína, vitaminas, carbohidratos, etc.

*Otros usos*

Los compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina pueden usarse para tratar o prevenir infecciones víricas (como infecciones por gripe, herpes o papilloma virus) o como agentes antifúngicos. En determinadas realizaciones, los compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina pueden administrarse como parte de una terapia de fármacos combinada con otro agente terapéutico para el tratamiento de enfermedades víricas, incluyendo por ejemplo aciclovir, ganciclovir y zidovudina. En otra realización, los compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina pueden administrarse como parte de una terapia de fármacos combinada con otro agente antifúngico, incluyendo por ejemplo, antifúngicos tópicos tales como ciclopirox, clotrimazol, econazol, miconazol, nistatina, oxiconazol, terconazol y tolnaftato, o antifúngicos sistémicos tales como fluconazol (Diflucan), itraconazol (Sporanox), ketoconazol (Nizoral) y miconazol (Monistat I.V.).

Los sujetos que pueden tratarse como se describe en la presente memoria incluyen eucariotas, tales como mamíferos, p. ej., seres humanos, ovinos, equinos, porcinos, caninos, felinos, primates no humanos, ratones y ratas. Las células que pueden tratarse incluyen células eucarióticas, p. ej., de un sujeto descrito anteriormente, o células vegetales, células de levadura y células procarióticas, p. ej., células bacterianas. Por ejemplo, los compuestos moduladores pueden administrarse a animales de granja para mejorar su capacidad de tolerar las condiciones de la granja por más tiempo.

Los compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina pueden también utilizarse para aumentar la vida, la resistencia al estrés y la resistencia a la apoptosis en plantas. En una realización, un compuesto se aplica a plantas, p. ej., en una base periódica, o a hongos. En otra realización, las plantas se modifican genéticamente para producir un compuesto. En otra realización, las plantas y las frutas se tratan con un compuesto antes de cosecharse y enviarse para aumentar la resistencia al daño durante el envío. Las semillas de las plantas pueden también ponerse en contacto con los compuestos descritos en esta memoria, p. ej., para conservarlas.

En otras realizaciones, los compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina pueden utilizarse para modular la vida en células de levadura. Las situaciones en las que puede ser conveniente extender la vida de las células de levadura incluyen cualquier proceso en el que se usa levadura, p. ej., la elaboración de cerveza, yogurt y artículos de panadería, p. ej., pan. El uso de levadura con una vida extendida puede generar menos uso de levadura o puede hacer que la levadura sea más activa por periodos de tiempo más largos. La levadura u otras células mamíferas utilizadas para producir proteínas pueden también tratarse como se describe en la presente memoria.

Los compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina pueden también utilizarse para aumentar la vida, la resistencia al estrés y la resistencia a la apoptosis en insectos. En esta realización, los compuestos se aplicarían a insectos útiles, p. ej., abejas y otros insectos que están implicados en la polinización de las plantas. En una realización específica, un compuesto se aplicaría a abejas implicadas en la producción de miel. En general, los métodos descritos en esta memoria pueden aplicarse a cualquier organismo, p. ej., eucariota, que puede tener importancia comercial. Por ejemplo, pueden aplicarse a peces (acuicultura) y pájaros (p. ej., pollo y aves).

Dosis más altas de los compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina pueden también usarse como pesticida, interfiriendo con la regulación de genes silenciados y con la regulación de apoptosis durante el desarrollo. En esta realización, un compuesto puede aplicarse a plantas usando un método conocido en la técnica que asegure que el compuesto esté biodisponible para larvas de insectos y no para plantas.

Por lo menos en vista de la conexión entre la reproducción y la longevidad (Longo y Finch, Science, 2002), los compuestos moduladores de sirtuina que aumentan el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina pueden aplicarse para efectuar la reproducción de organismos tales como insectos, animales y microorganismos.

#### 4 Ensayos

Incluso otros métodos contemplados en la presente memoria incluyen métodos de cribado para identificar compuestos o agentes que modulan las sirtuinas. Un agente puede ser un ácido nucleico, tal como un aptámero. Los ensayos pueden realizarse en un formato basado en células o libre de células. Por ejemplo, un ensayo puede comprender incubar (o contactar) una sirtuina con un agente de ensayo bajo condiciones en las que una sirtuina puede ser modulada por un agente conocido por modular la sirtuina, y monitorear o determinar el nivel de modulación de la sirtuina en presencia del agente de ensayo en relación con la ausencia del agente de ensayo. El nivel de modulación de una sirtuina puede determinarse determinando su capacidad de desacetilar un sustrato. Los sustratos ilustrativos son péptidos acetilados que pueden obtenerse de BIOMOL (Plymouth Meeting, PA). Los sustratos preferidos incluyen péptidos de p53, tales como aquellos que comprenden un K382 acetilado. Un sustrato particularmente preferido es Fluor de Lys-SIRT1 (BIOMOL), es decir, el péptido acetilado Arg-His-Lys-Lys. Otros sustratos son péptidos de las histonas humanas H3 y H4 o un aminoácido acetilado. Los sustratos pueden ser fluorogénicos. La sirtuina puede ser SIRT1, Sir2, SIRT3, o sus porciones. Por ejemplo, SIRT1 recombinante puede obtenerse de BIOMOL. La reacción puede llevarse a cabo durante aproximadamente 30 minutos y detenerse, p. ej., con nicotinamida. El kit de descubrimiento de ensayos/fármacos de actividad fluorescente HDAC (AK-500, BIOMOL Research Laboratories) puede usarse para determinar el nivel de acetilación. Se describen ensayos similares en Bitterman et al. (2002) J. Biol. Chem. 277:45099. El nivel de modulación de la sirtuina en un ensayo puede compararse con el nivel de modulación de la sirtuina en presencia de uno o más compuestos (separada o simultáneamente) descritos en la presente invención, que pueden servir como controles positivos o negativos. Las sirtuinas para uso en los ensayos pueden ser proteínas sirtuina de longitud total o sus porciones. Dado que se ha demostrado en este documento que los compuestos activadores parecen interactuar con el término N de SIRT1, las proteínas para uso en los ensayos incluyen porciones N-terminales de sirtuinas, p. ej., aproximadamente 1-176 o 1-255 aminoácidos de SIRT1; aproximadamente 1-174 o 1-252 aminoácidos de Sir2.

En una realización, un ensayo de cribado comprende (i) contactar una sirtuina con un agente de ensayo y un sustrato acetilado bajo condiciones apropiadas para que la sirtuina desacetile el sustrato en ausencia del agente de ensayo ; y (ii) determinar el nivel de acetilación del sustrato, donde un nivel inferior de acetilación del sustrato en presencia del agente de ensayo en relación con la ausencia del agente de ensayo indica que el agente de ensayo estimula la desacetilación por parte de la sirtuina, mientras que un nivel mayor de acetilación del sustrato en presencia del agente de ensayo en relación con la ausencia del agente de ensayo indica que el agente de ensayo inhibe la desacetilación por parte de la sirtuina.

Los métodos para identificar un agente que modula, p. ej., estimula o inhibe, las sirtuinas *in vivo* puede comprender (i) contactar una célula con un agente de ensayo y un sustrato capaz de ingresar en una célula en presencia de un inhibidor HDAC de clase I y de clase II bajo condiciones apropiadas para que la sirtuina desacetile el sustrato en ausencia del agente de ensayo ; y (ii) determinar el nivel de acetilación del sustrato, donde un nivel inferior de acetilación del sustrato en presencia del agente de ensayo en relación con ausencia del agente de ensayo indica que el agente de ensayo estimula la desacetilación por parte de la sirtuina, mientras que un nivel mayor de acetilación del sustrato en presencia del agente de ensayo en relación con ausencia del agente de ensayo indica que el agente de ensayo inhibe la desacetilación por parte de la sirtuina. Un sustrato preferido es un péptido acetilado, que es también preferiblemente fluorogénico, como se describe en más detalle en este documento. El método comprende además lisar las células para determinar el nivel de acetilación del sustrato. Los sustratos pueden añadirse a las células en una concentración que oscila entre aproximadamente 1  $\mu\text{M}$  y aproximadamente 10mM, preferiblemente entre aproximadamente 10 $\mu\text{M}$  y 1mM, incluso más preferiblemente entre aproximadamente 100 $\mu\text{M}$  y 1mM, tal como aproximadamente 200 $\mu\text{M}$ . Un sustrato preferido es una lisina acetilada, p. ej.,  $\epsilon$ -acetil lisina (Fluor de Lys, FdL) o Fluor de Lys-SIRT1. Un inhibidor preferido de HDAC de clase I y de clase II es tricostatina A (TSA), que puede usarse a concentraciones que oscilan entre aproximadamente 0,01 y 100 $\mu\text{M}$ , preferiblemente entre aproximadamente 0,1 y 10 $\mu\text{M}$ , tal como 1 $\mu\text{M}$ . La incubación de células con el compuesto de ensayo y el sustrato puede realizarse durante aproximadamente 10 minutos hasta 5 horas, preferiblemente durante aproximadamente 1-3 horas. Ya que TSA inhibe todos los HDAC de clase I y de clase II, y que ciertos sustratos, p. ej., Fluor de Lys, son deficientes para SIRT2 e incluso peores para SIRT3-7, dicho ensayo puede usarse para identificar moduladores de SIRT1 *in vivo*.

#### 5. Composiciones farmacéuticas

Los compuestos moduladores de sirtuina descritos en esta memoria pueden formularse en un modo convencional usando uno o más vehículos o excipientes fisiológicamente aceptables. Por ejemplo, los compuestos moduladores de sirtuina y sus sales y solvatos fisiológicamente aceptables pueden formularse para administración, por ejemplo, por inyección (p. ej., SubQ, IM, IP), inhalación o insuflación ( bien por boca o nariz) o administración oral, bucal, sublingual, transdérmica, nasal, parenteral o rectal. En una realización, un compuesto modulador de sirtuina puede administrarse localmente, en el sitio donde están presentes las células diana, es decir, en un tejido, órgano o fluido específico (p. ej., sangre, líquido cefalorraquídeo, etc.).

Los compuestos moduladores de sirtuina pueden formularse para una diversidad de modos de administración, incluyendo la administración sistémica y tópica o localizada. Las técnicas y formulaciones en general se pueden hallar en Remington's Pharmaceutical Sciences, Meade Publishing Co., Easton, PA. Para administración parenteral, se prefiere una inyección, que puede ser intramuscular, intravenosa, intraperitoneal y subcutánea. Para inyección, los compuestos pueden formularse en disoluciones líquidas, preferiblemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como disolución de Hank o disolución de Ringer. Además, los compuestos pueden formularse en forma sólida y redisolverse o suspenderse inmediatamente antes del uso. También se incluyen las formas liofilizadas.

Para la administración oral, las composiciones farmacéuticas pueden tomar la forma, por ejemplo, de comprimidos, grageas o cápsulas preparados por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como agentes aglomerantes (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa); agentes de carga (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina o hidrógeno-fosfato de calcio); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco o sílice); disgregantes (por ejemplo, almidón de patata o almidón glicolato de sodio); o agentes humectantes (por ejemplo, laurilsulfato de sodio). Los comprimidos se pueden revestir de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica. Las preparaciones líquidas para la administración oral pueden tener la forma, por ejemplo, de disoluciones, jarabes o suspensiones, o se pueden presentar como un producto seco para su constitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Dichas preparaciones líquidas pueden prepararse por medios convencionales con aditivos aceptables farmacéuticamente, tales como agentes de suspensión (por ejemplo, jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas comestibles hidrogenadas); agentes emulsionantes (por ejemplo, lecitina o goma arábiga); vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendras, ésteres oleosos, alcohol etílico o aceites vegetales fraccionados); y conservantes (por ejemplo, metil- o propil-p-hidroxibenzoatos o ácido sórbico). Las preparaciones también pueden contener sales de tamponamiento, agentes de sabor, color y edulcorantes según sea adecuado. Las preparaciones para administración oral se pueden formular adecuadamente para dar liberación controlada del compuesto activo.

Para la administración por inhalación (p. ej., administración pulmonar), los compuestos moduladores de sirtuina pueden administrarse convenientemente en forma de una presentación de pulverización de aerosol desde envases presurizados o desde un nebulizador, con el uso de un propulsor adecuado, por ejemplo diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para administrar una cantidad medida. Las cápsulas y los cartuchos de, por ejemplo, gelatina para uso en un inhalador o insuflador se pueden formular para que contengan una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

Los compuestos moduladores de sirtuina pueden formularse para administración parenteral por inyección, p. ej., inyección intravenosa rápida o infusión continua. Las formulaciones para inyectables se pueden presentar en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas, o en recipientes multidosis con un conservante añadido. Las composiciones pueden tomar formas tales como suspensiones, soluciones, o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para reconstituirlo con un vehículo adecuado, p.ej. agua estéril apirogénica, antes de su uso.

Los compuestos moduladores de sirtuina también pueden formularse en composiciones rectales tales como supositorios o enemas de retención, que contienen por ejemplo bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

Además de las formulaciones previamente descritas, los compuestos moduladores de sirtuina también se pueden formular en forma de una preparación de depósito. Tales formulaciones de larga acción pueden administrarse por implantación (por ejemplo por vía subcutánea o intramuscular) o por inyección intramuscular. Así, por ejemplo, los compuestos moduladores de sirtuina pueden formularse con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo como una emulsión en un aceite aceptable) o con resinas de intercambio iónico, o como derivados muy poco solubles, por ejemplo, como una sal muy poco soluble. La fórmula de liberación controlada también incluye parches.

En determinadas realizaciones, los compuestos descritos en esta memoria pueden formularse para administración al sistema nervioso central (SNC) (revisado en Begley, *Pharmacology & Therapeutics* 104: 29-45 (2004)). Los planteamientos convencionales para administración de fármacos al SNC incluyen: estrategias neuroquirúrgicas (p. ej., inyección intracerebral o infusión intracerebroventricular); manipulación molecular del agente (p. ej., producción de una proteína de fusión química que comprende un péptido de transporte que tiene afinidad hacia una molécula de superficie de células endoteliales en combinación con un agente que es por sí mismo capaz de cruzar el BBB) en un intento de explotar una de las rutas de transporte endógeno del BBB; las estrategias farmacológicas diseñadas para aumentar la solubilidad de los lípidos de un agente (p. ej., conjugación de agentes solubles en agua a vehículos de colesterol o lípido); y la ruptura transitoria de la integridad del BBB por ruptura hiperosmótica (que resulta de la infusión de disolución de manitol en la arteria carótida o el uso de un agente biológicamente activo tal como un péptido de angiotensina).

Una posibilidad para lograr la cinética de liberación sostenida es embeber o encapsular el compuesto activo en nanopartículas. Las nanopartículas pueden administrarse como polvo, como una mezcla de polvo con excipientes añadidos, o como suspensiones. Las suspensiones coloidales de nanopartículas pueden administrarse fácilmente a través de una cánula con un diámetro pequeño.

Las nanopartículas son partículas con un diámetro de aproximadamente 5 nm a aproximadamente 1000 nm. El término "nanopartículas", tal como se emplea en lo sucesivo, se refiere a partículas formadas por una matriz polimérica en la que se dispersa el compuesto activo, también conocidas como "nanoesferas", y también se refiere a nanopartículas que están compuestas por un núcleo que contiene el compuesto activo, rodeado de una membrana polimérica, también conocida como "nanocápsulas". En determinadas realizaciones, se prefieren las nanopartículas que tienen un diámetro de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 500 nm, en particular de aproximadamente 100 nm a aproximadamente 200 nm.

Las nanopartículas se pueden preparar por polimerización *in situ* de monómeros dispersados o usando polímeros preformados. Ya que los polímeros que se preparan *in situ*, con frecuencia no son biodegradables y/o contienen subproductos muy tóxicos, se prefieren los polímeros preformados. Las nanopartículas de polímeros preformados pueden prepararse por técnicas diferentes, p. ej., por evaporación en emulsión, desplazamiento de disolvente, remoción de sales, molienda mecánica, microprecipitación y por difusión de emulsificación.

Con los métodos anteriormente descritos, las nanopartículas pueden formarse con diversos tipos de polímeros. Para uso en el método de la presente invención, se prefieren las nanopartículas hechas a partir de polímeros biocompatibles. El término "biocompatible" se refiere a material que después de la introducción en un entorno biológico no tiene efectos importantes para el entorno biológico. De los polímeros biocompatibles se prefieren especialmente aquellos polímeros que son también biodegradables. El término "biodegradable" se refiere a material que después de la introducción en un entorno biológico se degrada enzimática o químicamente en moléculas más pequeñas, que pueden posteriormente eliminarse. Los ejemplos son poliésteres de ácidos hidroxicarboxílicos tales como ácido poli(láctico) (PLA), ácido poli(glicólico) (PGA), policaprolactona (PCL), copolímeros de ácido láctico y ácido glicólico (PLGA), copolímeros de ácido láctico y caprolactona, poliepsilon caprolactona, polihidroxi ácido butírico y poli(orto)ésteres, poliuretanos, polianhídridos, poliactetales, polidihidropiranos, policianoacrilatos, polímeros naturales tales como alginato y otros polisacáridos, incluidos dextrano y celulosa, colágeno y albúmina.

Los modificadores de superficie adecuados pueden preferiblemente seleccionarse entre excipientes farmacéuticos orgánicos e inorgánicos conocidos. Dichos excipientes incluyen varios polímeros, oligómeros de bajo peso molecular, productos naturales y tensioactivos. Los modificadores de superficie preferidos incluyen tensioactivos no iónicos y iónicos. Los ejemplos representativos de modificadores de superficie incluyen gelatina, caseína, lecitina

(fosfatidas), goma acacia, colesterol, tragacanto, ácido esteárico, cloruro de benzalconio, estearato de calcio, glicerol monoestearato, alcohol cetoestearílico, cera emulsionante cetomacrogol, ésteres de sorbitán, éteres de polioxietilenoalquilo, p. ej., ésteres de macrogol tales como cetomacrogol 1000, derivados de aceite de ricino y polioxietileno, ésteres de ácido graso polioxietileno sorbitán, p. ej., los polietilenglicoles comercializados Tweens<sup>TM</sup>, estearatos de polioxietileno, dióxido de silicio coloidal, fosfatos, dodecilsulfato sódico, carboximetilcelulosa de calcio, carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa, celulosa no cristalina, silicato de magnesio y aluminio, trietanolamina, alcohol polivinílico y polivinilpirrolidona (PVP). La mayoría de estos modificadores de superficie se conocen como excipientes farmacéuticos y se describen en detalle en Handbook of Pharmaceutical Excipients, publicado conjuntamente con American Pharmaceutical Association y con The Pharmaceutical Society of Great Britain, the Pharmaceutical Press, 1986.

Se puede hallar otra descripción sobre cómo preparar nanopartículas, por ejemplo, en la patente estadounidense núm. 6.264.922.

Los liposomas son otro sistema de administración de fármacos que es fácilmente inyectable. Por ende, en el método de la invención los compuestos activos pueden también administrarse en la forma de un sistema de administración de liposomas. El experto en la técnica conoce los liposomas. Los liposomas pueden formarse a partir de una diversidad de fosfolípidos tales como colesterol, estearilamina o fosfatidilcolinas. Los liposomas utilizables para el método de la invención abarcan todos los tipos de liposomas, incluyendo sin limitación, vesículas unilamelares pequeñas, vesículas unilamelares grandes y vesículas multilamelares.

Los liposomas se utilizan para una diversidad de propósitos terapéuticos y, en particular, para transportar agentes terapéuticos hacia las células diana. Ventajosamente, las formulaciones de fármacos con liposomas ofrecen el potencial de propiedades de administración de fármacos mejoradas, que incluyen, por ejemplo, la liberación controlada del fármaco. A menudo se necesita una extensión del tiempo de circulación para que los liposomas alcancen una región, célula o sitio diana. En particular, esto es necesario cuando la región, célula o sitio diana no está situada cerca del sitio de administración. Por ejemplo, cuando los liposomas se administran sistémicamente, es conveniente recubrir los liposomas con un agente hidrófilo, por ejemplo, un recubrimiento de cadenas de polímero hidrófilo tal como polietilenglicol (PEG) para extender el tiempo de circulación en la sangre de los liposomas. Dichos liposomas de superficie modificada comúnmente se denominan liposomas "de larga circulación" o "estéricamente estabilizados".

Una modificación de superficie a un liposoma es la unión de cadenas de PEG, típicamente que tienen un peso molecular de aproximadamente 1000 daltons (Da) a aproximadamente 5000 Da, y hasta aproximadamente 5 por ciento en moles (%) de los lípidos que componen los liposomas (véase, por ejemplo, Stealth Liposomes, CRC Press, Lasic, D. and Martin, F., eds., Boca Raton, Fla., (1995)), y referencias allí citadas. La farmacocinética exhibida por dichos liposomas se caracteriza por una reducción dependiente de la dosis en la absorción de los liposomas por el hígado y el bazo mediante el sistema de fagocitos mononucleares (MPS), y un tiempo de circulación en la sangre significativamente prolongado, en comparación con liposomas sin modificación de superficie, que tienden a eliminarse rápidamente de la sangre y acumularse en el hígado y el bazo.

En determinadas realizaciones, el complejo se protege para aumentar la semivida circulatoria del complejo, o se protege para aumentar la resistencia de ácido nucleico a degradación, por ejemplo, degradación por nucleasas.

Tal como se emplea en la presente memoria, "proteger" y sus cognados tales como "protegido", se refiere a la capacidad de "los restos protectores" de reducir la interacción no específica de los complejos descritos en la presente memoria con complemento sérico o con otras especies presentes en suero *in vitro* o *in vivo*. Los restos protectores pueden reducir la interacción o la unión a estas especies a través de uno o más mecanismos, por ejemplo, interacciones electrónicas no específicas o estéricas no específicas. Los ejemplos de dichas interacciones incluyen interacciones electrostáticas no específicas, interacciones de carga, interacciones Van der Waals, obstaculización estérica y similares. Para que un resto actúe como resto protector, el mecanismo o los mecanismos mediante los cuales puede reducir la interacción, la asociación o la unión con el complemento de suero u otras especies no tiene que ser identificado. Uno puede determinar si un resto puede actuar como un resto protector, determinando si o hasta qué punto un complejo se une a especies séricas.

Cabe destacar que los "restos protectores" pueden ser multifuncionales. Por ejemplo, un resto protector puede funcionar como, por ejemplo, un factor diana. Un resto protector puede también denominarse multifuncional con respecto al mecanismo(s) mediante el cual protege al complejo. Sin desear estar limitados por el mecanismo o la teoría propuestos, los ejemplos de dicho resto protector multifuncional son polímeros sintéticos de ruptura de membrana endosomal sensibles al pH, tales como PPAA o PEAA. Se ha demostrado que ciertos ácidos poli(alquilacrílicos) rompen las membranas endosomales, mientras dejan la membrana de la superficie celular externa intacta (Stayton et al. (2000) J. Controll. Release 65:203-220; Murthy et al. (1999) J. Controll. Release 61:137-143; WO 99/34831), aumentando así la biodisponibilidad celular y funcionando como factor diana. No obstante, PPAA reduce la unión del complemento de suero a los complejos en los que se incorpora, funcionando así como resto protector.

Otro modo de producir una formulación, particularmente una disolución, de un modulador de sirtuina tal como resveratrol o su derivado, es a través del uso de ciclodextrina. Por ciclodextrina se entiende  $\alpha$ -,  $\beta$ -, o  $\gamma$ -ciclodextrina. Las ciclodextrinas se describen en detalle en Pitha et al., patente estadounidense núm. 4.727.064, que se incorpora a la presente memoria por referencia. Las ciclodextrinas son oligómeros cíclicos de glucosa; estos compuestos forman complejos de inclusión con cualquier fármaco cuya molécula puede caber en las cavidades en búsqueda de lipófilos de la molécula de ciclodextrina.

La ciclodextrina de las composiciones de acuerdo con la invención puede ser  $\alpha$ -,  $\beta$ -, o  $\gamma$ -ciclodextrina. La  $\alpha$ -ciclodextrina contiene seis unidades de glucopiranosas; La  $\beta$ -ciclodextrina contiene siete unidades de glucopiranosas; y la  $\gamma$ -ciclodextrina contiene ocho unidades de glucopiranosas. Se cree que la molécula forma un cono truncado que tiene una apertura de núcleo de 4,7-5,3 angstroms, 6,0-6,5 angstroms, y 7,5-8,3 angstroms en  $\alpha$ -,  $\beta$ - o  $\gamma$ -ciclodextrina, respectivamente. La composición de acuerdo con la invención puede comprender una mezcla de dos o más de las  $\alpha$ -,  $\beta$ - o  $\gamma$ -ciclodextrinas. Típicamente, no obstante, la composición de acuerdo con la invención comprenderá solamente una de las  $\alpha$ -,  $\beta$ - o  $\gamma$ -ciclodextrinas.

Las ciclodextrinas más preferidas en las composiciones de acuerdo con la invención son compuestos de ciclodextrinas amorfas. Por ciclodextrina amorfa se entiende mezclas no cristalinas de ciclodextrinas donde la mezcla se prepara a partir de  $\alpha$ -,  $\beta$ - o  $\gamma$ -ciclodextrina. En general, la ciclodextrina amorfa se prepara por alquilación no selectiva de la especie de ciclodextrina deseada. Los agentes de alquilación adecuados para este propósito incluyen, aunque sin limitarse a ello, óxido de propileno, glicidol, yodoacetamida, cloroacetato y 2-dietilaminoetilcloruro. Las reacciones se llevan a cabo para producir mezclas que contengan una pluralidad de componentes, previniendo así la cristalización de la ciclodextrina. Se pueden preparar diversas ciclodextrinas alquiladas y, por supuesto, variarán dependiendo de la especie de inicio de la ciclodextrina y del agente alquilante que se emplee. Entre las ciclodextrinas amorfas adecuadas para composiciones de acuerdo con la invención se encuentran hidroxipropilo, hidroxietilo, glucosilo, maltosilo y derivados de maltotriosilo de  $\beta$ -ciclodextrina, carboxiamidometil- $\beta$ -ciclodextrina, carboximetil- $\beta$ -ciclodextrina, hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina y dietilamino- $\beta$ -ciclodextrina.

Un ejemplo de resveratrol disuelto en presencia de una ciclodextrina se provee en Marier et al., J. Pharmacol. Exp. Therap. 302:369-373 (2002), donde una disolución de 6 mg/mL de resveratrol se preparó usando disolución salina al 0,9% que contiene 20% de hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina.

Como se mencionó anteriormente, las composiciones de la invención comprenden una preparación acuosa de ciclodextrina amorfa preferiblemente sustituida y uno o más moduladores de sirtuina. Las cantidades relativas de moduladores de sirtuina y ciclodextrina variarán dependiendo de la cantidad relativa de cada uno de los moduladores de sirtuina y del efecto de la ciclodextrina sobre el compuesto. En general, la relación en peso del compuesto de los moduladores de sirtuina al peso del compuesto de ciclodextrina oscilará entre 1:1 y 1:100. Se cree que una relación en peso a peso en un intervalo de 1:5 a 1:50 y más preferiblemente en un intervalo de 1:10 a 1:20 del compuesto seleccionado a partir de los moduladores de sirtuina a ciclodextrina es la más eficaz para aumentar la disponibilidad circulante del modulador de sirtuina.

Cabe destacar que si la disolución acuosa que comprende los moduladores de sirtuina y una ciclodextrina se va a administrar parenteralmente, especialmente vía ruta intravenosa, una ciclodextrina estará sustancialmente libre de contaminantes pirogénicos. Se pueden adquirir diversas formas de ciclodextrina, tales como formas de ciclodextrina amorfa, de una serie de proveedores, incluyendo Sigma-Aldrich, Inc. (St. Louis, Mo., EE. UU.). Un método para la producción de hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina se describe en Pitha et al., patente estadounidense núm. 4.727.064.

La descripción adicional del uso de ciclodextrina para solubilizar compuestos puede hallarse en el documento US 2005/0026849.

Las formas de dosificación de rápida desintegración o disolución son útiles para la absorción rápida, particularmente la absorción bucal y sublingual de agentes farmacéuticamente activos. Las formas de dosificación de rápida disolución son beneficiosas para los pacientes, como pacientes de edad avanzada o pacientes pediátricos, que tienen dificultad para deglutir las típicas formas de dosificación sólidas, como comprimidos y comprimidos oblongos. Además, las formas de dosificación de disolución rápida superan desventajas asociadas con, por ejemplo, las formas de dosificación masticables, donde la longitud de tiempo en que un agente activo permanece en la boca del paciente cumple una función importante en determinar la cantidad de enmascaramiento del sabor y el grado al cual el paciente puede objetar aspereza en la garganta del agente activo.

Para superar dichos problemas, los fabricantes han desarrollado una serie de formulaciones orales de dosis sólidas de disolución rápida. Se encuentran disponibles de los fabricantes, incluidos Cima Labs, Fuisz Technologies Ltd., Prographarm, R. P. Scherer, Yamanouchi-Shaklee, y McNeil-PPC, Inc. Todos estos fabricantes comercializan diferentes tipos de formas de dosificación sólidas que se disuelven rápidamente. Véanse p. ej., las patentes y publicaciones de Cima Labs tales como las patentes estadounidenses núm. 5.607.697, 5.503.846, 5.223.264, 5.401.513, 5.219.574 y 5.178.878, WO 98/46215, WO 98/14179; las patentes para Fuisz Technologies, ahora parte de BioVail, tales como patentes estadounidenses núm. 5.871.781, 5.869.098, 5.866.163, 5.851.553, 5.622.719, 5.567.439 y 5.587.172; patente estadounidense núm.

5.464.632 para Prographarm; patentes para R. P. Scherer tales como patentes estadounidenses núm. 4.642.903, 5.188.825, 5.631.023 y 5.827.541; patentes para Yamanouchi-Shaklee tales como patentes estadounidenses núm. 5.576.014 y 5.446.464; patentes para Janssen tales como patentes estadounidenses núm. 5.807.576, 5.635.210, 5.595.761, 5.587.180 y 5.776.491; patentes estadounidenses núm. 5.639.475 y 5.709.886 para Eurand America, Inc.; patentes estadounidenses núm. 5.807.578 y 5.807.577 para L.A.B. Pharmaceutical Research; patentes para Schering Corporation tales como patentes estadounidenses núm. 5.112.616 y 5.073.374; patente estadounidense núm. 4.616.047 para Laboratoire L. LaFon; patente estadounidense núm. 5.501.861 para Takeda Chemicals Inc., Ltd.; y patente estadounidense núm. 6.316.029 para Elan.

10 En un ejemplo de preparación de un comprimido de disolución rápida, los gránulos para comprimidos de disolución rápida preparados por procedimientos de secado por atomización o pre-compactación se mezclan con excipientes y se comprimen en comprimidos usando maquinaria convencional para preparación de comprimidos. Los gránulos pueden combinarse con una diversidad de vehículos, incluyendo sacáridos de baja densidad y alta moldeabilidad, sacáridos de baja moldeabilidad, combinaciones de polioles, y luego comprimirse directamente en un comprimido que exhiba un mejor perfil de disolución y desintegración.

15 Los comprimidos de acuerdo con la presente invención típicamente tienen una dureza de aproximadamente 2 a aproximadamente 6 unidades Strong-Cobb (scu). Los comprimidos dentro de este intervalo de dureza se desintegran o disuelven rápidamente al masticarlos. Adicionalmente, los comprimidos se desintegran rápidamente en agua. En promedio, un comprimido típico de 1,1 a 1,5 gramos se desintegra en 1-3 minutos sin agitar. Esta rápida desintegración facilita la administración del material activo.

20 Los gránulos utilizados para preparar comprimidos pueden ser, por ejemplo, mezclas de carbohidratos o sales de metal alcalino térreo de baja densidad. Por ejemplo, una mezcla de sales de metal alcalino térreo incluye una combinación de carbonato cálcico e hidróxido de magnesio. De modo similar, un comprimido de disolución rápida puede prepararse de acuerdo con los métodos de la presente invención, que incorpora el uso de A) carbonato cálcico/maltodextrina extra liviana secada por atomización, B) hidróxido de magnesio y C) una combinación de polioles eutéctica que incluye Sorbitol Instant, xilitol y manitol. Estos materiales se han combinado para producir un comprimido de baja densidad que se disuelve muy rápidamente y promueve la desintegración rápida del ingrediente activo. Además pueden combinarse gránulos pre-compactados y secados por atomización en el mismo comprimido.

25 Para preparación de un comprimido de disolución rápida, un modulador de sirtuina útil en la presente invención puede tener la forma particulada, granular, cristalina, oleosa o de disolución. El modulador de sirtuina para uso en la presente invención puede ser un producto secado por atomización o un adsorbato que haya sido pre-compactado hasta una forma granular más dura que reduzca el gusto a medicamento. Un ingrediente activo farmacéutico para uso en la presente invención puede ser secado por atomización con un vehículo que prevenga que el ingrediente activo sea fácilmente extraído del comprimido al masticar.

30 Además de añadirse directamente a los comprimidos de la presente invención, el fármaco propiamente dicho puede ser procesado mediante el proceso de pre-compactación para lograr una mayor densidad antes de incorporarse a la formulación.

35 El proceso de pre-compactación utilizado en la presente invención puede usarse para administrar materiales farmacéuticos poco solubles, de modo tal de mejorar la liberación de dichos materiales farmacéuticos frente a las formas de dosificación tradicionales. Esto podría permitir el uso de niveles de dosificación inferiores para administrar niveles biodisponibles equivalentes de fármaco y reducir así los niveles de toxicidad de ambas entidades químicas nuevas y comercializadas. Los materiales farmacéuticos poco solubles pueden usarse en la forma de nanopartículas, que son partículas del tamaño de un nanómetro.

40 Además del ingrediente activo y de los gránulos preparados a partir de sales de metal alcalino térreo de baja densidad y/o carbohidratos hidrosolubles, los comprimidos de disolución rápida pueden formularse usando vehículos o excipientes convencionales y técnicas farmacéuticas consolidadas. Los vehículos o excipientes convencionales incluyen, aunque sin limitarse a ello, diluyentes, aglutinantes, adhesivos (es decir, derivados de celulosa y derivados acrílicos), lubricantes (es decir, estearato de magnesio o calcio, aceites vegetales, polietilenglicoles, talco, laurilsulfato sódico, monoestearato de polioxietileno), desintegrantes, colorantes, saporíferos, conservantes, edulcorantes y materiales varios tales como tampones y adsorbentes.

45 Se puede hallar una descripción adicional de la preparación de comprimidos de disolución rápida, por ejemplo, en la patente estadounidense núm. 5.939.091.

50 Las composiciones farmacéuticas (incluyendo preparaciones osmóticas) pueden comprender entre aproximadamente 0,00001 y 100%, tal como entre 0,001 y 10% o entre 0,1% y 5% en peso de uno o más de los compuestos moduladores de sirtuina descritos en la presente memoria.

55 En una realización, un compuesto modulador de sirtuina descrito en esta memoria se incorpora a una formulación tópica que contiene un vehículo tópico que es en general adecuado para administración tópica de un fármaco y que comprende cualquiera de dichos materiales conocidos en la técnica. El vehículo tópico puede seleccionarse como para proporcionar la composición en la forma deseada, p. ej., como un ungüento, loción, crema, microemulsión, gel,

aceite, disolución o similar, y puede estar comprendido por un material de origen natural o sintético. Es preferible que el vehículo seleccionado no afecte adversamente al agente activo u otros componentes de la formulación tópica. Los ejemplos de vehículos tópicos adecuados incluyen agua, alcoholes y otros disolventes orgánicos no tóxicos, glicerina, aceite mineral, silicona, vaselina, lanolina, ácidos grasos, aceites vegetales, ceras y similares.

Las formulaciones pueden ser ungüentos, lociones, cremas, microemulsiones y geles incoloros e inoloros.

Los compuestos moduladores de sirtuina pueden incorporarse en ungüentos, que en general son preparaciones semisólidas típicamente basadas en vaselina o derivados de vaselina. La base del ungüento específica para usar, como apreciarán los expertos en la técnica, es una que proporciona óptima administración del fármaco y, preferiblemente, provee también otras características deseadas, p. ej., emoliencia o similares. Al igual que con otros vehículos, una base de ungüento debe ser inerte, estable, no irritante y no sensibilizante. Como se explica en Remington's (*supra*) las bases de ungüento pueden agruparse en cuatro clases: bases oleaginosas; bases emulsionantes; bases en emulsión; y bases hidrosolubles. Las bases de ungüento oleaginosas incluyen, por ejemplo, aceites vegetales, grasas obtenidas de animales e hidrocarburos semisólidos obtenidos del petróleo. Las bases de ungüento emulsionantes, también conocidas como bases de ungüento absorbentes, contienen poca agua o no contienen agua e incluyen, por ejemplo, sulfato de hidroxistearina, lanolina anhidra y vaselina hidrófila. Las bases de ungüento en emulsión son o bien emulsiones agua en aceite (W/O) o emulsiones aceite en agua (O/W) e incluyen, por ejemplo, alcohol cetílico, gliceril monostearato, lanolina y ácido esteárico. Las bases de ungüento hidrosolubles ilustrativas se preparan a partir de polietilenglicoles (PEG) de peso molecular variable; de nuevo, se puede consultar Remington's, *supra*, para mayor información.

Los compuestos activadores de sirtuina pueden incorporarse en lociones, que en general son preparaciones para aplicar a la superficie de la piel sin fricción, y son preparaciones típicamente líquidas o semilíquidas en las que las partículas sólidas, incluyendo el agente activo, están presentes en una base de agua o alcohol. Las lociones son usualmente suspensiones de sólidos, y pueden comprender una emulsión oleosa líquida del tipo aceite en agua. Las lociones son formulaciones preferidas para tratar grandes áreas corporales, debido a la facilidad de aplicación de una composición más fluida. En general es necesario que la materia insoluble en una loción sea finamente dividida. Las lociones típicamente contendrán agentes de suspensión para producir mejores dispersiones como también compuestos útiles para localizar y sostener el agente activo en contacto con la piel, p. ej., metilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica o similar. Una loción ilustrativa para uso junto con el presente método contiene propilenglicol mezclado con una vaselina hidrófila tal como aquella que se puede obtener con la marca Aquaphor<sup>RTM</sup> de Beiersdorf, Inc. (Norwalk, Conn.).

Los compuestos moduladores de sirtuina pueden incorporarse en cremas, que en general son emulsiones líquidas o semisólidas viscosas, o bien aceite en agua o agua en aceite. Las bases en crema son lavables en agua y contienen una fase oleosa, un emulsionante y una fase acuosa. La fase oleosa en general está compuesta por vaselina y un alcohol graso tal como alcohol cetílico o estearílico; la fase acuosa usualmente, aunque no necesariamente, excede la fase oleosa en volumen, y en general contiene un humectante. El emulsionante en una formulación de crema, como se explica en Remington's, *supra*, en general es un tensioactivo no iónico, aniónico, catiónico o anfótero.

Los compuestos moduladores de sirtuina pueden incorporarse a microemulsiones, que en general son dispersiones termodinámicamente estables, isotrópicamente transparentes de dos líquidos inmiscibles, tal como aceite y agua, estabilizados por una película interfacial de moléculas de tensioactivo (Encyclopedia of Pharmaceutical Technology (Nueva York: Marcel Dekker, 1992), volumen 9). Para la preparación de microemulsiones, el tensioactivo (emulsionante), cotensioactivo (coemulsionante), una fase oleosa y una fase acuosa son necesarios. Los tensioactivos adecuados incluyen cualquier tensioactivo útil en la preparación de emulsiones, p. ej., emulsionantes típicamente utilizados en la preparación de cremas. El co-tensioactivo (o "co-emulsionante") en general se selecciona del grupo de derivados de poliglicerol, derivados de glicerol y alcoholes grasos. Las combinaciones emulsionante/co-emulsionante preferidas son en general, aunque no necesariamente, seleccionadas del grupo que consiste en: gliceril monostearato y polioxietileno-estearato; polietilenglicol y etilenglicol palmitoestearato; y triglicéridos caprílicos y cápricos y oleoil macroglicéridos. La fase acuosa incluye no solamente agua, sino también típicamente tampones, glucosa, propilenglicol, polietilenglicoles, preferiblemente polietilenglicoles de peso molecular inferior (p. ej., PEG 300 y PEG 400), y/o glicerol y similares, mientras que la fase oleosa en general comprenderá, por ejemplo, ésteres de ácido graso, aceites vegetales modificados, aceites de silicona, mezclas de mono- di- y triglicéridos, mono- y di-ésteres de PEG (p. ej., . oleoil macroglicéridos), etc.

Los compuestos moduladores de sirtuina pueden incorporarse a formulaciones en gel que en general son sistemas semisólidos que consisten en suspensiones compuestas por pequeñas partículas inorgánicas (sistemas bifásicos) o grandes moléculas orgánicas distribuidas sustancialmente de manera uniforme por un vehículo (geles monofásicos). Los geles monofásicos pueden prepararse, por ejemplo, combinando el agente activo, un vehículo líquido y un agente de gelificación adecuado tal como tragacanto (a 2 - 5%), alginato sódico (a 2-10%), gelatina (a 2-15%), metilcelulosa (a 3-5%), carboximetilcelulosa sódica (a 2-5%), carbómero (a 0.3-5%) o alcohol polivinílico (a 10-20%) juntos y mezclando hasta producir un producto semisólido característico. Otros agentes de gelificación adecuados incluyen metilhidroxilcelulosa, polioxietileno-polioxipropileno, hidroxietilcelulosa y gelatina. Si bien los geles comúnmente emplean vehículos acuosos líquidos, también pueden usarse alcoholes y aceites como el vehículo líquido.

Pueden incluirse diversos aditivos, conocidos por el experto en la técnica, en formulaciones, p. ej., formulaciones tópicas. Los ejemplos de aditivos incluyen, aunque sin limitarse a ello, solubilizantes, potenciadores de permeación en la piel, opacificadores, conservantes (p. ej., antioxidantes), agentes de gelificación, agentes tampón, tensioactivos (particularmente tensioactivos no iónicos y anfóteros), emulsionantes, emolientes, agentes espesantes, estabilizantes, humectantes, colorantes, fragancia y similares. La inclusión de solubilizantes y/o potenciadores de permeación en la piel es particularmente preferida, junto con emulsionantes, emolientes y conservantes. Una formulación tópica óptima comprende aproximadamente: 2 % en peso a 60 % en peso, preferiblemente 2% en peso a 50% en peso de solubilizante y/o potenciador de permeación en la piel; 2% en peso a 50 % en peso, preferiblemente 2 % en peso a 20% en peso de emulsionantes; 2 % en peso a 20 % de emolientes; y 0,01 a 0,2% en peso de conservantes, donde el agente activo y el vehículo (p. ej., agua) componen el resto de la formulación.

Un potenciador de permeación en la piel sirve para facilitar el pasaje de niveles terapéuticos del agente activo a través de un área de tamaño razonable de piel no quebrada. Los potenciadores adecuados se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo: alcoholes inferiores tales como metanol etanol y 2-propanol; sulfóxidos de alquilmetilo tales como dimetilsulfóxido (DMSO), decilmethylsulfóxido (C<sub>10</sub> MSO) y tetradecilmethyl sulfóxido; pirrolidonas tales como 2-pirrolidona, N-metil-2-pirrolidona y N-(2-hidroxietil)pirrolidona; urea; N,N-dietil-m-toluamida; alcanodiolos C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>; disolventes varios tales como dimetil formamida (DMF), N,N-dimetilacetamida (DMA) alcohol tetrahidrofurfúrico; y las azacicloheptan-2-onas 1-sustituidas, particularmente 1-n-dodecilciclazacicloheptan-2-ona (laurocapram; disponibles con la marca Azone<sup>RTM</sup> de Whitby Research Incorporated, Richmond, Va.).

Los ejemplos de solubilizantes incluyen, pero sin limitación, los siguientes: éteres hidrófilos tales como dietilenglicol monoetiléter (etoxidiglicol, disponible como Transcutol<sup>RTM</sup>) y etilenglicol monoetiléter oleato (disponible como Softcutol<sup>RTM</sup>); derivados de aceite de ricino y polietileno tales como aceite de ricino polioxi 35, aceite de ricino hidrogenado polioxi 40, etc.; polietilenglicol, particularmente polietilenglicoles de bajo peso molecular tales como PEG 300 y PEG 400, y derivados de polietilenglicol tales como glicéridos caprílicos/cápricos PEG-8 (comercializados como Labrasol<sup>RTM</sup>); alquilmetilsulfóxidos tales como DMSO; pirrolidonas tales como 2-pirrolidona y N-metil-2-pirrolidona; y DMA. Muchos solubilizantes pueden también actuar como potenciadores de absorción. Se puede incorporar un solo solubilizante a la formulación, o una mezcla de solubilizantes.

Los emulsionantes y co-emulsionantes adecuados incluyen, sin limitación, aquellos emulsionantes y co-emulsionantes descritos con respecto a las formulaciones de microemulsiones. Los emolientes incluyen, por ejemplo, propilenglicol, glicerol, isopropil miristato, polipropilenglicol-2 (PPG-2) miristil éter propionato y similares.

Otros agentes activos pueden también incluirse en las formulaciones, p. ej., otros agentes antiinflamatorios, analgésicos, agentes antimicrobianos, agentes antifúngicos, antibióticos, vitaminas, antioxidantes y agentes bloqueadores solares comúnmente hallados en formulaciones de pantallas solares, incluyendo sin limitación, antranilatos, benzofenonas (particularmente benzofenona-3), derivados de alcanfor, cinamatos (p. ej., octil metoxicinamato), dibenzoilmetanos (p. ej., butil metoxidibenzoilmetano), ácido p-aminobenzoico (PABA) y sus derivados, y salicilatos (p. ej., octil salicilato).

En determinadas formulaciones tópicas, el agente activo está presente en una cantidad en el intervalo de aproximadamente 0,25% en peso a 75 % en peso de la formulación, preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 0,25% en peso a 30 % en peso de la formulación, más preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 0,5 % en peso a 15 % en peso de la formulación, y lo más preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 1,0 % en peso a 10 % en peso de la formulación.

Las composiciones para tratamiento de la piel tópico pueden envasarse en un recipiente adecuado que se corresponda con su viscosidad y uso final por parte del consumidor. Por ejemplo, una loción o crema puede envasarse en un frasco o en un aplicador a bolilla, o en un dispositivo en aerosol con un propulsor, o en un recipiente equipado con una bomba adecuada para operar con el dedo. Si la composición es una crema, puede simplemente conservarse en un frasco o recipiente no deformable para oprimir con la mano, tal como un tubo o un frasco con tapa. La composición puede también incluirse en cápsulas tales como aquellas descritas en la patente estadounidense núm. 5.063.507. Por consiguiente, también se proveen recipientes cerrados que contienen una composición aceptable desde el punto de vista cosmético como se define en la presente memoria.

En una realización alternativa, se provee una formulación farmacéutica para administración oral o parenteral, en cuyo caso la formulación comprende una microemulsión que comprende un compuesto modulador como se describió anteriormente, pero puede contener vehículos, aditivos, etc. alternativos que sean farmacéuticamente aceptables, particularmente adecuados para administración del fármaco por vía oral o parenteral. Alternativamente, una microemulsión que contiene un compuesto modulador puede administrarse por vía oral o parenteral sustancialmente como se describió precedentemente, sin modificaciones.

Los complejos de fosfolípidos, p. ej., complejos de resveratrol-fosfolípido, y su preparación, se describen en la publicación de solicitud de patente estadounidense núm. 2004/116386. Los métodos para estabilizar componentes activos usando microcápsulas de poliol/polímero, y su preparación, se describen en el documento US20040108608. Los procedimientos para disolver compuestos lipófilos en disolución acuosa con copolímeros en bloque anfífilos se describen en el documento WO 04/035013.

Las afecciones del ojo pueden tratarse o prevenirse, p. ej., con inyección sistémica, tópica, intraocular de un compuesto modulador de sirtuina, o por inserción de un dispositivo de liberación sostenida que libere un compuesto modulador de sirtuina. Un compuesto modulador de sirtuina que aumenta o reduce el nivel y/o la actividad de una proteína sirtuina puede administrarse en un vehículo oftálmico farmacéuticamente aceptable, de modo tal que el compuesto se mantenga en contacto con la superficie ocular por un periodo de tiempo suficiente para permitir que el compuesto penetre en las regiones de la cornea e internas del ojo, como por ejemplo la cámara anterior, cámara posterior, cuerpo vítreo, humor acuoso, humor vítreo, cornea, iris/surco ciliar, lente, coroides/retina y esclerótica. El vehículo oftálmico farmacéuticamente aceptable puede ser, por ejemplo, un ungüento, aceite vegetal o un material encapsulante. Alternativamente, los compuestos de la invención pueden inyectarse directamente en el humor acuoso o vítreo. En otra alternativa, los compuestos pueden administrarse sistémicamente, tal como por inyección o infusión intravenosa, para tratamiento del ojo.

Los compuestos moduladores de sirtuina descritos en la presente memoria pueden conservarse en un entorno libre de oxígeno de acuerdo con los métodos de la técnica. Por ejemplo, puede prepararse resveratrol o su análogo en una cápsula sellada para administración oral, tal como Capsugel de Pfizer, Inc.

Las células, p. ej., tratadas *ex vivo* con un compuesto modulador de sirtuina, pueden administrarse de acuerdo con los métodos para administración de un injerto a un sujeto, que pueden ir acompañados, p. ej., de la administración de un fármaco inmunosupresor, p. ej., ciclosporina A. Para principios generales de formulaciones medicinales, el lector puede consultar *Cell Therapy: Stem Cell Transplantation, Gene Therapy, and Cellular Immunotherapy*, de G. Morstyn & W. Sheridan eds, Cambridge University Press, 1996; y *Hematopoietic Stem Cell Therapy*, E. D. Ball, J. Lister & P. Law, Churchill Livingstone, 2000.

La toxicidad y la eficacia terapéutica de los compuestos moduladores de sirtuina pueden determinarse por procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales. LD<sub>50</sub> es la dosis mortal para 50% de la población. La ED<sub>50</sub> es la dosis terapéuticamente eficaz en 50% de la población. La relación de dosis entre efectos tóxicos y terapéuticos (LD<sub>50</sub>/ED<sub>50</sub>) es el índice terapéutico. Se prefieren los compuestos moduladores de sirtuina que exhiben grandes índices terapéuticos. Si bien pueden usarse compuestos moduladores de sirtuina que exhiban efectos secundarios tóxicos, se deberán tomar precauciones para diseñar un sistema de administración que dirija dichos compuestos hacia el sitio de tejido afectado con el fin de minimizar el daño potencial a células no infectadas y reducir así los efectos secundarios.

Los datos obtenidos de los ensayos de cultivos celulares y estudios animales pueden usarse para formular un intervalo de dosificación para uso en seres humanos. La dosis de dichos compuestos puede yacer dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyan la ED<sub>50</sub> con poca o ninguna toxicidad. La dosis puede variar dentro de este intervalo, dependiendo de la forma empleada y de la ruta de administración que se utilice. Para cualquier compuesto, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Puede formularse una dosis en modelos animales para lograr un intervalo de concentración en plasma circulante que incluya la CI<sub>50</sub> (es decir, la concentración del compuesto de ensayo que logra una inhibición media máxima de los síntomas) según lo determinado en el cultivo celular. Dicha información puede usarse para determinar más precisamente las dosis útiles en seres humanos. Los niveles en plasma pueden medirse, por ejemplo, por cromatografía de líquidos de alto rendimiento.

## 6. Kits

También se proveen en la presente memoria kits, p. ej., kits para propósitos terapéuticos o kits para modular la vida de las células o modular la apoptosis. Un kit puede comprender uno o más compuestos moduladores de sirtuina, p. ej., en dosis pre-medidas. Un kit puede opcionalmente comprender dispositivos para contactar las células con los compuestos e instrucciones de uso. Los dispositivos incluyen jeringas, stents y otros dispositivos para introducir un compuesto modulador de sirtuina en un sujeto (p. ej., el vaso sanguíneo de un sujeto) o para aplicarlo a la piel de un sujeto.

Otro tipo de kit contemplado por la invención consiste en kits para identificar compuestos moduladores de sirtuina. Dichos kits contienen (1) una sirtuina o un material que contiene sirtuina y (2) un compuesto modulador de sirtuina de la invención, que están en recipientes separados. Dichos kits pueden usarse, por ejemplo, para realizar un ensayo de tipo competición para probar otros compuestos (típicamente provistos por el usuario) para actividad moduladora de sirtuina. En determinadas realizaciones, estos kits comprenden también medios para determinar la actividad de la sirtuina (p. ej., un péptido con un indicador apropiado, tal como aquellos descritos en los Ejemplos).

Incluso en otra realización, la invención provee una composición que comprende un modulador de sirtuina de la presente invención y otro agente terapéutico [los mismos utilizados en terapias combinadas y composiciones combinadas] en formas de dosificación separadas, pero asociados entre sí. La expresión "asociados entre sí", tal como se emplea en la presente memoria, significa que las formas de dosificación separadas se envasan juntas o están de alguna forma unidas entre sí de modo tal que sea fácilmente visible que las formas de dosificación separadas tienen como fin comercializarse y administrarse como parte del mismo régimen. El agente y el modulador de sirtuina preferiblemente se envasan juntos en un envase de tipo blíster u otro envase de múltiples cámaras,

recipientes sellados por separado (como bolsas de aluminio o similares) que el usuario puede separar (p. ej., desgarrando en líneas de corte entre los dos envases).

- 5 Incluso en otra realización, la invención provee un kit que comprende, en recipientes separados, a) un modulador de a sirtuina de la presente invención; y b) otro agente terapéutico tal como los descritos en esta memoria.

La práctica de los presentes métodos empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología celular, cultivo celular, biología molecular, biología transgénica, microbiología, DNA recombinante e inmunología, que están dentro de la materia. Dichas técnicas se explican en detalle en la bibliografía. Véanse, por ejemplo, Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2ª Ed., ed. de 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 estadounidense núm: 4.683.195; Nucleic Acid Hybridization (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); Transcription And Translation (B. D. Hames & 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); el tratado, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J. H. Miller and M. P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Methods In Enzymology, Vol. 154 y 155 (Wu et al. eds.), Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer and Walker, eds., Academic Press, Londres, 1987); Handbook Of Experimental Immunology, Volúmenes 1-IV (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds., 1986); Manipulating the Mouse Embryo, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986).

## 20 Ejemplos

La invención se describirá ahora en general y se entenderá más fácilmente con referencia a los siguientes ejemplos que se incluyen exclusivamente con fines ilustrativos de ciertos aspectos y realizaciones de la presente invención, y no tienen como fin limitar la invención en modo alguno.

Ejemplo 1: Síntesis y caracterización de moduladores de sirtuina

### 25 Sección experimental

Abreviaturas utilizadas en la sección experimental:

HATU = hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio

NMM = 4-metilmorfolina

DIEA = N,N-diisopropiletilamina

30 DMF = N,N-dimetilformamida

CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> = diclorometano

EtOAc= acetato de etilo

MeOH = metanol

Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> = sulfato de sodio

35 PPA= ácido polifosfórico

Et<sub>3</sub>N = trietilamina

rt = temperatura ambiente

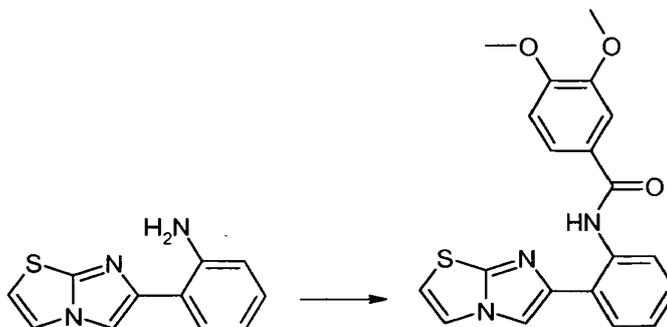
Preparación de 2-imidazo[2,1-b]tiazol-6-il-fenilamina:



40 En una preparación típica, se mezclaron 123 mg de 2-aminotiazol (1,23 mmol) y 2-bromo-2'-nitroacetofenona (300 mg, 1,23 mmol) con 15 mL de metil etil acetona, y se agitó a reflujo durante 18 horas. Luego se enfrió a temperatura ambiente y se filtró. El filtrado se concentró. Los sólidos resultantes se mezclaron con 20 mL de EtOH y se añadieron 5 gotas de HBr concentrado. La mezcla de reacción se agitó a reflujo durante 6 horas. Se disolvió todo en este punto, y la LC/MS indicó la formación del intermedio de nitro deseado (MS, M<sup>+</sup> + H = 246). La mezcla de

- 5 reacción se concentró y mezcló con 20 mL de NaHCO<sub>3</sub> acuoso, diluido. Los sólidos resultantes se recogieron por filtración y se secaron para proporcionar 300 mg del intermedio de nitro. Este material se mezcló con 15 mL de MeOH y 3 mL de agua, junto con 6 eq de hidrato de hidrosulfuro de sodio. La mezcla de reacción se agitó a reflujo durante 8 horas. Luego se enfrió a temperatura ambiente y se concentró. La capa acuosa se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Las capas orgánicas combinadas se secaron (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y concentraron para proporcionar 260 mg de 2-imidazo[2,1-b]tiazol-6-il-fenilamina.

Preparación del Compuesto 203:



- 10 Se mezcló 2-imidazo[2,1-b]tiazol-6-il-fenilamina (64 mg, 0,30 mmol) con 1 mL de piridina, junto con 60 mg de cloruro de 3,4-dimetoxibenzoilo (0,30 mmol). La mezcla de reacción se hizo reaccionar en el reactor de microondas Biotage a 160°C durante 10 min. La mezcla de reacción se enfrió hasta temperatura ambiente y se concentró. El residuo resultante se purificó por cromatografía (Isco, elución en gradiente, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> hasta 9:1 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH) para proporcionar el producto deseado (MS, M<sup>+</sup> + H = 380).

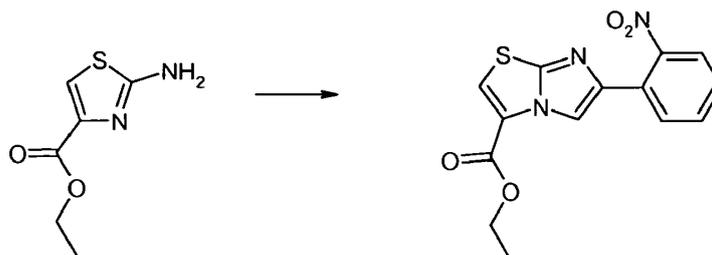
- 15 Preparación del Compuesto 204:

Se empleó el mismo procedimiento que en la preparación del Compuesto 203, usando el cloruro de ácido apropiado.

Preparación de los Compuestos 707, 739 y 740:

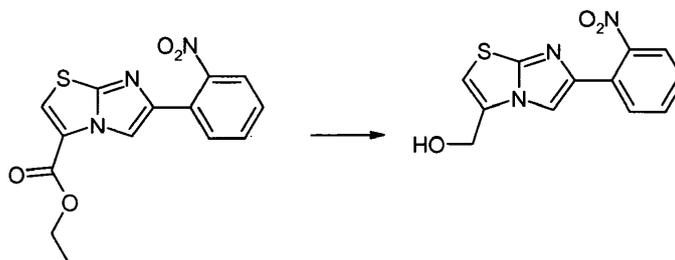
- 20 Se empleó el mismo procedimiento que en la preparación del Compuesto 203 excepto que con 2-amino-4-metiltiazol a comienzo de la secuencia sintética y el cloruro de ácido apropiado en la última etapa de formación de amida.

Preparación de éster etílico de ácido 6-(2-nitro-fenil)-imidazo[2,1-b]tiazol-3-carboxílico:



- 25 En una preparación típica, se mezclaron 2,1 g de 2-aminotiazol-4-carboxilato de etilo (Combi-Blocks, 0,0123 mol) con 25 mL de metil etil cetona, junto con 2-bromo-2'-nitroacetofenona (3,0 g, 0,0123 mol). La mezcla de reacción se agitó a reflujo durante 18 horas. Luego se enfrió a temperatura ambiente y se filtró para retirar parte de los sólidos. El filtrado se concentró para proporcionar 3,10 g de éster etílico de ácido 6-(2-nitro-fenil)-imidazo[2,1-b]tiazol-3-carboxílico (MS, M<sup>+</sup> + H = 318).

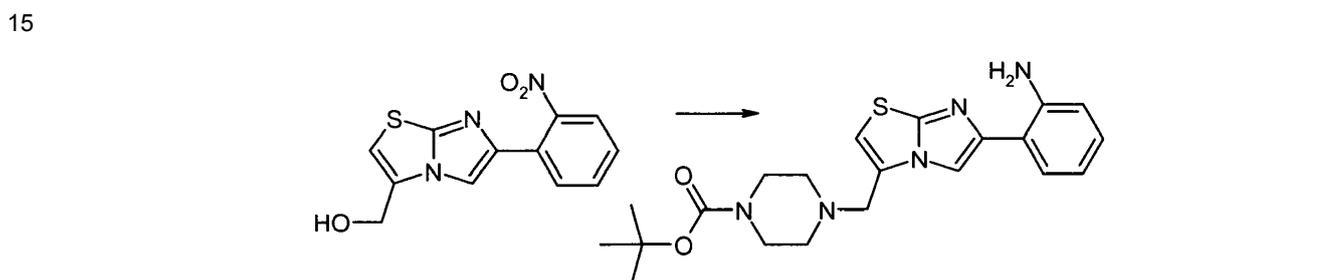
Preparación de [6-(2-nitro-fenil)-imidazo[2,1-b]tiazol-3-il]-metanol:



Se mezcló éster etílico de ácido

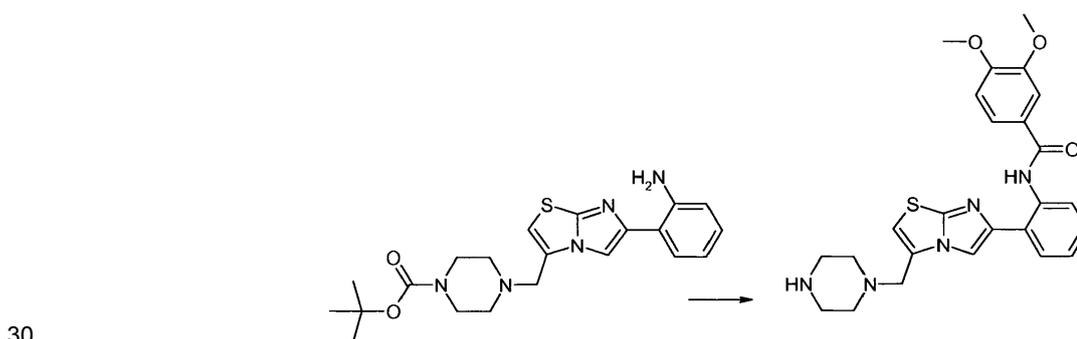
6-(2-Nitro-fenil)-imidazo[2,1-b]tiazol-3-carboxílico (14,50 g, 0,0458 mol) con 100 mL de THF y 100 mL de agua que contenía 7,3 g de NaOH (4 eq). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas. Luego se concentró. La capa acuosa se lavó una vez con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y luego se acidificó con HCl 6 N. Los sólidos se recogieron por filtración y se secaron para proporcionar 7,4 mg del intermedio ácido. Este material (7,4 g, 0,0256 mol) se mezcló con 200 mL de THF anhidro junto con NMM (2,8 mL, 0,0256 mol) y se enfrió a 0 °C. Se añadió cloroformiato de isobutilo (3,35 mL, 0,0256 mol) y la mezcla de reacción se agitó en un baño de hielo durante 3 horas. Se añadió  $\text{NaBH}_4$  (0,97 g, 0,0256 mol) como una disolución en 30 mL de agua. La mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 45 min, después se calentó a temperatura ambiente y se concentró. La capa acuosa se extrajo con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Las capas orgánicas combinadas se secaron ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) y concentraron para proveer el producto bruto. La purificación por cromatografía (Isco, usando una mezcla de pentano/EtOAc) proporcionó 5,20 g de [6-(2-nitro-fenil)-imidazo[2,1-b]tiazol-3-il]-metanol (74% de rendimiento).

Preparación de éster terc-butílico de ácido 4-[6-(2-amino-fenil)-imidazo[2,1-b]tiazol-3-ilmetil]-piperazina-1-carboxílico:



Se disolvió [6-(2-nitro-fenil)-imidazo[2,1-b]tiazol-3-il]-metanol (1,0 g, 3,64 mmol) en 100 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  junto con 1 eq de  $\text{Et}_3\text{N}$  (0,51 mL). Se añadió cloruro de metanosulfonilo (1 eq, 0,28 mL) y la mezcla de reacción se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante 15 min. Después se inactivó con salmuera y se extrajo con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Las capas orgánicas combinadas se secaron ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) y concentraron para proveer el intermedio de mesilato. Este material se mezcló con 4 mL de  $\text{CH}_3\text{CN}$  junto con 0,51 mL de  $\text{Et}_3\text{N}$  y 680 mg de Boc-piperazina (3,64 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 1 día. La mezcla de reacción se concentró y el residuo resultante se repartió entre  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y agua. La capa orgánica se secó ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) y concentró para proporcionar un rendimiento esencialmente cuantitativo del producto. Este material se mezcló con 6 mL de MeOH y 1 mL de agua, junto con 200 mg de hidrato de hidrosulfuro de sodio. La mezcla de reacción resultante se agitó a reflujo durante 24 horas. Luego se enfrió a temperatura ambiente y se concentró. El residuo resultante se diluyó con 2 mL de agua y se extrajo con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Las capas orgánicas combinadas se secaron ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) y concentraron para proporcionar 0,90 g de éster terc-butílico de ácido 4-[6-(2-aminofenil)-imidazo[2,1-b]tiazol-3-ilmetil]-piperazina-1-carboxílico.

Preparación del Compuesto 207:

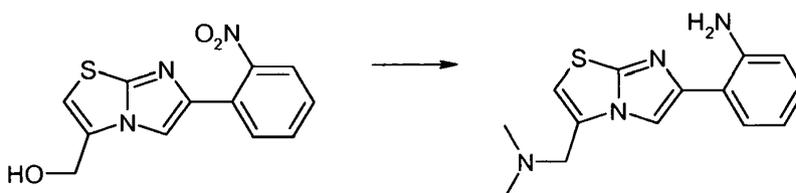


Se mezcló éster terc-butílico de ácido 4-[6-(2-amino-fenil)-imidazo[2,1-b]tiazol-3-ilmetil]-piperazina-1-carboxílico (0,3 mmol) con 1 mL de piridina junto con 1 eq (60 mg) de cloruro de 3,4-dimetoxibenzoílo. La mezcla de reacción se hizo reaccionar en un reactor de microondas Biotage a 160°C durante 10 min. Luego se enfrió hasta temperatura ambiente y se concentró. El producto bruto resultante se purificó por cromatografía (Isco, elución en gradiente,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  hasta 95%  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 4% MeOH y 1%  $\text{Et}_3\text{N}$ ). El producto purificado se trató luego con 2 mL de 25% TFA en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  durante 2 horas. Después se concentró y el residuo resultante se trituró con  $\text{Et}_2\text{O}$  para proporcionar el producto deseado como la sal de TFA (MS,  $\text{M}^+ + \text{H} = 478$ ).

Preparación de los Compuestos 208, 326, 327, 328, 329, 330, 337, 338, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 510, 511, 512, 543, 544, 708, 709, 710, 733, 735, 736, 737, 738, 743 y 744:

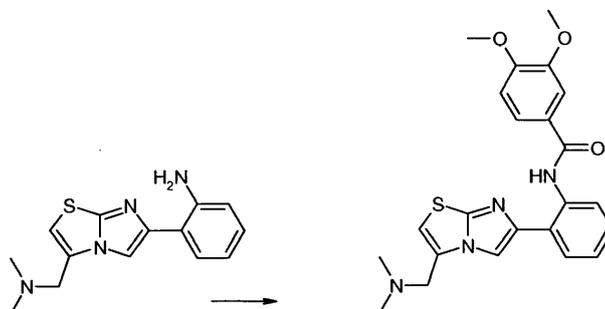
Se empleó el mismo procedimiento que en la preparación del Compuesto 207, usando el cloruro de ácido o cloruro de sulfonilo apropiado. Los Compuestos 623, 624, 625, 644, 645, 692, 695, 697 y 698 se prepararon de acuerdo con el procedimiento utilizado para la preparación del Compuesto 207, usando el cloruro de ácido apropiado. Los cloruros de ácido estaban comercialmente disponibles o se prepararon a partir de ácidos carboxílicos de la siguiente manera: El ácido carboxílico (1,0 mmol), cloruro de tionilo (2,0 mmol) y una cantidad catalítica de *N,N*-dimetilformamida (DMF) (2 gotas) se sometieron a reflujo en tolueno (2 mL) por 1 hora. La reacción se enfrió a temperatura ambiente y se concentró *in vacuo* para proporcionar los cloruros de ácido deseados.

Preparación de 2-(3-Dimetilaminometil-imidazo[2,1-b]tiazol-6-il)-fenilamina:



Se disolvió [6-(2-nitro-fenil)-imidazo[2,1-b]tiazol-3-il]-metanol (435 mg, 1,58 mmol) en 25 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  junto con 1 eq de  $\text{Et}_3\text{N}$  (0,330 mL). Se añadió cloruro de metanosulfonilo (1 eq, 0,12 mL) y la mezcla de reacción se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante 15 min. Después se inactivó con salmuera y se extrajo con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Las capas orgánicas combinadas se secaron ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) y concentraron para proveer el intermedio de mesilato. Este material se mezcló con 4 mL de THF junto con 4 mL de una disolución de dimetilamina 2 N en THF y se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. La mezcla de reacción se concentró y el residuo resultante se repartió entre  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y agua. La capa orgánica se secó ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) y concentró para proporcionar un rendimiento esencialmente cuantitativo del producto. Este material se mezcló con 6 mL de MeOH y 1 mL de agua, junto con 200 mg de hidrato de hidrosulfuro de sodio. La mezcla de reacción resultante se agitó a reflujo durante 6 horas. Luego se enfrió hasta temperatura ambiente, se diluyó con 100 mL de EtOH absoluto y se concentró. El residuo resultante se mezcló con 20 mL de 9:1  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  y se filtró. El filtrado se concentró para proporcionar 2-(3-dimetilaminometil-imidazo[2,1-b]tiazol-6-il)-fenilamina.

Preparación del Compuesto 205:

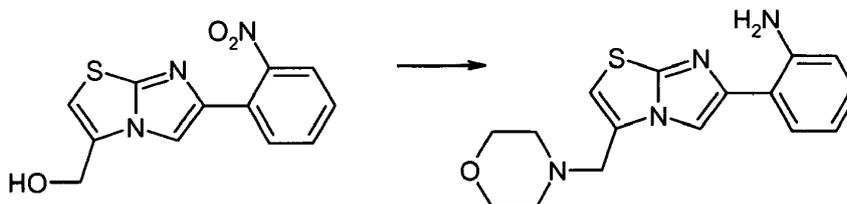


Se mezcló 2-(3-dimetilaminometil-imidazo[2,1-b]tiazol-6-il)-fenilamina (0,3 mmol) con 1 mL de piridina junto con 1 eq (60 mg) de cloruro de 3,4-dimetoxibenzoilo. La mezcla de reacción se hizo reaccionar en un reactor de microondas Biotage a  $160^\circ\text{C}$  durante 10 min. Luego se enfrió hasta temperatura ambiente y se concentró. El producto bruto resultante se purificó por cromatografía (Isco, elución en gradiente,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  hasta 95%  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 4% MeOH y 1%  $\text{Et}_3\text{N}$ ) para proporcionar el producto deseado en forma de un sólido amarillo claro (MS,  $\text{M}^+ + \text{H} = 437$ ).

Preparación del Compuesto 206:

Se empleó el mismo procedimiento que en la preparación del Compuesto 205, usando el cloruro de ácido apropiado.

Preparación de 2-(3-morfolin-4-ilmetil-imidazo[2,1-b]tiazol-6-il)-fenilamina:

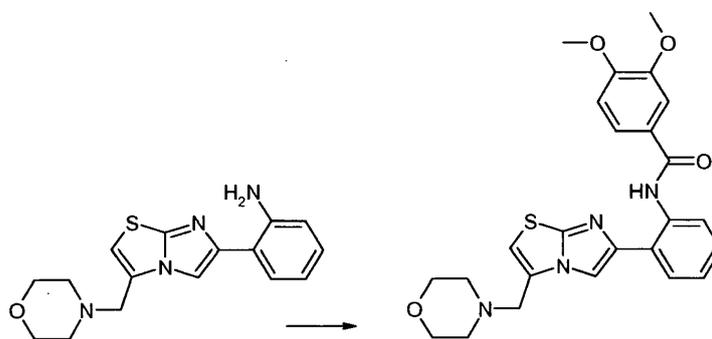


35

Se disolvió [6-(2-nitro-fenil)-imidazo[2,1-b]tiazol-3-il]-metanol (435 mg, 1,58 mmol) en 25 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  junto con 1 eq de  $\text{Et}_3\text{N}$  (0,330 mL). Se añadió cloruro de metanosulfonilo (1 eq, 0,12 mL) y la mezcla de reacción se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante 15 min. Después se inactivó con salmuera y se extrajo con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Las capas orgánicas combinadas se secaron ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) y concentraron para proveer el intermedio de mesilato. Este material se mezcló con 6 mL de  $\text{CH}_3\text{CN}$  junto con 0,33 mL de  $\text{Et}_3\text{N}$  y 0,14 mL de morfolina. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas. Al día siguiente, se concentró y el residuo resultante se repartió entre  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y agua. La capa orgánica se secó ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) y concentró para proporcionar un rendimiento esencialmente cuantitativo del producto. Este material se mezcló con 6 mL de MeOH y 1 mL de agua, junto con 200 mg de hidrato de hidrosulfuro de sodio. La mezcla de reacción resultante se agitó a reflujo durante 6 horas. Luego se enfrió hasta temperatura ambiente, se diluyó con 100 mL de EtOH absoluto y se concentró. El residuo resultante se mezcló con 20

mL de 9:1  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  y se filtró. El filtrado se concentró para proporcionar 2-(3-morfolin-4-ilmetil-imidazo[2,1-b]tiazol-6-il)-fenilamina.

15 Preparación del Compuesto 209:

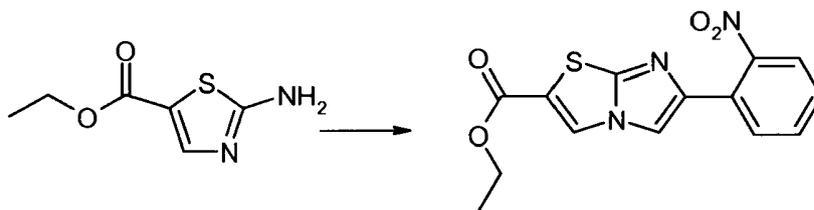


Se mezcló 2-(3-morfolin-4-ilmetil-imidazo[2,1-b]tiazol-6-il)-fenilamina (0,3 mmol) con 1 mL de piridina junto con 1 eq (60 mg) de cloruro de 3,4-dimetoxibenzoílo. La mezcla de reacción se hizo reaccionar en un reactor de microondas Biotage a  $160^\circ\text{C}$  durante 10 min. Luego se enfrió hasta temperatura ambiente y se concentró. El producto bruto resultante se purificó por cromatografía (Isco, elución en gradiente,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  hasta 95%  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 4% MeOH y 1%  $\text{Et}_3\text{N}$ ) para proporcionar el producto deseado en forma de un sólido amarillo claro (MS,  $\text{M}^+ + \text{H} = 479$ ).

Preparación del Compuesto 210:

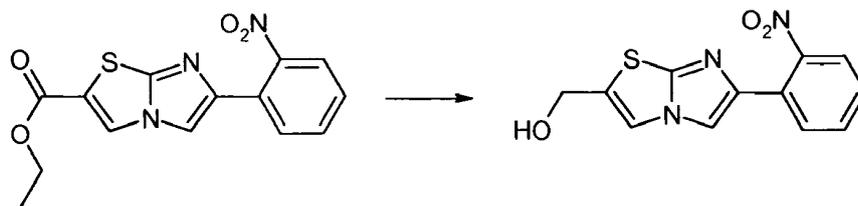
Se empleó el mismo procedimiento que en la preparación del Compuesto 209, usando el cloruro de ácido apropiado.

25 Preparación de éster etílico de ácido 6-(2-nitro-fenil)-imidazo[2,1-b]tiazol-2-carboxílico:



En una preparación típica, se mezcló 1,0 g de 2-aminotiazol-5-carboxilato de etilo (Astatech, 5,81 mmol) con 50 mL de acetona junto con 1,42 g de 2-bromo-2'-nitroacetofenona y se agitó a reflujo durante 18 horas. Luego se filtró. El filtrado se concentró para proporcionar la amida intermedia (MS,  $\text{M}^+ + \text{H} = 336$ ). Este material se mezcló con 20 mL de EtOH junto con 6 gotas de HBr concentrado y se agitó a reflujo durante 4 horas. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se concentró. El residuo resultante se diluyó con  $\text{NaHCO}_3$  diluido, acuoso. Los sólidos se recogieron por filtración y se secaron para proporcionar éster etílico de ácido 6-(2-nitro-fenil)-imidazo[2,1-b]tiazol-2-carboxílico (MS,  $\text{M}^+ + \text{H} = 318$ ).

Preparación de [6-(2-nitro-fenil)-imidazo[2,1-b]tiazol-2-il]-metanol:



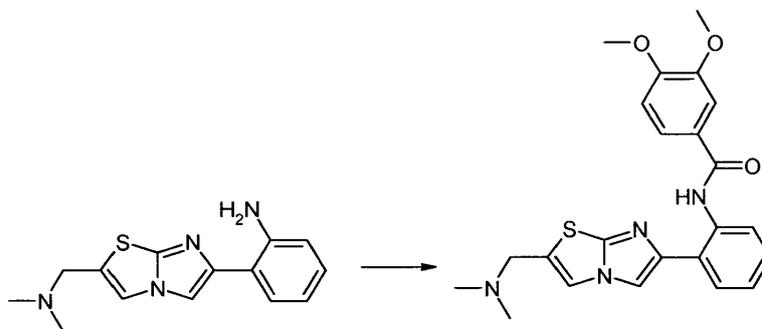
Se disolvió éster etílico de ácido 6-(2-nitro-fenil)-imidazo[2,1-b]tiazol-2-carboxílico (660 mg, 2,08 mmol) en 12 mL de THF y se añadió NaOH (4 eq) como una disolución en 10 mL de agua. La mezcla de reacción se agitó a 50 °C durante 12 horas. Luego se enfrió a temperatura ambiente y se concentró. La capa acuosa se acidificó con HCl 6 N a un valor de pH 5. Los sólidos se recogieron por filtración y se secaron para proporcionar un rendimiento esencialmente cuantitativo del ácido. Este material (2,08 mmol) se mezcló con 20 mL de THF anhidro junto con NMM (0,23 mL, 2,08 mmol) y se enfrió en un baño de hielo. Se añadió cloroformiato de isobutilo (0,27 mL, 2,08 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 30 min. Se añadió NaBH<sub>4</sub> (80 mg, 2,08 mmol) como una disolución en 5 mL de agua. La mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 30 minutos y después se concentró. La capa acuosa se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Las capas orgánicas combinadas se secaron (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentraron. La purificación por cromatografía (Isco, elución en gradiente usando una mezcla de CH<sub>2</sub> Cl<sub>2</sub> y MeOH) proporcionó 190 mg de [6-(2-nitrofenil)-imidazo[2,1-b]tiazol-2-il]-metanol.

Preparación de 2-(2-Dimetilaminometil-imidazo[2,1-b]tiazol-6-il)-fenilamina:



Se empleó esencialmente el mismo procedimiento utilizado durante la preparación de 2-(3-dimetilaminometil-imidazo[2,1-b]tiazol-6-il)-fenilamina, excepto que se usó [6-(2-nitro-fenil)-imidazo[2,1-b]tiazol-2-il]-metanol como material de partida.

Preparación del Compuesto 178:

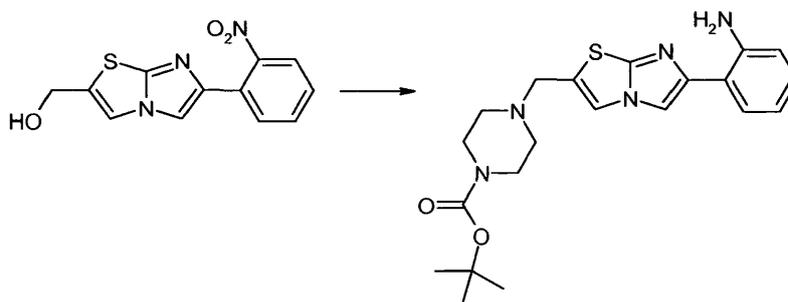


Se mezcló 2-(2-dimetilaminometil-imidazo[2,1-b]tiazol-6-il)-fenilamina (0,3 mmol) con 1 mL de piridina junto con 1 eq (60 mg) de cloruro de 3,4-dimetoxibenzoílo. La mezcla de reacción se hizo reaccionar en un reactor de microondas Biotage a 160°C durante 10 min. Luego se enfrió hasta temperatura ambiente y se concentró. El producto bruto resultante se purificó por cromatografía (Isco, elución en gradiente, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> hasta 95% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 4% MeOH y 1% Et<sub>3</sub>N) para proporcionar el producto deseado en forma de un sólido amarillo claro (MS, M<sup>+</sup> + H = 437).

Preparación del Compuesto 179:

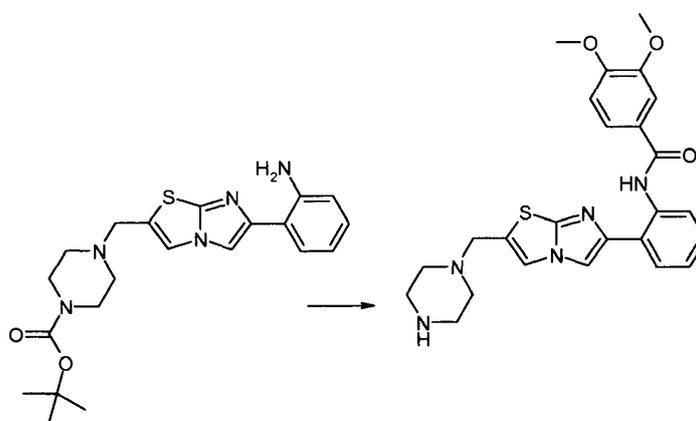
Se empleó el mismo procedimiento que en la preparación del Compuesto 178, usando el cloruro de ácido apropiado.

Preparación de éster terc-butílico de ácido 4-[6-(2-amino-fenil)-imidazo[2,1-b]tiazol-2-ilmetil]-piperazina-1-carboxílico:



Se empleó esencialmente el mismo procedimiento utilizado durante la preparación de éster terc-butílico de ácido 4-[6-(2-aminofenil)-imidazo[2,1-b]tiazol-3-ilmetil]-piperazina-1-carboxílico, excepto que se usó [6-(2-nitro-fenil)-imidazo[2,1-b]tiazol-2-il]-metanol como material de partida.

Preparación del Compuesto 270:

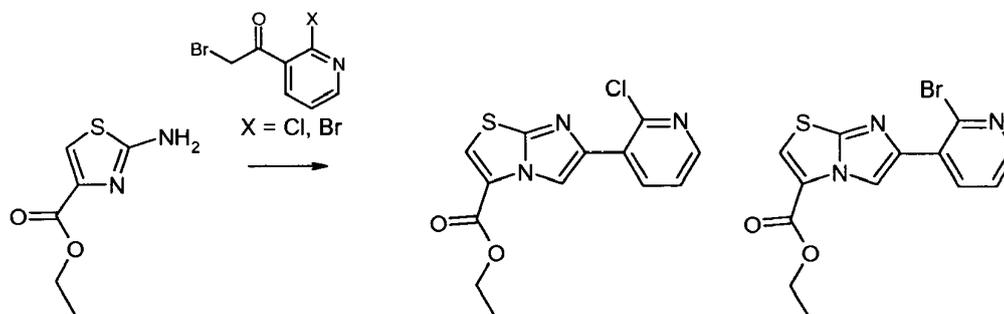


Se mezcló éster terc-butílico de ácido 4-[6-(2-amino-fenil)-imidazo[2,1-b]tiazol-2-ilmetil]-piperazina-1-carboxílico (0,2 mmol) con 1 mL de piridina junto con 1 eq (40 mg) de cloruro de 3,4-dimetoxibenzoílo. La mezcla de reacción se hizo reaccionar en un reactor de microondas Biotage a 160°C durante 10 min. Luego se enfrió hasta temperatura ambiente y se concentró. El producto bruto resultante se purificó por cromatografía (Isco, elución en gradiente, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> hasta 95% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 4% MeOH y 1% Et<sub>3</sub>N). El producto purificado se trató luego con 2 mL de 25% TFA en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> durante 2 horas. Después se concentró y el residuo resultante se trituró con Et<sub>2</sub>O para proporcionar el producto deseado como la sal de TFA (MS, M<sup>+</sup> + H = 478).

Preparación del Compuesto 271 y del Compuesto 513:

Se empleó el mismo procedimiento que en la preparación del Compuesto 270, usando el cloruro de ácido apropiado.

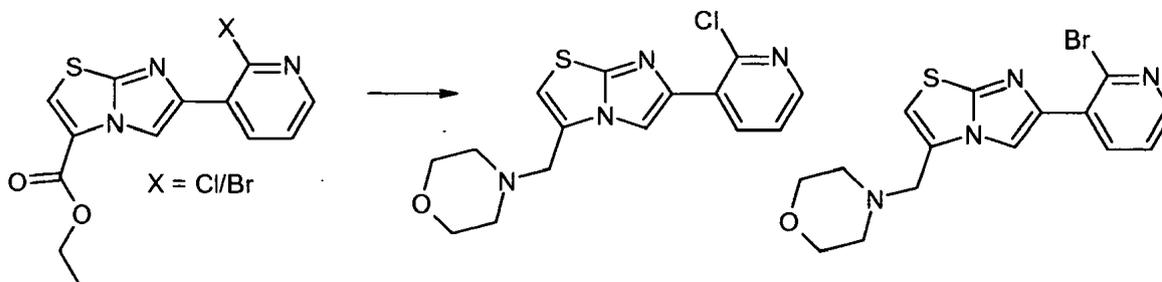
Preparación de una mezcla 1:1 de éster etílico de ácido 6-(2-Cloro-piridin-3-il)-imidazo[2,1-b]tiazol-3-carboxílico y éster etílico de ácido 6-(2-bromo-piridin-3-il)-imidazo[2,1-b]tiazol-3-carboxílico:



Se preparó una mezcla 1:1 de 2-bromo-1-(2-cloro-piridin-3-il)-etanona y 2-bromo-1-(2-bromo-piridin-3-il)-etanona de acuerdo con el procedimiento señalado en el documento WO 2005/061476. Este mezcla (5,6 g, aproximadamente 0,0240 mol) se mezcló con 150 mL de metil etil cetona junto con éster etílico de ácido 2-amino-tiazol-4-carboxílico (4,6 g) y se agitó a reflujo durante 18 horas. Se concentró la mezcla de reacción. El residuo resultante se mezcló con 150 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se filtró. Los sólidos filtrados fueron éster etílico de ácido 2-amino-tiazol-4-carboxílico sin

reaccionar. El filtrado se concentró para proporcionar una mezcla esencialmente pura 1:1 de éster etílico de ácido 6-(2-Cloro-piridin-3-il)-imidazo[2,1-b]tiazol-3-carboxílico y éster etílico de ácido 6-(2-bromo-piridin-3-il)-imidazo[2,1-b]tiazol-3-carboxílico (3,0 g total).

- 5 Preparación de una mezcla 1:1 de 6-(2-Cloro-piridin-3-il)-3-morfolin-4-ilmetil-imidazo[2,1-b]tiazol y 6-(2-bromo-piridin-3-il)-3-morfolin-4-ilmetil-imidazo[2,1-b]tiazol:

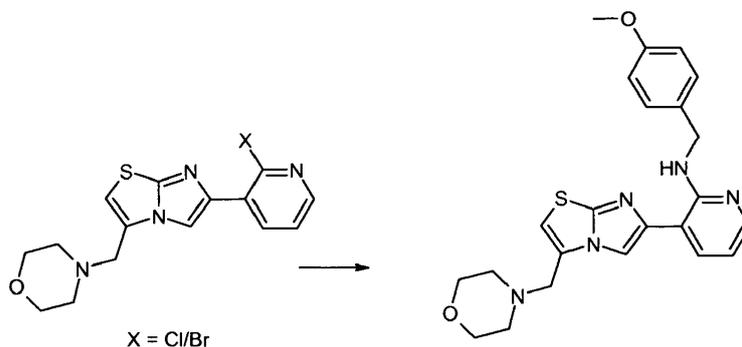


- 10 La mezcla 1:1 de éster etílico de ácido 6-(2-Cloro-piridin-3-il)-imidazo[2,1-b]tiazol-3-carboxílico y éster etílico de ácido 6-(2-bromo-piridin-3-il)-imidazo[2,1-b]tiazol-3-carboxílico (3,0 g) se mezcló con 100 mL de THF junto con 25 mL de agua que contenía 3 g de NaOH. La mezcla de reacción se agitó a 50 °C durante 3 horas. Luego se enfrió a temperatura ambiente y se concentró. La capa acuosa se acidificó hasta pH de 5 con HCl 6 N, y la mezcla resultante se filtró. Los sólidos se recogieron para proporcionar 2,14 g del ácido intermedio.

- 15 Esta mezcla 1:1 del ácido (2,14 g) se mezcló con 250 mL de THF anhidro junto con NMM (0,85 mL, mmol) y se enfrió en un baño de hielo. Se añadió cloroformato de isobutilo (1,0 ml) y la mezcla de reacción se calentó hasta temperatura ambiente y se agitó durante 3 horas. La mezcla de reacción se enfrió en un baño de hielo y se añadió NaBH<sub>4</sub> (0,29 g) en forma de una disolución en 20 mL de agua. La mezcla de reacción se agitó durante 30 minutos y luego se calentó a temperatura ambiente. Se concentró y posteriormente se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Las capas orgánicas combinadas se secaron (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y concentraron para proveer 1,5 g del alcohol intermedio.

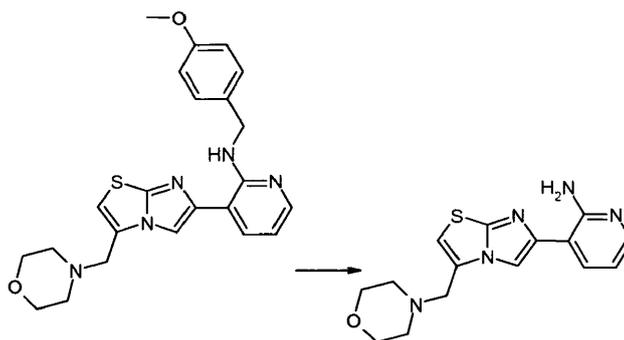
- 20 Esta mezcla 1:1 del alcohol intermedio (1,5 g) se mezcló con 100 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> junto con Et<sub>3</sub>N (0,80 mL) y se enfrió en un baño de hielo. Se añadió cloruro de metanosulfonilo (0,44 ml) y la mezcla de reacción se calentó a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se inactivó con salmuera y se separaron las dos capas. La capa orgánica se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y concentró para proveer el mesilato intermedio. Este material se mezcló inmediatamente con 30 mL de CH<sub>3</sub>CN junto con 0,80 mL de Et<sub>3</sub>N y 0,5 mL de morfolina. La mezcla de reacción se agitó a 50 °C durante 3 horas. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida y el residuo resultante se repartió entre CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y salmuera. La capa orgánica se separó, se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y concentró para proveer el producto bruto. La purificación por cromatografía (Isco, elución en gradiente, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> hasta 95% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 4% MeOH y 1% Et<sub>3</sub>N) proporcionó 720 mg de una mezcla 1:1 de 6-(2-Cloro-piridin-3-il)-3-morfolin-4-ilmetil-imidazo[2,1-b]tiazol y 6-(2-bromo-piridin-3-il)-3-morfolin-4-ilmetil-imidazo[2,1-b]tiazol.

Preparación de (4-metoxi-bencil)-[3-(3-morfolin-4-ilmetil-imidazo[2,1-b]tiazol-6-il)-piridin-2-il]-amina:



- 30 La mezcla 1:1 de 6-(2-Cloro-piridin-3-il)-3-morfolin-4-ilmetil-imidazo[2,1-b]tiazol y 6-(2-bromo-piridin-3-il)-3-morfolin-4-ilmetil-imidazo[2,1-b]tiazol (600 mg) se mezcló con 15 mL de tolueno junto con 0,47 mL de 4-metoxibencilamina y se agitó a reflujo durante 5 días. La mezcla de reacción se enfrió hasta temperatura ambiente y se repartió entre CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y salmuera. La capa orgánica se separó, se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y concentró para proveer el producto bruto. La purificación por cromatografía (Isco, elución en gradiente, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> hasta 95% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 4% MeOH y 1% Et<sub>3</sub>N) proporcionó 200 mg de (4-metoxi-bencil)-[3-(3-morfolin-4-ilmetil-imidazo[2,1-b]tiazol-6-il)-piridin-2-il]-amina.

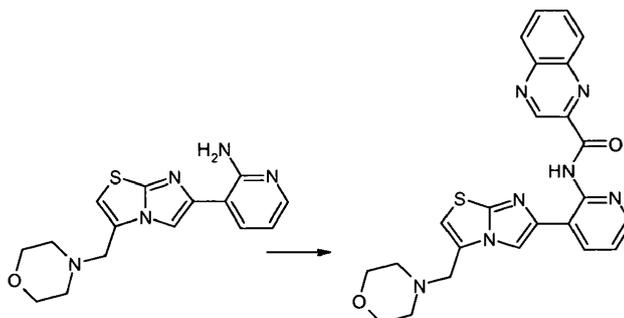
Preparación de 3-(3-morfolin-4-ilmetil-imidazo[2,1-b]tiazol-6-il)-piridin-2-ilamina:



5 Se mezcló (4-metoxi-bencil)-[3-(3-morfolin-4-ilmetil-imidazo[2,1-b]tiazol-6-il)-piridin-2-il]-amina (100 mg, 0,23 mmol) con 2 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  junto con trietilsilano (0,11 mL, 2 eq). Se añadió ácido trifluoroacético (1 mL) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas. Al día siguiente, la mezcla de reacción se concentró. El residuo resultante se trituró con  $\text{Et}_2\text{O}$  para dar

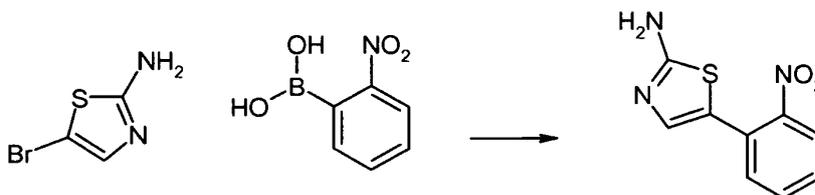
un rendimiento esencialmente cuantitativo de 3-(3-morfolin-4-ilmetil-imidazo[2,1-b]tiazol-6-il)-piridin-2-ilamina como la sal de TFA.

Preparación del Compuesto 621:



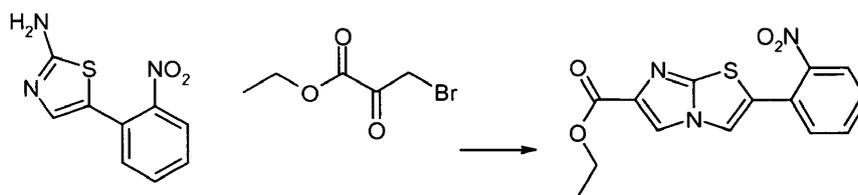
10 La sal de TFA de 3-(3-morfolin-4-ilmetil-imidazo[2,1-b]tiazol-6-il)-piridin-2-ilamina (0,1 mmol) se mezcló con 1 mL de piridina junto con 0,1 mmol de cloruro de 2-quinoxaloilo. La mezcla de reacción se hizo reaccionar en un reactor de microondas a  $160^\circ\text{C}$  durante 10 min. Luego se enfrió hasta temperatura ambiente y se concentró para proporcionar el producto bruto. La purificación por HPLC preparativa, usando una mezcla de  $\text{CH}_3\text{CN}$  acuoso que había sido  
15 tamponado con 0,1% TFA, proporcionó 18 mg del producto deseado como la sal de TFA (MS,  $\text{M}^+ + \text{H} = 472$ ).

Preparación de 5-(2-nitro-fenil)-tiazol-2-ilamina:



20 En una preparación típica, se mezcló monohidrobromuro de 2-amino-5-bromotiazol (Aldrich, 5,00g, 0,0192 mol) con 40 mL de tolueno, 40 mL de etanol y 20 mL de agua. Se añadió ácido 2-nitrofenil borónico (3,2 g, 0,0192 mol), junto con 2,35 g de complejo de [1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno]dicloro-paladio(II) con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1:1) y 6,10 g de carbonato  
25 sódico anhidro. La mezcla de reacción se agitó a  $90^\circ\text{C}$  durante 18 horas. Luego se enfrió a temperatura ambiente y se concentró. El residuo resultante se mezcló con 500 ml de EtOAc y se lavó con agua (3x50 ml). La capa orgánica se filtró para eliminar el precipitado negro. El filtrado se extrajo con HCl 1N diluido. Las capas acuosas combinadas se concentraron hasta casi sequedad. El residuo resultante se purificó por HPLC preparativa, usando una mezcla de acetonitrilo acuoso que había sido tamponada con 0,1% TFA para proporcionar 108 mg de 5-(2-nitrofenil)-tiazol-2-ilamina (MS,  $\text{M}^+ + \text{H} = 222$ ).

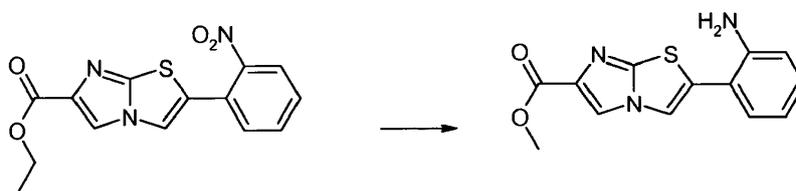
Preparación de éster etílico de ácido 2-(2-nitro-fenil)-imidazo[2,1-b]tiazol-6-carboxílico:



Se mezcló

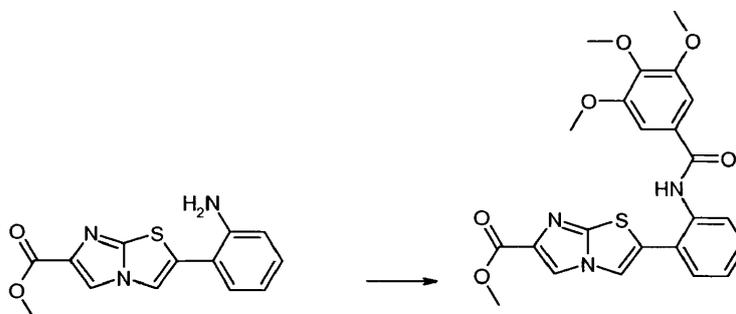
- 5 5-(2-nitro-fenil)-tiazol-2-ilamina (100 mg, 0,452 mmol) con 10 mL de metil etil cetona junto con 1,5 equivalentes de etil bromopiruvato de etilo. La mezcla de reacción se agitó a reflujo durante 5 horas. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se concentró. El producto bruto se purificó por cromatografía (Isco, elución en gradiente,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  a 9:1  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ ) para proporcionar 60 mg de éster etílico de ácido 2-(2-(2-nitro-fenil)-imidazo[2,1-b]tiazol-6-carboxílico (MS,  $M^+ + H = 318$ ).

Preparación de éster metílico de ácido 2-(2-amino-fenil)-imidazo[2,1-b]tiazol-6-carboxílico:



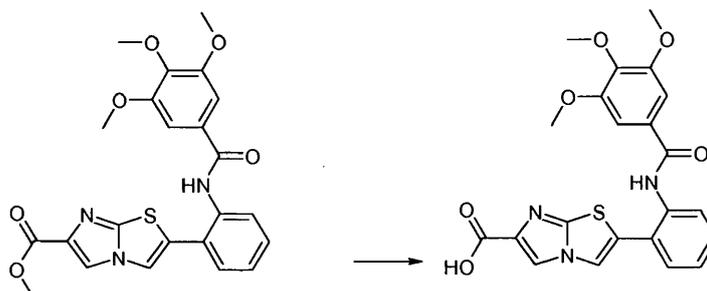
- 10 Se mezcló éster etílico de ácido 2-(2-nitro-fenil)-imidazo[2,1-b]tiazol-6-carboxílico (60 mg, 0,189 mmol) con 3 mL de MeOH junto con hidrato de hidrosulfuro de sodio (32 mg, 0,567 mmol) en 1 mL de agua. La mezcla de reacción se agitó a reflujo durante 1 hora y se monitoreó por LC/MS. La reducción del grupo nitro se completó en este punto y el grupo éster etílico se había intercambiado con el correspondiente derivado de metilo. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se concentró. La capa acuosa se extrajo con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Las capas orgánicas combinadas se secaron ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) y concentraron para proporcionar un rendimiento esencialmente cuantitativo de éster metílico de ácido 2-(2-amino-fenil)-imidazo[2,1-b]tiazol-6-carboxílico (MS,  $M^+ + H = 274$ ).

Preparación del Compuesto 703:



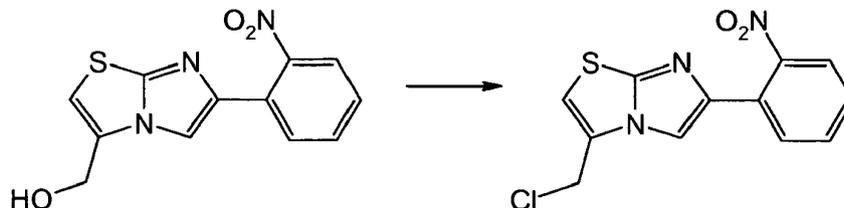
- 20 Se mezcló éster metílico de ácido 2-(2-amino-fenil)-imidazo[2,1-b]tiazol-6-carboxílico (27 mg, 0,095 mmol) con 1 mL de piridina junto con 22 mg de cloruro de 3,4,5-trimetoxibenzoilo. La mezcla de reacción se hizo reaccionar en un reactor de microondas a  $160^\circ\text{C}$  durante 10 minutos. Luego se enfrió a temperatura ambiente y se concentró. El producto bruto resultante se purificó por HPLC preparativa usando una mezcla de acetonitrilo acuoso que se había tamponado con 0,1% TFA para proporcionar 108 mg de éster metílico de ácido 2-[2-(3,4,5-trimetoxibenzoilamino)-fenil]-imidazo[2,1-b]tiazol-6-carboxílico (MS,  $M^+ + H = 468$ ).

Preparación del Compuesto 704:



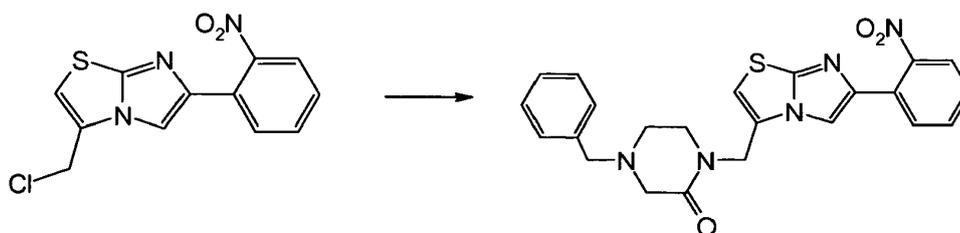
- 5 Se mezcló éster metílico de ácido 2-[2-(3,4,5-trimetoxibenzoilamino)-fenil]-imidazo[2,1-b]tiazol-6-carboxílico (6 mg) con 1 mL de THF. Se añadió hidróxido sódico (10 mg) como una disolución en 1 mL de agua. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas y después se concentró. El producto bruto resultante se purificó por HPLC preparativa usando una mezcla de acetonitrilo acuoso que se había tamponado con 0,1% TFA para proporcionar 108 mg de éster metílico de ácido 2-[2-(3,4,5-trimetoxi-benzoilamino)-fenil]-imidazo[2,1-b]tiazol-6-carboxílico (MS,  $M^+ + H = 454$ ).

Preparación de 3-(clorometil)-6-(2-nitrofenil)imidazo[2,1-b]tiazol:



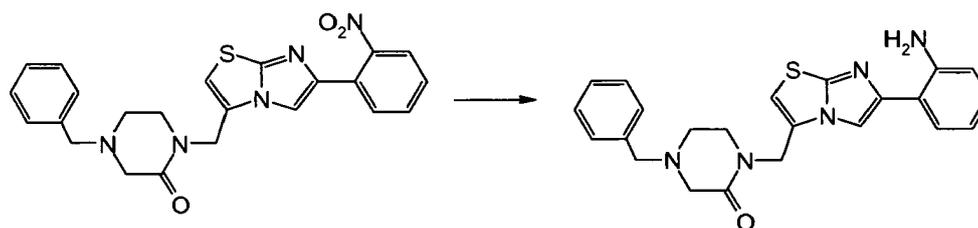
- 10 Se suspendió (3-nitro-5-tiazolo[5,4-c]piridin-2-il-fenil)-metanol (1,375 g, 5 mmol) en 25 mL de  $CH_2Cl_2$  y se enfrió con un baño de hielo. Se añadió gota a gota cloruro de tionilo (3,6 ml, 10 eq) y la mezcla de reacción se calentó lentamente a temperatura ambiente. Después de agitar durante una noche, a la mezcla de reacción se le añadieron 100 mL de éter, y la suspensión resultante se filtró para recoger 1,55 g del producto deseado (MS,  $M^+ + H = 293,1$ ).

Preparación de 4-bencil-1-((6-(2-nitrofenil)imidazo[2,1-b]tiazol-3-il)metil)piperazin-2-ona :



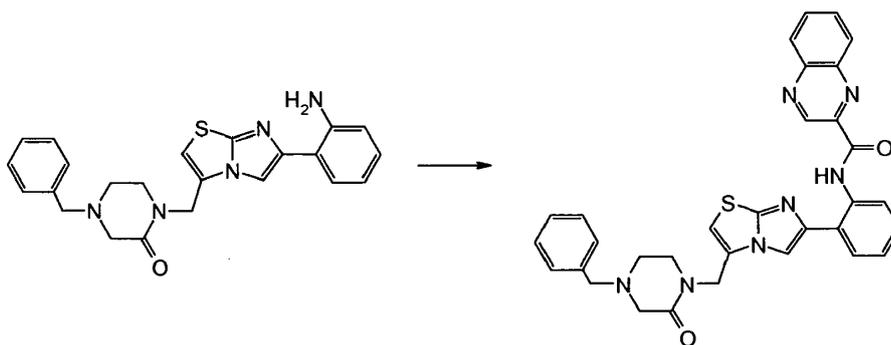
- 15 Se suspendieron 3-(clorometil)-6-(2-nitrofenil)imidazo[2,1-b]tiazol (292 mg, 1 mmol), 4-bencilpiperazin-2-ona (380 mg, 2 mmol) y NaH (88 mg, 2,2 eq) en 4 mL de DMF seca. La reacción se calentó a 100°C durante una noche. Después de enfriar a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se repartió entre acetato de etilo y agua. La capa orgánica se recogió, se secó y se evaporó para proveer el producto bruto, que se purificó adicionalmente por HPLC inversa para dar 211 mg del producto deseado 4-bencil-1-((6-(2-nitrofenil)imidazo[2,1-b]tiazol-3-il)metil)piperazin-2-ona (MS,  $M^+ + H = 448,1$ ).

Preparación de 1-((6-(2-aminofenil)imidazo[2,1-b]tiazol-3-il)metil)-4-bencilpiperazin-2-ona:



- 25 A una suspensión de 200 mg de 1-((6-(2-nitrofenil)imidazo[2,1-b]tiazol-3-il)metil)-4-bencilpiperazin-2-ona en 5 mL de MeOH se le añadieron 250 mg de hidrato de hidrosulfuro de sodio. La mezcla de reacción se calentó a 135°C durante 30 minutos (MW). Después de enfriar a temperatura ambiente, la mezcla se diluyó con 50 ml de agua y se extrajo con  $CH_2Cl_2$ . Las capas orgánicas combinadas se secaron ( $Na_2SO_4$ ) y se concentraron para proporcionar el producto bruto, que se puede purificar adicionalmente por HPLC de fase inversa para proveer 135 mg del producto diana 1-((6-(2-aminofenil)imidazo[2,1-b]tiazol-3-il)metil)-4-bencilpiperazin-2-ona (MS,  $M^+ + H = 418,1$ ).

- 30 Preparación del Compuesto 628:

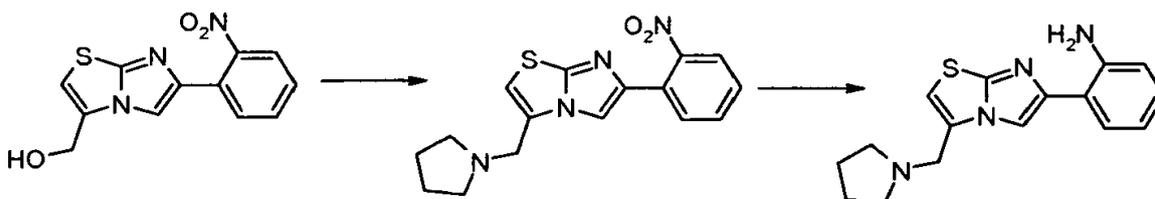


- 5 Se calentó una mezcla de 1-((6-(2-aminofenil)imidazo[2,1-b]tiazol-3-il)metil)-4-bencilpiperazin-2-ona (44 mg, 0,1 mmol) y cloruro de 2-quinoxalóilo (21 mg, 1,1 eq) en 2,5 mL de piridina durante 20 minutos a 160 °C (MW). Después de enfriar a temperatura ambiente, se eliminó la piridina y el producto bruto de la reacción se redisolvió en metanol y se purificó por HPLC de fase inversa para proveer 22 mg del producto deseado (MS,  $M^+ + H = 574,1$ ).

Preparación de 617, 618, 647, 648, 676, 677, 678, 679, 699, 741, 742 y 711:

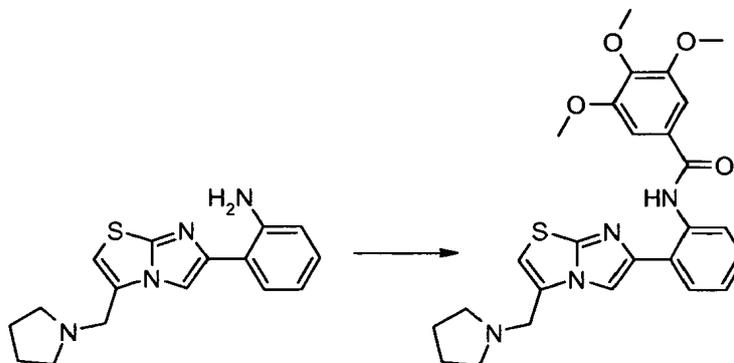
Estos compuestos se prepararon análogamente al Compuesto 628. Los productos se purificaron por HPLC de fase inversa.

- 10 Preparación de 2-(3-pirrolidin-1-ilmetil-imidazo[2,1-b]tiazol-6-il)-fenilamina:



- 15 Se enfrió [6-(2-nitro-fenil)-imidazo[2,1-b]tiazol-3-il]-metanol (110 mg, 0,4 mmol) en  $CH_2Cl_2$  (5 ml) con trietilamina (56 ul, 1 eq) a 0 °C. Se añadió cloruro de metilsulfonilo (31 ul, 1 eq) gota a gota, se agitó a 0 °C durante 10 min, se calentó hasta temperatura ambiente y se agitó durante 15 min. La reacción se inactivó por la adición de salmuera, y el mesilato se extrajo con  $CH_2Cl_2$ , se secó sobre  $Na_2SO_4$  y se concentró. El residuo se disolvió en acetonitrilo (3 ml), y se añadió trietilamina (31 ul, 1 eq), seguida de pirrolidina (66 ul, 2 eq). La mezcla de reacción se agitó durante 2 horas, se concentró y se trató con pentano. La cromatografía en columna en  $CH_2Cl_2$  (gradiente de 0 a 4% MeOH) proporcionó 6-(2-Nitro-fenil)-3-pirrolidin-1-ilmetil-imidazo[2,1-b]tiazol. Este material se disolvió en metanol (16 ml) y se añadió una disolución de hidrógeno sulfuro sódico (112 mg, 5 eq) en agua (4 ml). La mezcla de reacción se sometió a reflujo durante 2 días con cargas adicionales de NaHS (2 x 112 mg). La reacción se concentró para eliminar el metanol, y la disolución acuosa se extrajo con  $CH_2Cl_2$  (3 x 40 ml). Se secó la capa orgánica sobre  $Na_2SO_4$ , y se concentró para obtener el producto como una película amarilla, 109 mg. (MS,  $M^+ + H = 299,1$ )

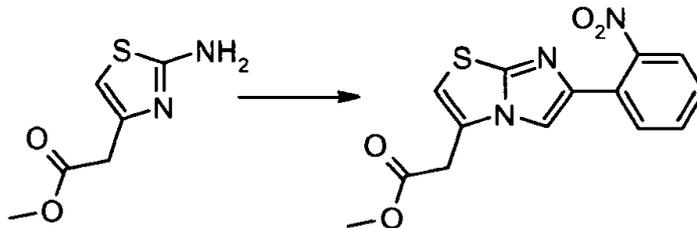
Preparación del Compuesto 620:



- 25 Se agitó 2-(3-pirrolidin-1-ilmetil-imidazo[2,1-b]tiazol-6-il)-fenilamina (200 umol) en 2 ml de piridina con cloruro de 3,4,5-trimetoibenzóilo (200 umol, 46 mg). La disolución se agitó durante 3 horas, se concentró hasta sequedad, se trató con Metanol y se purificó por HPLC preparativa. Las fracciones se liofilizaron para obtener 36 mg del producto como una sal de TFA. (MS,  $M^+ + H = 493,1$ .)

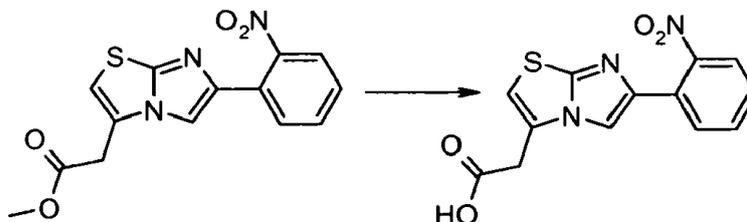
El Compuesto 619 se preparó en un modo análogo al Compuesto 620, usando los cloruros de ácido apropiados.

Preparación de éster etílico de ácido 6-(2-nitro-fenil)-imidazo[2,1-b]tiazol-3-carboxílico:

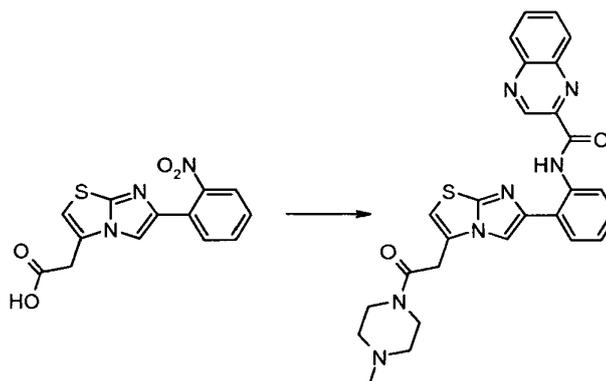


- 5 En una preparación típica, se mezcló éster metílico de ácido (2-Amino-tiazol-4-il)-acético (1,0 g, 5,8 mmol) con 30 mL de metil etil cetona junto con 2-bromo-2'-nitroacetofenona (1,42 g, 5,8 mmol). La mezcla de reacción se sometió a reflujo durante 1 hora y se agitó a 90 °C durante una noche. Después se enfrió a temperatura ambiente y se concentró hasta un aceite rojo. Los intentos de precipitar el producto por disolución en metanol y añadir agua resultaron en una emulsión. Se eliminó el metanol por roto-evaporación, y la emulsión acuosa se cargó a un embudo separador. Se ajustó el pH hasta 9 con NaHCO<sub>3</sub>, y la mezcla se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 50 ml). La capa orgánica combinada se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se concentró hasta un aceite rojo y se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> con un gradiente de 0 a 5% MeOH). El producto se obtuvo en forma de sólido rojo (0,59 g, 32% de rendimiento). (MS, M<sup>+</sup> + H =318,0.)

Preparación de ácido [6-(2-Nitro-fenil)-imidazo[2,1-b]tiazol-3-il]-acético:



- 15 Se combinó éster etílico de ácido 6-(2-nitro-fenil)-imidazo[2,1-b]tiazol-3-carboxílico (466 mg, 1,47 mmol) en 2:1 THF/Agua con 4 eq de NaOH (234 mg). La mezcla de reacción se calentó a 50°C durante 3 horas. La mezcla de reacción se concentró a sequedad, el residuo se disolvió en agua (20 ml), se lavó con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, y la capa acuosa se ajustó hasta pH = 3 con HCl 4N. Los sólidos se recogieron por filtración, se lavaron con agua y se secaron para obtener el producto ácido como un sólido pardo (442 mg, 99% de rendimiento) (MS, M<sup>+</sup> + H =304,0)
- 20 Preparación del Compuesto 649:



- 25 En un vial se disolvieron ácido [6-(2-Nitro-fenil)-imidazo[2,1-b]tiazol-3-il]-acético (30 mg, 100 uMol), N-metilpiperazina (10 mg, 1,0 eq) y N,N-Diisopropiletilamina (52 uL, 3,0 eq) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Se añadió HOAT (16 mg, 1,2 eq) a la mezcla de reacción seguido de EDCI (29 mg, 1,5 eq). La reacción se agitó durante una noche. Después de añadir 50% de NaHCO<sub>3</sub> saturado (2 ml) y de extraer con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 3 mL), la capa orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentró. La trituración con pentano proporcionó el producto de amida en forma de un sólido pardo.

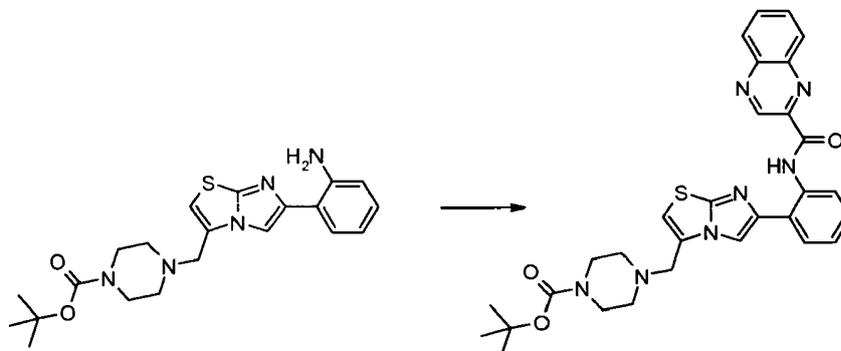
La amida anterior se disolvió en metanol (4 ml) con NaHS (34 mg, 6 eq) y se calentó en microondas a 150 °C durante 30 min. Se cargó MgSO<sub>4</sub> a la mezcla de reacción y tras filtrar, concentrar y tratar con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2x) se obtuvo la anilina deseada en la forma de una película roja.

- 30 La anilina anterior se disolvió en piridina (2 ml) y se cargó cloruro de 2-quinoxalóilo (38 mg, 2,0 eq) en forma de un sólido. Después de agitar durante una noche, la reacción se concentró hasta sequedad y se purificó sobre HPLC

preparativa para obtener el compuesto del título en forma de un sólido anaranjado (32,2 mg, 44% de rendimiento en 3 etapas). (MS,  $M^+ + H = 512,2$ )

Preparación del Compuesto 650:

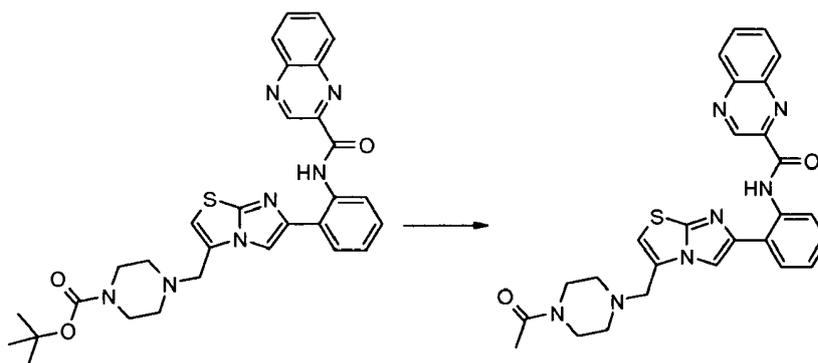
5



10

A un vial se le añadió éster terc-butílico de ácido 4-[6-(2-amino-fenil)-imidazo[2,1-b]tiazol-3-ilmetil]-piperazina-1-carboxílico (82 mg, 0,2 mmol), trietilamina (56  $\mu$ l, 2 eq) y  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anhidro (3 ml). Se añadió 2-quinoxaloilo (40 mg, 1,0 eq) en forma de un sólido. La mezcla de reacción se agitó durante 18 horas, se concentró y se trató con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . La purificación sobre gel de sílice con un eluyente de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (con gradiente 95:4:1  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :MeOH:Et<sub>3</sub>N) proporcionó el **Compuesto 650** en forma de un sólido amarillo. (MS,  $M^+ + H = 570,2$ )

Preparación del Compuesto 651:

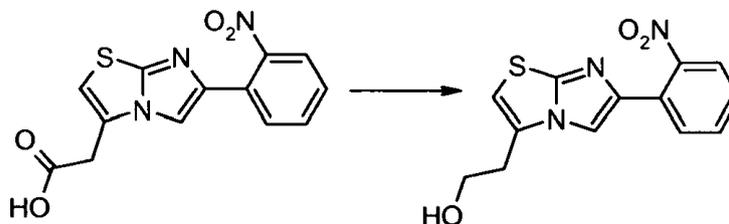


15

Se trató el Compuesto 650 (105 mg, 0,185 mmol) con 30% TFA en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (4 ml) durante 2 horas, se trató con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3x) y éter (3x), para obtener el Compuesto 441 bruto. La mitad de este material (92  $\mu$ mol) se disolvió en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (5 ml), junto con Et<sub>3</sub>N (70  $\mu$ l) y se enfrió a 0 °C. Se añadió anhídrido acético (10  $\mu$ l, 1 eq) y la mezcla de reacción se calentó a temperatura ambiente durante 1 hora. La reacción se inactivó con la adición de metanol y agua, y se concentró hasta sequedad. La purificación por HPLC preparativa de fase inversa y la liofilización proporcionaron el Compuesto 651 en forma de una sal de TFA. (MS,  $M^+ + H = 512,2$ )

Preparación de 2-[6-(2-Nitro-fenil)-imidazo[2,1-b]tiazol-3-il]-etanol

20

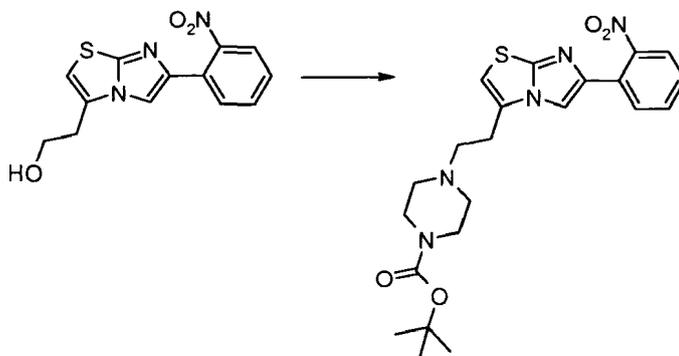


25

Se suspendió ácido [6-(2-nitro-fenil)-imidazo[2,1-b]tiazol-3-il]-acético (300 mg, 1,0 mmol) en THF (20 ml) y se agitó con NMM (110  $\mu$ l, 1 eq) a temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla de reacción se enfrió a 0 °C y se cargó cloroformiato de isobutilo (131  $\mu$ l, 1 eq), y la mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 2 horas, momento en el cual se completó la formación de anhídrido mixto. Se añadió una mezcla de NaBH<sub>4</sub> (38 mg) en agua (5 ml) gota a gota a 0 °C y se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante 1 hora. La reacción no procedió hasta completarse con 1 eq.; por lo tanto, se repitió la adición de NaBH<sub>4</sub> con 3 eq de NaBH<sub>4</sub>. La reacción no se completó al cabo de 1 hora, por consiguiente la mezcla de reacción se concentró hasta sequedad, se cargó con THF nuevo, seguido de NaBH<sub>4</sub> (1 eq) y se agitó durante una noche. La LC-MS indicó que la reacción se había completado, por lo tanto la mezcla se concentró hasta sequedad y se añadieron  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (50 ml) y agua (20 ml). Las capas se separaron, y la

capa acuosa se extrajo con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 x 50 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y se concentraron hasta sequedad. El producto se purificó sobre gel de sílice (Pentano con un gradiente de 15% a 100% EtOAc), se concentró y se liofilizó a partir de  $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$  (160 mg, 55% de rendimiento). (MS,  $\text{M}^+ + \text{H} = 290,0$ )

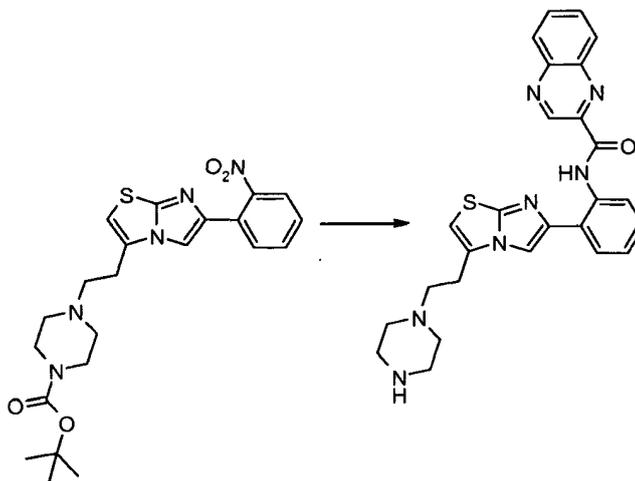
- 5 Preparación de éster terc-butílico de ácido 4-{2-[6-(2-nitro-fenil)-imidazo[2,1-b]tiazol-3-il]-etil}-piperazina-1-carboxílico:



- 10 Se disolvió 2-[6-(2-Nitro-fenil)-imidazo[2,1-b]tiazol-3-il]-etanol (40 mg, 0,14 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anhidro y se enfrió hasta  $0^\circ\text{C}$ . Se añadió trietilamina (19  $\mu\text{l}$ , 1eq) seguida de cloruro de metanosulfonilo (11  $\mu\text{l}$ , 1 eq). La mezcla de reacción se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante 30 min. La LC-MS indicó que la reacción estaba incompleta, por lo tanto se repitió la adición de Trietilamina (19  $\mu\text{l}$ , 1eq) y cloruro de metanosulfonilo (11  $\mu\text{l}$ , 1 eq). La mezcla de reacción se inactivó con la adición de 2 ml de salmuera, se extrajo con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2x2ml), se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y se concentró hasta obtener el mesilato en forma de una película amarilla.

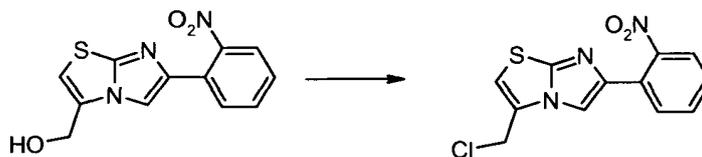
- 15 El mesilato se disolvió en acetonitrilo anhidro (2 ml), Trietilamina (38  $\mu\text{l}$ , 2 eq), y se agitó con N-Boc-piperazina (26 mg, 2 eq) durante una noche. La mezcla de reacción aún fue exclusivamente el mesilato. La mezcla de reacción se cargó con yoduro de sodio (41 mg) y se agitó durante 6 días, después se purificó por HPLC preparativa de fase inversa. Las fracciones se tornaron alcalinas con  $\text{NaHCO}_3$  (sat), se concentraron para eliminar  $\text{CH}_3\text{CN}$ , y la capa acuosa se extrajo con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Se secó la capa orgánica y se concentró para obtener el producto como una película amarilla. (MS,  $\text{M}^+ + \text{H} = 458,2$ )

- 20 Preparación del Compuesto 680:



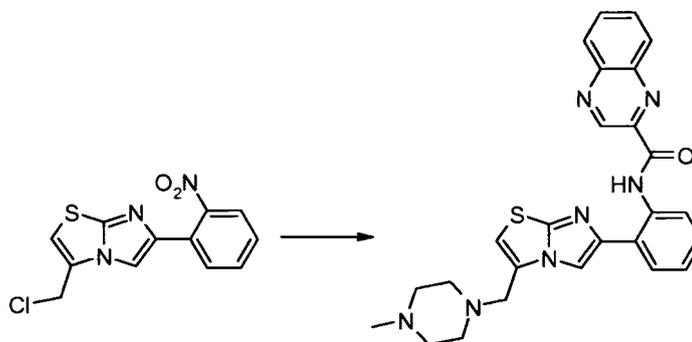
- 25 En un tubo de microondas se añadió éster terc-butílico de ácido 4-{2-[6-(2-Nitro-fenil)-imidazo[2,1-b]tiazol-3-il]-etil}-piperazina-1-carboxílico (24 mg, 0,05 mmol), NaHS (30 mg, 10 eq) y 5 ml de metanol. La mezcla de reacción se calentó en microondas a  $150^\circ\text{C}$  durante 30 min. La reacción procedió, pero no se completó. Se cargaron 30 mg adicionales de NaHS, y la mezcla de reacción se calentó en microondas a  $150^\circ\text{C}$  durante 30 minutos. Nuevamente, se cargaron 15 mg de NaHS y se calentó en microondas a  $160^\circ\text{C}$  durante 20 minutos. Los sólidos se retiraron por filtración. La disolución se secó sobre  $\text{MgSO}_4$  y se concentró para obtener el intermedio de amina. Esta amina (0,05 mmol) se mezcló con piridina (3 ml), con cloruro de 2-quinoxalóilo (20 mg, 2 eq) y se calentó en microondas a  $160^\circ\text{C}$  durante 10 min. La reacción se completó parcialmente, por lo tanto después de cargar otros dos equivalentes de cloruro de 2-quinoxalóilo (20 mg) la reacción se calentó en microondas durante 20 minutos a  $160^\circ\text{C}$ . La mezcla de reacción se concentró hasta sequedad y se purificó por cromatografía sobre gel de sílice (eluyente  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , gradiente 0 a 5% MeOH). El residuo se trató con 25% TFA/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  durante 3 horas, se concentró y purificó en HPLC preparativa de fase inversa. (MS,  $\text{M}^+ + \text{H} = 484,2$ ).

Preparación de 3-Clorometil-6-(2-nitro-fenil)-imidazo[2,1-b]tiazol:



5 A una disolución de [6-(2-Nitro-fenil)-imidazo[2,1-b]tiazol-3-il]-metanol (1,0 g, 3,63 mmol) en diclorometano anhidro (15 ml) se le añadió lentamente cloruro de tionilo (2 ml, 7,5 eq). La disolución se tornó homogénea, seguida del desarrollo de un precipitado amarillo. Después de 5 minutos, se añadió una cantidad catalítica de DMF (1 gota) y la mezcla se agitó durante 1 hora, se concentró hasta sequedad, se trató con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2x) luego éter (1x) y se secó a presión reducida. Se obtuvo 1,53 g de un sólido amarillo y se asumió como un rendimiento cuantitativo. (MS, M<sup>+</sup> + H =294,0)

10 Preparación del Compuesto 700:



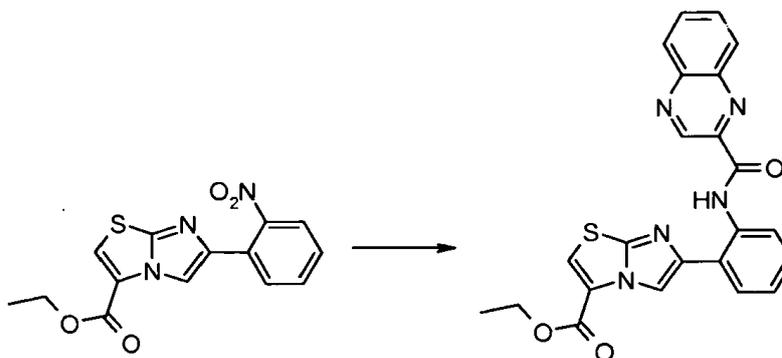
Desplazamiento: 3-Clorometil-6-(2-nitro-fenil)-imidazo[2,1-b]tiazol (126 mg, 0,300 mmol) en 2 ml de 1-metil-piperazina se calentó en microondas a 110 °C durante 30 minutos. La mezcla de reacción se concentró hasta sequedad, y trató con metanol para obtener 3-(4-Metil-piperazin-1-ilmetil)-6-(2-nitro-fenil)-imidazo[2,1-b]tiazol bruto.

15 Nitro-reducción: El residuo anterior se disolvió en etanol (20 ml) y se añadió paladio al 10% sobre carbono con agitación. La atmósfera se evacuó y se volvió a llenar con nitrógeno (3x) y se agitó en globo de H<sub>2</sub> (1 atm.) durante 18 horas. La mezcla de reacción se filtró a través de Celite, se concentró hasta sequedad y se trató con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y pentano para obtener la amina en forma de un aceite rojo.

20 Formación de amida: La amina de arriba se disolvió en piridina (3 ml), se añadió a un tubo de microondas que contenía cloruro de 2-quinoxalilo (64 mg, 1,1 eq) y se calentó en microondas durante 30 minutos a 160 °C. Se completó solamente 50% de la reacción, por lo tanto se cargó otra porción de cloruro de 2-quinoxalilo y se siguió calentando durante 30 minutos a 160 °C. La mezcla de reacción se concentró hasta sequedad y se purificó por HPLC preparativa de fase inversa. (MS, M<sup>+</sup> + H =512,2)

25 Los Compuestos 714, 715, 716 y 717 se prepararon en un modo análogo al Compuesto 700, usando las aminas apropiadas. (Se eliminaron los grupos protectores Boc por tratamiento con 25% TFA en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> durante 3 horas, antes de la purificación).

Preparación del Compuesto 718:



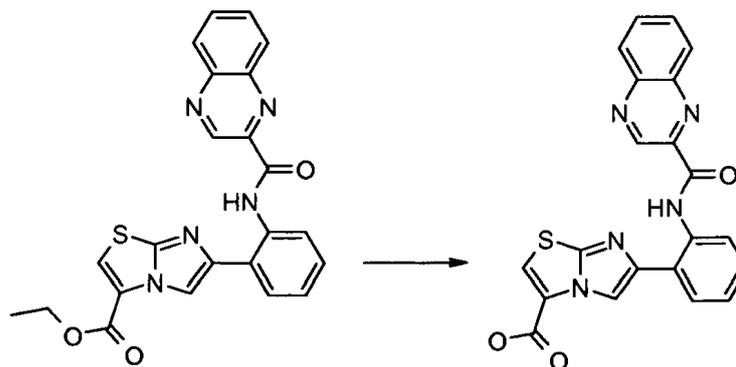
30 Se disolvió éster etílico de ácido 6-(2-nitro-fenil)-imidazo[2,1-b]tiazol-3-carboxílico (0,342 g, 1 mmol) en 3:1 Etanol:THF (80 ml). A la mezcla de reacción se le añadió Pd/C al 10% (30 mg) y la mezcla de reacción se agitó en

un globo de H<sub>2</sub> (1 atm) durante 7 días con cambios periódicos de catalizador adicional. La mezcla de reacción se filtró a través de Celite, se concentró hasta sequedad y se trató con pentano para obtener la anilina en forma de un sólido anaranjado, 289 mg.

- 5 Una porción de la anilina de arriba (56 mg, 200  $\mu$ mol) se disolvió en piridina (4 ml) y se agitó con cloruro de 2-quinoxalilo (46 mg 1,2 eq) durante una noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se inactivó con etanol, se concentró hasta sequedad y se trató con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/pentano. El residuo se disolvió en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se lavó con 50% de NaHCO<sub>3</sub> saturado, acuoso, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. El producto se purificó sobre gel de sílice (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> con un gradiente de 0 a 5% de metanol). (MS, M<sup>+</sup> + H =444,1)

- 10 Se preparó el Compuesto 720 en un modo idéntico al Compuesto 718, usando éster metílico de ácido [6-(2-Nitro-fenil)-imidazo[2,1-b]tiazol-3-il]-acético como el material de partida.

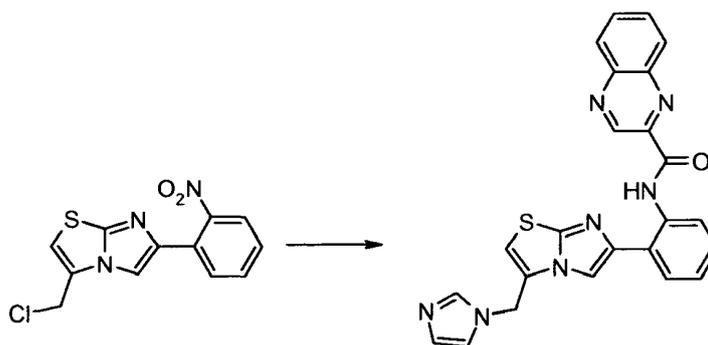
Preparación del Compuesto 719:



- 15 Se disolvió éster etílico de ácido 6-{2-[(quinoxalina-2-carbonil)-amino]-fenil}-imidazo[2,1-b]tiazol-3-carboxílico en 1:10 THF:Metanol (33 ml) y se agitó con NaOH acuoso 1 M (4 ml) durante una noche. La reacción se completó por LC-MS. La mezcla de reacción se concentró para eliminar los compuestos orgánicos y se cargó con agua (20 mL). La capa alcalina (pH=13) acuosa se lavó con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 x 20 ml). La capa acuosa se acidificó (pH=2) con HCl 4 M y se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 20 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtraron y se concentraron con pentano para obtener el producto deseado en forma de un sólido anaranjado. (MS, M<sup>+</sup> + H =416,0)

- 20 El Compuesto 721 se preparó en un modo idéntico al Compuesto 719, usando el material de partida análogo éster metílico.

Preparación del Compuesto 745:



- 25 Desplazamiento: Se calentaron 3-clorometil-6-(2-nitro-fenil)-imidazo[2,1-b]tiazol (0,200 mmol), imidazol (68 mg, 5 eq) y trietilamina (140  $\mu$ l) en acetonitrilo (3 ml) a 110 °C durante 30 minutos en un microondas. La mezcla de reacción se concentró hasta sequedad.

- 30 Nitro-reducción: El residuo anterior se disolvió en metanol (6 ml), y se añadió una mezcla de NaHS (67 mg, 6 eq) en agua (1 ml), y la reacción se agitó a 60 °C durante una noche. A la mañana siguiente, se cargó otra porción de NaHS (67 mg, 6 eq) y la reacción se calentó a 85 °C durante 3 horas. La reacción se enfrió, se concentró hasta sequedad, se diluyó con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y agua, y se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 x 40 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se concentraron.

Formación de amida: La amina de arriba se disolvió en piridina (3 ml) y se agitó con cloruro de 2-quinoxalilo (46 mg, 1,2 eq) a temperatura ambiente durante 3 horas. La mezcla de reacción se concentró hasta sequedad y se purificó por HPLC preparativa de fase inversa. Y se liofilizó con HCl para obtener la sal de HCl. (MS, M<sup>+</sup> + H = 452,1)

## Ejemplo 2: Identificación de moduladores de sirtuina

Se usó un ensayo basado en polarización de fluorescencia o espectrometría de masas para identificar los moduladores de actividad de SIRT1. Se usó el mismo ensayo para identificar moduladores de cualquier proteína sirtuina. Los ensayos de polarización por fluorescencia utilizan uno o dos péptidos distintos basados en un fragmento de p53, una diana de desacetilación de sirtuina conocida. Los compuestos 1-18 se ensayaron usando un sustrato que contenía el péptido 1, que tiene residuos de 14 aminoácidos de la siguiente manera: GQSTSSHSK(Ac)NleSTEG (SEC ID NÚM: 1) donde K(Ac) es un residuo lisina acetilado y Nle es una norleucina. El péptido está marcado con el fluoróforo MR121 (excitación 635 nm/emisión 680 nm) en el término C y con biotina en el término N. La secuencia del sustrato de péptido se basa en p53 con varias modificaciones. En particular, todos los residuos arginina y leucina que no sean la lisina acetilada han sido reemplazados con serina, de modo que el péptido no es susceptible a escisión de tripsina en ausencia de desacetilación. Además, el residuo de metionina naturalmente presente en la secuencia ha sido reemplazado con la norleucina, ya que la metionina puede ser susceptible a oxidación durante la síntesis y la purificación. Los compuestos 19-56 se ensayaron usando un sustrato que contenía el péptido 2, que tiene residuos de 20 aminoácidos de la siguiente manera: EE-K(biotin)-GQSTSSHSK(Ac)NleSTEG-K(MR121)-EE-NH<sub>2</sub> (SEC ID NÚM: 2) donde K(biotina) es un residuo lisina biotinilado, K(Ac) es un residuo lisina acetilado, Nle es norleucina y K(MR121) es un residuo lisina modificado por un fluoróforo MR121. Este péptido está marcado con el fluoróforo MR121 (excitación 635 nm/emisión 680 nm) en el término C y con biotina en el término N. La secuencia de los sustratos de péptido se basan en p53 con varias modificaciones. En particular, todos los residuos arginina y leucina que no sean residuos lisina acetilados han sido reemplazados con serina, de modo que los péptidos no son susceptibles a escisión de tripsina en ausencia de desacetilación. Además, los residuos de metionina naturalmente presentes en las secuencias han sido reemplazados con la norleucina, ya que la metionina puede ser susceptible a oxidación durante la síntesis y la purificación. Como un sustrato alternativo en el ensayo, el siguiente péptido 3 también se ha utilizado para ensayar los Compuestos 19 a 56: Ac-EE-K(biotina)-GQSTSSHSK(Ac)NleSTEG-K(5TMR)-EE-NH<sub>2</sub> (SEC ID NÚM: 3) donde K(Ac) es un residuo lisina acetilado y Nle es una norleucina. El péptido está marcado con el fluoróforo 5TMR (excitación 540 nm/emisión 580 nm) en el término C. La secuencia del sustrato de péptido también se basa en p53 con varias modificaciones. Además, el residuo de metionina naturalmente presente en la secuencia se reemplazó con la norleucina, ya que la metionina puede ser susceptible a oxidación durante la síntesis y la purificación.

Los sustratos de péptido se expusieron a una proteína sirtuina en presencia de NAD<sup>+</sup> para permitir la desacetilación del sustrato y tornarlo sensible a la escisión por tripsina. Luego se añadió tripsina y la reacción se llevó a cabo hasta completarse (es decir, se escindió el sustrato desacetilado) liberando el fragmento MR121 o 5TMR. Se añade luego estreptavidina a la reacción, donde puede unirse tanto al sustrato no escindido (es decir, a cualquier sustrato acetilado remanente) y a la porción no fluorescente del sustrato de péptido escindido (es decir, el fragmento que contiene biotina). La señal de polarización por fluorescencia observada para los sustratos de péptido de longitud total unidos a estreptavidina fue superior que la señal de polarización por fluorescencia observada para el fragmento C-terminal MR121 o 5TMR liberado. De esta manera, la polarización por fluorescencia obtenida es inversamente proporcional al nivel de desacetilación (p. ej., la señal es inversamente proporcional a la actividad de la proteína sirtuina). Los resultados se leyeron en una lectora de polarización por fluorescencia de microplacas (Molecular Devices Spectramax MD) con filtros de excitación y emisión adecuados.

Los ensayos de polarización por fluorescencia que usan el péptido 1 se llevaron a cabo de la siguiente manera: se incuban sustrato peptídico 0,5  $\mu$ M y  $\beta$ NAD<sup>+</sup> 150  $\mu$ M con 0,1  $\mu$ g/mL de SIRT1 durante 60 minutos a 37°C en un tampón de reacción (Tris-acetato 25, mM, pH8, 137 mM Na-Ac, 2,7 mM K-Ac, 1 mM Mg-Ac, 0,05% Tween-20, 0,1% Pluronic F127, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, DTT 5 mM, 0,025% BSA, nicotinamida 0,15 mM). Los compuestos de ensayo 1-18 se solubilizaron en DMSO y se añadieron a la reacción a 11 concentraciones que oscilaron entre 0,7  $\mu$ M y 100  $\mu$ M.

Los ensayos de polarización por fluorescencia que usan el péptido 2 se pueden llevar a cabo de la siguiente manera: se incubaron sustrato peptídico 0,5  $\mu$ M y  $\beta$ NAD<sup>+</sup> 120  $\mu$ M con SIRT1 3 nM durante 20 minutos a 25°C en un tampón de reacción (Tris-acetato 25 mM, pH8, 137 mM Na-Ac, 2,7 mM K-Ac, 1 mM Mg-Ac, 0,05% Tween-20, 0,1% Pluronic F127, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, DTT 5 mM, 0,025% BSA). Los compuestos de ensayo 19-56 se solubilizaron en DMSO y se añadieron a la reacción a 10 concentraciones que oscilaron entre 300  $\mu$ M y 0.15  $\mu$ M en diluciones triples.

Después de la incubación con SIRT1, se añadió nicotinamida a la reacción hasta una concentración final de 3 mM para detener la reacción de desacetilación y se añadió 0,5  $\mu$ g/mL de tripsina para escindir el sustrato desacetilado. La reacción se incubó durante 30 minutos a 37°C en presencia de estreptavidina 1  $\mu$ M. La polarización fluorescente se determinó a longitudes de onda de excitación (650 nm) y emisiones (680 nm). El nivel de actividad de la proteína sirtuina en presencia de diversas concentraciones del compuesto de ensayo se determina entonces y puede compararse con el nivel de actividad de la proteína sirtuina en ausencia del compuesto de ensayo, y/o con el nivel de actividad de las proteínas sirtuina en el control negativo control (p. ej., nivel de inhibición) y en el control positivo (p. ej., nivel de activación) anteriormente descritos.

Para los ensayos de polarización por fluorescencia, un control para inhibición de actividad de sirtuina se lleva a cabo añadiendo 1  $\mu$ L de nicotinamida 500 mM como control negativo al comienzo de la reacción (p. ej., permite la determinación de la inhibición de sirtuina máxima). Se llevó a cabo un control para activación de la actividad de

sirtuina usando 3 nM de proteína sirtuina, con 1  $\mu$ L de DMSO en lugar del compuesto, para alcanzar una desacetilación inicial del sustrato (p. ej., para determinar la actividad de sirtuina normalizada).

5 El ensayo de espectrometría de masas utiliza un péptido que tiene residuos de 20 aminoácidos de la siguiente manera: Ac-EE-K(biotina)-GQSTSSHSK(Ac)NleSTEG-K(5TMR)-EE-NH<sub>2</sub> (SEC ID NÚM: 3) donde K(Ac) es un residuo lisina acetilado y Nle es una norleucina. El péptido está marcado con el fluoróforo 5TMR (excitación 540 nm/emisión 580 nm) en el término C. La secuencia del sustrato de péptido se basa en p53 con varias modificaciones. Además, el residuo de metionina naturalmente presente en la secuencia se reemplazó con la norleucina, ya que la metionina puede ser susceptible a oxidación durante la síntesis y la purificación.

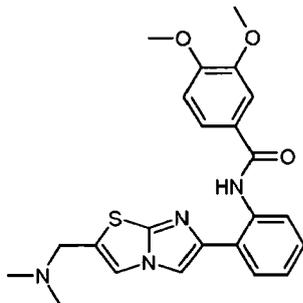
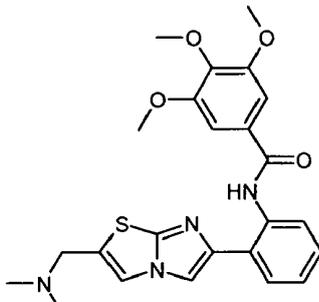
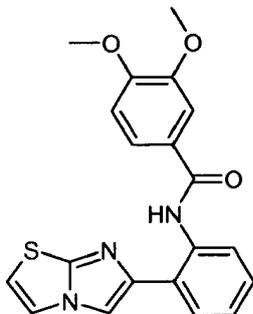
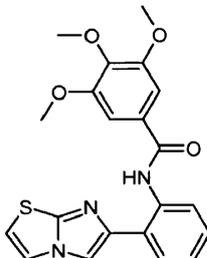
10 El ensayo de espectrometría de masas se lleva a cabo de la siguiente manera: Se incuban sustrato peptídico 0,5  $\mu$ M y  $\beta$ NAD<sup>+</sup> 120  $\mu$ M con SIRT1 10 nM durante 25 minutos a 25°C en un tampón de reacción (Tris-acetato 50 mM, pH 8, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, DTT 5 mM, 0,05% BSA). Los compuestos de ensayo se pueden añadir a la reacción como se describió anteriormente. El gen de SirT1 se clona en un vector que contiene el promotor T7 y se transforma en BL21(DE3). Después de 25 minutos de incubación con SIRT1, se añaden 10  $\mu$ L de ácido fórmico al  
15 10% para detener la reacción. Las reacciones se sellan y congelan para posterior análisis de espectrometría de masas. La determinación de la masa del péptido de sustrato permite la determinación precisa del grado de acetilación (es decir, el material de partida) en comparación con el péptido desacetilado (producto).

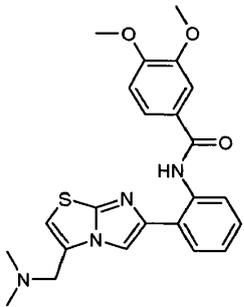
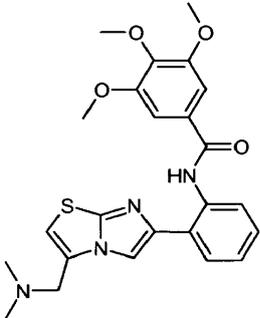
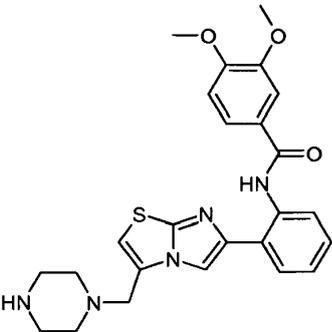
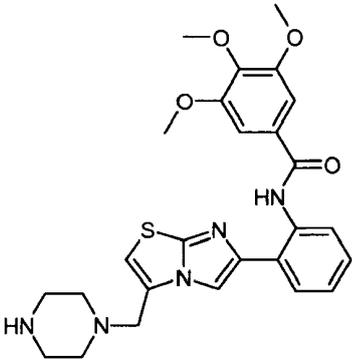
Para el ensayo basado en espectrometría de masas, un control para inhibición de actividad de sirtuina se lleva a cabo añadiendo 1  $\mu$ L de nicotinamida 500 mM como control negativo al comienzo de la reacción (p. ej., permite la  
20 determinación de la inhibición de sirtuina máxima). Se realiza un control para activación de actividad de sirtuina usando 10 nM de proteína sirtuina, con 1  $\mu$ L de DMSO en lugar del compuesto, para determinar la cantidad de desacetilación del sustrato en un punto de tiempo determinado dentro del intervalo lineal del ensayo. Este punto de tiempo es el mismo que se usó para los compuestos de ensayo y, dentro del intervalo lineal, el punto de tiempo representa un cambio en velocidad.

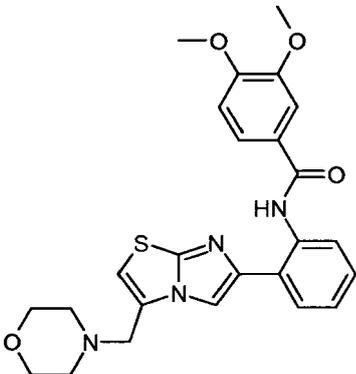
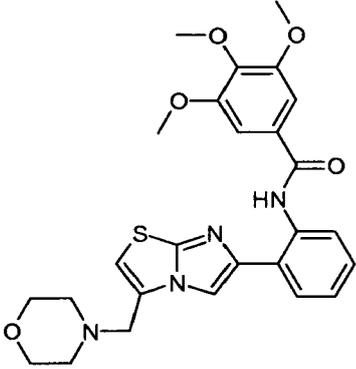
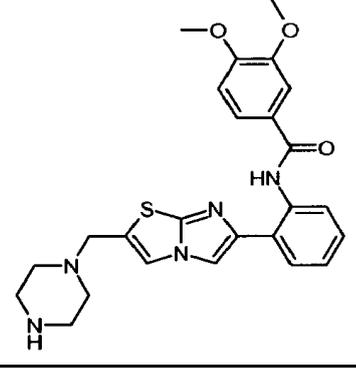
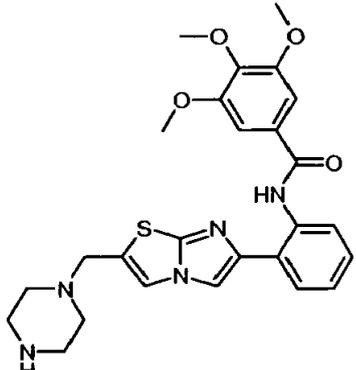
25 Para cada uno de los ensayos precedentes, la proteína SIRT1 se expresó y purificó de la siguiente manera. El gen de SirT1 se clonó en un vector que contiene el promotor T7 y se transformó en BL21(DE3). La proteína se expresó por inducción con IPTG 1 mM como una proteína de fusión marcada con His N-terminal a 18°C durante una noche, y se cosechó a 30.000 x g. Las células se lisaron con lisozima en tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM, Tris[2-carboxietil] fosfina 2 mM (TCEP), 10  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub>, NaCl 200 mM) y se trataron además con sonicación durante 10 min para lisis  
30 completa. La proteína se purificó en una columna Ni-NTA (Amersham) y se mezclaron las fracciones que contenían la proteína pura, se concentraron y se pasaron por una columna (Sephadex S200 26/60 global). La proteína soluble que contenía el pico se recogió y se pasó por una columna de intercambio iónico (MonoQ). La elución en gradiente (200 mM - 500 mM NaCl) produjo la proteína pura. Esta proteína se concentró y dializó contra tampón de diálisis (20 mM Tris-HCl, 2 mM TCEP) durante una noche. La proteína se repartió en alícuotas y se congeló a -80°C hasta uso  
35 posterior.

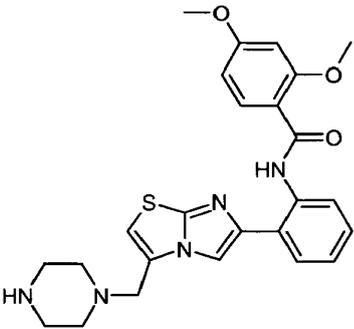
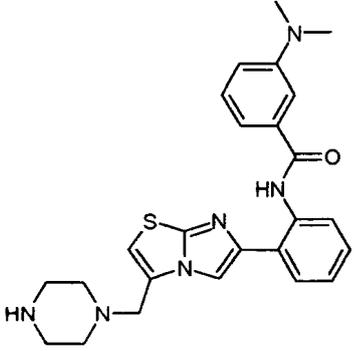
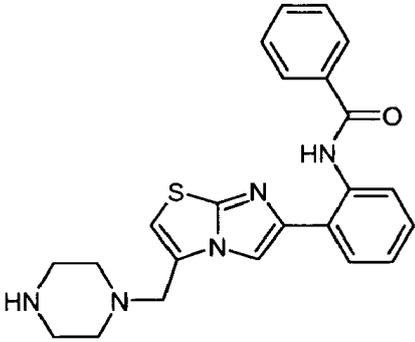
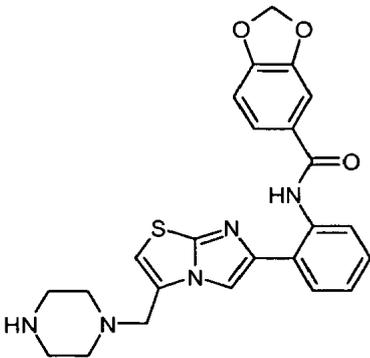
Los compuestos moduladores de sirtuina que activaron SIRT1 se identificaron usando el ensayo anteriormente descrito y se indican en la Tabla 4. Los valores ED<sub>50</sub> para los compuestos activadores en el ensayo de polarización por fluorescencia (FP) o en el ensayo de espectrometría de masas (MS) se representan con A' (ED<sub>50</sub> = < 5 $\mu$ M), A (ED<sub>50</sub> = 5-50  $\mu$ M), B (ED<sub>50</sub> = 51-100  $\mu$ M), C (ED<sub>50</sub> = 101-150  $\mu$ M) y D (ED<sub>50</sub> = >150  $\mu$ M). NT significa que el compuesto no fue ensayado usando el ensayo indicado. NA significa que el compuesto no fue activo en el ensayo  
40 indicado. Número de veces de activación, según lo determinado en la MS se representa con A (número de veces de activación >250%), B (número de veces de activación <250%) o C (sin número de veces de activación). El valor ED<sub>50</sub> de resveratrol para activación de SIRT1 es 16  $\mu$ M y el número de veces de activación de resveratrol para SIRT1 en el ensayo de MS es aproximadamente 200%. De modo similar, los valores CI<sub>50</sub> para los compuestos inhibidores se representan con A (CI<sub>50</sub> = <50  $\mu$ M), B (CI<sub>50</sub> = 51-100  $\mu$ M), C (CI<sub>50</sub> = 101-150  $\mu$ M) y D (CI<sub>50</sub> = >150  $\mu$ M).  
45

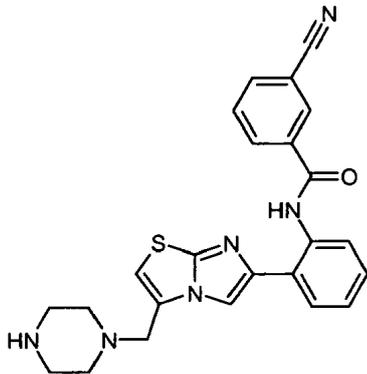
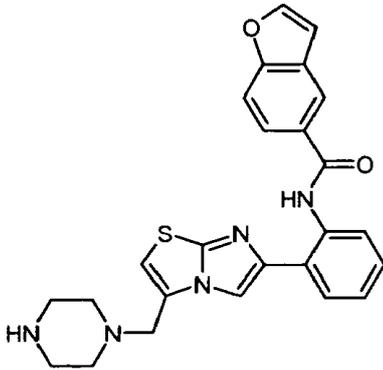
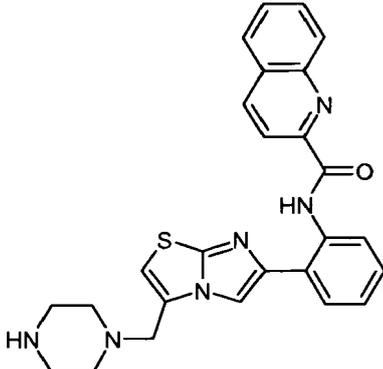
Tabla 4. Activadores de Sirt1

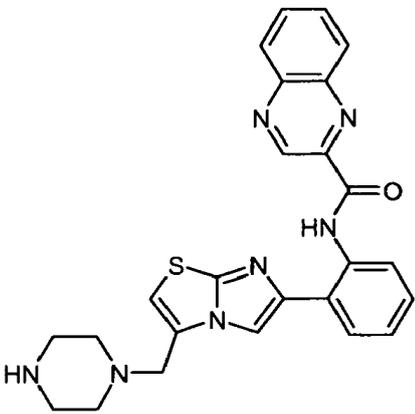
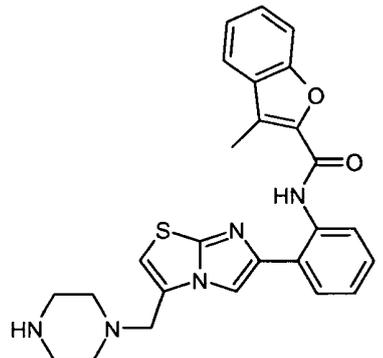
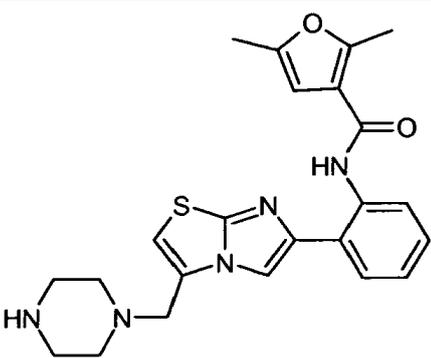
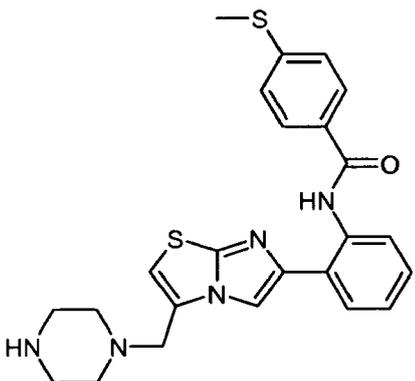
COMPUESTO NÚM.	[M+H] <sup>+</sup>	ESTRUCTURA	ED <sub>50</sub> ENSAYO FP	ED <sub>50</sub> ENSAYO MS	NÚM. DE VECES DE ACT. MS
178	437			a	a
179	467			A'	A
203	380			A'	B
204	410			A'	A

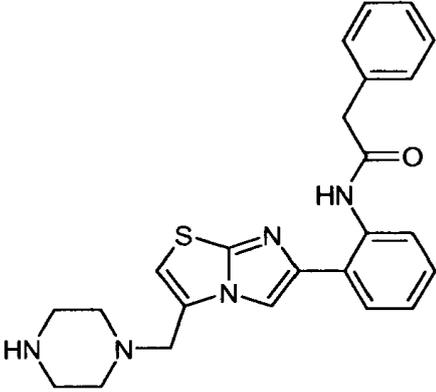
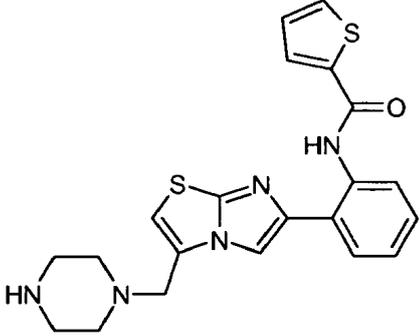
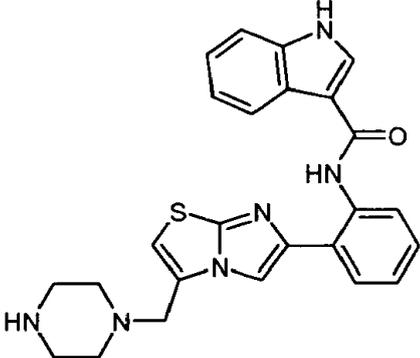
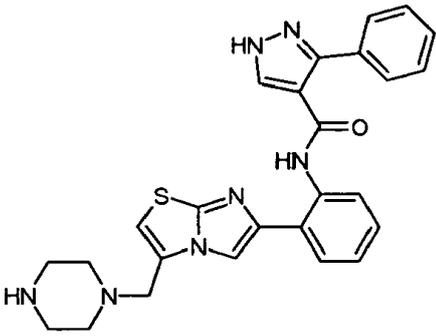
COMPUESTO NÚM.	[M+H] <sup>+</sup>	ESTRUCTURA	ED <sub>50</sub> ENSAYO FP	ED <sub>50</sub> ENSAYO MS	NÚM. DE VECES DE ACT. MS
205	437			A	A
206	467			A	A
207	478			A	A
208	508			A	A

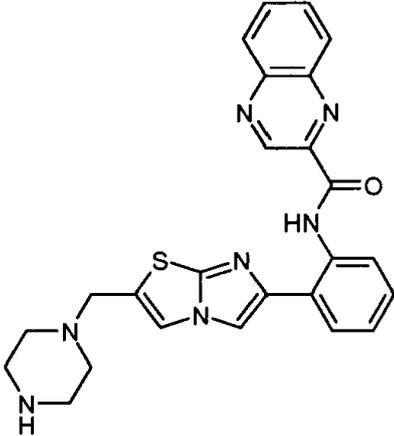
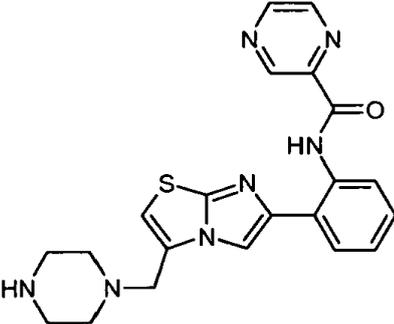
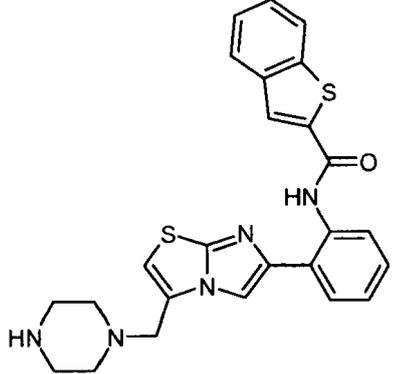
COMPUESTO NÚM.	[M+H] <sup>+</sup>	ESTRUCTURA	ED <sub>50</sub> ENSAYO FP	ED <sub>50</sub> ENSAYO MS	NÚM. DE VECES DE ACT. MS
209	479			A	A
210	509			A	B
270	478			A	A
271	508			A'	A

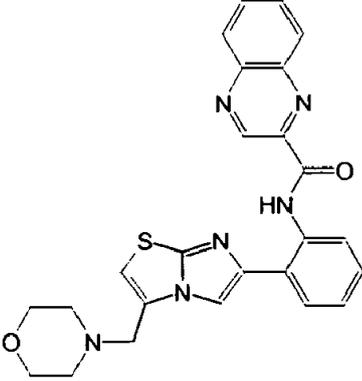
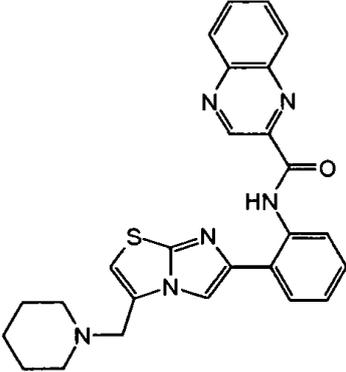
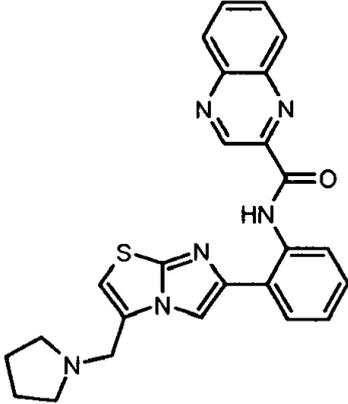
COMPUESTO NÚM.	[M+H] <sup>+</sup>	ESTRUCTURA	ED <sub>50</sub> ENSAYO FP	ED <sub>50</sub> ENSAYO MS	NÚM. DE VECES DE ACT. MS
326	478			A	B
327	461			A	A
328	418			B	A
329	462			A	A

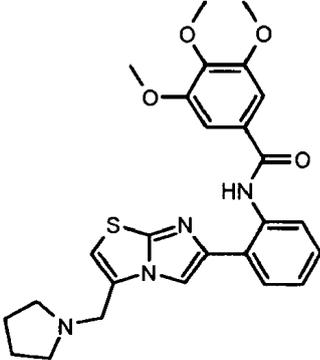
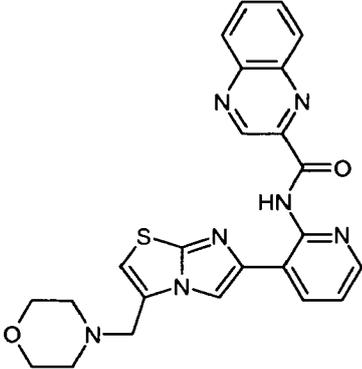
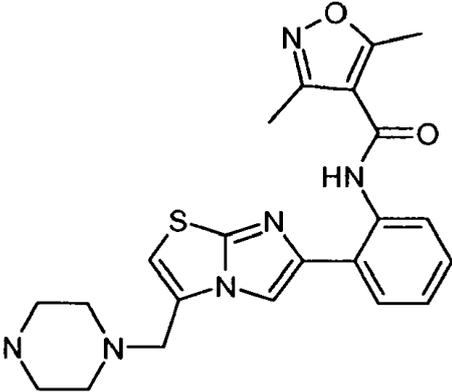
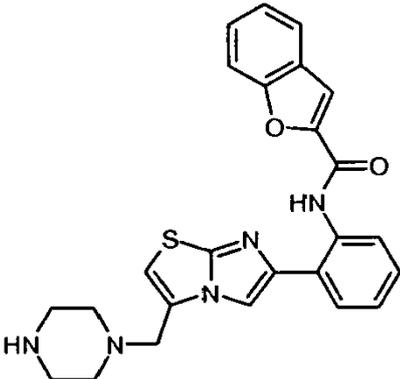
COMPUESTO NÚM.	[M+H] <sup>+</sup>	ESTRUCTURA	ED <sub>50</sub> ENSAYO FP	ED <sub>50</sub> ENSAYO MS	NÚM. DE VECES DE ACT. MS
330	443			A	A
338	458			A	A
440	468			A'	A

COMPUESTO NÚM.	[M+H] <sup>+</sup>	ESTRUCTURA	ED <sub>50</sub> ENSAYO FP	ED <sub>50</sub> ENSAYO MS	NÚM. DE VECES DE ACT. MS
441	470			A'	A
442	472			A'	A
443	436			A	A
444	464			A	A

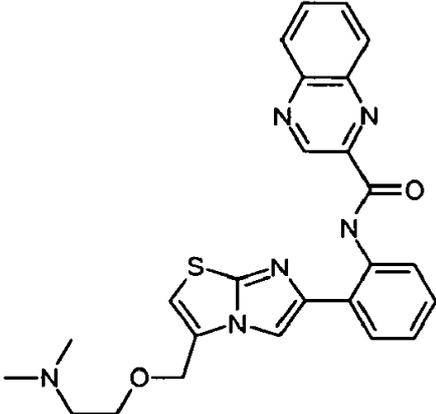
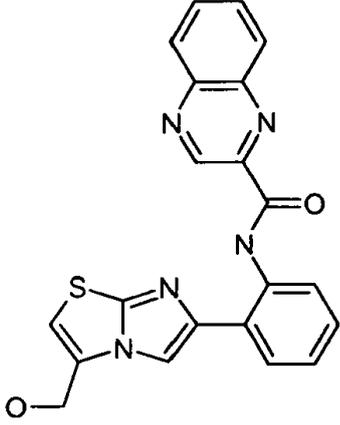
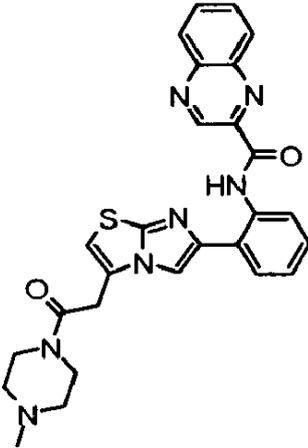
COMPUESTO NÚM.	[M+H] <sup>+</sup>	ESTRUCTURA	ED <sub>50</sub> ENSAYO FP	ED <sub>50</sub> ENSAYO MS	NÚM. DE VECES DE ACT. MS
445	432			A	B
446	424			A	B
510	457			A'	A
512	484			A'	A

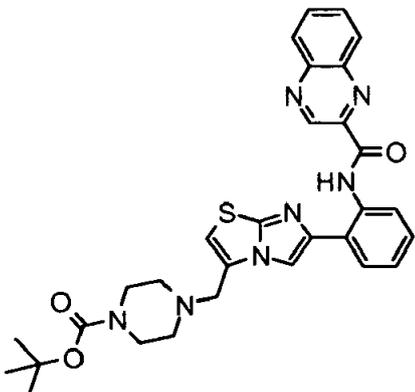
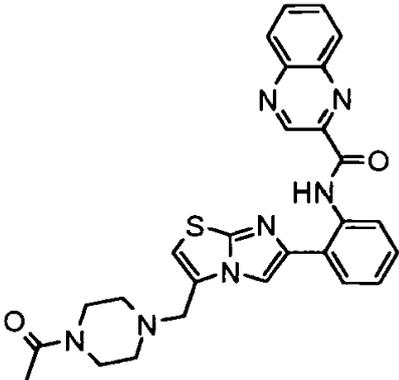
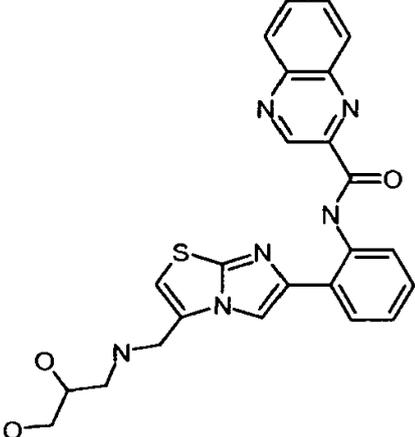
COMPUESTO NÚM.	[M+H] <sup>+</sup>	ESTRUCTURA	ED <sub>50</sub> ENSAYO FP	ED <sub>50</sub> ENSAYO MS	NÚM. DE VECES DE ACT. MS
513	470			A'	A
543	420			A'	A
544	474			A	A

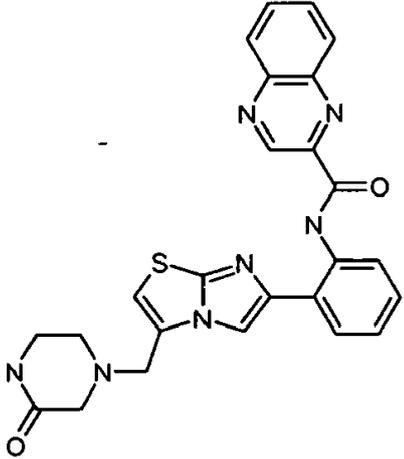
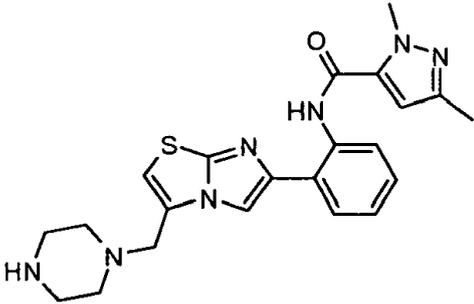
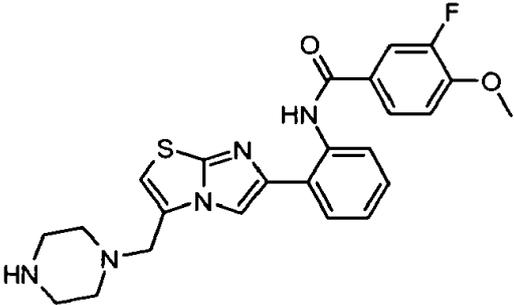
COMPUESTO NÚM.	[M+H] <sup>+</sup>	ESTRUCTURA	ED <sub>50</sub> ENSAYO FP	ED <sub>50</sub> ENSAYO MS	NÚM. DE VECES DE ACT. MS
617	471,1			A'	A
618	469,1			A'	B
619	455			A'	B

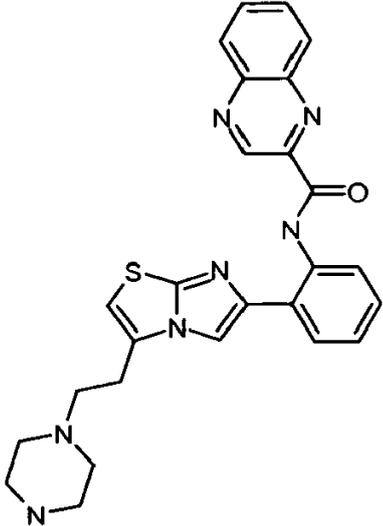
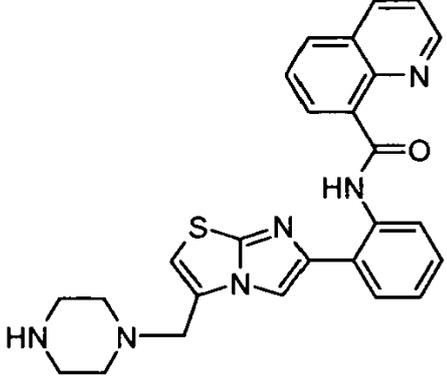
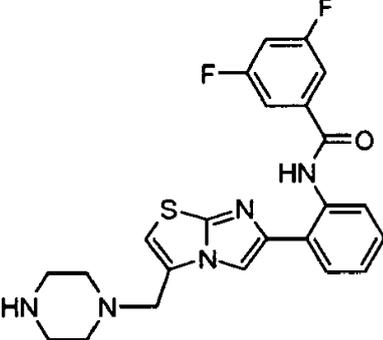
COMPUESTO NÚM.	[M+H] <sup>+</sup>	ESTRUCTURA	ED <sub>50</sub> ENSAYO FP	ED <sub>50</sub> ENSAYO MS	NÚM. DE VECES DE ACT. MS
620	493,1			A'	B
621	472			A'	A
623	437			ND	C
624	458			A'	A

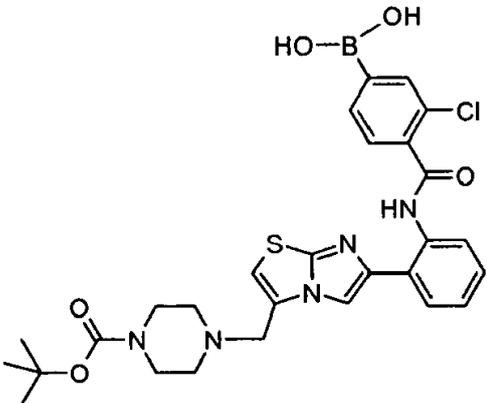
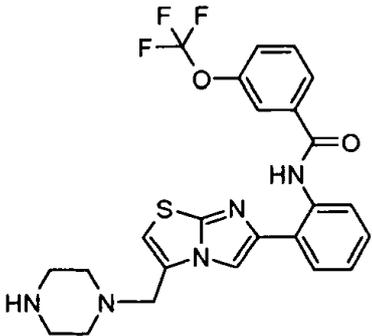
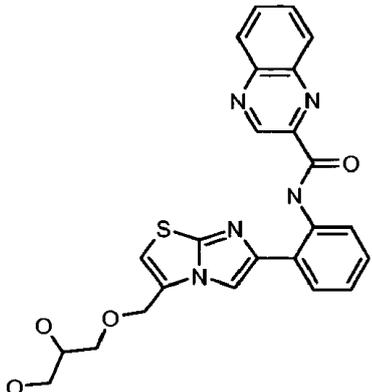


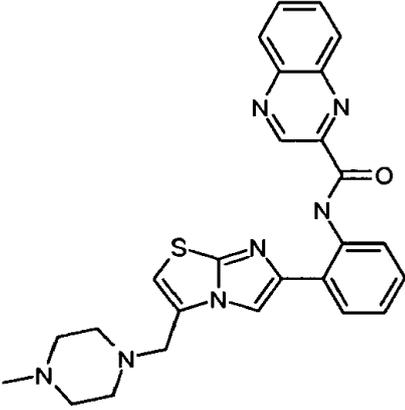
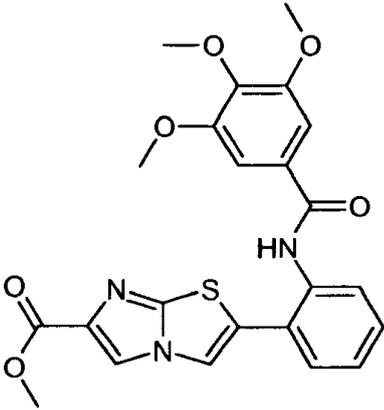
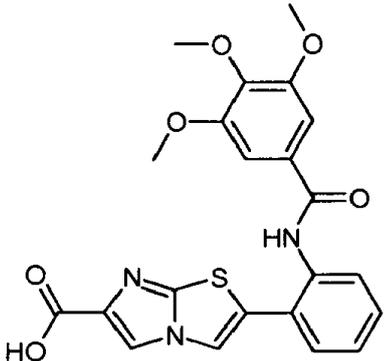
COMPUESTO NÚM.	[M+H] <sup>+</sup>	ESTRUCTURA	ED <sub>50</sub> ENSAYO FP	ED <sub>50</sub> ENSAYO MS	NÚM. DE VECES DE ACT. MS
647	473,1			A'	A
648	402,1			A'	B
649	512,2			A'	A

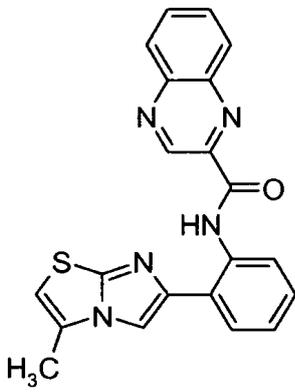
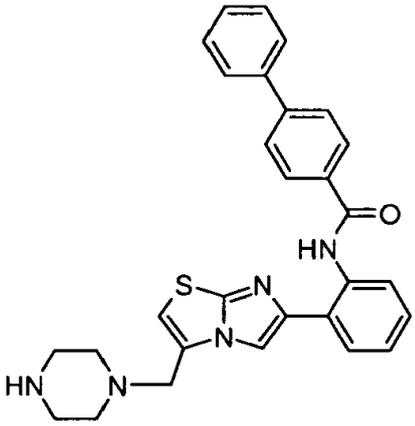
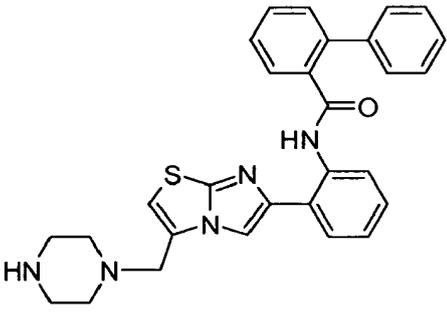
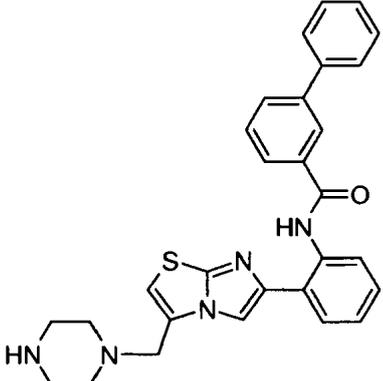
COMPUESTO NÚM.	[M+H] <sup>+</sup>	ESTRUCTURA	ED <sub>50</sub> ENSAYO FP	ED <sub>50</sub> ENSAYO MS	NÚM. DE VECES DE ACT. MS
650	570,2			ND	
651	512,2			A'	A
676				A'	A

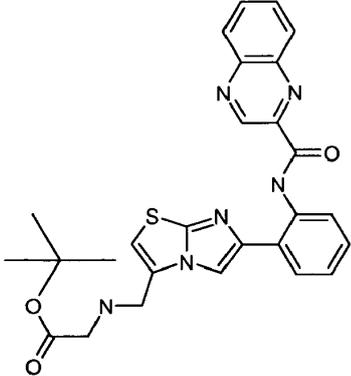
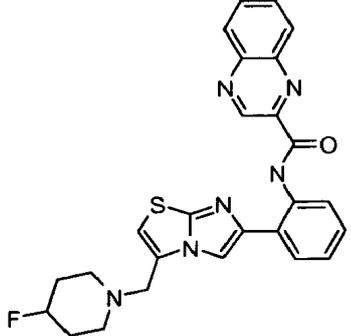
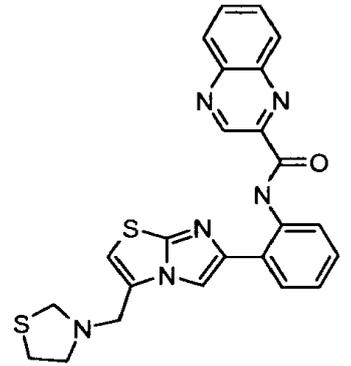
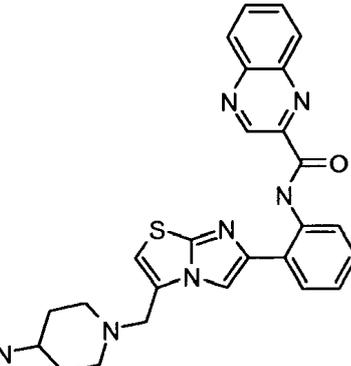
COMPUESTO NÚM.	[M+H] <sup>+</sup>	ESTRUCTURA	ED <sub>50</sub> ENSAYO FP	ED <sub>50</sub> ENSAYO MS	NÚM. DE VECES DE ACT. MS
677				A'	A
678				A	B
679				A	B

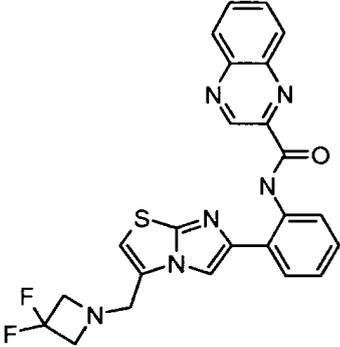
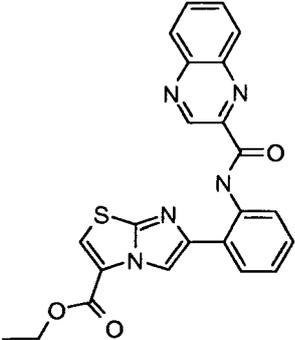
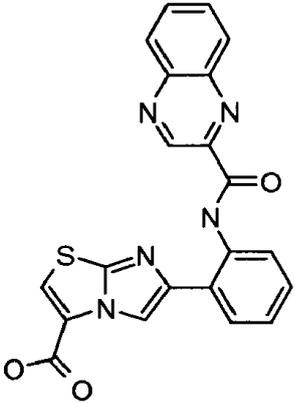
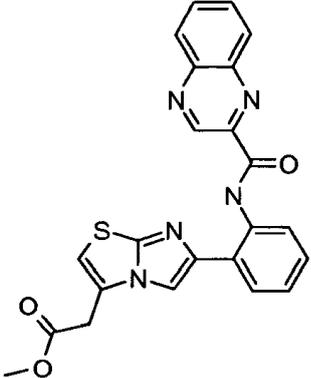
COMPUESTO NÚM.	[M+H] <sup>+</sup>	ESTRUCTURA	ED <sub>50</sub> ENSAYO FP	ED <sub>50</sub> ENSAYO MS	NÚM. DE VECES DE ACT. MS
680	484,2			A'	A
692	469			C	B
695	454			A'	A

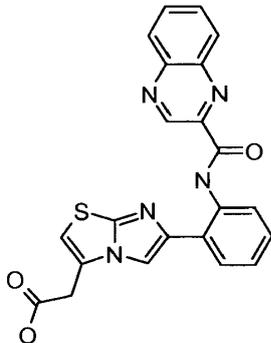
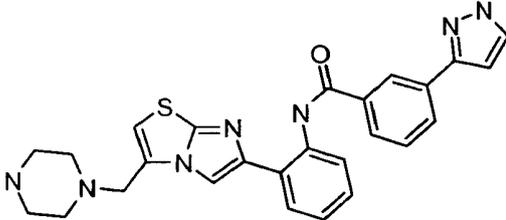
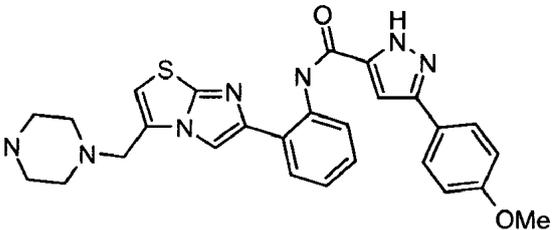
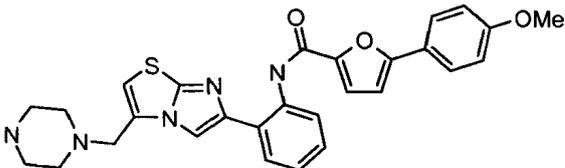
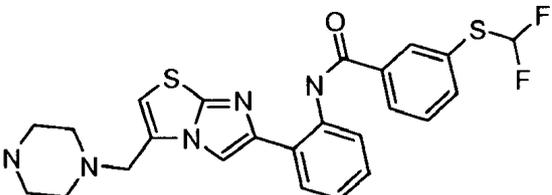
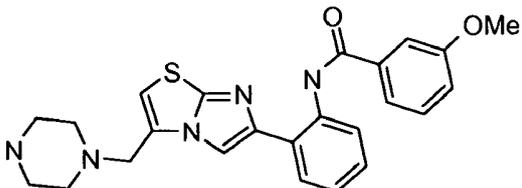
COMPUESTO NÚM.	[M+H] <sup>+</sup>	ESTRUCTURA	ED <sub>50</sub> ENSAYO FP	ED <sub>50</sub> ENSAYO MS	NÚM. DE VECES DE ACT. MS
697	596			ND	C
698	502			A'	A
699				A	A

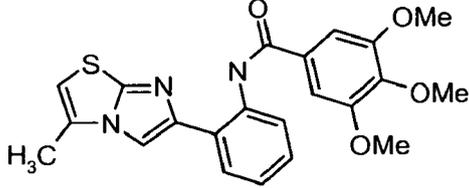
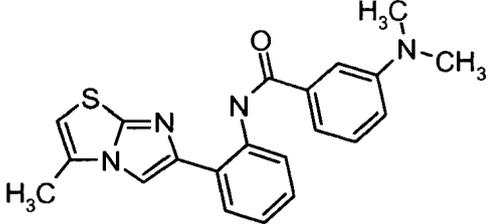
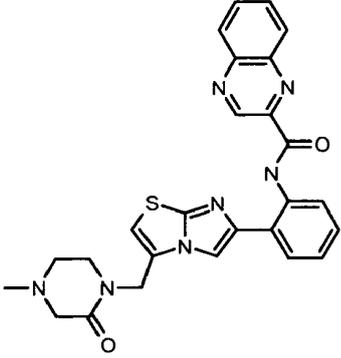
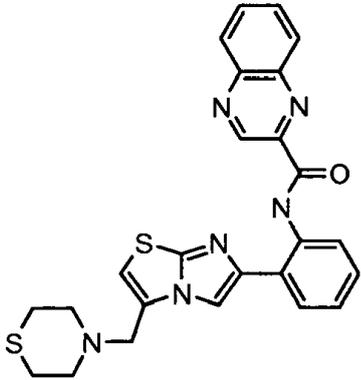
COMPUESTO NÚM.	[M+H] <sup>+</sup>	ESTRUCTURA	ED <sub>50</sub> ENSAYO FP	ED <sub>50</sub> ENSAYO MS	NÚM. DE VECES DE ACT. MS
700	512,2			A'	A
703	468			ND	C
704	454			ND	C

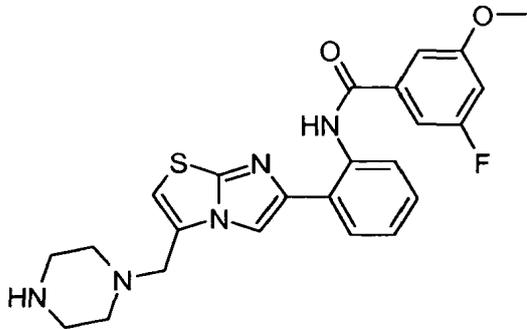
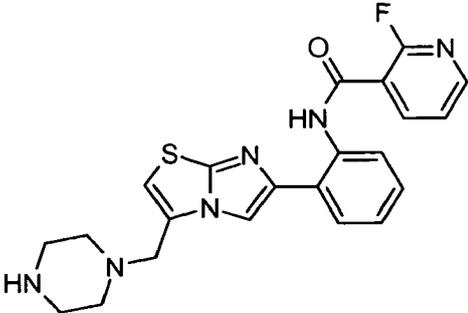
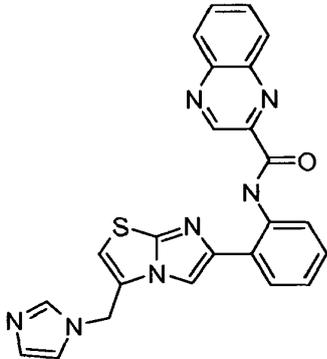
COMPUESTO NÚM.	[M+H] <sup>+</sup>	ESTRUCTURA	ED <sub>50</sub> ENSAYO FP	ED <sub>50</sub> ENSAYO MS	NÚM. DE VECES DE ACT. MS
707	386,1			A'	A
708	494,2			A'	A
709	494,1			ND	C
710	494,1			A'	A

COMPUESTO NÚM.	[M+H] <sup>+</sup>	ESTRUCTURA	ED <sub>50</sub> ENSAYO FP	ED <sub>50</sub> ENSAYO MS	NÚM. DE VECES DE ACT. MS
711				A	B
714				A	B
715				A'	B
716				A'	A

COMPUESTO NÚM.	[M+H] <sup>+</sup>	ESTRUCTURA	ED <sub>50</sub> ENSAYO FP	ED <sub>50</sub> ENSAYO MS	NÚM. DE VECES DE ACT. MS
717				A	B
718	444,1			ND	C
719	416			A	A
720				ND	C

COMPUESTO NÚM.	[M+H] <sup>+</sup>	ESTRUCTURA	ED <sub>50</sub> ENSAYO FP	ED <sub>50</sub> ENSAYO MS	NÚM. DE VECES DE ACT. MS
721				A	A
733	484,2			A'	A
735	514,2			A'	A
736	514,2			A'	A
737	500,1			A'	A
738	448,1			A	A

COMPUESTO NÚM.	[M+H] <sup>+</sup>	ESTRUCTURA	ED <sub>50</sub> ENSAYO FP	ED <sub>50</sub> ENSAYO MS	NÚM. DE VECES DE ACT. MS
739	424,1			A'	A
740	377,1			A'	B
741	498,1			A'	A
742	487,1			A'	B

COMPUESTO NÚM.	[M+H] <sup>+</sup>	ESTRUCTURA	ED <sub>50</sub> ENSAYO FP	ED <sub>50</sub> ENSAYO MS	NÚM. DE VECES DE ACT. MS
743	466,1			A	A
744	437,1			B	A
745	452,1			A'	A

## Ejemplo 3: Identificación de moduladores de sirtuina que usan SIRT3

Se usó un ensayo de polarización por fluorescencia para identificar moduladores de actividad de SIRT3. Se usó el mismo ensayo para identificar moduladores de cualquier proteína sirtuina. El ensayo utiliza un sustrato de péptido basado en un fragmento de Histona H4, una diana de desacetilación de sirtuina conocida. El sustrato contiene un péptido que tiene residuos de 14 aminoácidos de la siguiente manera: Biotina-GASSHSK(Ac)VLK(MR121) (SEC ID NÚM: 4) donde K(Ac) es un residuo lisina acetilado. El péptido está marcado con el fluoróforo MR121 (excitación 635 nm/emisión 680 nm) en el término C y con biotina en el término N.

El sustrato de péptido se expuso a una proteína sirtuina en presencia de NAD<sup>+</sup> para permitir la desacetilación del sustrato y hacerlo sensible a la escisión por tripsina. Luego se añade tripsina y la reacción se lleva a cabo hasta completarse (es decir, se escinde el sustrato desacetilado) liberando el fragmento MR121 o TMR. Se añade luego estreptavidina a la reacción, donde puede unirse tanto al sustrato no escindido (es decir, a cualquier sustrato acetilado remanente) y a la porción no fluorescente del sustrato de péptido escindido (es decir, el fragmento que contiene biotina). La señal de polarización por fluorescencia observada para el sustrato de péptido de longitud total unido a estreptavidina es superior que la señal de polarización por fluorescencia observada para el fragmento C-terminal MR121 o TMR liberado. Por lo tanto, la polarización por fluorescencia obtenida es inversamente proporcional al nivel de desacetilación (p. ej., la señal es inversamente proporcional a la actividad de la proteína

sirtuina). Los resultados se leen en una lectora de polarización por fluorescencia de microplacas (Molecular Devices Spectramax MD) con filtros de excitación y emisión adecuados.

5 Los ensayos de polarización por fluorescencia pueden realizarse de la siguiente manera: se incuba sustrato de péptido 0,5  $\mu\text{M}$  y  $\beta\text{NAD}^+$  50  $\mu\text{M}$  con 2 nM de SIRT3 durante 60 minutos a 37°C en un tampón de reacción (Tris-acetato 25 mM, pH8, 137 mM Na-Ac, 2,7 mM K-Ac, 1 mM Mg-Ac, 0,1% Pluronic F127,  $\text{CaCl}_2$  10 mM, TCEP 1 mM, 0,025% BSA). Los compuestos de ensayo se solubilizan en DMSO y se añaden a la reacción a 11 concentraciones que oscilan entre 0,7  $\mu\text{M}$  y 100  $\mu\text{M}$ . La proteína SIRT3 utilizada en los ensayos correspondió a los residuos de aminoácidos 102-399 de SIRT3 humana con marca His N-terminal. La proteína se sobreespresó en *E. coli* y se purificó en una columna de quelato de níquel usando técnicas convencionales. Después de una incubación de 60 minutos con SIRT3, se añade nicotinamida a la reacción hasta una concentración final de 3 mM para detener la reacción de desacetilación y se añade 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de tripsina para escindir el sustrato desacetilado. La reacción se incubaba durante 30 minutos a 37°C en presencia de estreptavidina 1 mM. La polarización fluorescente se determina a longitudes de onda de excitación (650 nm) y emisiones (680 nm). El nivel de actividad de la proteína sirtuina en presencia de diversas concentraciones del compuesto de ensayo se determina entonces y puede compararse con el nivel de actividad de la proteína sirtuina en ausencia del compuesto de ensayo, y/o con el nivel de actividad de las proteínas sirtuina en el control negativo control (p. ej., nivel de inhibición) y en el control positivo (p. ej., nivel de activación) anteriormente descritos.

20 Se lleva a cabo un control para inhibición de actividad de sirtuina, añadiendo nicotinamida 30 mM al comienzo de la reacción (p. ej., permite la determinación de la inhibición máxima de sirtuina). Se realiza un control para activación de la actividad de una sirtuina usando 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de proteína sirtuina para alcanzar la desacetilación inicial del sustrato (p. ej., para determinar la actividad de sirtuina normalizada).

#### EJEMPLO 4: Ensayos de actividad de sirtuinas basados en células

25 Ensayo de movilización de grasa. Se disponen en placas células 3T3 L1 con 2 ml de 30.000 células/ml en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM)/10% suero de ternero recién nacido en placas de 24 pocillos. Se permite diferenciar los pocillos individuales por adición de Rosiglitazona 100 nM. Las células control no diferenciadas se mantienen en DMEM/10% suero de ternero recién nacido nuevo durante todo el ensayo. A las 48 horas (2 días), se inicia la adipogénesis por adición de DMEM/10% suero de ternero fetal/0,5 mM 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX)/1  $\mu\text{M}$  dexametasona. A las 96 horas (4 días), se permite que avance la adipogénesis por eliminación de los medios y añadiendo 2 ml de DMEM/10% suero de ternero fetal junto con 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de insulina o 100 nM de Rosiglitazona. A las 144 horas (6 días) y a las 192 horas (8 días), todos los pocillos se cambian a DMEM/10% suero de ternero fetal.

35 A las 240 horas (10 días de la disposición en placas original de las células), los compuestos de ensayo en un intervalo de concentraciones se añaden a pocillos individuales por triplicado, junto con Rosiglitazona 100 nM. Se mantienen tres pocillos de células no diferenciadas en DMEM/10% suero de ternero recién nacido y tres pocillos de células control diferenciadas se mantienen en medio DMEM fresco/10% suero de ternero recién nacido con Rosiglitazona 100 nM. Como control positivo para movilización de grasa, se usa resveratrol (un activador de SIRT1) a concentraciones que oscilan en diluciones triples de 100  $\mu\text{M}$  a 0,4  $\mu\text{M}$ .

40 A las 312 horas (13 días), el medio se elimina y las células se lavan dos veces con PBS. Se añaden 0,5 mL de disolución rojo O al aceite (provista en el kit de ensayo de adipogénesis, Cat. núm. ECM950, Chemicon International, Temecula, CA) por pocillo, incluyendo pocillos que no tienen células como control de fondo. Las placas se incuban durante 15 minutos a temperatura ambiente y luego se extrae la disolución de tinte rojo O al aceite y los pocillos se lavan 3 veces con 1 mL de disolución de lavado (Kit de ensayo de adipogénesis). Después de eliminar el último lavado, las placas teñidas se visualizan, exploran o fotografían. Se extrae el tinte (Kit de ensayo de adipogénesis) y se cuantifica en una lectora de placas a 520 nm. Los resultados cuantitativos y visuales se exponen en la Figura 16.

45 *Ensayo de protección de células ganglionares primarias de la raíz primaria (DRG)*. Los compuestos de prueba se ensayan en un ensayo de protección de axones como se describe (Araki et al. (2004) Science 305(5686):1010-3). En resumen, se cultivan explantes DRG de ratón de embriones E12.5 en presencia del factor de crecimiento nervioso 1 nM. Se extraen las células no neuronales de los cultivos, añadiendo 5-fluorouracilo al medio de cultivo. Los compuestos de ensayo se añaden 12 a 24 horas antes de las transecciones de axones. La transección de neuritas se realiza a los 10-20 días *in vitro* (DIV) usando una aguja de calibre 18 para extraer los cuerpos de las células neuronales.

#### EJEMPLO 5: ensayo de ATP basado en células

55 Este ejemplo describe el efecto del activador de SIRT1, resveratrol sobre los niveles de ATP celulares en células NCI-H358. Los niveles de ATP celular se encuentran en medición indirecta de los índices metabólicos celulares y, por extensión, función mitocondrial. Ya que la activación de SIRT1 se ha vinculado al incremento de biogénesis mitocondrial *in vivo*, este estudio está diseñado para determinar si el resveratrol incrementa el funcionamiento mitocondrial, usando niveles de ATP celular como la lectura. El ensayo de ATP se combina con el ensayo de viabilidad celular de modo que los niveles de ATP celular pueden normalizarse a células viables. Los niveles de ATP

celular se midieron usando el kit ATPLite 1Step (PerkinElmer), y la viabilidad celular se midió usando el tinte permeable de células AlamarBlue™.

5 El ensayo de ATP celular es un ensayo de multiplexión que mide tanto los niveles 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 indican como [ATP]/viabilidad para cada pocillo de la placa de ensayo.

10 El kit ATPLite 1Step™ es un ensayo basado en células luminiscentes para detección de ATP. El kit contiene una mezcla de sustrato liofilizado, comprendida por D-luciferina y la enzima de luciérnaga (*Photinus pyralis*) luciferasa. Asimismo, el kit contiene un tampón de reconstitución a base de detergente 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 señalada a continuación. La cantidad de luz producida es proporcional a la concentración de ATP celular.

15 El ensayo AlamarBlue™ es un ensayo de una sola etapa que utiliza un tinte permeable a las células soluble, no tóxico, que se añade al medio de desarrollo de las células. Este tinte se somete a reducción de electrones en células viables pero no en células muertas. El producto de tinte reducido proporciona una señal fluorescente que puede ser monitoreada con una lectora de placas de fluorescencia (excitación 545 nm y emisión 575 nm). La cantidad de fluorescencia generada en un pocillo determinado es proporcional al número de células viables. La señal de viabilidad generada por este ensayo se usa para normalizar la señal de ATP de los resultados del ensayo ATPLite 1Step™.

20 Preparación de una sustancia de prueba para el ensayo de ATP celular: Se pesó resveratrol y se dispuso en un vial de color pardo. El material se disolvió en 100% vehículo (DMSO) para proveer una concentración final de 10 mM (disolución madre). La disolución madre se diluyó en serie con 100% DMSO como se describe en SOP 7.10. Las concentraciones finales de resveratrol en la placa del compuesto fueron 0,008, 0,023, 0,069, 0,206, 0,617, 1,852, 5,556, 16,67, 50 y 150 µM.

25 El efecto del resveratrol sobre los niveles de ATP celular en células NCI-H358 (100 µL) se examinó usando el ensayo de ATP celular descrito. El diseño experimental se resume en la Figura 1. En este ensayo, se siembran células NCI-H358 (obtenidas de American Tissue Culture Collection, ATCC) en microplacas de 96 pocillos (10<sup>4</sup> células/pocillo). El medio de cultivo de desarrollo de NCI-H358 consiste en medio RPMI 1640 enriquecido con 10% FBS, 100 mg/mL estreptomycin y 100 unidades/mL de penicilina. Se trataron microplacas de células por triplicado 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 15 µL de vehículo (DMSO; concentración final de 0,5%; 12 réplicas por placa). Después de 48 horas del tratamiento del compuesto bajo condiciones de desarrollo celular, las placas se eliminaron de la incubadora y se añadieron 15 µL de tinte AlamarBlue™ a cada pocillo. Se incubaron microplacas de células con tinte durante 2 horas bajo condiciones de crecimiento, y luego se midió la fluorescencia usando una lectora de placas. El medio que contenía AlamarBlue™ se eliminó y las placas se lavaron en 100 µL de PBS por pocillo. Este lavado se eliminó y se añadieron 200 µL de reactivo 1x ATPLite 1Step a cada pocillo. La luminiscencia se midió luego usando una lectora de placas. La señal de ATP para cada pocillo, medida por barrido de luminiscencia, se normalizó a su correspondiente valor de viabilidad celular, medido por barrido de fluorescencia, para generar el nivel de ATP promedio por unidad celular viable (ATP/vCell). El ATP/vCell para cada tratamiento se normalizó luego al vehículo promedio ATP/vCell para su respectiva microplaca celular, proporcionando el ATP/vCell normalizado (norm. ATP/vCell). Finalmente el ATP/vCell normalizado para cada tratamiento único se promedió con las réplicas de placas, generando el ATP/vCell normalizado promedio. Las dosis de resveratrol que aumentan los niveles de ATP celular tienen valores ATP/vCell normalizados superiores a 1,0. La concentración de resveratrol que produce 50% del incremento máximo en ATP/vCell normalizado (CE50 ATP) se determinó por análisis de curvas de mejor ajuste usando un modelo de curva de dosis y respuesta sigmoide.

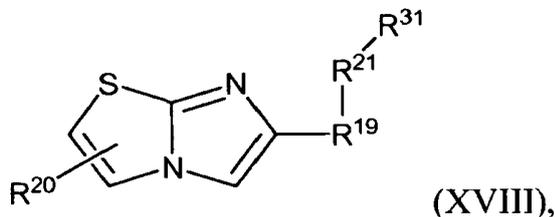
Se midieron los niveles de ATP de las células tratadas con 10 concentraciones de resveratrol o vehículo solo. Cada uno de estos niveles de ATP se normalizó a la viabilidad celular en el correspondiente pocillo de tratamiento, generando el valor ATP/vCell. Cada valor ATP/vCell se normalizó subsiguientemente a sus valores de vehículo promedio ATP/vCell para su respectiva microplaca celular.

50 Los datos se representan como ATP/vCell normalizado (unidades arbitrarias). La Figura 2 indica la curva de dosis y respuesta sigmoide del mejor ajuste para las 10 concentraciones de resveratrol graficada contra los correspondientes valores ATP/vCell normalizados. Estos valores representan un promedio de los tres replicados de las placas. El resveratrol incrementa los niveles de ATP en células NCI-H358 en un modo dependiente de la dosis. El incremento máximo en los niveles de ATP celular fue de 3,0 veces y ocurrió con el tratamiento de 50 µM de resveratrol. El valor EC50 de ATP para resveratrol se determinó en 29 µM.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto

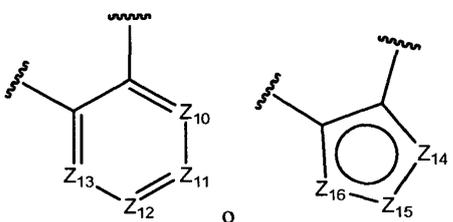
A) de la fórmula:



5

o su sal farmacéuticamente aceptable, en la que

R<sup>19</sup> se selecciona entre:



en la que:

10 cada Z<sub>10</sub>, Z<sub>11</sub>, Z<sub>12</sub> y Z<sub>13</sub> se selecciona independientemente entre N, CR<sup>20</sup> o CR<sub>1</sub>'; y cada Z<sub>14</sub>, Z<sub>15</sub> y Z<sub>16</sub> se selecciona independientemente entre N, NR<sub>1</sub>', S, O, CR<sup>20</sup> o CR<sub>1</sub>';

cero a dos de Z<sub>10</sub>, Z<sub>11</sub>, Z<sub>12</sub> o Z<sub>13</sub> son N;

en la que:

por lo menos uno de Z<sub>14</sub>, Z<sub>15</sub> y Z<sub>16</sub> es N, NR<sub>1</sub>', O o S;

15 cero a uno de Z<sub>14</sub>, Z<sub>15</sub> y Z<sub>16</sub> es S o O;

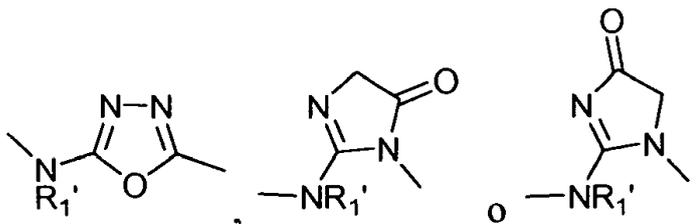
cero a dos de Z<sub>14</sub>, Z<sub>15</sub> y Z<sub>16</sub> son N o NR<sub>1</sub>';

cero a un R<sup>20</sup> es un grupo solubilizante; y

cero a un R<sub>1</sub>' es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> lineal o ramificado opcionalmente sustituido;

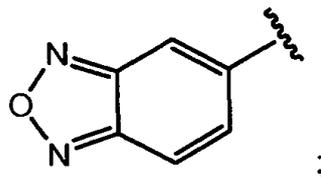
cada R<sup>20</sup> se selecciona independientemente entre H o un grupo solubilizante;

20 R<sup>21</sup> se selecciona entre -NR<sub>1</sub>'-C(O)-, -NR<sub>1</sub>'-S(O)<sub>2</sub>-, -NR<sub>1</sub>'-C(O)-NR<sub>1</sub>'-, -NR<sub>1</sub>'-C(S)-NR<sub>1</sub>'-, -NR<sub>1</sub>'-C(S)-NR<sub>1</sub>'-CR<sub>1</sub>'R<sub>1</sub>'-,  
-NR<sub>1</sub>'-C(O)-CR<sub>1</sub>'R<sub>1</sub>'-NR<sub>1</sub>'-, -NR<sub>1</sub>'-C(=NR<sub>1</sub>')-NR<sub>1</sub>'-, -C(O)-NR<sub>1</sub>'-, -C(O)-NR<sub>1</sub>'-S(O)<sub>2</sub>-, -NR<sub>1</sub>'-, -CR<sub>1</sub>'R<sub>1</sub>'-, -NR<sub>1</sub>'-C(O)-  
CR<sub>1</sub>'=CR<sub>1</sub>'-, -NR<sub>1</sub>'-S(O)<sub>2</sub>-NR<sub>1</sub>'-, -NR<sub>1</sub>'-C(O)-NR<sub>1</sub>'-S(O)<sub>2</sub>-, -NR<sub>1</sub>'-CR<sub>1</sub>'R<sub>1</sub>'-C(O)-NR<sub>1</sub>'-, -CR<sub>1</sub>'R<sub>1</sub>'-C(O)-NR<sub>1</sub>'-, -NR<sub>1</sub>'-  
C(O)-CR<sub>1</sub>'=CR<sub>1</sub>'-CR<sub>1</sub>'R<sub>1</sub>'-, -NR<sub>1</sub>'-C(=N-CN)-NR<sub>1</sub>'-, -NR<sub>1</sub>'-C(O)-CR<sub>1</sub>'R<sub>1</sub>'-O-, -NR<sub>1</sub>'-C(O)-CR<sub>1</sub>'R<sub>1</sub>'-CR<sub>1</sub>'R<sub>1</sub>'-O-, -NR<sub>1</sub>'-  
S(O)<sub>2</sub>-CR<sub>1</sub>'R<sub>1</sub>'-, -NR<sub>1</sub>'-S(O)<sub>2</sub>-CR<sub>1</sub>'R<sub>1</sub>'- CR<sub>1</sub>'R<sub>1</sub>'-, -NR<sub>1</sub>'-C(O)-CR<sub>1</sub>'R<sub>1</sub>'-; -NR<sub>1</sub>'-C(O)-CR<sub>1</sub>'R<sub>1</sub>'-CR<sub>1</sub>'R<sub>1</sub>'-, -NR<sub>1</sub>'-C(S)-  
25 NR<sub>1</sub>'-CR<sub>1</sub>'R<sub>1</sub>'-CR<sub>1</sub>'R<sub>1</sub>'-, -NR<sub>1</sub>'-C(O)-O-



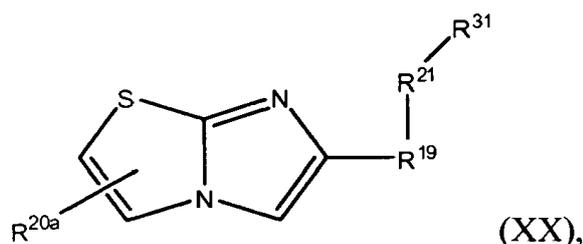
cada R<sub>1</sub>' se selecciona independientemente entre H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> lineal o ramificado opcionalmente sustituido; y R<sup>31</sup> se selecciona entre un arilo monocíclico o bicíclico opcionalmente sustituido, o un heteroarilo monocíclico o bicíclico opcionalmente sustituido, con la salvedad que cuando R

<sup>21</sup> es -NR<sub>1</sub>'-C(O)-, R<sup>31</sup> no es 4-cianofenilo o



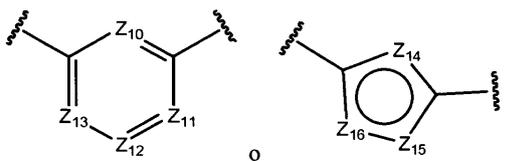
y cuando R<sup>21</sup> es -NR<sub>1</sub>'-S(O)<sub>2</sub>-, R<sup>31</sup> no es 4-metoxifenilo o 4-t-butilfenilo; o

5 B) un compuesto de la fórmula:



o su sal farmacéuticamente aceptable, en la que

R<sup>19</sup> se selecciona entre:



10 en la que:

cada Z<sub>10</sub>, Z<sub>11</sub>, Z<sub>12</sub> y Z<sub>13</sub> se selecciona independientemente entre N, CR<sup>20</sup> o CR<sub>1</sub>'; y cada Z<sub>14</sub>, Z<sub>15</sub> y Z<sub>16</sub> se selecciona independientemente entre N, NR<sub>1</sub>', S, O, CR<sup>20</sup> o CR<sub>1</sub>';

en la que:

cero a dos de Z<sub>10</sub>, Z<sub>11</sub>, Z<sub>12</sub> o Z<sub>13</sub> son N;

15 por lo menos uno de Z<sub>14</sub>, Z<sub>15</sub> y Z<sub>16</sub> es N, NR<sub>1</sub>', O o S;

cero a uno de Z<sub>14</sub>, Z<sub>15</sub> y Z<sub>16</sub> es S o O;

cero a dos de Z<sub>14</sub>, Z<sub>15</sub> y Z<sub>16</sub> son N o NR<sub>1</sub>';

cero a un R<sup>20</sup> es un grupo solubilizante; y

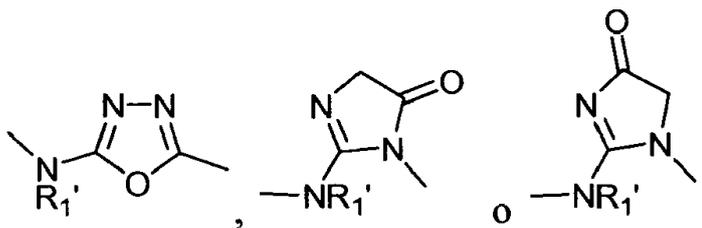
cero a un R<sub>1</sub>' es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> lineal o ramificado opcionalmente sustituido;

20 cada R<sup>20</sup> se selecciona independientemente entre H o un grupo solubilizante;

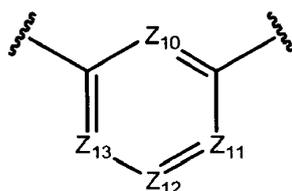
R<sup>20a</sup> se selecciona independientemente entre H o un grupo solubilizante;

R<sup>21</sup> se selecciona entre -NR<sub>1</sub>'-C(O)-, -NR<sub>1</sub>'-S(O)<sub>2</sub>-, -NR<sub>1</sub>'-C(O)-NR<sub>1</sub>'-, -NR<sub>1</sub>'-C(S)-NR<sub>1</sub>'-, -NR<sub>1</sub>'-C(S)-NR<sub>1</sub>'-CR<sub>1</sub>'R<sub>1</sub>'-, -NR<sub>1</sub>'-C(O)-CR<sub>1</sub>'R<sub>1</sub>'-NR<sub>1</sub>'-, -NR<sub>1</sub>'-C(=NR<sub>1</sub>')-NR<sub>1</sub>'-, -C(O)-NR<sub>1</sub>'-, -C(O)-NR<sub>1</sub>'-S(O)<sub>2</sub>-, -CR<sub>1</sub>'R<sub>1</sub>'-, -NR<sub>1</sub>'-C(O)-CR<sub>1</sub>'=CR<sub>1</sub>'-, -NR<sub>1</sub>'-S(O)<sub>2</sub>-NR<sub>1</sub>'-, -NR<sub>1</sub>'-C(O)-NR<sub>1</sub>'-S(O)<sub>2</sub>-, -NR<sub>1</sub>'-CR<sub>1</sub>'R<sub>1</sub>'-C(O)-NR<sub>1</sub>'-, -CR<sub>1</sub>'R<sub>1</sub>'-C(O)-NR<sub>1</sub>'-, -NR<sub>1</sub>'-C(O)-CR<sub>1</sub>'=CR<sub>1</sub>'-CR<sub>1</sub>'R<sub>1</sub>'-, -NR<sub>1</sub>'-C(=N-CN)-NR<sub>1</sub>'-, -NR<sub>1</sub>'-C(O)-CR<sub>1</sub>'R<sub>1</sub>'-O-, -NR<sub>1</sub>'-C(O)-CR<sub>1</sub>'R<sub>1</sub>'-CR<sub>1</sub>'R<sub>1</sub>'-O-, -NR<sub>1</sub>'-S(O)<sub>2</sub>-CR<sub>1</sub>'R<sub>1</sub>'-, -NR<sub>1</sub>'-S(O)<sub>2</sub>-CR<sub>1</sub>'R<sub>1</sub>'-CR<sub>1</sub>'R<sub>1</sub>'-, -NR<sub>1</sub>'-C(O)-CR<sub>1</sub>'R<sub>1</sub>'-, -NR<sub>1</sub>'-C(O)-CR<sub>1</sub>'R<sub>1</sub>'-CR<sub>1</sub>'R<sub>1</sub>'-, -NR<sub>1</sub>'-C(S)-NR<sub>1</sub>'-CR<sub>1</sub>'R<sub>1</sub>'-CR<sub>1</sub>'R<sub>1</sub>'-, -NR<sub>1</sub>'-C(O)-O-,

25

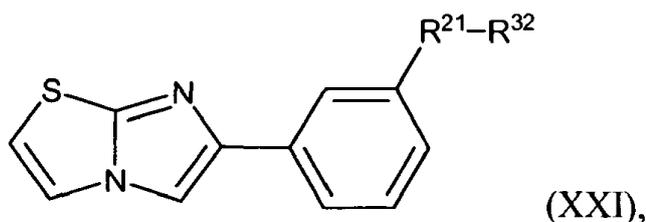


5 donde cada  $R_1'$  se selecciona independientemente entre H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> lineal o ramificado opcionalmente sustituido; y  $R^{31}$  se selecciona entre arilo monocíclico o bicíclico opcionalmente sustituido, o un heteroarilo monocíclico o bicíclico opcionalmente sustituido, donde cuando  $R^{19}$  es



y  $Z_{10}$ ,  $Z_{11}$ ,  $Z_{12}$  y  $Z_{13}$  son cada uno CH,  $R^{20a}$  es un grupo solubilizante; o

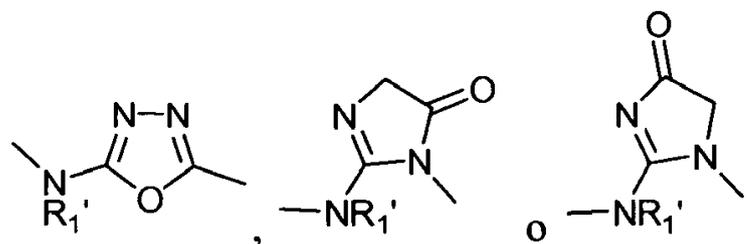
C) de la fórmula:



10 o su sal farmacéuticamente aceptable, en la que

$R^{21}$  se selecciona entre  $-NR_1'-C(O)-$ ,  $-NR_1'-S(O)_2-$ ,  $-NR_1'-C(O)-NR_1'-$ ,  $-NR_1'-C(S)-NR_1'-$ ,  $-NR_1'-C(S)-NR_1'-CR_1'R_1'-$ ,  $-NR_1'-C(O)-CR_1'R_1'-NR_1'-$ ,  $-NR_1'-C(=NR_1')-NR_1'-$ ,  $-C(O)-NR_1'-$ ,  $-C(O)-NR_1'-S(O)_2-$ ,  $-NR_1'-$ ,  $-CR_1'R_1'-$ ,  $-NR_1'-C(O)-CR_1'=CR_1'-$ ,  $-NR_1'-S(O)_2-NR_1'-$ ,  $-NR_1'-C(O)-NR_1'-S(O)_2-$ ,  $-NR_1'-CR_1'R_1'-C(O)-NR_1'-$ ,  $-CR_1'R_1'-C(O)-NR_1'-$ ,  $-NR_1'-C(O)-CR_1'=CR_1'-CR_1'R_1'-$ ,  $-NR_1'-C(=N-CN)-NR_1'-$ ,  $-NR_1'-C(O)-CR_1'R_1'-O-$ ,  $-NR_1'-C(O)-CR_1'R_1'-CR_1'R_1'-O-$ ,  $-NR_1'-S(O)_2-CR_1'R_1'-$ ,  $-NR_1'-S(O)_2-CR_1'R_1'-CR_1'R_1'-$ ,  $-NR_1'-C(O)-CR_1'R_1'-$ ;  $-NR_1'-C(O)-CR_1'R_1'-CR_1'R_1'-$ ,  $-NR_1'-C(S)-NR_1'-CR_1'R_1'-$ ,  $-NR_1'-C(O)-O-$ ,

15



donde cada  $R_1'$  se selecciona independientemente entre H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> lineal o ramificado opcionalmente sustituido; y

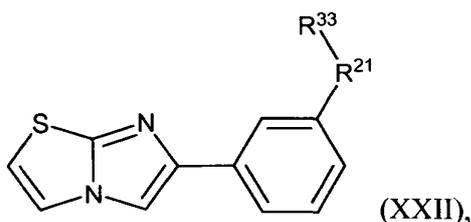
20  $R^{32}$  es un heteroarilo monocíclico o bicíclico opcionalmente sustituido, o un arilo bicíclico opcionalmente sustituido, donde:

cuando  $R^{21}$  es  $-NH-C(O)-CH_2-$ ,  $R^{32}$  no es tien-2-ilo no sustituido;

cuando  $R^{21}$  es  $-NH-C(O)-$ ,  $R^{32}$  no es furan-2-ilo, 5-bromofuran-2-ilo o 2-fenil-4-metiltiazol-5-ilo;

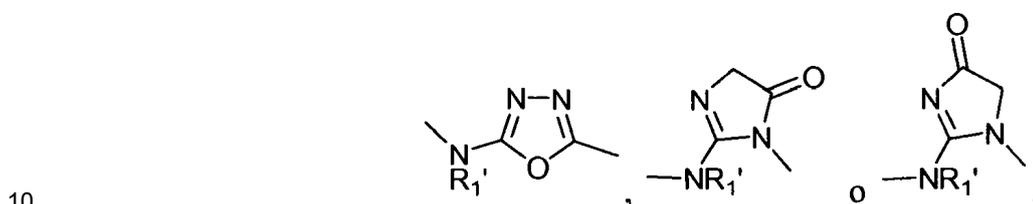
cuando  $R^{21}$  es  $-NH-S(O)_2-$ ,  $R^{32}$  no es naftilo no sustituido o 5-clorotien-2-ilo; o

25 D) de la fórmula:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, donde:

- 5  $R^{21}$  se selecciona entre  $-NR_1'-C(O)-$ ,  $-NR_1'-S(O)_2-$ ,  $-NR_1'-C(O)-NR_1'-$ ,  $-NR_1'-C(S)-NR_1'-$ ,  $-NR_1'-C(S)-NR_1'-CR_1'R_1'-$ ,  $-NR_1'-C(O)-CR_1'R_1'-NR_1'-$ ,  $-NR_1'-C(=NR_1')-NR_1'-$ ,  $-C(O)-NR_1'-$ ,  $-C(O)-NR_1'-S(O)_2-$ ,  $-NR_1'-$ ,  $-CR_1'R_1'-$ ,  $-NR_1'-C(O)-CR_1'=CR_1'-$ ,  $-NR_1'-S(O)_2-NR_1'-$ ,  $-NR_1'-C(O)-NR_1'-S(O)_2-$ ,  $-NR_1'-CR_1'R_1'-C(O)-NR_1'-$ ,  $-CR_1'R_1'-C(O)-NR_1'-$ ,  $-NR_1'-C(O)-CR_1'=CR_1'-CR_1'R_1'-$ ,  $-NR_1'-C(=N-CN)-NR_1'-$ ,  $-NR_1'-C(O)-CR_1'R_1'-O-$ ,  $-NR_1'-C(O)-CR_1'R_1'-CR_1'R_1'-O-$ ,  $-NR_1'-S(O)_2-CR_1'R_1'-$ ,  $-NR_1'-S(O)_2-CR_1'R_1'-CR_1'R_1'-$ ,  $-NR_1'-C(O)-CR_1'R_1'-$ ,  $-NR_1'-C(O)-CR_1'R_1'-CR_1'R_1'-$ ,  $-NR_1'-C(S)-NR_1'-CR_1'R_1'-CR_1'R_1'-$ ,  $-NR_1'-C(O)-O-$ ,



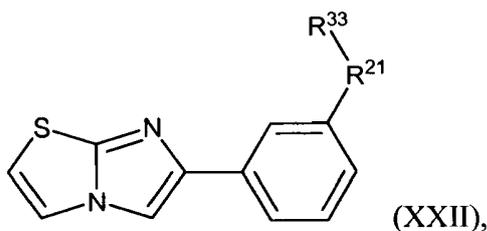
donde cada  $R_1'$  se selecciona independientemente entre H o alquilo  $C_1-C_3$  lineal o ramificado opcionalmente sustituido; y  $R^{33}$  es un fenilo opcionalmente sustituido, donde:

cuando  $R^{21}$  es  $-NR_1'-C(O)-$ ,  $R_1'$  no es H;

cuando  $R^{21}$  es  $-NH-C(O)-CH_2-$  o  $-NH-C(O)-CH_2-O-$ ,  $R^{33}$  no es fenilo no sustituido o 4-halofenilo; y

- 15 cuando  $R^{21}$  es  $-NH-S(O)_2-$ ,  $R^{33}$  es fenilo no sustituido, 2,4- o 3,4-dimetilfenilo, 2,4-dimetil-5-metoxifenilo, 2-metoxi-3,4-diclorofenilo, 2-metoxi-5-bromofenil-3,4-dioxietilenofenilo, 3,4-dimetoxifenilo, 3,4-diclorofenilo, 3,4-dimetilfenilo, 3- o 4-metilfenilo, 4-alcoxifenilo, 4-fenoxifenilo, 4-halofenilo, 4-bifenilo o 4-acetilaminofenilo; o

E) de la fórmula:

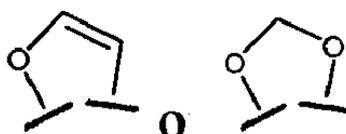


20 o su sal farmacéuticamente aceptable, donde:

$R^{21}$  se selecciona entre  $-NH-C(O)-$  o  $-NH-C(O)-CH_2-$ ; y

$R^{33}$  es fenilo sustituido con

- a) un grupo  $-N(CH_3)_2$  ;  
 b) un grupo CN en la posición 3;  
 25 c) un grupo  $-S(CH_3)$ ; o  
 d)



formando un puente entre las posiciones 3 y 4, donde en cualquiera de las opciones (A), (B), (C) o (D), cuando R<sub>1</sub>' está sustituido, R<sub>1</sub>' está sustituido con uno o más de -OH, halógeno, -OR<sup>a</sup>, -O-COR<sup>a</sup>, -COR<sup>a</sup>, -C(O)R<sup>a</sup>, -CN, -NO<sub>2</sub>, -COOH, -COOR<sup>a</sup>, -OCO<sub>2</sub>R<sup>a</sup>, -C(O)NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -OC(O)NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -SO<sub>3</sub>H, -NH<sub>2</sub>, -NHR<sup>a</sup>, -N(R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>), -COOR<sup>a</sup>, -CHO, -CONH<sub>2</sub>, -CONHR<sup>a</sup>, -CON(R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>), -NHCOR<sup>a</sup>, -NRCOR<sup>a</sup>, -NHCONH<sub>2</sub>, -NHCONR<sup>a</sup>H, -NHCON(R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>), -NR<sup>c</sup>CONH<sub>2</sub>, -NR<sup>c</sup>CONR<sup>a</sup>H, -NR<sup>c</sup>CON(R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>), -C(=NH)-NH<sub>2</sub>, -C(=NH)-NHR<sup>a</sup>, -C(=NH)-N(R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>), -C(=NR<sup>c</sup>)-NH<sub>2</sub>, -C(=NR<sup>c</sup>)-NHR<sup>a</sup>, -C(=NR<sup>c</sup>)-N(R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>), -NH-C(=NH)-NH<sub>2</sub>, -NH-C(=NH)-NHR<sup>a</sup>, -NH-C(=NH)-N(R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>), -NH-C(=NR<sup>c</sup>)-NH<sub>2</sub>, -NH-C(=NR<sup>c</sup>)-NHR<sup>a</sup>, -NH-C(=NR<sup>c</sup>)-N(R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>), -NR<sup>d</sup>H-C(=NH)-NH<sub>2</sub>, -NR<sup>d</sup>-C(=NH)-NHR<sup>a</sup>, -NR<sup>d</sup>-C(=NH)-N(R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>), -NR<sup>d</sup>-C(=NR<sup>c</sup>)-NH<sub>2</sub>, -NR<sup>d</sup>-C(=NR<sup>c</sup>)-NHR<sup>a</sup>, -NR<sup>d</sup>-C(=NR<sup>c</sup>)-N(R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>), -NHNH<sub>2</sub>, -NHNHR<sup>a</sup>, -NHR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, -SO<sub>2</sub>NHR<sup>a</sup>, -SO<sub>2</sub>NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -CH=CHR<sup>a</sup>, -CH=CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -CR<sup>c</sup>=CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, CR<sup>c</sup>=CHR<sup>a</sup>, -CR<sup>c</sup>=CR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, -CCR<sup>a</sup>, -SH, -SO<sub>k</sub>R<sup>a</sup>, -S(O)<sub>k</sub>OR<sup>a</sup> y -NH-C(=NH)-NH<sub>2</sub>, donde

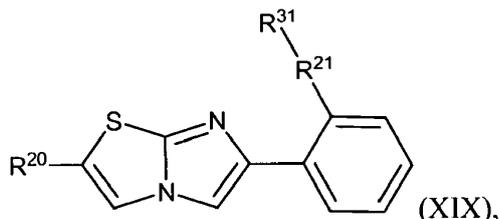
k es 0, 1 o 2;

R<sup>a</sup>-R<sup>d</sup> son cada uno independientemente un grupo aromático o aromático sustituido alifático, alifático sustituido, bencilo, bencilo sustituido; y

-NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, tomados juntos, pueden tener también la forma de un grupo heterocíclico no aromático, sustituido o no sustituido;

donde un grupo heterocíclico no aromático, grupo bencilo o grupo arilo puede también tener un grupo alifático o alifático sustituido como sustituyente; un grupo alifático sustituido puede también tener un anillo heterocíclico no aromático, un anillo heterocíclico no aromático sustituido, bencilo, bencilo sustituido, arilo o arilo sustituido como sustituyente; y un grupo heterocíclico no aromático, alifático, sustituido, arilo sustituido o bencilo sustituido puede tener más de un sustituyente.

2. El compuesto según la reivindicación 1, opción (A) que tiene la fórmula:



donde

R<sup>20</sup> se selecciona entre H o un grupo solubilizante;

R<sup>21</sup> se selecciona entre -NH-C(O)- o -NH-C(O)-CH<sub>2</sub>-; y

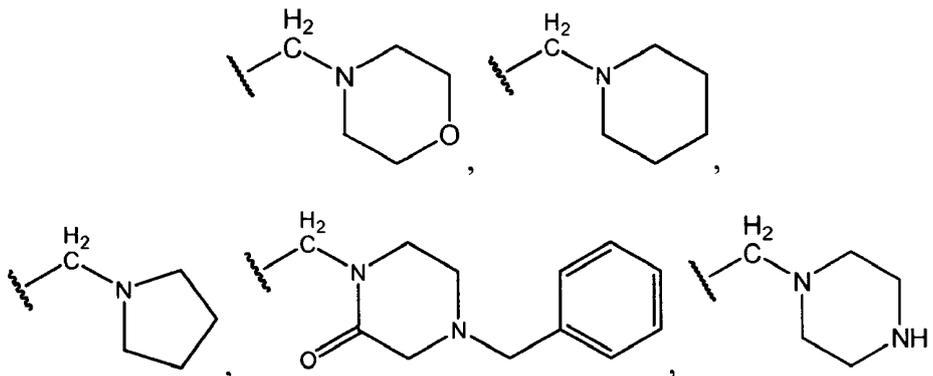
R<sup>31</sup> se selecciona entre un arilo monocíclico o bicíclico opcionalmente sustituido, o un heteroarilo monocíclico o bicíclico opcionalmente sustituido.

3. El compuesto según la reivindicación 1, opción (A) en el que R<sup>19</sup> se selecciona entre fenilo, piridilo, tienilo o furanilo.

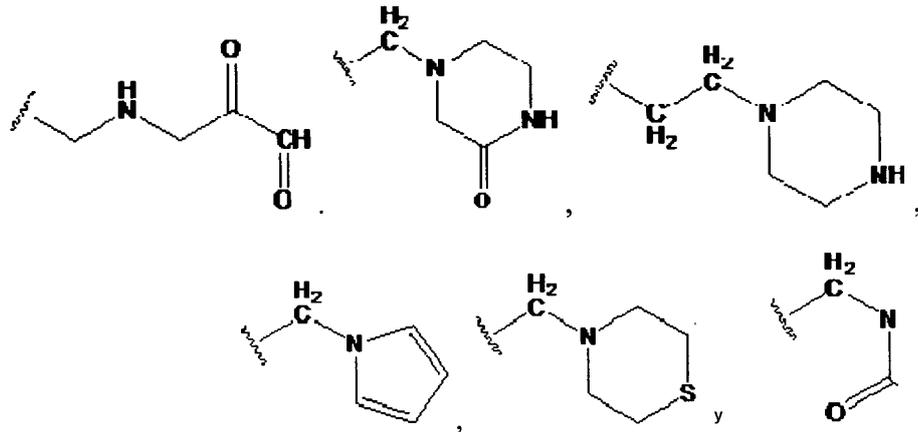
4. El compuesto según la reivindicación 3, en el que R<sup>19</sup> es fenilo opcionalmente sustituido.

5. El compuesto según la reivindicación 1, opción (A) o cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4 en el que:

R<sup>20</sup> se selecciona entre H, -CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>,



35



6. El compuesto según la reivindicación 1, opción (A) o cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5 en el que:

5  $R^{31}$  se selecciona entre fenilo, pirazolilo, furilo, piridilo, pirimidinilo, tienilo, naftilo, benzopirazolilo, benzofurilo, quinolinilo, quinoxalinilo o benzotienilo y donde  $R^{31}$  está opcionalmente sustituido.

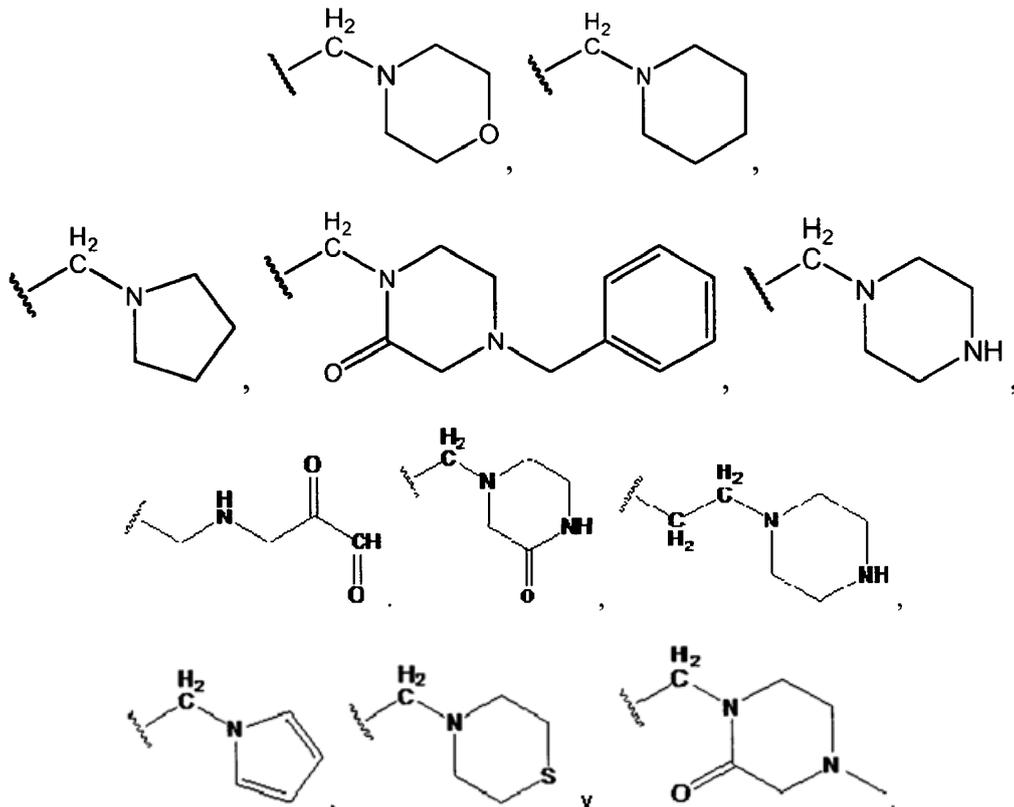
7. El compuesto según la reivindicación 1, opción (A) o cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6 en el que  $R^{21}$  es  $-NH-C(O)-$ .

8. El compuesto según la reivindicación 1, opción (B) en el que  $R^{19}$  se selecciona entre fenilo, piridilo, tienilo o furilo.

10 9. El compuesto según la reivindicación 8, en el que  $R^{19}$  es fenilo opcionalmente sustituido.

10. El compuesto según la reivindicación 1, opción (B), la reivindicación 8 o la reivindicación 9, en el que:

$R^{20a}$  se selecciona entre H,  $-CH_2-N(CH_3)_2$ .



15

11. El compuesto según la reivindicación 1, opción (B) o cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10 en el que:

R<sup>31</sup> se selecciona entre fenilo, pirazolilo, furilo, piridilo, pirimidinilo, tienilo, naftilo, benzopirazolilo, benzofuranilo, quinolinilo, quinoxalinilo o benzotienilo y donde R<sup>31</sup> está opcionalmente sustituido.

5 12. El compuesto según la reivindicación 1, opción (B) o cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11 en el que R<sup>21</sup> es -NH-C(O)-.

13. El compuesto según la reivindicación 1, opción (C), en el que:

R<sup>32</sup> se selecciona entre pirrolilo, pirazolilo, pirazinilo, furilo, piridilo, pirimidinilo o tienilo, y R<sup>32</sup> está opcionalmente sustituido y opcionalmente benzocondensado.

10 14. El compuesto según la reivindicación 13, en el que R<sup>32</sup> se selecciona entre benzofurilo, metilfurilo, benzotienilo, piridilo, pirazinilo, pirimidinilo, pirazolilo, donde dicho metilfurilo, piridilo, pirazinilo, pirimidinilo o pirazolilo está opcionalmente benzocondensado y donde R<sup>32</sup> está opcionalmente sustituido o adicionalmente sustituido.

15. Un compuesto según la reivindicación 1, en el que R<sup>31</sup> o R<sup>32</sup> es heteroarilo seleccionado entre imidazolilo, tienilo, furilo, piridilo, pirimidilo, piranilo, pirazolilo, pirrolilo, pirazinilo, tiazolilo, oxazolilo y tetrazolilo.

15 16. Una composición que comprende un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en el que la composición está libre de pirógenos.

17. Una composición farmacéutica que comprende un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable y un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-15.

20 18. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto para tratar o prevenir la resistencia a insulina, un síndrome metabólico, diabetes o sus complicaciones, o para aumentar la sensibilidad a la insulina en un sujeto humano, que comprende un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15.

19. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto para reducir el peso de un sujeto humano, o para prevenir el aumento de peso, que comprende un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15.

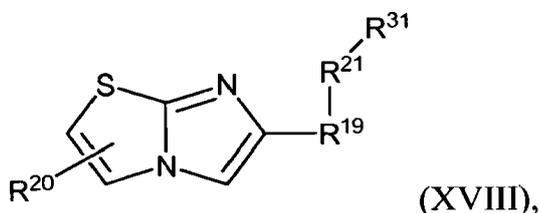
25 20. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto para prolongar la vida de un sujeto humano que comprende un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15.

21. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno ocular en un sujeto humano, que comprende un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15.

30 22. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto según la reivindicación 21, en la que la enfermedad o trastorno ocular es deterioro de la visión, glaucoma, neuritis óptica, degeneración macular o neuropatía óptica isquémica anterior.

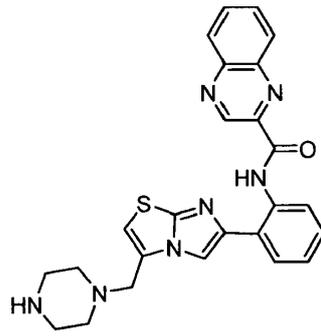
23. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto para tratar o prevenir neuropatía inducida por agentes quimioterapéuticos en un sujeto humano, que comprende un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15.

24. Un compuesto según la reivindicación 1, en el que el compuesto se representa con la fórmula:



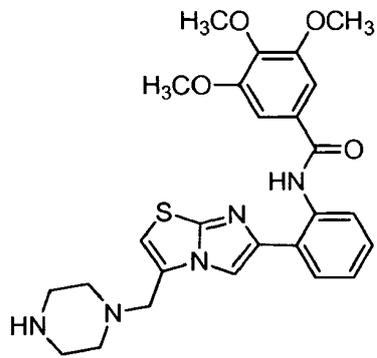
35 o su sal farmacéuticamente aceptable, donde los grupos variables son como se definen en la reivindicación 1, opción A.

25. Un compuesto de fórmula:



o su sal farmacéuticamente aceptable.

26. Un compuesto de fórmula:



5

o su sal farmacéuticamente aceptable.

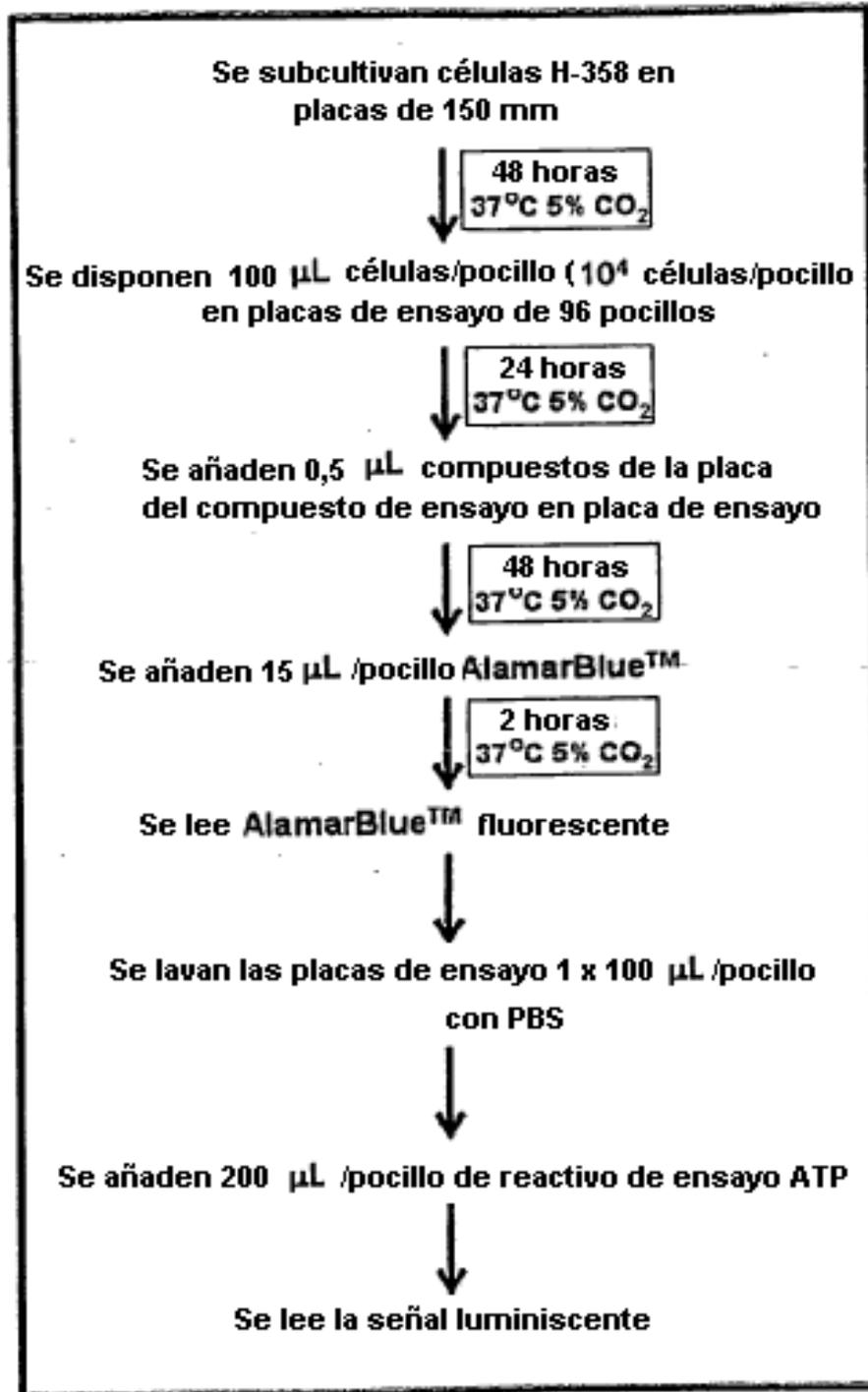


FIG. 1

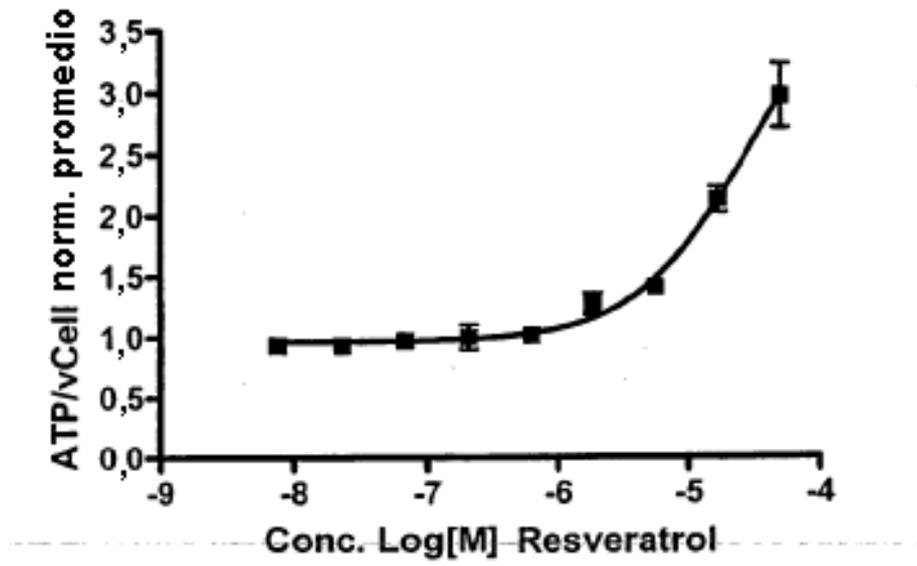


FIG. 2